

**IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER *Plakobranchus*
(GASTROPODA) DARI RAJA AMPAT BERDASARKAN GEN
COI**

SKRIPSI

Oleh
FITRIA EKA APRILIA
105090100111028



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER *Plakobranchus*
(GASTROPODA) DARI RAJA AMPAT BERDASARKAN GEN
COI**

SKRIPSI

HALAMAN I PADA RPENGESAHAN

**D Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi UL**

Oleh:

**FITRIA EKA APRILIA
105090100111028**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER *Plakobranchus* (GASTROPODA) DARI RAJA AMPAT BERDASARKAN GEN COI

FITRIA EKA APRILIA

105090100111028

Telah dipertahankan di depan Majelis Pengaji
pada tanggal 8 Agustus 2014

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Drs. Aris Soewondo, M.Si
NIP 196411221990021001

Mengetahui

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

Rodliyati Azrianingsih, S.Si.,M.Agr.Sc.,PhD
NIP 19700128 199412 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fitria Eka Aprilia
NIM : 105090100111028
Jurusan : Biologi
Penulis tugas Akhir berjudul : Identifikasi Secara Molekuler *Plakobranchus (Gastropoda)* dari Raja Ampat Berdasarkan Gen COI

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Agustus 2014
Yang menyatakan,

(Fitria Eka Aprilia)
NIM. 105090100111028

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 sejauh penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER *Plakobranchus* (GASTROPODA) DARI RAJA AMPAT BERDASARKAN GEN COI

Fitria E.A, Aris Soewondo

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2014

ABSTRAK

Identifikasi mengenai spesies laut sangat penting untuk dilakukan dalam rangka mengembangkan pendeskripsi dan pendataan biodiversitas laut. Beberapa hewan laut memiliki morfologi yang sulit diidentifikasi hanya dengan morfologi saja, misalnya kelompok moluska. *Plakobranchus ocellatus* merupakan kelompok moluska yang dikenal sebagai spesies *cryptic komplek*, terdiri dari kompleks *sibling* spesies yang memiliki variasi warna morfologi yang berbeda. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi secara molekuler *Plakobranchus* UNP 68 dari perairan Raja Ampat berdasarkan gen CO1. Metode yang dilakukan pada penelitian ini antara lain, isolasi DNA, PCR, dan sekruensing. Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa *Plakobranchus* UNP 68 dari Raja Ampat merupakan spesies *Plakobranchus ocellatus* yang memiliki kekerabatan terdekat dengan spesies *Plakobranchus ocellatus* sp.1 “spotless” dari Sulawesi dan Filipina. Jarak genetik *Plakobranchus* UNP 68 dengan spesies *Plakobranchus ocellatus* sp.1 “spotless” dari Sulawesi dan Filipina adalah 1,3%, sedangkan nilai similaritas 98,69%. Berdasarkan nilai jarak genetiknya, *Plakobranchus ocellatus* UNP 68 termasuk variasi intraspesifik dari spesies *Plakobranchus ocellatus*.

Kata kunci: COI, gen, identifikasi dan *Plakobranchus ocellatus*

**MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Plakobranchus*
(GASTROPODA) FROM RAJA AMPAT BASED ON COI
GENE**

Fitria E.A., Aris Soewondo

Biology Departement, Faculty of Science, Brawijaya University

2014

ABSTRACT

This study aimed to identify *Plakobranchus* from Raja Ampat based on mitochondrial gene, Cytochrome cOxidase subunit 1 (COI). The results of the study shows that *Plakobranchus* of Raja Ampat (UNP 68) was closely related to *Plakobranchus ocellatus* sp.1 "spotless" species from Sulawesi and Philippines. Genetic distance *Plakobranchus ocellatus* UNP 68 with *Plakobranchus ocellatus* sp.1 "spotless" from Sulawesi and Philippines is 1.3%, while similarity value is 98.69%. Based on genetic distance value, *Plakobranchus ocellatus* UNP 68 considered as intraspecific genetic variation in species *Plakobranchus ocellatus*.

Keywords : COI, gene, identification, and *Plakobranchus ocellatus*

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. Bapak Drs. Aris Soewondo, M.Si selaku dosen Pembimbing,
2. Bapak Widodo, M.Si., Ph.D., Med.Sc selaku dosen Penguji I, dan Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya,
3. Bapak Muhammin Rifa'i S.Si., Ph.D., Med.Sc selaku dosen Penguji II,
4. Bapak Abdul Hamid A. Toha selaku ketua proyek penelitian Marine Biodiversity Raja Ampat Islands (MB-RAI)
5. Orang tua penulis Bapak Mujiono dan Ibu Zulaika, yang dengan sepenuh hati memberikan dukungan moril maupun spiritual sehingga penulisan tugas akhir ini dapat terselesaikan, serta Adik Diana dan Tia yang selalu memberi semangat,
6. Laboran Lab. Biologi Molekuler dan Seluler, SusiatiM.Biomed
7. Teman-teman penelitian MB-RAI Ninda Sahriyani dan Robitoh Desi Kurniasari,
8. Teman-teman angkatan 2010 dan anggota Lab. Biologi Molekuler dan Seluler, Yonna, Aden, Lutviyatun, Afifi S.Si, Winda, Khoirotul, Lelly, Kikky, dll, serta beberapa pihak yang tidak dapat disebutkan satu per-satu.

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

Malang, Agustus 2014

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan	3
1.4. Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. <i>Plakobranchus</i>	5
2.2. Raja Ampat	9
2.3. Identifikasi Secara Molekuler	9
2.4. Gen Cytochrome c Oxidase I (COI)	11
BAB III METODE PENELITIAN	12
3.1. Waktu dan Tempat.....	12
3.2. Prosedur Kerja	12
3.2.1. Sampel PlakobranchusUNP 68	12
3.2.2. Ekstraksi DNA dari Jaringan	13
3.2.3. Elektroforesis Gel Agarose Hasil Isolasi DNA	14
3.2.4. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	14
3.2.5. Elektroforesis Gel Agarose DNA hasil PCR	15
3.2.6. Sekuensing	15
3.2.7. Analisis Data.....	15
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1. Hasil Isolasi DNA <i>Plakobranchus</i> UNP 68.....	17
4.2. Hasil Amplifikasi DNA <i>Plakobranchus</i> UNP 68	17

4.3. Hasil Sekuensing <i>Plakobranchus</i> UNP 68	18
4.4. Jarak Genetik dan Filogenetik <i>Plakobranchus</i> UNP68..	19
BAB V PENUTUP	24
5.1. Kesimpulan.....	24
5.2. Saran.....	24
DAFTAR PUSTAKA	25



DAFTAR TABEL

Nomor	halaman
1. Penanda molekuler yang umum untuk tingkat spesies (Hajibabei dkk., 2007)	10
2. Jarak genetik (%) dan nilai similaritas (%)antara <i>Plakobranchus</i> dari Raja Ampat (UNP 68) dengan beberapa <i>Plakobranchusocellatus</i> dari lokasi yang berbeda.....	21



DAFTAR GAMBAR

Nomor	halaman
1. Morfologi <i>Plakobranchus ocellatus</i> bagian dorsal...	5
2. Spesies <i>Plakobranchus</i> dengan berbagai variasiwarna morfologi	7
3. <i>Plakobranchus ocellatus</i> dengan parapodia terbuka.....	8
4. Lokasi pengambilan <i>Plakobranchus</i> UNP 68	2
5. <i>Plakobranchus</i> UNP 68.....	3
6. Hasil uji kualitatif isolasi DNA <i>Plakobranchus</i> UNP 68.....	7
7. Hasil uji kualitatif DNA hasil PCR <i>Plakobranchus</i> UNP 68.....	8
8. Pohon filogeni <i>Plakobranchus</i> dari Raja Ampat (UNP 68) dengan beberapa <i>Plakobranchus</i> dari lokasi yang berbeda.....	20

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	halaman
1. Elektroferogram Hasil Sekuensing Gen COI <i>Plakobrancus</i> UNP 68 Arah Forward.....	28
2. Elektroferogram Hasil Sekuensing Gen COI <i>Plakobrancus</i> UNP 68 Arah Reverse	29
3. Sekuens forward <i>Plakobranchus</i> UNP 68.....	30
4. Sekuens reverse <i>Plakobranchus</i> UNP 68.....	31
5. Sekuen Gen COI <i>Plakobrancus</i> UNP 68	32
6. Perhitungan jarak genetik (%).....	33



DAFTAR SINGKATAN

Simbol/singkatan

DNA

bp

TBE

mt-DNA

BL

COI

EtBr

Keterangan

: Deoxyribose Nucleic Acid

: Base pair, satuan panjang DNA & RNA.

: Tris Cl- boric acid- EDTA, buffer yang digunakan dalam pembuatan gel agarose

: Mitokondrial DNA

: Body Length

: Cytochrome c Oxidase I (COI)

: Etidium Bromida



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Raja Ampat adalah gugusan pulau yang terletak di bagian barat pulau Papua. Raja Ampat adalah bagian dari “segitiga karang” (*The Coral Triangle*) yang memiliki keanekaragaman hayati laut tertinggi didunia. Diantara wilayah lain dalam “segitiga karang”, Raja Ampat yang memiliki keragaman hayati laut tertinggi (McKenna dkk., 2002 dan Donnelly dkk., 2001). Selain spesies karang dan ikan karang yang keragamannya tinggi, di Raja Ampat juga terdapat kelompok fauna utama lainnya seperti moluska dan krustasea yang memiliki jumlah spesies yang belum terdeskripsikan atau *cryptic* sangat tinggi dan dengan demikian relatif sedikit yang sudah diketahui sampai tingkat spesies (Veron, 2009).

Identifikasi spesies merupakan titik awal yang penting untuk berbagai penelitian dalam biologi kelautan. Identifikasi dapat dilakukan dengan dua pendekatan, yaitu pendekatan morfologi dan molekuler. Identifikasi secara konvensional pendekatanya berdasarkan karakter fenotipik morfologi yang langsung terlihat. Identifikasi melalui karakter morfologi membutuhkan keahlian yang tinggi dan Menurut Herbert dkk. (2003), identifikasi spesies secara morfologi memiliki beberapa kekurangan. Pertama, baik plastisitas fenotipik maupun variabilitas genetik pada pengenalan spesies melalui karakter dapat menyebabkan salah identifikasi. Kedua, pendekatan identifikasi melalui karakter morfologi mengenyampingkan taksa yang *cryptic*, yang sering dijumpai pada beberapa kelompok organisme. Ketiga, identifikasi menggunakan pendekatan morfologi sering hanya efektif untuk fase hidup dan jenis kelamin tertentu saja. Keempat, penggunaan kunci-kunci untuk identifikasi sering membutuhkan keahlian yang tinggi karena sering terjadi salah menentukan jenis taksa. Dikarenakan beberapa keterbatasan tersebut identifikasi spesies melalui pendekatan morfologi untuk spesies *cryptic*, kelompok organisme yang memiliki taksonomi yang sulit, atau secara taksonomi ambigu pada telur dan larva tidak teridentifikasi (Carvalho dkk., 2010).

Adanya keterbatasan tersebut maka diperlukan pendekatan baru dalam mengidentifikasi taksa. Identifikasi molekuler, dimana

identifikasi didasarkan pada segmen kecil dari genom. Pendekatan ini juga dapat digunakan pada kelompok organisme yang memiliki sedikit karakter morfologi yang dapat dipelajari, misalnya virus, bakteri, dan protista (Herbert dkk., 2003, Hajibabaei dkk., 2007).

Genom mitokondria adalah penanda yang paling baik untuk DNA *barcoding* daripada genom nuklear karena beberapa alasan, yaitu tidak adanya intron, karena diturunkan secara maternal sehingga kecil kemungkinan terjadinya rekombinasi, dan frekuensi terjadinya insersi dan delesi rendah sehingga pencepatan sekuen dari spesies yang berbeda lebih mudah karena celah (*barcode gap*) tidak terlalu jauh. Gen *Cytochrome c Oxidase I* (COI) dari genom mitokondria DNA (mtDNA) merupakan gen yang sering digunakan sebagai DNA *barcode* untuk identifikasi hewan (Chauhan & Varma, 2009). Gen COI memiliki dua keunggulan. Pertama, primer universal dari gen ini sangat kokoh, sehingga mampu mengenali ujung 5' dari sebagian besar kelompok hewan. Kedua, gen COI memiliki evolusi molekuler yang paling besar dibandingkan dengan gen-gen di mitokondria yang lain (Hajibabaei dkk., 2006).

Gen COI telah berhasil diaplikasikan untuk identifikasi Annelida, Chordata, Echinodermata, Nematoda, Platyhelminthes, Arthropoda, dan Mollusca sampai tingkat spesies. Analisis menggunakan Gen COI sebagai *barcode* juga dapat mengidentifikasi dengan benar pada 200 spesies Lepidoptera yang berkerabat dekat. Gen COI juga telah berhasil digunakan dalam beberapa penelitian sebagai *barcode* gastropoda (Herbert dkk., 2003).

DNA *barcoding* dapat mengimbangi keterbatasan dari identifikasi konvensional, menghasilkan identifikasi yang kuat dan tidak ambigu tidak hanya pada individu utuh tapi juga pada telur, larva dan fragmen tubuh. Pendekatan tersebut menggunakan strategi berdasarkan identifikasi secara molekuler pada analisis homologi *gene region* tertentu (misalnya, COI, 16S, 18S, dan ITS) untuk membedakan antar spesies (Hajibabaei, 2007; Carvalho dkk., 2010).

Beberapa hewan laut memiliki morfologi yang sulit diidentifikasi hanya dengan morfologi saja, misalnya kelompok moluska yang anggotanya sebagian besar adalah kelompok spesies *cryptic*. Karakter morfologi masih gagal dalam memberi batas pada spesies *cryptic*. Salah satu moluska yang dikenal sebagai spesies

cryptic adalah *Plakobranchus ocellatus* (Trowbridge dkk., 2011 dan Krug dkk., 2013).

Plakobranchus ocellatus adalah siput laut tidak bercangkang, pertama kali dideskripsikan oleh Van Hasselt pada tahun 1824. *P. ocellatus* dikenal sebagai species *cryptickomplek*, dan tersebar luas di daerah intertidal dangkal di wilayah Indo-Pasifik, dengan berbagai variasi warna atau pola di lokasi yang berbeda sepanjang Indo-Pasifik (Jensen, 2007; Wagele, 2011). Terdapat 10 variasi genetik yang berbeda *P. ocellatus* dari perairan Indo-Pasifik dengan berbagai variasi warna morfologi. Diversitas morfologi yang ada pada spesies *Plakobranchus ocellatus* ini kurang efektif jika diidentifikasi melalui pendekatan taksonomi secara konvesional, karena identifikasi melalui pendekatan konvensional berdasarkan karakter fenotipik yang tampak mengenyampingkan spesies yang *cryptic*. Spesies *P. ocellatus* dapat dikenali oleh tidak adanya cangkang, simetri bilateral, rhinophore lateral dan ocelli yang meliputi seluruh tubuhnya. Pengetahuan mengenai perkembangan larva, perilaku, dan sumber makanan dari *P. ocellatus* masih sedikit. Bahkan taksonominya belum terklarifikasi dan monotypic dari spesies ini masih dipertanyakan oleh peneliti saat ini (Rudman, 1998).

Identifikasi mengenai spesies laut sangat penting untuk dilakukan dalam rangka mengembangkan pendeskripsi dan pendaftaran biodiversitas laut. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Marine Biodiversity of Raja Ampat Islands (MB-RAI). Dari beberapa invertebrata yang dikoleksi dari Raja Ampat, peneliti mengidentifikasi *Plakobranchus*, karena belum teridentifikasi sampai tingkat spesies.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka rumusan masalah yang diangkat dalam penelitian ini yaitu, berdasarkan gen COI termasuk dalam jenisapa *Plakobranchus* UNP 68 tersebut?

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu melakukan identifikasi secara molekuler *Plakobranchus* UNP 68 dari perairan Raja Ampat berdasarkan gen CO1.

1.4. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai dasar informasi mengenai takson *Plakobranchus*, menambah informasi diversitas siput laut *Plakobranchus* dan invertebrata laut Raja Ampat.

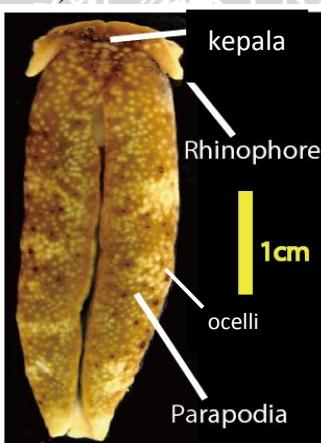


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Plakobranchus*

Plakobranchus merupakan siput laut tidak bercangkang yang termasuk dalam Ordo Sacoglossa (Jensen, 1997). Genus *Plakobranchushanya* memiliki satu spesies, yaitu *Plakobranchus ocellatus*. *Plakobranchus* memiliki ciri umum yaitu terdapat rhinophore lateral, tubuh pipih dan ditutupi lipatan parapodia. Tubuhnya umumnya berwarna krem dan dilapisi ocelli. Warna ocelli bermacam-macam begitu juga warna ujung rhinophore dan ujung posteriornya (Low, 2011). Hewan ini umumnya menghuni terumbu karang perairan laut dangkal dan berkamuflase dengan baik di pasir karang (Maeda dkk., 2012).



Gambar 2.1. Morfologi *Plakobranchusocellatus*bagian dorsal (Maeda dkk., 2012).

Plakobranchus ocellatus van Hasselt, 1824 telah lama dipelajari mengenai kemampuannya mempertahankan kloroplas dari alga yang telah dimakannya tetap fungsional selama beberapa minggu atau bulan setelah konsumsi, dan menjadi model untuk studi endosimbiosis (Maeda dkk., 2012 dan Handeler dkk., 2009). Seperti pada Gambar 2.3, hewan ini menyimpan sejumlah besar kloroplas di

lipatan parapodialnya, sehingga memungkinkan untuk berfotosintesis dan menyediakan nutrisi bagi hewan ini (Handeler dkk., 2009).

Plakobranchus ocellatus dikenal sebagai spesies *cryptic* kompleks, yang terdiri dari sekelompok spesies *sibling* yang memiliki variasi warna morfologi yang berbeda (Trowbridge dkk., 2011, Handeler dkk., 2006, dan Krug dkk., 2013). Diversitas morfologi yang ada pada spesies *Plakobranchus ocellatus* ini kurang efektif jika diidentifikasi melalui pendekatan taksonomi secara konvesional, karena identifikasi melalui pendekatan konvensional berdasarkan karakter fenotipik yang tampak mengenyampingkan spesies yang *cryptic*. *Plakobranchus ocellatus* terdiri lima morfologi warna yang berbeda, yaitu putih, biru, ungu, hitam dan *spotless* (Gambar 2.2) yang tercatat dari Jepang (Takano dkk., 2013).

Plakobranchus ocellatus dianggap *monotypic* dengan distribusi yang luas dari Jepang, Great Barrier Reef Australia, Filipina, Vietnam, Malaysia, Hawaii dan Bali (Rudman 1998; Jensen, 2007; Handeler dkk. 2009; Maeda dkk. 2010; Trowbridge dkk. 2011; Christa dkk., 2012). Spesies *Plakobranchus* memiliki larva planktotrophic, yaitu mampu menyebar jarak jauh, hal ini yang mungkin menjelaskan kesamaan genetik spesies yang sama yang dipisahkan jarak lebih dari 6000 km (Krug dkk., 2013). Meskipun variasi dalam morfologi dan warna pola yang jelas antara spesimen dari asal yang berbeda (Gambar 2.2), belum ada spesies yang telah dijelaskan lebih lanjut sejauh ini.



Gambar 2.2. Spesies *Plakobranchus* dengan berbagai variasi warna morfologi. A, *Plakobranchus ocellatus* (ungu) (BL: 31 mm). B, *P. ocellatus* (putih) (BL: 32 mm). C, *P. ocellatus* (biru) (BL: 26 mm). D, *P. ocellatus* (hitam) (BL: 30 mm). E, *P. ocellatus* (spotless) (BL: 1,5-2cm) (Christa dkk., 2012 dan Takano dkk., 2013).



Gambar 2.3 *Plakobranchus ocellatus* dengan parapodia terbuka. Parapodia dibuka untuk menunjukkan tonjolan-tonjolan yang merupakan adaptasi morfologi khusus untuk menyimpan kloroplas (Christa dkk., 2013).

Klasifikasi *Plakobranchus* menurut Marine species (2013) adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Animalia
Filum	:	Mollusca
Kelas	:	Gastropoda
Subkelas	:	Heterobranchia
Infrakelas	:	Opistobranchia
Ordo	:	Sacoglossa
Subordo	:	Plakobranchacea
Superfamili	:	Plakobranchoidea
Famili	:	Plakobranchidae
Genus	:	<i>Plakobranchus</i>

P. ocellatus dapat ditemukan terdistribusi secara luas di seluruh daerah tropis perairan Indo-Pasifik dan rentang suhu 23°C hingga 29°C. Relatif melimpah di daerah tropis, dan semakin ke arah kutub populasi mengalami penurunan (Jensen, 2007).

2.2. Raja Ampat

Raja Ampat adalah gugusan pulau yang terletak di $0^{\circ}20' \text{ LU}$ dan $2^{\circ}15' \text{ LS}$ dan $129^{\circ}35' \text{ BT}$ dan $131^{\circ}20' \text{ BT}$ bagian barat pulau Papua. Raja Ampat adalah kepulauan, terdapat beberapa pulau besar, yaitu Waigeo, Batanta, Salawati dan Misool serta ratusan pula-pulau kecil di sekitarnya (McKenna dkk., 2002). Terdiri dari 1500 pulau yang melingkupi luas lebih dari 40.000 km^2 daratan dan lautan. Raja Ampat terpisah dari Sorong dan menjadi kabupaten sendiri pada tahun 2003 dengan ibu kota kabupaten Waisai yang terletak di pulau yang paling besar, Waigeo (Jeffreys, 2010).

Raja Ampat adalah bagian dari Papuan Bird's Head Seascape (BHS) dan "segitiga karang" (*The Coral Triangle*). Segitiga karang ini merupakan kawasan yang mendukung kehidupan keanekaragaman hayati laut terkaya di dunia (McKenna dkk., 2002 dan Donnelly dkk., 2003). Dibandingkan dengan wilayah segitiga karang lainnya (Papua New Guinea, Filippina, Malaysia, Jepang dan Australia) keragaman karang tertinggi di "segitiga karang" adalah di Raja Ampat, dengan 553 spesies yang teridentifikasi dan dianggap sebagai pusat global keanekaragaman hayati tropis perairan laut dangkal (Mangubhai dkk., 2012).

2.3. Identifikasi Secara Molekuler

Identifikasi secara molekuler adalah metode identifikasi spesies berdasarkan analisis homologi *gene region* tertentu sebagai barcode (misalnya, COI, 16S, 18S, dan ITS) untuk membedakan spesies. Metode ini disebut juga DNA *barcoding* (Hajibabaei, 2007; Carvalho dkk., 2010). DNA *barcoding* bertujuan memberikan metode yang efisien untuk mengidentifikasi spesies (Chauhan & Varma, 2009). DNA *barcoding* berdasarkan anggapan bahwa sekuen terstandardisasi dapat membedakan individu-individu spesies karena variasi genetik interspesies melampaui intraspesies (Herbert, 2002 dalam Nielsen & Matz, 2006; Chauhan & Varma, 2009). Berbagai gen *region* digunakan identifikasi sampai tingkat spesies seperti pada tabel 1.

Berikutini adalah tabel penanda molekuler yang digunakan untuk DNA *barcoding*.

Tabel 2.1 Penanda molekuler yang umum untuk tingkat spesies (Hajibabei dkk., 2007)

Gen	Lokasi Genom	Jumlah sekuen			
		Animalia	Plantae	Fungi	Protista
COI	Mitokondria	195777	520	410	1931
16S-rDNA	Mitokondria	41381	221	285	2059
Cyt-b	Mitokondria	88324	165	1084	1920
ITS1-rDNA	Nukleus	12175	57693	56675	68839
ITS2-rDNA	Nukleus	13923	58065	56349	67332
18S-rDNA	Nukleus	21062	17121	3327	32290
rbcl	Plastida	-	30663	-	37328

Prinsip dasar DNA *barcoding* sederhananya itu DNA diekstraksi dari spesimen, diampifikasi dan disekuensi. Gen yang digunakan sebagai label atau *barcode* adalah yang hampir identik di antara individu berbeda antar spesies, dan berfungsi sebagai label identifikasi spesies ("DNA barcode"). Sekuen dari gen specimen kemudian dicocokan dengan sekuen yang diperoleh dari database sekuen spesies yang telah diketahui, sehingga dapat ditentukan afiliais dari spesimen (Nielsen & Matz, 2006). Spesiester identifikasi jika sekuen cocok dengan salah satu database. Jika tidak, *new record* dapat mengarah pada sekuen *barcode* baru (yaitu haplotipe baru atau variante geografis), atau dapat menunjukkan spesies baru. Meskipun perannya dalam mengidentifikasi spesimen ke tingkat spesies merupakan alat bantu penting untuk alur kerja taksonomi, *barcoding* bukan pengganti untuk analisis taksonomi yang komprehensif. Sebagai contoh, ketika sebuah spesimen diketahui tidak terdapat kecocokan dengan data yang ada di database *barcode*, maka *barcode* tidak memenuhi syarat

untuk penunjukan spesimen sebagai spesies baru. Sebaliknya, spesimen tersebut ditandai untuk analisis taksonomi menyeluruh, berdasarkan data morfologi, molekuler, biogeografi, tingkah laku, perkembangan, dan ekologi (Hajibabaei, 2007 dan Jorger & Schrodil, 2013).

Ada beberapa cara agar barcode dapat ‘dibaca’, misalnya dengan *statistical multivariate*, membuat pohon filogenetik, atau dengan *diagnostic Single Nucleotide polymorphism* (SNPs) (Zimmer & Roalson, 2005).

2.4. Gen Cytochrome c Oxidase I (COI)

Gen COI adalah gen standar dari genom mitokondria yang sering digunakan sebagai gen pendanda pada identifikasi hewan (Herbert dkk, 2003). Gen COI memiliki dua keunggulan. Pertama, primer universal dari gen ini sangat kokoh, sehingga mampu mengenali ujung 5’ dari sebagian besar kelompok hewan. Kedua, gen COI memiliki evolusi molekuler yang paling tinggi dibandingkan dengan gen-gen di mitokondria yang lain, sehingga memiliki variasi intraspesifik rendah, tetapi interspesifik divergensinya tinggi antara taksa yang berdekatan.

Gen COI telah berhasil diaplikasikan untuk identifikasi Annelida, Chordata, Echinodermata, Nematoda, Platyhelminthes, Arthropoda, dan Mollusca sampai tingkat spesies. Analisis menggunakan Gen COI sebagai *barcode* juga dapat mengidentifikasi dengan benar pada 200 spesies Lepidoptera yang berkerabat dekat. Kekuatan sebenarnya dari barcode DNA terletak pada kemampuan menggunakan lokus yang sama untuk mengklasifikasikan semua spesies (Nielsen & Matz, 2006 dan Feng dkk., 2011). Gen COI juga telah berhasil digunakan dalam beberapa penelitian sebagai *barcode* gastropoda (Herbert dkk., 2003).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanaan pada bulan Desember 2013 - Juni 2014. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

3.2. Prosedur Kerja

3.2.1.Sampel *Plakobranchus*UNP 68

Spesimen *Plakobranchus* diambil pada tanggal 13 Mei 2013 di Mios con, Waigeo, Raja Ampat (S 00d 20.851', T 130d 43.624' , kedalaman 30-40 kaki, dan salinitas 31 ppt). Spesimen yang digunakan pada penelitian ini hanya satu dengan kode UNP 68.



Gambar 3.1. Lokasi pengambilan *Plakobranchus* UNP 68. Tanda bulat merah menunjukkan lokasi pengambilan *Plakobranchus* UNP 68, sedangkan wilayah Kepulauan Raja Ampat diarsir dengan warna merah muda.

Berikut ini adalah gambar spesimen *Plakobranchus* UNP 68:



Gambar 3.2. *Plakobranchus* UNP 68

3.2.2. Ekstraksi DNA dari Jaringan

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

1. Pemisahan jaringan

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

2. Pelisisan sel

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

3. DNA binding

Ditambahkan 200 µl etanol absolut dan segera dimix dengan cara dibolak-balik. Dipindahkan semua campuran ke GD Column dalam 2 ml Collection Tube. Disentrifugasi 10000

rpm selama 1 menit. Dipindah GD Column ke Collection Tube baru. Collection Tube yang berisi presipitat dibuang

4. Washing

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

5. Elusi

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

3.2.3.Elektroforesis Gel Agarose Hasil Isolasi DNA

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

3.2.4.PCR (Polymerase Chain Reaction)

DNA yang telah diisolasi diamplifikasi fragmen gen mitokondria CO1 menggunakan primer LCO1490 Forward (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') dan HCO2198Reverse (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'). Campuran

untuk PCR yang digunakan yaitu ddH₂O 12µl, pcr mix kapa Taq Extra HotStart ReadyMix PCR kit (1,25 U per 50µl reaksi DNA polimerase, KAPA Taq Extra buffer (1X), dNTPs (masing-masing dNTP 0,3 mM (1X)), MgCl₂ (2 mM 1X) dan stabiliser), 1 µl masing-masing primer (10 µM), dan 1 µl DNA template. Program PCR : *hot start* 95°C selama 3 menit, *denaturation* 95°C selama 30 detik, *annealing* 50°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 1 menit(30 siklus), dan *post extension* 72°C selama 1 menit. Sampel hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C.

3.2.5.Elektroforesis Gel Agarose DNA hasil PCR

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

3.2.6.Sekuensing

Produk PCR dikirim ke FirstBase, Malaysia untuk diskuensiing. Sekuensiing dengan primer yang sama untuk identifikasi target gen COI.

3.2.7.Analisis Data

Sekuen forward dan reverse yang diperoleh diedit dengan software Bioedit 7.0.9. Kemudian sekuen disejajarkan dengan software Blast di NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Berdasarkan hasil Blast diunduh beberapa sekuen *Plakobranchus ocellatus* dari NCBI (Tabel 4.1). Penelitian ini menggunakan satu sekuen dari

spesies lain yang masih satu famili sebagai *outgroup*, yaitu *Thuridilla lineolata*. Hasil sekuening disejajarkan dengan sekuen yang diperoleh dari GeneBank (NCBI). Setelah disejajarkan, kemudian ujung sekuen dipotong untuk menyamakan panjang sekuen. Setelah itu dilakukan perhitungan jarak genetik dengan menggunakan software Mega 5.1. Setelah diketahui jarak genetiknya kemudian dihitung similaritasnya dengan rumus :

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

Dibuat pohon filogenetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara spesies satu dan spesies lainnya berdasarkan gen COI menggunakan Neighbour Joining (NJ) dengan metode estimasi jarak kimura 2-parameter (*Bootstrap 1000*) pada software Mega 5.1.

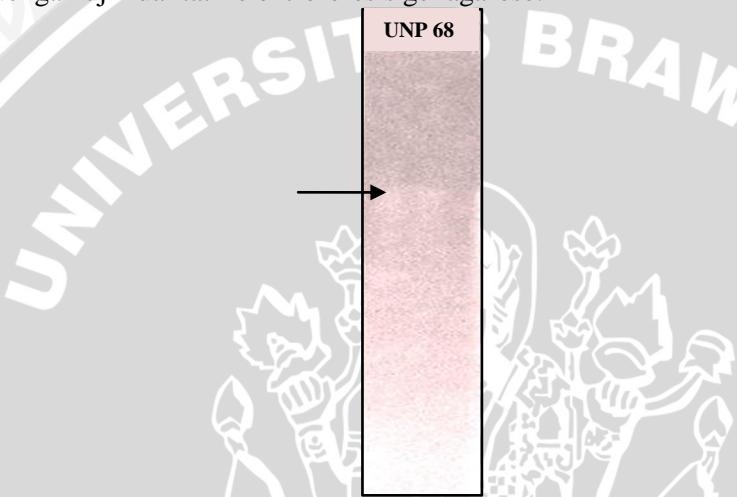


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Isolasi DNA *Plakobranchus* UNP 68

DNA diisolasi dari jaringan *Plakobranchus* menggunakan Gsync DNA Extraction Kit (Geneaid). Hasil isolasi DNA dilihat keberhasilannya dengan uji kualitatif elektroforesis gel agarose.



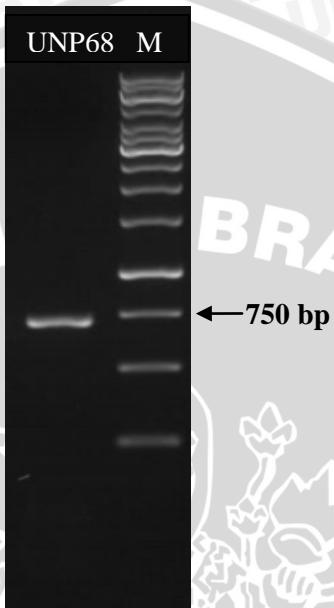
Gambar 4.1 Hasil uji kualitatif isolasi DNA *Plakobranchus*UNP 68

Berdasarkan hasil uji kualitatif isolasi DNA, DNA berhasil diisolasi, ditandai dengan terdapat pita pada gel agarose (ditunjuk oleh tanda panah).

4.2. Hasil Amplifikasi DNA *Plakobranchus*UNP 68

Fragmen gen COI diampifikasi dari DNA *Plakobranchus* menggunakan primer LCO-1490 dan HCO-2198 (Folmer dkk., 1994). Digunakan fragmen gen COI untuk mengidentifikasi *Plakobranchus*, karena COI sebagai penanda molekuler yang paling baik untuk identifikasi spesies dan identifikasi *Plakobranchus* saat ini sering menggunakan COI. Gen COI memiliki tingkat evolusi yang tinggi, sehingga dapat membedakan spesies dengan hubungan kekerabatan dekat sekalipun. Tingginya tingkat evolusi COI ini menghasilkan

sekuen hampir identik antara individu pada berbeda antar spesies (Herbert dkk., 2003).



Gambar 4.2 Hasil uji kualitatif DNA hasil PCR *Plakobranchus*UNP 68.
UNP 68 : *Plakobranchus* dari Raja Ampat; M : Marker.

Fragmen gen COI *Plakobranchus* berhasil teramplifikasi dengan panjang amplikon sekitar 680 bp, ditunjukkan dengan profil pita DNA pada sumuran UNP 68.

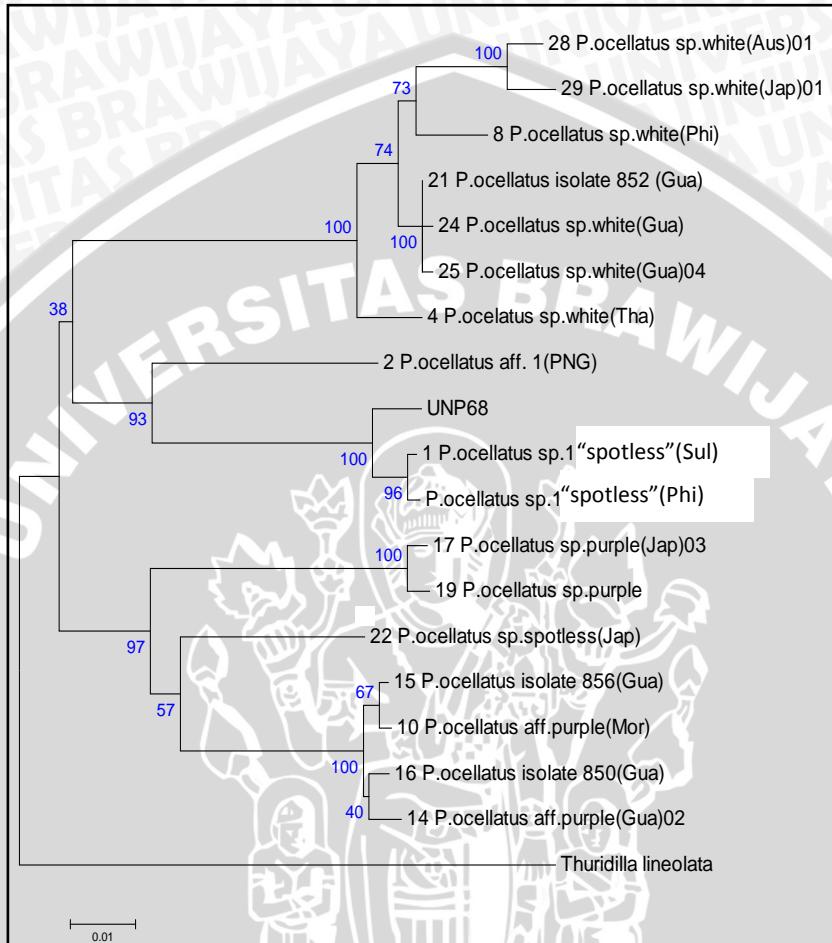
4.3. Hasil Sekuensing *Plakobranchus*UNP 68

Hasil sekruensing gen COI *Plakobranchus* berupa *peaks* yang diterjemahkan menjadi basa-basa nukleotida. Sekruensing yang didapatkan berupa urutan nukleotida yang diblok dengan tiga macam warna yang berbeda, yaitu ada yang diblok warna merah, kuning, dan biru. Warna merah menunjukkan keakuratan pembacaan nukleotida yang rendah, warna kuning menunjukkan pembacaan nukleotida pada level medium, sedangkan warna biru menunjukkan pembacaan nukleotida yang akurasi paling tinggi, atau dengan kata lain, nukleotida yang dibaca oleh mesin sekruenser 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 dan muncul *peak* tunggal (Lampiran 1, 2 ,3 dan 4).

4.4. Jarak Genetik dan Filogenetik *Plakobranchus*

Sekuen COI *Plakobranchus* UNP 68 yang didapat dari hasil sekuensing, disejajarkan dengan sekuen *Plakobranchus* lainnya yang diunduh dari Genebank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) sebanyak 17 sekuen. Pemilihan 17 sekuen ini bukan hanya karena nilai similaritasnya tertinggi tapi juga mewakili *Plakobranchus* dari beberapa lokasi di dunia yang telah diidentifikasi menggunakan fragmen gen COI. Setelah disejajarkan, ujung sekuen dipotong untuk menyamakan panjang sekuen, karena sekuen yang didapat lebih panjang dari sekuen literatur yang didapat. Panjang fragmen gen COI yang diapakai yaitu 622 bp pada masing-masing sekuen. Digunakan spesies *Thuridilla lineolata* sebagai spesies *outgroup* untuk membuat pohon filogeni kali ini. *Thuridilla lineolata* merupakan spesies siput laut yang satu famili dengan *P. ocellatus*.



Gambar 4.4 Pohon filogeni *Plakobranchus ocellatus* Raja Ampat (UNP 68) dengan beberapa *P.oceallatus* dari lokasi yang berbeda. Pohon filogeni berdasarkan analisis Neighbour Joining dengan metode estimasi jarak Kimura 2-Parameter (*Boostrap* 1000) pada data sekuen gen COI *Plakobranchus ocellatus* Raja Ampat (UNP 68) dengan beberapa *P.oceallatus* dari lokasi yang berbeda, yaitu Jepang (Jap), Australia (Au), Papua New Guinea (PNG), Philippine (Phi), Sulawesi (Sul), Moorea (Mor)

dan Guam (Gua). *Thuridilla lineolata* digunakan sebagai *outgroup*.

Tabel 4.1 Jarak genetik (%) dan nilai similaritas (%) antara *Plakobranchus* dari Raja Ampat (UNP 68) dengan beberapa *Plakobranchus ocellatus* dari lokasi yang berbeda. Jarak genetik berdasarkan metode estimasi jarak Kimura 2-Parameter (Bootstrap 1000) pada data sekuen gen COI *Plakobranchus* Raja Ampat (UNP 68), Jepang (Jap), Australia (Au), Papua New Guinea (Gui), Philippine (Phi), Sulawesi (Sul), Moorea (Mor) dan Guam.

Spesies	<i>Plakobranchus</i> UNP 68	Jarak Genetik (%)	Similaritas (%)
P.ocellatus sp.1 "spotless" (Phi)(KC573733)	1,5	98,53	
1.P.ocellatus sp.1 "spotless" (Sul)(KC573732)	1,5	98,53	
2 P.ocellatus aff. 1(PNG) (KC573734)	7,7	92,32	
4 P.ocellatus sp.white(Tha) (KC573723)	11,3	88,73	
15 P.ocellatus isolate 856(Gua) (HM187635)	11,9	88,10	
10 P.ocellatus aff.purple(Mor) (KC573729)	11,9	88,10	
16 P.ocellatus isolate 850(Gua) (HM187633)	11,9	88,10	
14 P.ocellatus aff.purple(Gua)02 (KC573730)	12,1	87,90	
17 P.ocellatus sp.purple(Jap)03 (KC573727)	12,1	87,93	
19 P.ocellatus sp.purple (AB758969)	12,1	87,93	
22 P.ocellatus sp.spotless(Jap) (KC573731)	12,3	87,73	
8 P.ocellatus sp.white(Phi) (KC573720)	12,6	87,38	
21 P.ocellatus isolate 852 (Gua) (HM187634)	12,5	87,53	
24 P.ocellatus sp.white(Gua) (KC573722)	12,7	87,33	
25 P.ocellatus sp.white(Gua)04 (KC573721)	12,7	87,33	
28 P.ocellatus sp.white(Aus)01 (KC573725)	14,0	86,02	
29 P.ocellatus sp.white(Jap)01 (KC5737191)	14,6	85,43	
<i>Thuridilla lineolata</i>	15,6	84,39	

Analisis filogeni berdasarkan fragmen gen COI menunjukkan bahwa *Plakobranchus* UNP 68 satu *clade* dengan *P.ocellatus* dari Sulawesi dan Filipina didukung dengan nilai *Bootstrap* yang tinggi. Berdasarkan perhitungan jarak genetik menggunakan metode Kimura 2-parameter didapatkan hasil bahwa *Plakobranchus* dari Raja Ampat

(UNP 68) merupakan spesies *Plakobranchus ocellatus* yang memiliki kekerabatan terdekat dengan spesies *Plakobranchus ocellatus* sp.1 “spotless” dari Sulawesi dan Filipina. Jarak genetik dan nilai similaritas *Plakobranchus ocellatus* UNP 68 dengan spesies *Plakobranchus ocellatus* sp.1 “spotless” dari Sulawesi dan Filipina masing-masing adalah 1,5% dan 98,53% dengan standart error sebesar 0,5%. Menurut Christa dkk. (2012) jika jarak genetik <3% dianggap mewakili variasi intraspesifik. Berdasarkan penelitian Krug dkk. (2013), *Plakobranchus* dari Sulawesi dan Filipina (dengan kode akses GeneBank seperti pada tabel 4.1) merupakan *Plakobranchus ocelatus* sp.1 “spotless”. Ciri-ciri morfologi *Plakobranchus ocelatus* sp.1 “spotless”, yaitu memiliki beberapa ocelli gelap di dalam cincin atau ocelli pada parapodia berpigmen seragam (Krug dkk., 2013). Berdasarkan gambar spesimen (Gambar 3.1), *Plakobranchus ocellatus* UNP 68 dari Raja Ampat memiliki ocelli dorsal yang berpigmen seragam, sesuai dengan ciri-ciri *Plakobranchus ocellatus* “spotless”.

Jarak genetik *Plakobranchus ocellatus* dari Raja Ampat dengan spesies *Plakobranchus ocellatus* lain, dari Jepang, Guam, Papua New Guinea, Australia, Moorea dan Thailand adalah <15%, yaitu 7,7-14,6%, sedangkan nilai similaritasnya >85%. Jarak genetik *Plakobranchus ocellatus* UNP 68 dengan *outgroup Thuridilla lineolata* adalah 15,6% (Tabel 4.1). Dalam gen COI, jarak lebih dari 10% adalah dianggap sebagai nilai yang wajar untuk mencirikan spesies yang berbeda dan jarak kurang dari 3% dianggap mewakili variabilitas intraspesifik (Christa dkk., 2012). Pada penelitian kali ini jarak terjauh adalah 13,04% (Tabel 4.1). Hal ini mendukung penelitian sebelumnya bahwa *Plakobranchus* adalah spesies *cryptickomplek* (Jensen, 2007; Wagele, 2011; Christa dkk., 2012 dan Krug dkk., 2013).

Penelitian Krug dkk. (2013), menunjukkan bahwa *Plakobranchus ocellatus* terdiri dari 10 variasi genetik yang berbeda. Sepuluh genetik yang berbeda merepresentasikan variasi morfologi yang berbeda juga, antara lain *purple*, *aff. purple*, *white*, *black*, *blue*, *spotless*, sp.1 *spotless*, *aff. sp1spotless*, sp.2 *spotless*, dan sp.3 *spotless*. *Plakobranchus “white”* memiliki persebaran paling luas yaitu Australia, Guam, Jepang, Filipina dan Thailand. Spesimen ini memiliki ciri, yaitu terdapat satu baris cincin hitam besar, ocelli

orange sepanjang garis tepi tubuh dan ocelli gelap dikelilingi warna putih pada permukaan ventral pada kaki. *Plakobrancus* "black" untuk saat ini hanya dijumpai di jepang, cirinya yaitu mirip dengan yang spesimen putih, tapi memiliki ocelli yang lebih besar pada kaki. Spesimen "purple" tidak memiliki ocelli pada parapodia, pada kaki terdapat bintik-bintik ungu samar dengan tengahnya berwarna gelap, dan ungu pada *margin* tubuh dan rhinophores. Spesimen "spotless" memiliki beberapa ocelli gelap di dalam cincin atau ocelli pada parapodia berpigmen seragam. Spesimen "blue" pada bagian parapodia dan kepalanya terdapat ocelli gelap dengan orange terang di tengahnya, dan terdapat bintik-bintik orange kecil di kaki.



BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan *Plakobranchus* dari Raja Ampat (UNP 68) merupakan spesies *Plakobranchus ocellatus* yang memiliki kekerabatan terdekat dengan spesies *Plakobranchus ocellatus* (*spotless*) dari Sulawesi dan Filipina. Ciri-ciri morfologi *Plakobranchus ocelatus* sp.1 “*spotless*”, yaitu memiliki beberapa ocelli gelap di dalam cincin atau ocelli pada parapodia berpigmen seragam. *Plakobranchus ocellatus* UNP 68 termasuk variasi intraspesifik dari spesies *Plakobranchus ocellatus*.

5.2. Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian selanjutnya yaitu agar ciri-ciri morfologi spesimen ini juga dipelajari sehingga dapat dibandingkan ciri-cirinya dengan spesies yang lain.

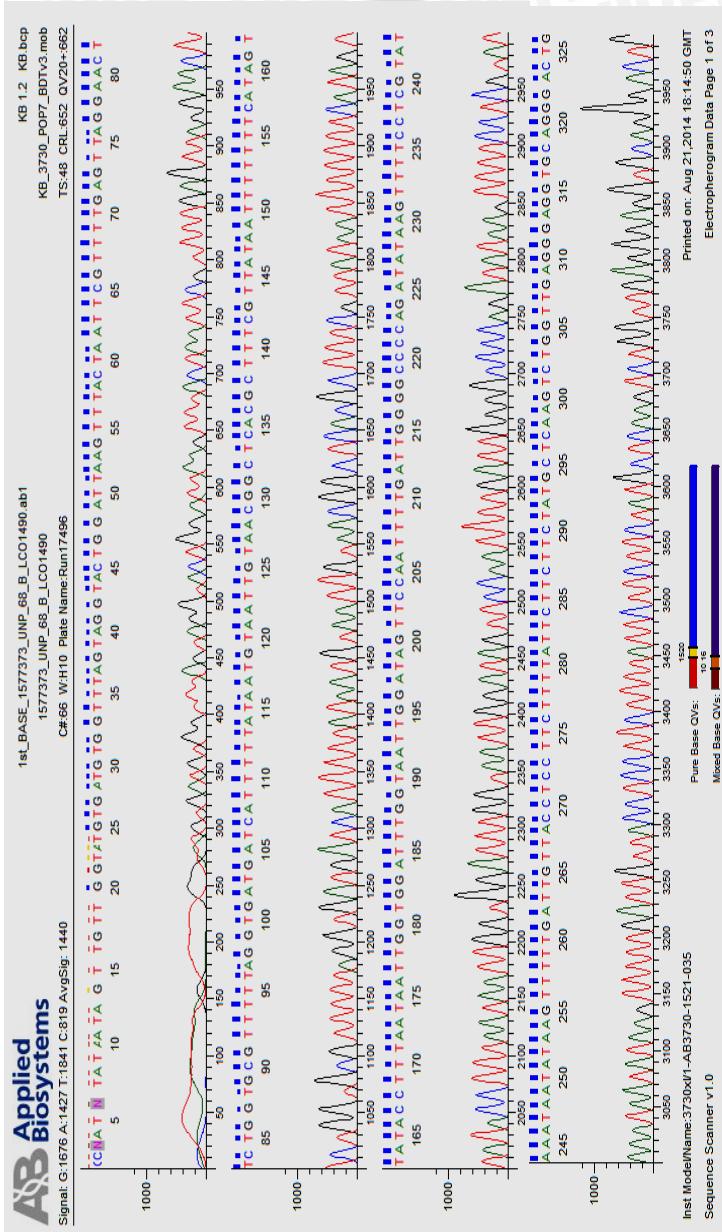
DAFTAR PUSTAKA

- Chauhan, A.K., & A. Varma. 2009. **A textbook of molecular biotechnology.** I. K. International. New Delhi.
- Carvalho, G. R., S. Creer, M.J. Allen, F.O. Costa, C.S. Tsigenopoulos, M. Le Goff-Vitry, A. Magoulas, L. Medlin, & K. Metfies. 2010. Genomics in the Discovery and monitoring of Marine Biodiversity dalam J. M. Cock, K. Tessmar-Raible, C. Boyen dan F. Viard (Ed). **Introduction to marine genomics.Advances in marine genomicsI.** Springer. New York.
- Christa, G., L. Wescott, T.F. Schaberle, G.M. Konig, & H. Wagele. 2012. What remains after 2 months of starvation? Analysis of sequestered algae in a photosynthetic slug, *Plakobranchus ocellatus* (Sacoglossa, Opisthobranchia), by barcoding. *Planta*.
- Christa, G.L., V. Zimorski, C. Woehle, A.G.M. Tielens, H. Wagele, W.F. Martin, & S. B. Gould. 2013. Plastid-bearing sea slugs fix CO₂ in the light but do not require photosynthesis to survive. *Proc. R. Soc. B* 281: 20132493.
- Donnelly, R., D. Neville, & P.J. Mous. 2003. Report on a rapid ecological assessment of the Raja Ampat Islands, Papua, Eastern Indonesia held October 30 – November 22, 2002. *The Nature Conservancy, Bali*.
- Feng, Y., Q. Li, & L.K.X. Zheng. 2011. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COI and 16S rRNA genes. *Mol Biol Rep* (2011) 38:291–299
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, & R. Vrijenhoek. 1998. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*(1994) 3(5), 294-299
- Händeler, K., & H. Wägele. 2006. Preliminary study on molecular phylogeny of Sacoglossa and a compilation of their food organisms. *Bonner zoologische Beiträge* 55 (2006)
- Händeler, K., Y. P Grzymbowski, P. J. Krug & H. Wägele. 2009. Functional chloroplasts in metazoan cells - a unique

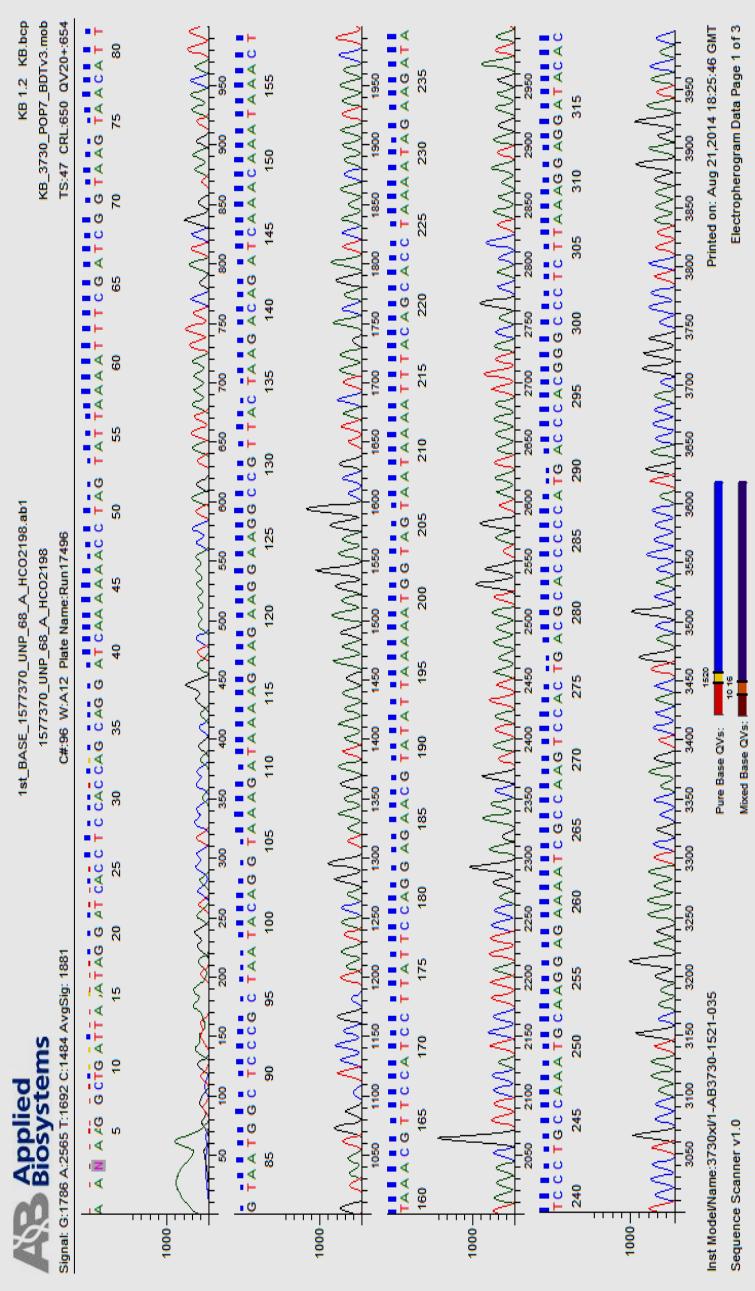
- evolutionary strategy in animal life. *Frontiers in Zoology* 2009, 6 :28.
- Hajibabaei, M., M.A. Smith, D.H. Janzen, J.J Rodriguez, J.B Whitfield, & P.D.N. Hebert. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes* 6:959–964
- Hajibabaei, M., G. A. C. Singer., P.D.N. Hebert, & D.A. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics* Vol.23 No.4.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S. L. Ball, & J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270, 313–321
- Jeffreys, A. 2010. **The Report: Indonesia 2010.** Oxford Business Group. Indonesia.
- Jensen, K. 2007. Biogeography of the Sacoglossa (Mollusca, Opisthobranchia. *Bonner zoologische Beitrage*, vol. 55, pp. 255-281.
- Jorger, K.M & M. Schrodil. 2013. How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers in Zoology* 2013,10:59
- Krug, P.J., J.E. Vendetti, A.K. Rodriguez, J.N. Retana, Y.M. Hirano, & C.D. Trowbridge. 2013. Integrative species delimitation in photosynthetic sea slugs reveals twenty candidate species in three nominal taxa studied for drug discovery, plastid symbiosis or biological control. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69 (2013) 1101–1119.
- Low, H.W. 2011.
<http://www.gbri.org.au/Species/Plakobranchusocellatus.asPx>.
Diakses tanggal 7 Juli 2014.
- Mangubhai, S., M. V. Erdmann, J.R. Wilson, C.L. Huffard, F. Ballam, N.I. Hidayat, C. Hitipeuw, M.E. Lazuardi & D. Muhajir, Pada, G. Purbag, C. Rotinsulu, L. Rumetna, K. Sumolang, & W. Wen. 2012. Papuan Bird's Head Seascape: Emerging threats and challenges in the global center of marine biodiversity. *Marine Pollution Bulletin* 64 (2012) 2279–2295.
- Marine species. 2013.
<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=225419>.
Diakses tanggal 28 Oktober 2013.

- McKenna, S. A., G. R. Allen & S. Suryadi. 2002 **A marine Rapid Assesment of Raja Ampat Islands, Papua Province, Indonesia.** RAP Bulletin of Assesment 22. Conservation International, senter for applied biodiversity science, departement of conservation biology. Washington, DC.
- Maeda, T., E. Hirose, Y. Chikaraishi, M. Kawato, K. Takishit, T. Yoshida, H. Verbruggen, J. Tanaka, S. Shimamura, Y. Takaki, Masashi Tsuchiya, K. Iwai & T. Maruyama. 2012. Algivore or Phototroph? *Plakobranchus ocellatus* (Gastropoda) Continuously Acquires Kleptoplasts and Nutrition from Multiple Algal Species in Nature. *PLoS ONE* 7(7): e42024.
- Nielsen, R & M.Matz. 2006. Statistical Approaches for DNA Barcoding. *Sysl. Biol.* 55(1):162-169, 2006
- Rudman, W.B. 1998. *Plakobranchus ocellatus* van Hasselt, 1824. [In] Sea Slug Forum. Australian Museum, Sydney. <http://www.seaslugforum.net/factsheet/placocel>. Diakses 7 Juli 2014.
- Takano, T., Y.M. Hirano, C.D. Trowbridge, Y.J. Hirano&Yasuyuki Watano Taxonomic clarifi cation in the genus *Elysia* (Gastropoda: Sacoglossa): *E. atroviridis*and *E. setoensis*. *Amer. Malac. Bull.* 31(1):25–37(2013)
- Trowbridge, C. D., Y. M. Hirano &Y. J. Hirano. 2011. Inventory of Japanese sacoglossan opisthobranchs: Historical review, currentrecords, and unresolved issues. *American Malacological Bulletin* 29: 1–22.
- Veron, J.E.N., L.M. Devantier, E. Turak, A. L. Green, S. Kininmonth, M.S.T. Afford-Smith & N. Peterson. 2009. Delineating the Coral Triangle. *Galaxea, Journal of Coral Reef Studies* 11: 91 – 100 (2009).
- Wägele, H., M. J. Raupach, I. Burghardt, Y. Grzymbo wski, & K. Händeler. 2010. Solar Powered Seaslugs (Opisthobranchia, Gastropoda, Mollusca): Incorporation of Photosynthetic Units: A Key Character Enhancing Radiation? *M. Glaubrecht (ed.), Evolution in Action,*
- Zimmer, E.A., & E. H. Roalson. 2005. **Methods in enzymology, molecular evolution: producing the biochemical data, part B volume 395.** Elsevier academic press. California USA.

Lampiran 1. Elektroferogram hasil sekuensing Gen COI *Plakobrancus* UJNP 68 arah Forward



Lampiran 2. Elektroferogram hasil sekuisensi gen COI *Plakobrancus* UJNP 68 arah Reverse



Lampiran 3. Sekuens *forwardPlakobranchus* UNP 68

1	CCGTTTAA	TGTTCTGA	TTAGTTTACT	TATTCCTT	GATGATCTT	GTITTTAGCT	CCTCTGGTGC	CTTCGATCTT	ATATGTAACG
131	GCATACCTT	TGTTTAAAT	TTATACCTT	TTGATTGTTG	TATTCCTT	TTATGATAG	TTATGATAG	TTATGATAG	TTATGATAG
261	GTATGTTAC	TCTCTTCTT	ATTTCTTC	TATCTCTAG	GGAGGTGAG	GGAGGTGAG	GGAGGTGAG	GGAGGTGAG	GGAGGTGAG
391	GATTTCTCC	TGGATTTTG	CAGGGATTC	TCTCTTAC	TTTCTTAA	GGTCACTAA	GGTCACTAA	GGTCACTAA	GGTCACTAA
521	GTAGGCTC	TTTCTTCT	TOCTCTCT	CTCTTATG	TTACAGTTA	TTACAGTTA	TTACAGTTA	TTACAGTTA	TTACAGTTA
651	ACCTGTTG	TTTCTTCT	ACCTGTTG	ACCTGTTG	TTTAAANN	TTTAAANN	TTTAAANN	TTTAAANN	TTTAAANN

Keterangan :

blok merah : Low base

blok kuning : Medium base
blok biru : High base



BRAWIJAYA

Lampiran 4. Sekuens *reversePlakobranchus* UNP 68

1	TTAGGGCTG	ATTAATAAGG	ATCACTCCA	CGAAGGAAAT	CAAAAACCT	ATGTTAAA	TTCGATGG	TAGTACAT	CCGCCTATA	IGTATGCT	CAGGTAAATA	TATAGAGA
131	TTATTTGAGC	ATATCAAG	ATTAATCT	AACCTTCACT	CCCTATTC	GAGGACCTA	TATTTAAA	GTTGTTATA	RACCTTAAAG	AGAGATTAAC	CCTCCGAAAT	GGAGGAGAAA
261	ATGGCCGAG	TCCACTGAG	CAACCCCATG	AACCCACGESC	CCTCTTAAAG	GAGGATACAC	ATTTATCC	GTCCCTGAC	ATTTATCC	AGAGATTAAC	CTCCCTCAC	GGAGGAGAAA
391	ATTAATAAC	TTATTTATT	TATACGAGA	AAACCTTAT	CTTGGECCCC	AACTACAAAT	TTAATGAA	TCACCAATT	TCACCAATT	AAATTTATAA	TCACCAATT	GGAGGAGAAA
521	TAAGCCCTAC	TAATACAT	TTAAATGT	CAAGACCTAA	AAACCCACCC	GAATGTTCA	TTAAATGT	CTTAAATCCAG	TTAAATGTAA	AACTACAAACG	TCACCAATT	GGAGGAGAAA
651	AGTACCAAAT	TCCTTATGAT	TGTTGTTGAC	CGAAN								

Keterangan :

blok merah : Low base

blok kuning : Medium base

blok biru : High base



Lampiran 5. Sekuen Gen COI *Plakobrancus* UNP 68

TATATATAGTTTGGTATGTGATGTGGTTAGTAGGTA
GGATTAAGTTACTAATTCTTTGAGTTAGGAACCTCTGG
TGCCTTTAGGTGATGATCATTATAATGTAAATTGTA
CGGCTCACGCTTCGTTATAATTCTCATAGTTACCTT
TAATAATTGGTGGATTGGTAATTGGATAGTCCAATTG
ATTGGGGCCCCAGATAAAGTTTCTCGTATAAATAATAT
AAGTTTTGATTGTTACCTCCTCTTTATTCTCTCTATG
CTCAAGTCTGGTTGAGGGAGGTGCAGGGACTGGATGA
GTGTATCCTCCTTAAGAGGGCCGTGGTCATGGGAGGG
CGTCAGTGGACTTGGCGATTTCTCCTGCATTGGCAGGG
ATATCTTCTATTTAGGTGCTGTAAATTATTACTACCATT
TTAATATACGTTCTCCTGGAATAAAGGATGGAACGTTAAG
TTTATTTGTTGATCTGTCTTAGTAACGCCCTCCTTCT
TTTATCTTACCTGTATTAGCGGGAGCCATTACAATGTTAC
TTACCGATCGAAATTAAATAACTAGGTTTTGATCTGCT
GGTGG

Lampiran 6. Perhitungan jarak genetik (%) antara *Plakobranchus ocellatus* dari Raja Ampat (UNP 68) dengan *Plakobranchus* dari Jepang (Jap), Australia (Au), Papua New Guinea (Gui), Philippine (Phi), Sulawesi (Sul), Moorea (Mor) dan Guam menggunakan metode estimasi jarak Kimura 2-Parameter (Bootstrap 1000).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. UNP68	0.0047	0.0122	0.0046	0.0151	0.0154	0.0156	0.0154	0.0153	0.0160	0.0159	0.0169	0.0153	0.0162	0.0160	0.0171	0.0151	0.0175	0.0155	
2.1 <i>P.ocellatus</i> sp.1[Sul]	0.0147	0.0124	0.0022	0.0150	0.0160	0.0163	0.0159	0.0146	0.0155	0.0153	0.0160	0.0150	0.0155	0.0154	0.0163	0.0150	0.0173	0.0161	
3.2 <i>P.ocellatus</i> aff.[PNG]	0.0768	0.0824		0.0129	0.0143	0.0157	0.0157	0.0156	0.0152	0.0152	0.0149	0.0155	0.0152	0.0150	0.0149	0.0158	0.0153	0.0165	
4. <i>P.ocellatus</i> sp.1[Phi]	0.0147	0.0032	0.0861		0.0154	0.0160	0.0163	0.0159	0.0146	0.0156	0.0154	0.0162	0.0149	0.0156	0.0155	0.0164	0.0149	0.0175	0.0161
5.4 <i>P.ocellatus</i> sp.white[Tha]	0.1127	0.1108	0.1052	0.1147		0.1052	0.1054	0.1053	0.1054	0.0075	0.0053	0.0082	0.0166	0.0055	0.0054	0.0084	0.0165	0.0191	0.0156
6.15 <i>P.ocellatus</i> isolate 856[Guia]	0.1190	0.1250	0.1214	0.1250	0.1170		0.0021	0.0027	0.0116	0.0153	0.0147	0.0159	0.0131	0.0149	0.0149	0.0165	0.0133	0.0189	
7.10 <i>P.ocellatus</i> suff.purple[Mor]	0.1190	0.1250	0.1193	0.1250	0.1170	0.0832		0.0035	0.0105	0.0155	0.0150	0.0160	0.0132	0.0152	0.0151	0.0167	0.0134	0.0189	
8.16 <i>P.ocellatus</i> isolate 850[Guia]	0.1190	0.1250	0.1214	0.1250	0.1170	0.048	0.0081		0.0107	0.0153	0.0148	0.0159	0.0130	0.0150	0.0149	0.0165	0.0131	0.0189	
9.22 <i>P.ocellatus</i> sp.spotless[Jap]	0.1227	0.1167	0.1190	0.1167	0.1210	0.0631	0.0549		0.0146	0.0148	0.0156	0.0113	0.0149	0.0150	0.0161	0.0112	0.0171	0.0108	
10.8 <i>P.ocellatus</i> sp.white[Phi]	0.1262	0.1222	0.1165	0.1222	0.0348	0.1205	0.1205	0.1126		0.0051	0.0068	0.0163	0.0054	0.0053	0.0059	0.0162	0.0189	0.0156	
11.21 <i>P.ocellatus</i> isolate 852[Guia]	0.1247	0.1187	0.1130	0.1187	0.0180	0.1130	0.1130	0.1130		0.0179	0.0651	0.0166	0.0115	0.0016	0.0063	0.0165	0.0188	0.0150	
12.28 <i>P.ocellatus</i> sp.white[Aus]01	0.1398	0.1337	0.1279	0.1337	0.0432	0.1320	0.1320	0.1279	0.1312		0.0262	0.0172	0.0064	0.0064	0.0044	0.0172	0.0193	0.0161	
13.17 <i>P.ocellatus</i> sp.purple[Jap]03	0.1207	0.1187	0.1167	0.1187	0.1287	0.0946	0.0906	0.0735	0.1262	0.1237	0.1481		0.0168	0.0168	0.0178	0.0032	0.0175	0.0140	
14.24 <i>P.ocellatus</i> sp.white[Guia]	0.1267	0.1207	0.1150	0.1207	0.0197	0.1150	0.1150	0.1150	0.1150	0.0196	0.0016	0.0279	0.1308		0.0021	0.0066	0.0167	0.0189	
15.25 <i>P.ocellatus</i> sp.white[Guia]04	0.1267	0.1207	0.1150	0.1207	0.0197	0.1150	0.1150	0.1150	0.1150	0.0196	0.0016	0.0279	0.1308	0.0032		0.0066	0.0168	0.0190	
16.29 <i>P.ocellatus</i> sp.white[Jap]01	0.1457	0.1395	0.1337	0.1395	0.0449	0.1381	0.1381	0.1340	0.1381	0.0329	0.0279	0.0130	0.1502	0.0295	0.0295		0.0177	0.0194	
17.19 <i>P.ocellatus</i> sp.purple	0.1207	0.1187	0.1167	0.1187	0.1287	0.0944	0.0944	0.0906	0.0735	0.1262	0.1287	0.1481	0.0065	0.1308		0.1308	0.1502	0.0172	
18.Thuridillineolata	0.1561	0.1561	0.1479	0.1581	0.1657	0.1662	0.1683	0.1562	0.1477	0.1656	0.1637	0.1818	0.1575	0.1657	0.1837	0.1575		0.0183	
19.14 <i>P.ocellatus</i> aff.purple[Guia]02	0.1210	0.1271	0.1234	0.1271	0.1190	0.0897	0.0130	0.0881	0.0668	0.1225	0.1150	0.1340	0.0983	0.1170	0.1402	0.0983	0.1620		