

**IDENTIFIKASI MORFOLOGI DAN KARAKTERISTIK GENETIK IKAN
UCENG (*Nemacheilus fasciatus*) BERDASARKAN GEN
CYTOCHROME OXIDASE C SUBUNIT I (COI)**

TESIS



Oleh :

**AMALIA AYUK RIYADINI
NIM. 156080100111021**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT BIOTEKNOLOGI KELAUTAN DAN PERIKANAN**

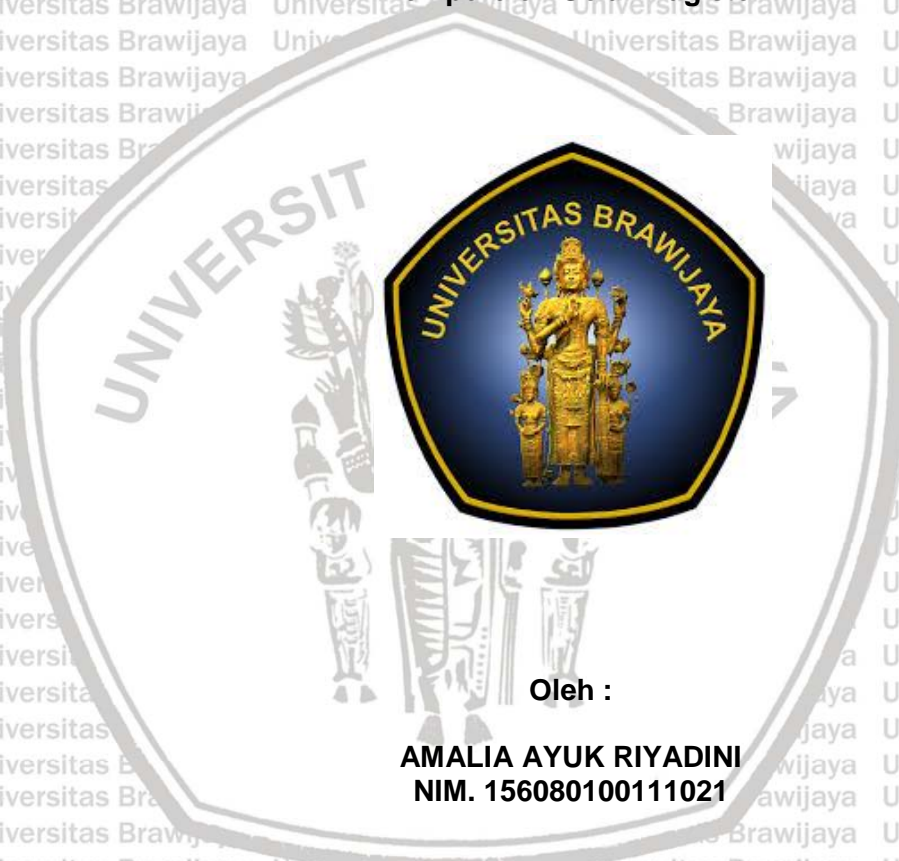
**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**



**IDENTIFIKASI MORFOLOGI DAN KARAKTERISTIK GENETIK IKAN
UCENG (*Nemacheilus fasciatus*) BERDASARKAN GEN
CYTOCHROME OXIDASE C SUBUNIT I (COI)**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



Oleh :

**AMALIA AYUK RIYADINI
NIM. 156080100111021**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT BIOTEKNOLOGI KELAUTAN DAN PERIKANAN**

**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**



TESIS

IDENTIFIKASI MORFOLOGI DAN KARAKTERISTIK GENETIK IKAN UCENG (*Nemacheilus fasciatus*) BERDASARKAN GEN CYTOCHROME OXIDASE C SUBUNIT I (COI)

Oleh:

AMALIA AYUK RIYADINI
NIM. 1656080100111021

Telah dipertahankan di depan penguji
Pada Jumat, 5 Juli 2019
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Ketua

Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS
NIP.19600425 198503 1 002

Tanggal: 18 JUL 2019

Anggota

Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc
NIP. 196210141987011001

Tanggal: 18 JUL 2019

Mengetahui,

Dekan

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan



Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal: 18 JUL 2019

Ketua
Program Magister

Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si
NIP. 19660825 199203 1 001

Tanggal: 18 JUL 2019

JUDUL TESIS: Identifikasi Morfologi dan Karakteristik Genetik Ikan Uceng (*Nemacheilus fasciatus*) berdasarkan Gen Cytochrome Oxidase C Subunit I (COI)

Nama : Amalia Ayuk Riyadini

NIM : 156080100111021

Program Studi : Budidaya Perairan

Minat : Bioteknologi Kelautan dan Perikanan

KOMISI PEMBIMBING

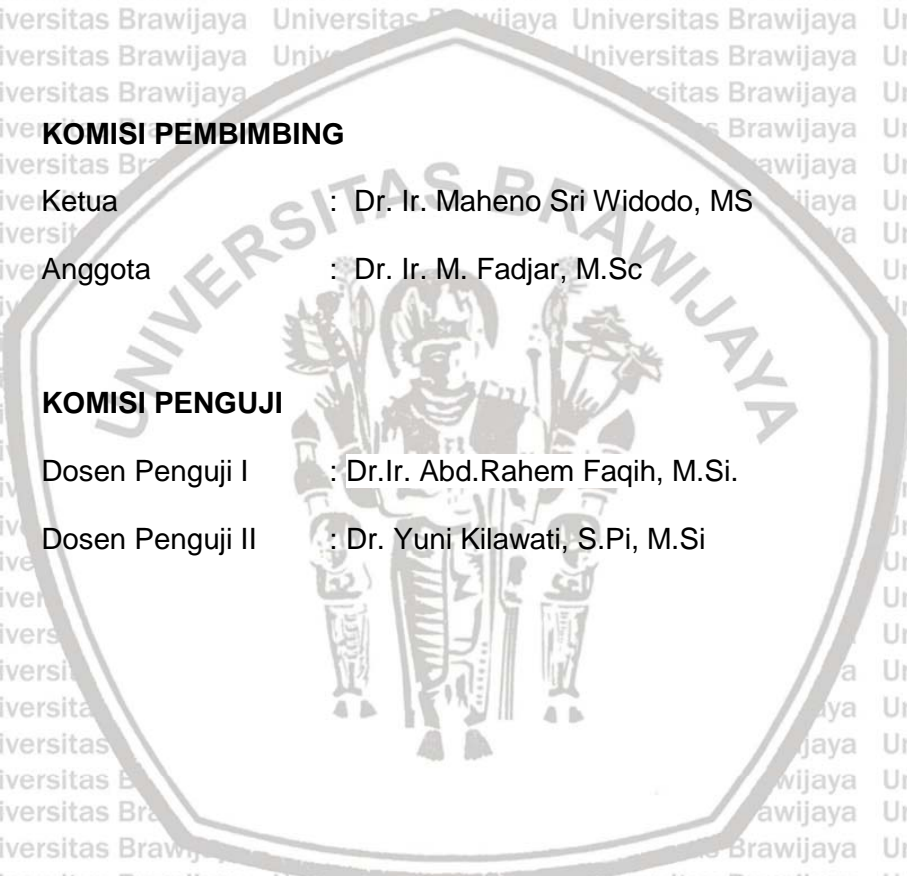
Ketua : Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS

Anggota : Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc

KOMISI PENGUJI

Dosen Penguji I : Dr.Ir. Abd.Rahem Faqih, M.Si.

Dosen Penguji II : Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, M.Si



PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis ataupun diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila ternyata dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia Tesis ini digugurkan serta diproses sesuai dengan peraturan perundangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Malang, 26 Juni 2019



Amalia Ayuk R.
NIM. 156080100111021

SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI TESIS



plagiarism-detector
Cutting-edge class tool for plagiarism detection and prevention

19 0734 T

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PASCASARJANA

SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI
Nomor: 1375/UN10.F40/PN/2019

Sertifikat ini diberikan kepada:

Nama : Amalia Ayuk Riyadini
NIM : 156080100111021
Program Studi : Program Magister Budidaya Perairan
Fakultas : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas : Universitas Brawijaya

Dengan Judul Tesis
**Identifikasi Morfologi dan Karakteristik Genetik Ikan Uceng (*Nemacheilus fasciatus*)
Berdasarkan Gen Cytochrome Oxidase C Subunit I (COI) di Jawa Timur**

Telah dideteksi tingkat plagiasinya secara online pada tanggal **21 Juni 2019**
dan dinyatakan **bebas plagiasi** dengan kriteria toleransi $\leq 5\%$.

Malang, 24 Juni 2019
Ketua Badan Penerbitan Jurnal

Direktur
Prof. Dr. Marjono, M.Phil
NIP. 196211161988031004

Indah Yanti, S.Si., M.Si.
NIP. 19791129 200501 2 002



RIWAYAT HIDUP

Amalia Ayuk R., dilahirkan di Pacitan pada tanggal 4 Juni 1989 dari pasangan suami istri Sutrisno dan Mami K. Menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar Negeri Pacitan I pada tahun 2001, melanjutkan ke jenjang Sekolah Menengah Pertama Negeri I Pacitan dan tamat pada tahun 2004, selanjutnya meneruskan ke Sekolah Menengah Atas Negeri I Pacitan pada tahun 2007. Di tahun yang sama terdaftar sebagai mahasiswa Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang. Penulis tamat pada tahun 2013 dan memperoleh gelar sarjana S.Pi Diangkat sebagai staf Asisten Dosen Non PNS di Universitas Brawijaya pada tahun 2013-2015. Pada tahun 2015 diterima sebagai mahasiswa Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Email pribadi: liabinarung@gmail.com

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengungkapkan ucapan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Allah SWT, Tuhan semesta alam, atas segala limpahan berkat dan rahmat-Nya sehingga penyusunan tesis ini dapat diselesaikan.
2. Kedua orang tua saya yang tiada henti memberikan dukungan, doa, kesabaran dan segala bantuan baik fisik maupun materi semoga senantiasa dalam lindungan Allah SWT.
3. Suami dan anak tercinta, yang telah merelakan sebagian waktunya berpisah sejenak denganku, semoga kita segera berkumpul lagi. Pasangan sehidup sesurgaku (insya Allah), atas semua semangat dan kesabarannya....terima kasih.
4. Bapak Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS dan Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc. selaku komisi pembimbing yang selalu memberikan arahan, ide dan gagasan dalam penyusunan naskah ini, atas semua bantuannya matur nuwun sanget, Gusti Allah ingkang mbales.
5. Bapak Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si dan Ibu Dr. Yuni Kilawati, S.Pi., M.Si selaku Komisi Penguji yang telah memberikan kritik dan saran demi perbaikan tesis ini.
6. Rr. Fitria Dewi Listiani, S.Si selaku laboran di Laboratorium Biologi Molekuler, Laboratorium Ilmu Sentral Hayati Universitas Brawijaya, atas bantuannya selama penelitian berlangsung di laboratorium.
7. Bapak Andrianus Sembiring dari Yayasan Biodiversitas Indonesia as an Indonesian marine scientist, hehe.. terima kasih telah diijinkan nitip sekuensing melalui BioNusa.
8. Mas Joko (Ponorogo), Mas Agus (Blitar), Pak Darmaji (Pandaan) dan

Alam (Lumajang) atas bantuannya mengambil sampel di TKP.

9. Dek Hilchamn, Chikita dan Saiful yang telah membantu secara teknis dalam penelitian ini.

10. Teman seperjuangan kelas Master Sains 2015 s.d 2017 (especially Andhang, Ayuk, Ana, Valen, Rio Nomleni).

11. Bebeb family, grub jalan-jalan tiada henti (MES Danny, Randy, Adhi Kamula, Sahlan M Saleh, Mas Yus Andalus, Mas Aditya Basir, Damai DiniArii, Desy Emilyasari, Kak Rani Tarigan, Ria Retno Manik...see u next time. Gw bakal ke tempat kalian satu persatu!

12. Rekan ruangan dosen GeJe (Mas Budianto, Mas Seto Sugianto, Mas Soko Nuswantoro, Mba Fani Fariedah, Mba Rani Yuwanita, Mba Nina Ayunin, Mba Kartika, Mba Yuni Widyawati, Nailul Izzah) terima kasih atas kebersamaan 6 tahun di FPIK, sedih sebenarnya berpisah dari kalian.

13. Member Griya Shanta E305 (Leny, Ayuk, Lelly, Dinda, Tiwi, Evi, Emil, Tutyk) yang setia menjadi tim hore, good luck everywhere u are!

14. Dhyakanya dan Tante Celli, keluargaku di Malang Raya selama hampir dari separuh umurku (2007-2019), sedih harus meninggalkan kota ini.

15. Para malaikat begajulan (Faris a.k.a bojo guwe, Adjie, Putra), setelah nama kalian kusebut di skripsi kali ini kusebut lagi di tesis, wkwk. Entah hubungan kita ini apa namanya, mugo2 ndonya akhirat!

16. Inner Circle of Wanita & Gunung yang karena penyelesaian tesis ini saya tidak bisa ikut banyak jadwal penting termasuk ROAM Gn. Kerinci, Jambore Nasional, dll.

Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu-persatu oleh peneliti yang tidak segan-seganya berkontribusi berbagai macam hal dalam penelitian ini.

RINGKASAN

AMALIA AYUK R. Identifikasi Morfologi dan Karakteristik Genetik Ikan Uceng (*Nemacheilus fasciatus*) Berdasarkan Gen Cytochrome Oxidase C Subunit I (COI). Dibimbing oleh: Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS dan Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc

Nemacheilus fasciatus merupakan ikan yang biasa hidup liar di beberapa aliran sungai di Jawa Timur. Ikan ini tergolong ke dalam genus *Nemacheilus* dan famili *Nemacheilidae*. Keberadaan ikan ini di perairan semakin menurun sehingga perlu dilakukan domestikasi. Proses domestikasi merupakan salah satu langkah penting dalam program pengembangan ikan liar menjadikan target budidaya. Untuk tujuan ini diperlukan informasi mengenai identifikasi spesies, karakter genetik dan analisis keragaman genetik sebagai plasma nutfah biodiversitas. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi *N. fasciatus* di beberapa perairan sungai di Jawa Timur melalui karakter morfologi dan genetiknya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies *N. fasciatus* di Jawa Timur berdasarkan karakter morfologi, berdasarkan gen cytochrome oxidase c subunit I (COI) dan menganalisis karakteristik genetik serta hubungan filogenetik *N. fasciatus* di Jawa Timur berdasarkan gen COI.

Pengecekan spesies dan karakteristik genetika dilakukan dengan menggunakan DNA *barcoding*. DNA *barcoding* memberikan kecepatan dan keakuratan dalam identifikasi spesies dengan fokus analisis pada segmen kecil dari mtDNA, konfirmasi identitas sampel, melihat karakteristik genetik, pengecekan keragaman genetik dan kekerabatan, serta analisis filogenetik. DNA *barcoding* dalam penelitian menggunakan DNA mitokondria. COI sebagai *barcode* universal pada hewan dan secara global gen COI telah terpilih sebagai alat standar untuk taksonomi molekuler dan identifikasi. Amplifikasi (PCR) gen COI dilakukan menggunakan kit GO TAQ Green PCR Mix dengan pasangan primer LCO1490 5'-gggtcaacaaatcataaagatattgg3' dan HCO2198 5'-taaacttcagggtgacca aaaaatca-3'.

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Mei 2019. Isolasi DNA, uji kualitatif dan kuantitatif DNA dan PCR dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif dengan pendekatan kuantitatif. Teknik pengumpulan data karakter morfologi dilakukan dengan teknik observasi dan pengukuran langsung di lokasi penelitian, sedangkan informasi genetik diperoleh melalui tahapan perlakuan di laboratorium.

Hasil identifikasi sampel yang dikumpulkan berdasarkan karakter morfologi (morfometrik dan meristik) diketahui bahwa seluruh sampel merupakan spesies *Nemacheilus fasciatus*. Karakter meristik yang dapat digunakan sebagai penciri spesies ini antara lain pada kanan dan kiri tubuhnya terdapat pola totol (band) memanjang longitudinal diseluruh tubuh dari arah depan ke arah sirip ekor berjumlah 12-18 buah, bola mata berwarna hitam besar, lubang hidung dekat satu sama lain, memiliki sepasang barbel pada mulut dan memiliki pola menyerupai pelana pada dorsal berjumlah 11-12. Hasil analisis *truss*

morphometric diketahui terdapat perbedaan pengaruh antara daerah terhadap panjang tertentu tubuh ikan. Variabel pengukuran yang menunjukkan perbedaan antara lain A1, A2, C2, C5 karena memiliki nilai $P < 0,05$.

Gen cytochrome oxidase c subunit I (COI) mampu digunakan sebagai penanda molekuler dalam mengidentifikasi spesies *Nemacheilus fasciatus* dengan menghasilkan sekuen nukleotida 640 bp.

Karakteristik genetik *Nemacheilus fasciatus* berdasarkan gen COI sebagai penanda molekuler antara lain memiliki komposisi basa T=23,47%, C=19,51%, A=26,63% dan G=30,40%. Probabilitas substitusi transisi lebih besar yaitu dengan nilai tertinggi 18,65% pada basa A-G, sedangkan substitusi transversal nilai tertinggi hanya 5,83% pada basa T-G, dengan nilai koreksi dari total rasio transisi/transversi (R) sebesar 1,66%. Keragaman haplotipe tertinggi 1.00000 dan keragaman nukleotida (π) tertinggi dengan 0,40000. Jarak genetik antar sampel diketahui paling rendah 0,0000 yaitu jarak antara sampel Pasuruan 1, Pasuruan 2, Pasuruan 4 dan Pasuruan 5. Jarak genetik terjauh adalah 0,0371 yaitu jarak antara sampel Lumajang 1 dan Ponorogo 3. Kekekabatan genetik *Nemacheilus fasciatus* menghasilkan pohon filogenetik dengan selang kepercayaan tinggi yaitu dengan nilai bootstrap 98%. Kelima belas sampel membentuk 12 haplotipe dengan mutasi terbanyak pada sampel Ponorogo 1, Ponorogo 2 dan Ponorogo 3.

Berdasarkan penelitian dan analisis yang dilakukan, disarankan perlu dilakukan pengambilan sampel dalam jumlah yang lebih banyak untuk mendapatkan gambaran yang lebih lengkap mengenai spesies *Nemacheilus fasciatus*.

SUMMARY

AMALIA AYUK R. Identification of Morphology and Genetic Characteristics of Uceng (*Nemacheilus fasciatus*) Based on Genes Cytochrome Oxidase C Subunit I (COI). Under the guidance of: Dr. Ir. Maheno Sri Widodo, MS and Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc

Nemacheilus fasciatus is a fish that usually lives wild in several rivers in East Java. This fish belongs to the genus *Nemacheilus* and the family *Nemacheilidae*. The existence of these fish in the waters has decreased so that it needs to be done domestication. The domestication process is one of the important steps in the wild fish development program making it the cultivation target. For this purpose, information is needed regarding species identification, genetic character and genetic diversity analysis as biodiversity germplasm. Based on this, this study was conducted to identify *N. fasciatus* in several river waters in East Java through its morphological and genetic characters.

This study aims to identify *N. fasciatus* species in East Java based on morphological characters, based on the cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene and analyze the genetic characteristics and phylogenetic relationships of *N. fasciatus* in East Java based on the COI gene.

Checking species and genetic characteristics is done using DNA barcoding. DNA barcoding provides speed and accuracy in species identification with a focus on analysis of small segments of mtDNA, confirming sample identity, looking at genetic characteristics, checking genetic diversity and kinship, and phylogenetic analysis. DNA barcoding in the study used mitochondrial DNA. COI is a universal barcode on animals and globally the COI gene has been chosen as a standard tool for molecular taxonomy and identification. The amplification (PCR) of the COI gene was carried out using the GO TAQ Green PCR Mix kit with primary pairs LCO1490 5'-ggtaacaaatcataaagatattgg3' and HCO2198 5'-taaacttcagggtgacca aaaaatca-3'.

This research was conducted in March to May 2019. DNA isolation, qualitative and quantitative tests of DNA and PCR were carried out at the Central Laboratory of Life Sciences, Brawijaya University, Malang.

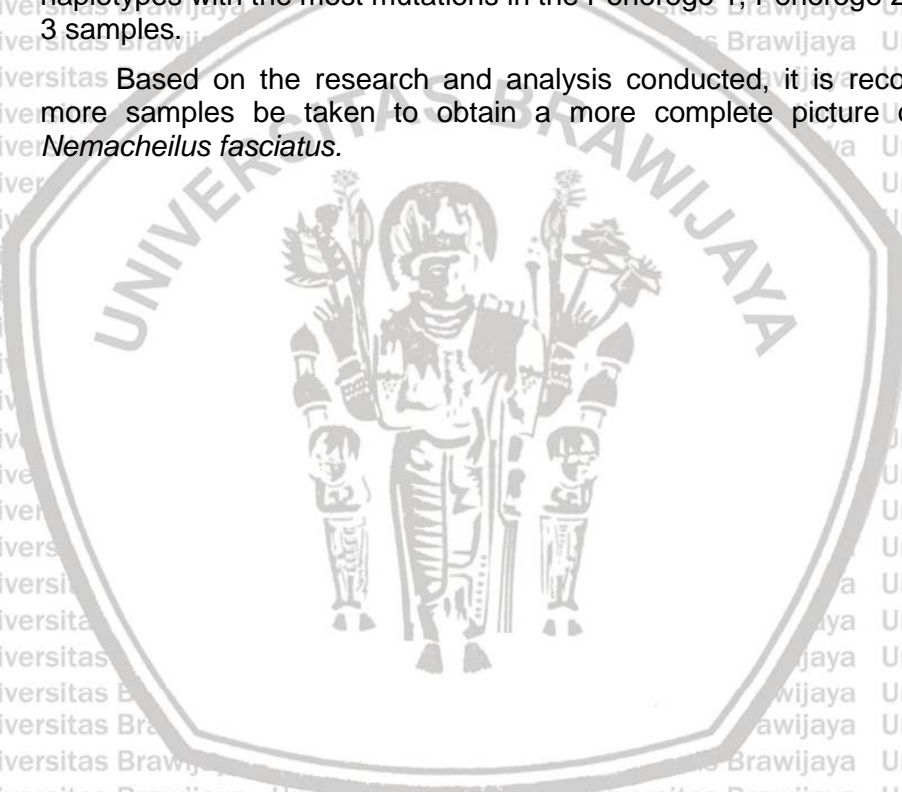
The research method used is descriptive method with a quantitative approach. Morphological character data collection techniques were carried out by observation and measurement techniques directly at the study site, while genetic information was obtained through stages of treatment in the laboratory.

The results of the identification of samples collected based on morphological (morphometric and meristic) characters are known that all samples are species of *Nemacheilus fasciatus*. Meristic characters that can be used as a characteristic of this species include the right and left of the body there are longitudinal dots around the body from the front towards the 12-18 caudal fins, large black eyeballs, close to each other's nostrils others, have a pair of barbells in the mouth and have a dorsal saddle-like pattern of 11-12. The results of the truss morphometric analysis show that there are differences in influence between regions on the specific length of the fish body. Measurement variables that show differences include A1, A2, C2, C5 because they have a value of $P < 0.05$.

The cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene was able to be used as a molecular marker in identifying *Nemacheilus fasciatus* species by producing a nucleotide 640 bp sequence.

Genetic characteristics of *Nemacheilus fasciatus* based on the COI gene as molecular markers include alkaline composition T = 23.47%, C = 19.51%, A = 26.63% and G = 30.40%. The transition probability substitution is greater, with the highest value of 18.65% in the A-G base, while the highest transversion substitution value is only 5.83% in the T-G base, with the correction value of the total transition / transversion (R) ratio of 1.66%. The highest diversity of haplotypes is 1.00000 and nucleotide diversity (π) is highest with 0,40000. The genetic distance between samples is at least 0.0000, which is the distance between the samples of Pasuruan 1, Pasuruan 2, Pasuruan 4 and Pasuruan 5. The farthest genetic distance is 0.0371, which is the distance between Lumajang 1 and Ponorogo samples. 3. Genetic kinship of *Nemacheilus fasciatus* with a high confidence interval with a 98% bootstrap value. The fifteen samples formed 12 haplotypes with the most mutations in the Ponorogo 1, Ponorogo 2 and Ponorogo 3 samples.

Based on the research and analysis conducted, it is recommended that more samples be taken to obtain a more complete picture of the species *Nemacheilus fasciatus*.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun tesis yang berjudul 'Identifikasi Morfologi dan Karakteristik Genetik Ikan Uceng (*Nemacheilus fasciatus*) berdasarkan Gen Cytochrome Oxidase C Subunit I (COI)'. Tesis ini disusun sebagai persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Perikanan dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Dalam penyusunan tesis ini, penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan informasi yang dimiliki penulis. Oleh sebab itu, penulis menerima segala kritik dan saran yang membangun sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

Malang, Juni 2019

Amalia Ayuk R.

GLOSARIUM

B

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool adalah sebuah algoritma untuk membandingkan informasi sekuen biologi, misalnya sekuen asam amino suatu protein atau sekuen nukleotida DNA dan/atau RNA.

BOLD

Barcode of Life Data System adalah database sekuen yang dikhususkan untuk barcode DNA. Tersedia platform daring untuk menganalisis sekuen DNA.

C

COI

Cytochrome C Oxidase subunit I (disebut juga COX1) adalah gen pada mtDNA yang digunakan sebagai penanda atau marka standar dalam DNA *barcoding*.

D

DNA

Deoxyribonucleic Acid adalah suatu asam nukleat yang menyimpan segala informasi biologis yang unik dari setiap makhluk hidup.

DNA *barcoding*

teknik untuk identifikasi taksonomik yang memanfaatkan region DNA standar pendek yang ada secara universal dan variatif dalam membedakan spesies satu dengan yang lain. Region DNA yang tersebut sangat berbeda-beda antarspesies namun hampir tidak berubah di dalam suatu spesies sehingga dapat dipakai sebagai penanda suatu spesies.

E

Isolasi DNA

proses mendapatkan DNA utuh dari suatu jaringan makhluk hidup.

Elektroforesis

teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik.

K

Kaliper

jangka sorong.



L

Lokus

lokasi gen pada sebuah kromosom.

M

Meristik

tubuh atau bagian tubuh yang dapat dihitung.

Mitokondria

salah satu organel sel dalam sel eukariotik yang berfungsi sebagai tempat berlangsungnya fungsi respirasi sel pada makhluk hidup, selain fungsi seluler lain seperti metabolisme asam lemak, homeostasis kalsium, transduksi sinyal selular, biosintesis pirimidina dan penghasil energi yang berupa adenosin trifosfat (ATP) pada lintasan katabolisme.

Morfometrik

tubuh atau bagian tubuh yang dapat diukur.

mtDNA

mitokondrial DNA, materi genetik DNA yang berada di dalam mitokondria.

P

PCR

Polymerase Chain Reaction merupakan suatu teknik untuk memperbanyak (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini, DNA dapat dihasilkan dalam jumlah besar dengan waktu relatif singkat sehingga memudahkan berbagai teknik lain yang menggunakan DNA.

Primer

sekuen DNA berupa asam nukleat untai tunggal pendek yang komplemen terhadap sekuen yang akan diamplifikasi, terutama dalam PCR untuk sintesis DNA.

S

Sekuensing DNA

proses penentuan urutan nukleotida suatu fragmen DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup.

Spesies kriptik

spesies tersamar, yaitu spesies yang memiliki kemiripan karakter morfologi yang tinggi dengan spesies lain.

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI	v
RIWAYAT HIDUP	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
KATA PENGANTAR	xiii
GLOSARIUM	xiv
DAFTAR ISI	xvi
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Mafaat Penelitian.....	5
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Ikan Uceng (<i>Nemacheilus</i> sp.).....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>Nemacheilus</i> sp.....	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran <i>Nemacheilus</i> sp.....	7
2.1.3 Kebiasaan Makan <i>Nemacheilus</i> sp.....	8
2.2 Karakter Morfologi.....	9
2.3 Karakteristik Genetik.....	10
2.4 DNA <i>Barcoding</i>	11
2.5 DNA Mitokondria.....	13
2.6 Gen Cytochrome Oxidase C Subunit I (COI).....	14



2.7 Filogenetik	17
3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN	19
3.1 Landasan Teori	19
3.2 Kerangka Konsep	20
3.3 Kerangka Operasional dan Analisis Data	21
3.4 Kebaruan Penelitian	24
4. METODE PENELITIAN	26
4.1 Waktu Dan Tempat Penelitian	26
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	27
4.3 Metode dan Pendekatan Penelitian	28
4.4 Prosedur Pengumpulan Data	29
4.4.1 Pengumpulan Data Morfometrik dan Meristik	29
4.4.2 Pengumpulan Data Genetik	31
4.4.3 Pengumpulan Data Kualitas Air	36
4.5 Analisis Data	36
4.5.1 Analisis Data Morfometrik dan Meristik	36
4.5.2 Analisis Data Genetik	38
5 HASIL DAN PEMBAHASAN	40
5.1 Identifikasi Spesies Berdasarkan Morfologi	40
5.2 Identifikasi Spesies Berdasarkan Gen COI	43
5.3 Karakteristik Genetik <i>Nemacheilus fasciatus</i>	46
5.4 Filogenetik <i>Nemacheilus fasciatus</i>	54
5.5 Kualitas Air	58
6 KESIMPULAN DAN SARAN	63
6.1 Kesimpulan	63
6.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	79

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Nemacheilus fasciatus</i>	6
2. Struktur mtDNA Eukariot	14
3. Kerangka Konsep	21
4. Kerangka Operasional	23
5. Peta Lokasi Pengambilan Sampel	26
6. Skema Pengukuran Morfometrik <i>Nemacheilus</i> sp.	29
7. Skema Pengukuran Meristik <i>Nemacheilus</i> sp.	31
8. <i>N. fasciatus</i> hasil pengamatan	40
9. Hasil elektroforesis sampel <i>N. fasciatus</i>	44
10. Keragaman Haplotipe <i>N. fasciatus</i>	51
11. Filogenetik <i>N. fasciatus</i>	55
12. Filogenetik <i>N. fasciatus</i> dibandingkan dengan Spesies lain	56
13. Diagram Kecepatan Arus dan DO	59
14. Diagram pH	62
15. Diagram TOM	62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2 Persebaran <i>Nemacheilus</i> sp. di Indonesia	8
3 Kajian Pustaka Mengenai Identifikasi <i>Nemacheilus fasciatus</i>	25
4 Lokasi Sampling.....	27
5 Karakter Morfometrik <i>N. fasciatus</i>	30
6 Pengukuran Kualitas Air, Metode dan Tempat Pengukuran.....	36
7 Kategori Nilai Keragaman Genetik	38
8 Sekuen Genus <i>Nemacheilus</i> dari GenBank	39
9 Karakter Meristik <i>N. fasciatus</i>	41
10 Hasil Uji MANOVA	42
11 Identifikasi Sampel Menggunakan BLAST	45
12 Komposisi Basa Genus <i>Nemacheilus</i>	46
13 Komposisi Basa Masing-masing Sampel <i>N. fasciatus</i>	47
14 Probabilitas Substitusi Nukleotida dengan Analisis ML	48
15 Indeks Keragaman Haplotipe (<i>Hd</i>) dan Nukleotida (π).....	50
16 Jarak Genetik Antar Populasi <i>N. fasciatus</i>	53
17 Jarak Genetik dalam Populasi <i>N. fasciatus</i>	53
18 Analisis <i>Fixation Index (Fst)</i> <i>N. fasciatus</i>	54
19 Ketinggian Lokasi Pengambilan Sampel	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
20 Hasil Penghitungan Karakter Meristik <i>N. fasciatus</i>	79
21 Hasil Penghitungan Karakter Morfometrik <i>N. fasciatus</i>	80
22 Hasil Penghitungan Data <i>Truss Morphometric</i>	82
23 Jarak Genetik <i>N. fasciatus</i>	84
24 Hasil BLAST Sampel Ponorogo 1.....	85
25 Hasil BLAST Sampel Ponorogo 2.....	86
26 Hasil BLAST Sampel Ponorogo 3.....	87
27 Hasil BLAST Sampel Blitar 1.....	88
28 Hasil BLAST Sampel Blitar 2.....	89
29 Hasil BLAST Sampel Blitar 3.....	90
30 Hasil BLAST Sampel Blitar 4.....	91
31 Hasil BLAST Sampel Blitar 5.....	92
32 Hasil BLAST Sampel Pasuruan 1.....	93
33 Hasil BLAST Sampel Pasuruan 2.....	94
34 Hasil BLAST Sampel Pasuruan 3.....	95
35 Hasil BLAST Sampel Pasuruan 4.....	96
36 Hasil BLAST Sampel Pasuruan 5.....	97
37 Hasil BLAST Sampel Lumajang 1.....	98
38 Hasil BLAST Sampel Lumajang 2.....	99
39 Kromatogram Sampel Ponorogo 1.....	100
40 Kromatogram Sampel Ponorogo 2.....	101
41 Kromatogram Sampel Ponorogo 3.....	102
42 Kromatogram Sampel Blitar 1.....	103
43 Kromatogram Sampel Blitar 2.....	104



44 Kromatogram Sampel Blitar 3 105

45 Kromatogram Sampel Blitar 4 106

46 Kromatogram Sampel Blitar 5 107

47 Kromatogram Sampel Pasuruan 1 108

48 Kromatogram Sampel Pasuruan 2 109

49 Kromatogram Sampel Pasuruan 3 110

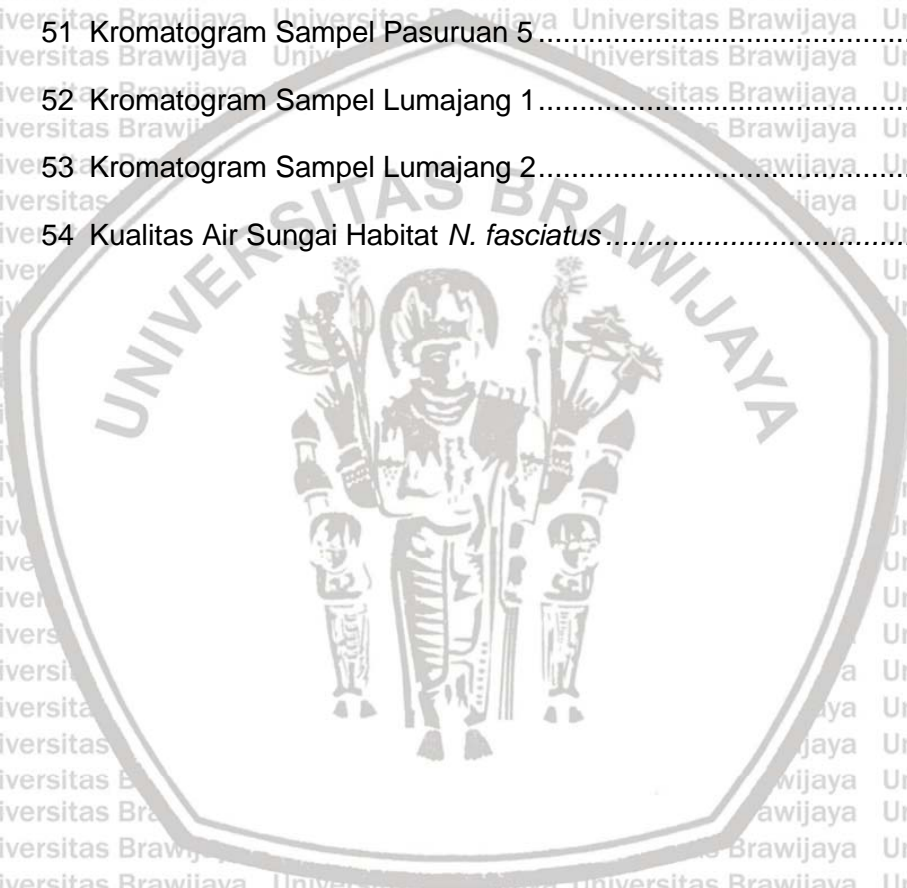
50 Kromatogram Sampel Pasuruan 4 111

51 Kromatogram Sampel Pasuruan 5 112

52 Kromatogram Sampel Lumajang 1 113

53 Kromatogram Sampel Lumajang 2 114

54 Kualitas Air Sungai Habitat *N. fasciatus* 115



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman sumber daya hayati Indonesia sangat tinggi yaitu sebanyak 1210 jenis (Froese dan Pauly, 2014). Kepadatan spesies air tawar yang dimiliki Indonesia adalah yang tertinggi di dunia (0,6 spesies per 1000 km²), di atas Brazil (0,37 spesies per 1000 km²) dan Republik Demokratik Kongo (0,48 spesies per 1000 km²) (Hubert *et al.*, 2015). Di antara tiga pulau besar, Jawa menunjukkan kepadatan spesies tertinggi dengan 1,7 spesies per 1000 km² (total 213 spesies), di atas Kalimantan (1,2 spesies per 1000 km² untuk total 646 spesies) dan Sumatra (1,7 spesies per 1000 km² dengan total 460 spesies) (Dahrudin *et al.*, 2016).

Ikan uceng (*Nemacheilus fasciatus*) tergolong ke dalam famili Nemacheilidae dan genus *Nemacheilus* (Kottelat, 2013). Ikan ini merupakan ikan air tawar asli Indonesia yang populasinya tersebar di wilayah Jawa dan Sumatera. *Nemacheilus fasciatus* merupakan salah satu spesies air tawar endemik dan terbiasa hidup liar (Nurhidayat *et al.*, 2017). Permintaan pasar di beberapa daerah terhadap ikan ini meningkatkan aktivitas penangkapan ikan *N. fasciatus* di sungai, sehingga apabila dilakukan penangkapan secara terus menerus populasinya di alam akan semakin menurun (Risyanto *et al.*, 2012). Sebagai spesies air tawar, habitatnya terancam oleh aktivitas manusia seperti penambangan, penebangan, konversi lahan, pencemaran dan eksploitasi berlebihan oleh perikanan darat sehingga merusak *feeding ground* dan *spawning ground* (Normile 2010; Fraser 2006; Clements *et al.* 2006, Sodhi *et al.* 2010).

Salah satu langkah untuk menekan penurunan populasi ikan adalah dengan cara budidaya. Perlu dilakukan perencanaan manajemen budidaya berkelanjutan yang bisa dimulai dengan tahap domestikasi (Nguyen *et al.*, 2008;

De Bruyn *et al.*, 2013). Proses domestikasi *N. fasciatus* sedang giat dilakukan di daerah Kabupaten Temanggung (KKP, 2016). Menurut Muchlisin *et al.*, (2015), proses domestikasi merupakan salah satu langkah penting dalam program pengembangan ikan-ikan liar menjadi ikan target budidaya. Spesies *N. fasciatus* masih jarang diteliti di Indonesia. Penelitian ikan *N. fasciatus* di Indonesia yang telah dilakukan yaitu mengenai biologi ikan tersebut (Risyanto *et al.*, 2012; Wijaya *et al.*, 2018), aspek reproduksi (Nurhidayat *et al.*, 2017) dan pola pertumbuhannya (Prakoso *et al.*, 2017). Dahruddin *et al.* (2016) meneliti keanekaragaman spesies ikan air tawar secara umum di Jawa dan Bali, dimana spesies *N. fasciatus* termasuk dalam cakupan penelitiannya. Hadiaty (2014), melakukan pendataan taksonomis melalui karakter morfologi secara menyeluruh terhadap genus *Nemacheilus* di Indonesia yang selanjutnya menjadi rujukan utama penelitian ini.

Beberapa penelitian di negara lain tentang ikan yang masih satu famili dengan ikan *N. fasciatus* ini di antaranya *N. oedipus* (Kottelat, 1988), *N. evezardi* (Pati dan Agrawal, 2002; Biswas dan Ramteke; 2008), *N. mooreh* (Kharat *et al.*, 2008), *N. tebo* (Hadiaty dan Kottelat, 2009), *N. stigmofasciatus* (Arunachalam dan Muralidharan, 2009), *N. marang* (Hadiaty dan Kottelat, 2010), *N. pallidus* (Aoyama *et al.*, 2011), *Turcinoemacheilus kosswigi* (Esmaili *et al.*, 2012), *N. elegantissimus* (Chin dan Samat, 1992), Genus *Oxyemacheilus* (Sayyadzadeh *et al.*, 2016), *N. tubrigum* (Hadiaty dan Siebert, 2001). Acharjee dan Barat (2014) mengkaji beberapa spesies *Nemacheilus* sp. di beberapa daerah di India sehubungan dengan prospeknya sebagai ikan hias ornamental.

Spesies-spesies dalam famili *Nemacheilidae* memiliki kemiripan morfologi yang cukup tinggi satu sama lain (Jamshidi *et al.*, 2013) sehingga banyak ditemukan permasalahan taksonomis pada penempatan tingkat spesiesnya (Tang *et al.*, 2006). Hal tersebut dikarenakan oleh sulitnya mengidentifikasi famili

Nemacheilidae berdasarkan karakteristik morfologi sehingga membutuhkan validasi taksonomi melalui molekuler (Keskar *et al.*, 2014) untuk konfirmasi spesies dan mengetahui kekerabatannya.

Pengecekan spesies dan kekerabatan genetika dapat dilakukan dengan menggunakan DNA *barcoding*. DNA *barcoding* memberikan kecepatan dan keakuratan dalam identifikasi spesies dengan fokus analisis pada segmen kecil dari mtDNA (Muchlisin *et al.*, 2013; Karim *et al.*, 2015). DNA *barcoding* dapat menjadi solusi krisis taksonomi saat ini (Meier *et al.*, 2006) dan telah banyak dikembangkan untuk mengidentifikasi spesies, karena relatif mudah dilakukan dibandingkan teknik lainnya (Wong dan Hanner, 2008).

Salah satu penanda yang dapat digunakan dalam DNA *barcoding* adalah gen Cytochrome Oxidase subunit I (COI) yang merupakan salah satu dari beberapa penanda dalam DNA mitokondria (mtDNA). Gen COI merupakan penanda standar untuk taksonomi dan identifikasi (Hebert *et al.*, 2003).

COI tidak mengalami variasi yang besar, memiliki struktur yang kuat dan tidak mengalami pengulangan nukleotida yang sering (Hebert *et al.*, 2003).

Sifatnya diturunkan dari salah satu parental, berlokus tunggal dan menunjukkan tingkat diskriminasi yang tinggi (Kartavtsev *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014).

Apikasi DNA *barcode* menggunakan gen COI untuk identifikasi spesies pada Nemacheilidae telah berhasil dilakukan oleh beberapa peneliti diantaranya oleh Patil *et al.* (2016) di India, Sayyadzadeh *et al.* (2016) di Iran, Pandey (2016) di India dan Dahruddin *et al.*, (2016) di perairan sungai di Jawa Tengah. Namun sejauh ini analisis tentang identifikasi morfologi dan karakteristik genetik menggunakan COI di beberapa perairan sungai di Jawa Timur belum dilakukan.

Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi *N. fasciatus* di Jawa Timur dan menganalisis karakteristik genetiknya menggunakan gen COI sebagai penanda genetik.

1.2 Rumusan Masalah

Proses domestikasi merupakan salah satu langkah penting dalam program pengembangan ikan-ikan liar menjadi ikan target budidaya. Umumnya identifikasi dari beberapa spesies ikan termasuk spesies *N. fasciatus* masih berdasarkan pada karakter morfologi, hal ini cukup sulit mengingat kemiripan ciri morfologi antar spesies. Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi molekuler untuk identifikasi spesies dan sebagai dasar dalam melakukan analisis karakteristik genetik dan kekerabatan spesies sesuai dengan domain utama pada riset ini.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut:

1. Bagaimana identifikasi spesies *N. fasciatus* berdasarkan karakter morfologi?
2. Bagaimana identifikasi spesies *N. fasciatus* berdasarkan gen Cytochrome Oxidase subunit I (COI) sebagai penanda molekuler?
3. Bagaimana karakteristik genetik *N. fasciatus* berdasarkan gen Cytochrome Oxidase subunit I (COI)?

1.3 Tujuan Penelitian

Identifikasi morfologi, karakteristik genetik dan hubungan kekerabatan suatu individu penting untuk mendukung program domestikasi spesies yang selanjutnya diharapkan dapat menunjang keberhasilan budidaya. Berdasarkan rumusan masalah yang diuraikan maka penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengidentifikasi spesies dari *N. fasciatus* berdasarkan karakter morfologi.
2. Mengidentifikasi spesies dari *N. fasciatus* berdasarkan gen Cytochrome Oxidase subunit I (COI).
3. Menganalisis karakteristik genetik *N. fasciatus* berdasarkan gen Cytochrome Oxidase subunit I (COI) sebagai penanda molekuler.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dapat diperoleh dari penelitian ini antara lain sebagai berikut:

1. Memberi penilaian kemampuan sekuen gen sebagai DNA *barcoding* standar dalam penggunaannya untuk mengidentifikasi spesies ikan secara genetik melalui *Barcode of Life Database (BOLD)*.
2. Menemukan variasi sekuen dari sampel *N. fasciatus* yang diperoleh dari satu lokasi dengan lokasi lainnya di beberapa perairan sungai di Jawa Timur.
3. Aplikasi praktis oleh peneliti taksonomis maupun non-taksonomis untuk kepentingan di masa depan, termasuk dalam pengelolaan sumberdaya ikan *N. fasciatus* melalui domestikasi dan budidaya berkelanjutan.

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2019 sampai Juni 2019. Pengambilan sampel dilakukan di beberapa aliran sungai di Jawa Timur yaitu di daerah Ponorogo, Blitar, Pasuruan dan Lumajang. Isolasi DNA, uji kualitatif dan kuantitatif DNA dan amplifikasi dilakukan di Laboratorium Ilmu Sentral Hayati, Universitas Brawijaya, Malang.

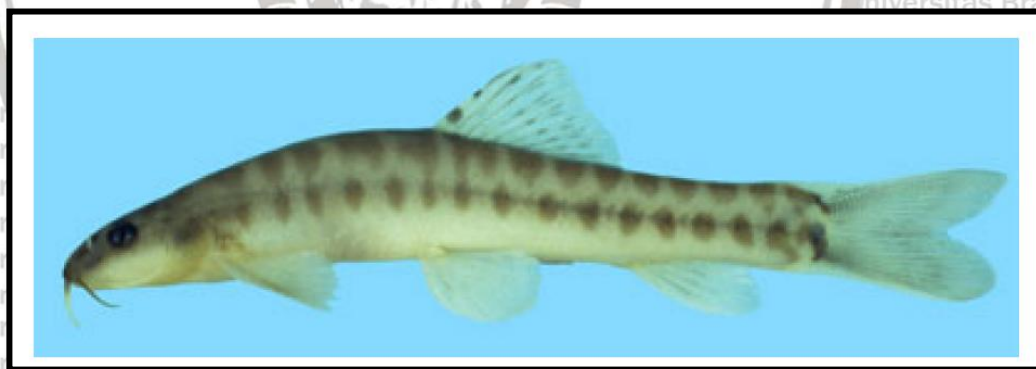
2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Nemacheilus fasciatus*

2.1.1. Klasifikasi dan Morfologi *Nemacheilus fasciatus*

Secara taksonomi ikan uceng (*N. fasciatus*) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Class : Actinopterygii
Order : Cypriniformes
Family : Nemacheilidae
Genus : *Nemacheilus*
Spesies : *Nemacheilus fasciatus*
Nama lokal : Ikan Uceng



Gambar 1. *Nemacheilus fasciatus* (Hadiaty, 2014)

Menurut Kottelat *et al.* (1993), genus *Nemacheilus* memiliki lebih dari 450 spesies dengan distribusi di wilayah Cina bagian selatan dan Asia Tenggara, Baluchistan, Irian Barat dan Afrika Timur. Ikan ini memiliki bentuk morfologi yang ditandai dengan sirip punggung yang agak pendek (7 atau 8 cabang), garis longitudinal membentuk sebuah band diseluruh tubuh ke arah sirip ekor, bola

mata berwarna hitam besar. Lubang hidung (nostril) dekat satu sama lain, tubular tapi tidak diperpanjang sebagai sungut. Mulut setengah lingkaran, bibir agak berdaging, sangat berkerut, bibir atas dengan sepasang barbel. Pada *N. fasciatus* jantan bentuk tubuhnya lebih langsing dengan pewarnaan tubuh yang lebih cerah dibanding betina. Ekor jantan biasanya berwarna merah sedangkan hal yang sama tidak ditemukan pada *N. fasciatus* betina.

N. fasciatus tergolong ke dalam famili Nemacheilidae dan genus Nemacheilus. Ukuran badannya kecil, panjang maksimalnya hanya mencapai 10 cm. Ikan ini bentuknya kurus, bulat, kecil dan memiliki garis-garis pada badannya, dan beberapa sungut pada ujung mulutnya. Selain dimanfaatkan untuk ikan konsumsi, ikan ini juga diperdagangkan sebagai ikan hias (Prakoso *et al.*, 2016).

2.1.2. Habitat dan Penyebaran *Nemacheilus* sp.

Ikan *N. fasciatus* sangat susah ditangkap karena habitatnya perairan berbatu hingga perairan berkerikil dan ukuran tubuh yang kecil (Risyanto *et al.*, 2012). *N. fasciatus* dengan badan memanjang, ditemukan pada perairan dengan kandungan oksigen terlarut tinggi, hidup di tepi sungai pada bagian dangkal dan dasar sungai batu, kerikil dan pasir. Spesies ini mampu berenang dengan melawan arus (Brown, 1975 dalam Kottelat *et al.*, 1993). Ikan ini hidup di air dengan aliran yang cukup deras dan banyak spesies yang hanya ditemukan di aliran air sungai yang deras dekat dengan sumber mata air pegunungan.

Kebanyakan spesies dalam grup ini dikenal sebagai ikan hias (Pandey *et al.*, 2016).

Ikan ini merupakan ikan asli Indonesia yang populasinya tersebar di wilayah Jawa dan Sumatera. Distribusi ikan *N. fasciatus* di dunia tidak begitu luas. Ikan ini hidup di sungai yang airnya mengalir agak deras dengan dasar

berbatuan sebagai tempat berlindung (Prakoso *et al.*, 2016). Penyebaran spesies *N. fasciatus* yang pernah diteliti oleh Hadiaty (2014) di Jawa Tengah antara lain di Purwokerto dan Temanggung. Sedangkan di Jawa Timur antara lain di kawasan karst Tuban, karst Pacitan, Blitar dan Kediri. Persebaran ikan dari genus *Nemacheilus* di Indonesia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Persebaran *Nemacheilus* sp. di Indonesia (Hadiaty, 2014)

No.	Spesies	Tempat Penyebaran
1.	<i>N. tuberigum</i>	Suaq Balimbing, Ketambe
2.	<i>N. fasciatus</i>	TN. Bukit Barisan, Metro, Lahat, Muara Enim, Bogor, Sukabumi, Karst Gunung Sewu, Purwokerto, Temanggung, Tuban, Pacitan, Blitar
3.	<i>N. selangoricus</i>	Bangka, Belitung, Mandor, Banjarmasin, Kotawaringin Barat, Lahat, Muara Enim, Muara Sabak
4.	<i>N. chrysolaimos</i>	Bogor, Bandung
5.	<i>N. kapuasensis</i>	Sangkalirang, Tabalar
6.	<i>N. longipectoralis</i>	Kutai Kartanegara
7.	<i>N. marang</i>	Sangkalirang
8.	<i>N. spiniferus</i>	Murung Raya, Palangkaraya, Kotawaringin Timur, Kotawaringin Barat, Sangkulirang, Tabalar, Kutai Barat, Kutai Kartanegara
9.	<i>N. tebo</i>	Sangkalirang
10.	<i>Nemacheilus</i> nsp.	Kotawaringin Barat

Ikan ini susah ditemukan di alam liar. Seperti halnya ikan sungai yang lain, pada sore hari biasanya ikan *N. fasciatus* mulai keluar dari persembunyiannya menuju perairan dangkal untuk mencari makan. Hal tersebut berlangsung sampai malam hari. *N. fasciatus* akan kembali ke persembunyian dan keluar kembali antara jam 4 dini hari sampai dengan jam 6 pagi (Budiharjo, 2003).

2.1.3. Kebiasaan Makan *Nemacheilus fasciatus*

Ikan *N. fasciatus* termasuk omnivora berdasarkan makanannya, akan tetapi banyak terjadi ketidaksesuaian yang disebabkan oleh keadaan habitat

hidup ikan itu. Faktor-faktor yang mempengaruhi pola kebiasaan makanannya diantaranya faktor penyebaran organisme sebagai makanan ikan, faktor ketersediaan makanan, faktor pilihan dari ikan itu sendiri serta faktor-faktor fisik yang mempengaruhi perairan. Kelompok ikan herbivora atau detritivora cenderung memakan detritus dan plankton sebagai makanan utamanya, berbeda dengan ikan herbivora, kelompok ikan omnivora lebih cenderung memakan makanan alami berupa serangga air, udang, anak ikan dan tumbuhan air karnivora makanan utamanya ialah udang dan anak ikan (Esther dan Stevens, 2008).

Menurut Fishbase (2010), makanan ikan ini di alam adalah organisme bentik dan detritus. Pengetahuan kebiasaan makan ikan *Nemacheilus* sp. di habitat aslinya sangat menentukan dalam mendukung keberhasilan proses pengembangan budidaya.

Pengetahuan dasar mengenai kebiasaan makan dan kecenderungan memilih makanan (*food preference*) pada suatu spesies merupakan hal yang penting untuk memastikan kesesuaiannya di lingkungan budidaya (Kishore *et al.*, 1998). Studi kebiasaan makan dari habitat aslinya juga membantu memahami autoekologi, produksi dan peran ekologi pada populasi ikan. Bahkan kebiasaan makan memiliki pengaruh terhadap tingkah laku pemijahan ikan. (Sabu *et al.*, 2013).

2.2 Karakter Morfologi

Pengamatan morfologi termasuk diantaranya pengukuran morfometrik dan meristik, pengamatan pola warna dan ciri khusus. Pengamatan morfologi berguna dalam menentukan spesies, seksualitas, umur ikan dan sebagainya yang dipengaruhi oleh banyak faktor diantaranya musim, habitat, kematangan gonad, seksualitas dan pakan. Panjang total pada ikan berhubungan dengan

umur, diferensiasi berdasarkan ukuran dalam populasi dan seksualitas. Morfologi ikan merupakan parameter utama dalam identifikasi dan digunakan sebagai dasar penelitian secara umum (Sabu *et al.*, 2013).

Karakter morfometrik adalah karakter yang berkaitan dengan ukuran tubuh atau bagian tubuh. Ukuran ini berupa jarak antara satu bagian tubuh dengan bagian tubuh yang lain dan disebut dengan ukuran mutlak. Ukuran mutlak dari setiap individu berbeda-beda. Perbedaan ini disebabkan oleh umur, jenis kelamin dan faktor-faktor lingkungan (Affandi *et al.*, 1992). Faktor lingkungan (misalnya ketersediaan makanan, suhu dan salinitas) merupakan faktor yang berpengaruh pada pertumbuhan ikan, oleh karena itu dalam morfometrik digunakan ukuran perbandingan atau persen dari panjang baku (PB), panjang kepala (PK) atau karakter lain.

Morfometrik adalah studi yang bersangkutan dengan variasi dan perubahan dalam ukuran dan bentuk dari organisme yang didasarkan pada sekumpulan data pengukuran yang mewakili variasi bentuk dan ukuran ikan (Turan, 1998). Dalam pengukuran morfologi digunakan untuk mengukur ciri-ciri khusus dan hubungan variasi suatu taksonomi dalam stok populasi ikan (Misra dan Easton, 1999).

Karakter meristik adalah karakter yang berkaitan dengan bagian tubuh yang dapat dihitung, misalnya ruas tulang belakang, barisan sisik, jari-jari lemah dan duri sirip. Moyle dan Cech (1988) mengemukakan bahwa seringkali terdapat variasi pada karakter-karakter ini dalam satu spesies. Variasi-variasi ini dapat disebabkan oleh kondisi perkembangan larva ikan, faktor lingkungan dan ketersediaan makanan.

2.3 Karakteristik Genetik

Karakteristik genetik sangat penting untuk menjaga stabilitas dan keberlanjutan populasi (Ferguson *et al.*, 1995) serta memiliki dampak langsung dan tidak langsung pada populasi, komunitas, dan ekosistem (Hughes *et al.*, 2008).

Keanekaragaman genetik dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Perubahan ini mungkin dapat mempengaruhi fenotipe suatu organisme yang dapat dipantau dengan mata telanjang, atau mempengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu. Secara umum keanekaragaman genetik dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain (Dudu *et al.*, 2017). Hilangnya keragaman genetik mengurangi kemampuan spesies untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan (Frankham, 1999).

Sumber-sumber gen dari berbagai organisme dapat dilacak dan dipindahkan ke organisme lain untuk tujuan perbaikan penampilan organisme tersebut (*genetically modified organisms*). Banyak yang masih menganggap keanekaragaman hanya dilihat dalam keseharian saja sebagai fenotipe yang terlihat tanpa melihat manfaat yang dapat diambil dari keanekaragaman genotip. Dalam keanekaragaman yang tinggi menyimpan gen berpotensi yang tinggi pula (Suryanto dan Suwanto, 2001).

2.4 DNA Barcoding

DNA *barcoding* diusulkan pertama kali oleh Hebert *et al.*, (2003), yang menyatakan bahwa semua spesies organisme dapat diidentifikasi dengan menggunakan sekuen pendek dari sebuah gen yang posisinya di dalam genom telah terstandarisasi (disepakati bersama) yang disebut sebagai 'DNA *barcoding*'.

Istilah DNA *barcoding* dimaksudkan untuk menjelaskan sebuah sistem identifikasi berdasarkan sekuen DNA dari satu atau beberapa lokus yang

digunakan bersama sebagai unit komplementer (Kress dan Erickson, 2007). DNA *barcoding* merupakan alat untuk identifikasi taksonomik yang memanfaatkan region DNA standar pendek yang ada secara universal dan variatif dalam membedakan spesies satu dengan yang lain (Savolainen *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2007).

Teknik ini sangat berfungsi dalam mengeksplorasi sampel yang sulit diidentifikasi. DNA *barcoding* adalah metode yang menjanjikan identifikasi spesies hewan dengan cepat dan akurat berdasarkan urutan gen mitokondria c oksidase subunit (COI). Tujuan dari DNA *barcoding* adalah untuk mengidentifikasi secara cepat dan akurat dari organisme yang *barcode*-nya telah terdata di (gene bank) pustaka sekuens. Teknik DNA *barcoding* digunakan untuk mengidentifikasi spesies, karena relatif mudah dilakukan dibandingkan teknik lainnya (Wong dan Hanner, 2008).

Pada hewan, barcode DNA didasarkan pada urutan 658 fragmen pasangan-basa dari gen mitokondria, sitokrom c oksidase subunit 1 (COI) (Hebert *et al.*, 2003). Urutan sekuen ini dapat dibandingkan terhadap database sekuen yang diketahui dari referensi spesimen untuk mendapatkan identifikasi spesies (Ekrem *et al.*, 2007). Karena metode ini tergantung pada pendekatan molekuler daripada pada morfologi, itu dapat diterapkan pada organisme dari setiap tahap kehidupan dari telur hingga dewasa. Ini juga bertujuan untuk menggunakan standar protokol yang dapat diterapkan ke berbagai organisme oleh individu yang memiliki minimum jumlah keahlian teknis dan tanpa perlu untuk pengetahuan luas tentang morfologi tradisional taksonomi. Data urutan dan spesimen disimpan dan tersedia di Barcode of Life Data Database System (BOLD) (Ratnasingham dan Hebert 2007).

Penggunaan DNA *barcoding* dapat bersifat praktis diaplikasikan (Stocle *et al.*, 2011) maupun sebagai perangkat untuk mendukung penelitian-penelitian

lainnya (Ebihara, 2010) dengan memilih satu atau beberapa lokus yang dapat disekuens secara rutin dan dapat diandalkan untuk mengidentifikasi sampel dalam jumlah banyak dan beragam serta mudah dibandingkan antar spesies. Selain untuk identifikasi takson-takson kriptik (Jaafar *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*, 2008), DNA *barcoding* memiliki fungsi-fungsi aplikatif misalnya untuk melihat karakteristik genetik, pengecekan keragaman genetik dan kekerabatan (Ginneken *et al.*, 2017), survei ekologi (Dick dan Kress, 2009), konfirmasi identitas sampel-sampel (Xue dan Li, 2011) serta analisis filogenetik dan laju evolusi (Trontelj *et al.*, 2005; Mayden *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2011; Kusuma *et al.*, 2016).

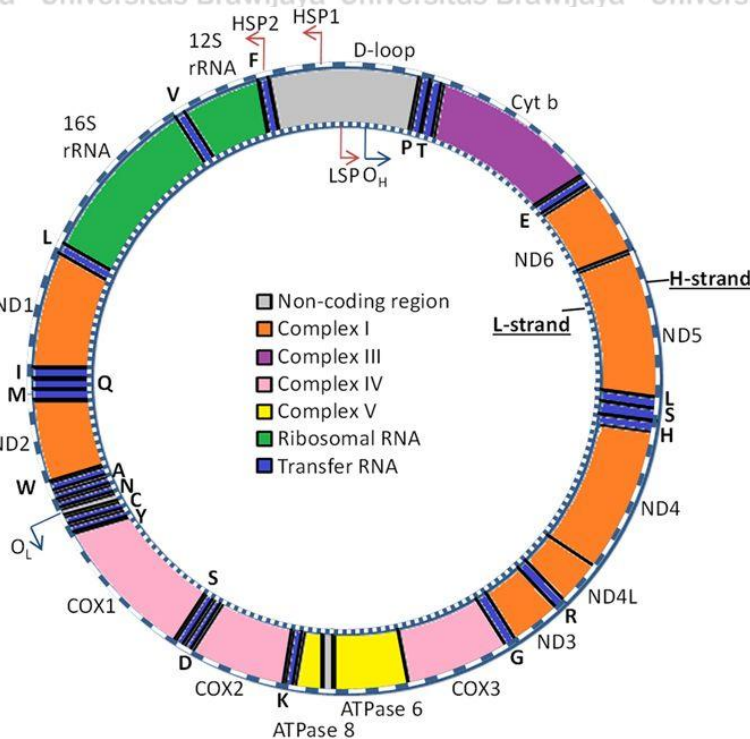
2.5 DNA Mitokondria (mtDNA)

Selain berasal dari DNA inti, sumber DNA dapat pula diperoleh dari organel-organel sitoplasmik salah satunya adalah mitokondria (mtDNA). mtDNA adalah DNA berbentuk sirkuler dan berutas ganda yang ada di dalam mitokondria yaitu organel sel yang berperan dalam metabolisme sel. Ukuran mtDNA sangat pendek, biasanya kurang dari 17.000 pb (pasang basa), contohnya saja pada spesies *Rasbora aprotaenia* memiliki ukuran 16,541 bp, *Rasbora lateristriata* 16,539 bp (Kusuma and Kumazawa, 2015) yang tersusun atas gen yang mengontrol metabolisme selular.

Jika DNA inti setengahnya diperoleh dari garis maternal dan setengah yang lain dari paternal, maka mtDNA seluruhnya berasal dari garis maternal.

Dalam setiap molekul DNA terdapat ratusan kopi empat basa nitrogen yaitu Adenin (A), Guanin (G), Sitosin (C) dan Timin (T). Keempat basa tersebut berasal dari dua kelompok basa yaitu kelompok purin (terdiri dari A dan G) dan kelompok pirimidin (terdiri dari C dan T). Berdasarkan kandungan basa guaninnya, mtDNA dibagi menjadi dua untai (Liu *et al.*, 2014) yaitu untai yang

kaya G disebut untai berat (*heavy strand*) dan yang mengandung sedikit G disebut untai ringan (*light strand*). COI merupakan salah satu gen penyandi mtDNA untai berat (Reyes *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2014). Struktur mtDNA seperti terlihat pada Gambar 2 berikut:



Gambar 2. Struktur mtDNA eukariot

2.6 Cythochrome Oxidase Sub Unit I (COI)

Teknik identifikasi berdasarkan DNA telah sangat berkembang dan sangat bermanfaat dalam proses analisis (Zhang *et al.*, 2004, Teletchea, 2009).

Sebagai metode yang distandarisasi dan universal, sistem identifikasi dengan *barcode* DNA sangat mendukung guna menentukan spesies dan keanekaragaman secara biologi (Hebert *et al.*, 2004). Beberapa taksa hewan, perbedaan sekuen dalam region 5' dari gen mitokondria COI secara umum lebih besar antar spesies daripada inter spesies. Sehingga disarankan pendekatan secara ekstensif dapat diterapkan di antara jarak filogenetik kelompok hewan (Lambert *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006; Neigel *et al.*, 2007).

Hollingsworth *et al.* (2011) menerangkan tiga prinsip *barcode* DNA yaitu standarisasi, minimalisasi dan skalabilitas. Penerjemahan ketiga hal ini ke dalam pemilihan region DNA untuk *barcode* mencakup pemilihan satu atau beberapa lokus yang dapat disequen secara rutin dan dapat diandalkan untuk sampel dalam jumlah besar dan beragam. Hasilnya harus mudah dibandingkan antara satu spesies dengan spesies lainnya. Kriteria-kriteria di atas sudah dipenuhi oleh gen mitokondria COI sebagai *barcode* DNA universal pada hewan (Hebert *et al.*, 2003). Gen COI merupakan region yang mengkode protein dalam jumlah salinan yang banyak dalam sel. Gen ini tidak mengalami variasi panjang yang besar, struktur sekunder yang kuat, maupun perulangan nukleotida tunggal yang cukup rapat (Hollingsworth *et al.*, 2011).

Gen COI merupakan salah satu gen yang dapat digunakan sebagai penanda genetik dalam studi molekuler untuk mempelajari karakteristik genetik antar spesies maupun antar individu. Identifikasi spesies melalui DNA *barcode* untuk spesies hewan adalah fragmen 658 bp dari gen COI. DNA *barcode* ini telah sukses mengidentifikasi spesies berbagai invertebrata dan vertebrata dari Leiodoptera sampai burung dan dalam geografi yang berbeda (Hajibabaei *et al.*, 2006). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sistem identifikasi hewan berdasarkan gen COI cukup efektif. Genom mitokondria dari spesies yang berkerabat dalam satu filum yang dibandingkan menunjukkan diversitas yang cukup untuk membedakan antar hewan tersebut.

Karakteristik penting yang harus diperhatikan sebagai marka genetik adalah laju substitusi nukleotida/asam amino pada daerah-daerah tertentu. Gen COI memiliki karakteristik khusus yang sesuai sebagai alat dalam kajian evolusioner yaitu:

1. Sebagai pengkatalis terakhir di mitokondria, sehingga COI banyak dikaji pada level biokimia dan menunjukkan bahwa struktur dan ukuran gen COI terkonservasi pada semua organisme aerobik (Lunt *et al.*, 1996).

2. Runutan asam amino berkorelasi dengan fungsi masing-masing bagian COI sehingga menunjukkan karakteristik bagi spesies yang memilikinya (Roe dan Sperling, 2007).

3. Sekuen 658 basepair (bp) pada ujung 5' diusulkan sebagai *barcode* hewan (Hebert *et al.*, 2003). Barcode tersebut telah berhasil dibuktikan kemampuannya sebagai pembeda antar spesies.

Keberadaan asam amino COI pada mitokondria berhubungan erat dengan dua fungsi yaitu sebagai bagian struktural membran dalam mitokondria (*protein trans membrane*) dan akseptor (penerima) elektron terakhir dalam rantai respirasi sel. Sebagai bagian struktural, COI berupa polipeptida yang berlipat beberapa kali menembus dwilapis lipid membran. Lunt *et al.*, (1996) telah mengeksplorasi gen COI dalam hubungannya dengan pola evolusi dan primer *conserve* untuk kajian filogeni. Ternyata berdasarkan strukturnya, laju evolusi pada setiap bagian dari asam amino bervariasi. Hal ini berhubungan dengan fungsi bagian-bagian tersebut. Oleh karena itu, penggunaan segmen DNA COI untuk tujuan yang sama, sangat bergantung pada fragmen yang dipergunakan.

Gen COI merupakan salah satu gen dalam kompleks fragmen sitokrom oksidase yang berperan dalam proses respirasi sel. Fragmen asam amino COI termasuk wilayah fragmen yang dipertahankan sehingga memungkinkan dibuat primer universal dari wilayah tersebut. Fragmen COI jarang mengalami substitusi asam amino akan tetapi perubahan silent (perubahan yang tidak mengubah fungsi asam amino) sering terjadi. Hal tersebut yang menyebabkan fragmen asam amino COI berguna untuk merekonstruksi filogenetik pada cabang evolusi di bawah tingkat spesies (Palumbi, 1996).

Hebbert *et al.* (2003), menyatakan bahwa tidak ada alasan yang memaksakan pada suatu spesifik gen. Akan tetapi penggunaan gen COI memiliki 2 keuntungan. Pertama adalah primer universal dari gen ini sangat kuat, kedua COI memiliki rentangan tanda pylogenetik yang lebih baik dibandingkan dengan gen mitokondria lain.

2.7 Filogenetik

Filogenetik merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menggambarkan hubungan kekerabatan antar taksa. Filogenetik dapat disusun berdasarkan karakter morfologi dan molekular. Filogenetik molekular menggunakan data urutan nukleotida untuk menyusun hubungan kekerabatan serta struktur evolusi suatu taksa (Thacker, 2003; Willet *et al.*, 1995).

Filogenetik atau pohon evolusi merepresentasikan jarak evolusi antara organisme. Pohon terdiri dari *nodes* atau *vertices* yang dihubungkan dengan *edges* atau cabang. *Nodes* merepresentasikan sekuens atau organisme berdasarkan data yang digunakan. *Edge* menghubungkan *nodes* dan internal *nodes*. Panjang dari *edge* disebut *edge length* atau bobot. Internal *nodes* merupakan hipotesa dari leluhur *nodes*. *Node* yang tidak mempunyai *child* disebut *leaf*. Leluhur atau nenek moyang dari seluruh sekuens dalam kelompok organisme yang ada di dalam pohon merupakan *root* atau akar dari pohon yang terdapat di tengah pohon. Pohon filogenetik dibuat berdasarkan kemiripan dan perbedaan karakteristik fisik atau genetik kelompok organisme. Pohon ini digunakan untuk mempelajari sejarah evolusi dan dapat diaplikasikan untuk membuat sistematika biologi, seperti pohon kehidupan. Selain itu pohon ini dapat digunakan untuk mencari fungsi dari suatu gen atau protein, riset medis dan epidemiologi seperti HIV dan studi evolusi (Baxevanis dan Ouellette, 2001).

Terdapat banyak metode untuk memvisualisasikan pohon filogenetik, beberapa

macam topologi yang biasa digunakan dalam pohon filogenetik adalah *phylogram*, *radial* dan *cladogram* (Munzer *et al.*, 2003), serta *radial* dan *circular* (Bachmaier, 2005).

Hasil penelitian DNA *barcoding* menghasilkan urutan DNA parsial dapat dilihat pada pangkalan data bertaraf dunia (*GenBank*) yang menyimpan data DNA, RNA dan protein lainnya yang dapat diakses secara gratis. Data di *GenBank* tersimpan dalam bentuk file elektronik dengan format tertentu, misalkan FASTA yaitu data berdasarkan teks.

Filogenetik molekular mempunyai beberapa fungsi penting, antara lain :

(1) mengetahui identitas suatu jenis organisme, (2) mengetahui pewarisan keturunan (paternitas dan maternitas), (3) mengetahui hubungan kekerabatan di dalam suatu kelompok atau populasi, (4) mengetahui perbedaan pada populasi atau subspecies yang berbeda geografis, (5) mengetahui hubungan diantara spesies yang terisolasi dalam pohon kehidupan suatu organisme (Thacker, 2003). Keunggulan filogenetik dengan menggunakan data molekular dibandingkan data morfologi adalah dapat membedakan taksa yang sulit diamati karakteristik morfologinya (Shearer & Coffroth, 2008).

3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Landasan Teori

Krisis keanekaragaman hayati saat ini (Novacek dan Cleland, 2001; Bellwood *et al.*, 2004) dan kehilangan keanekaragaman hayati secara cepat telah mendorong usaha mendaftarkan semua keanekaragaman hayati di bumi dalam kurun waktu 25 tahun ke depan dan usaha konservasi (Wilson, 2003). Salah satu keanekaragaman yang dimiliki Indonesia adalah ikan air tawar (Kottelat *et al.*, 1993), dari genus *Nemacheilus* dan family *Nemacheilidae* (Roberts, 1993; Kottelat, 2013).

Salah satu langkah untuk menjaga keanekaragaman dan menekan penurunan populasi adalah dengan cara budidaya yang diawali dengan proses domestikasi (KKP, 2016). Kegiatan domestikasi merupakan salah satu cara untuk meningkatkan produktivitas perikanan di Indonesia. Dengan adanya kegiatan domestikasi, diharapkan produksi dan produktivitas ikan *N. fasciatus* akan dapat ditingkatkan dan ketersediaannya berkelanjutan. Perlu dilakukan identifikasi morfologi dan karakteristik genetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan beberapa populasi dari lokasi yang berbeda untuk mengetahui potensinya sebagai induk dalam tahap lanjutan domestikasi. Analisis variasi genetik dilakukan dengan menggunakan teori DNA *barcoding* yang diharapkan mampu mengetahui karakteristik *N. fasciatus* di beberapa perairan sungai di Jawa Timur.

DNA *barcoding* memberikan keakuratan dalam identifikasi spesies dengan focus pada segmen kecil mtDNA (Muchlisin *et al.*, 2013; Karim *et al.*, 2015). DNA *barcoding* dapat menjadi solusi krisis taksonomi saat ini (Meier *et al.*, 2006). Beberapa penelitian identifikasi molekuler terhadap genus *Nemacheilus* dengan aplikasi DNA *barcode* menggunakan gen COI telah berhasil dilakukan

Patil *et al.*, (2016) di India; Sayyadzadeh *et al.*, (2016) di Iran dan Pandey (2016) di India.

Aplikasi DNA *barcoding* dalam penelitian ini menggunakan Gen COI yang terdapat dalam mitokondria, dimana gen COI secara umum merupakan penanda standar untuk taksonomi dan identifikasi hewan (Hebert *et al.*, 2003). Selain untuk identifikasi takson-takson kriptik (Lahaye *et al.*, 2008), DNA *barcoding* juga bermanfaat dalam melihat karakteristik genetik, pengecekan keragaman genetik dan kekerabatan (Ginneken *et al.*, 2017) serta analisis filogenetik (Trontelj *et al.*, 2005; Mayden *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2011; Kusuma *et al.*, 2016).

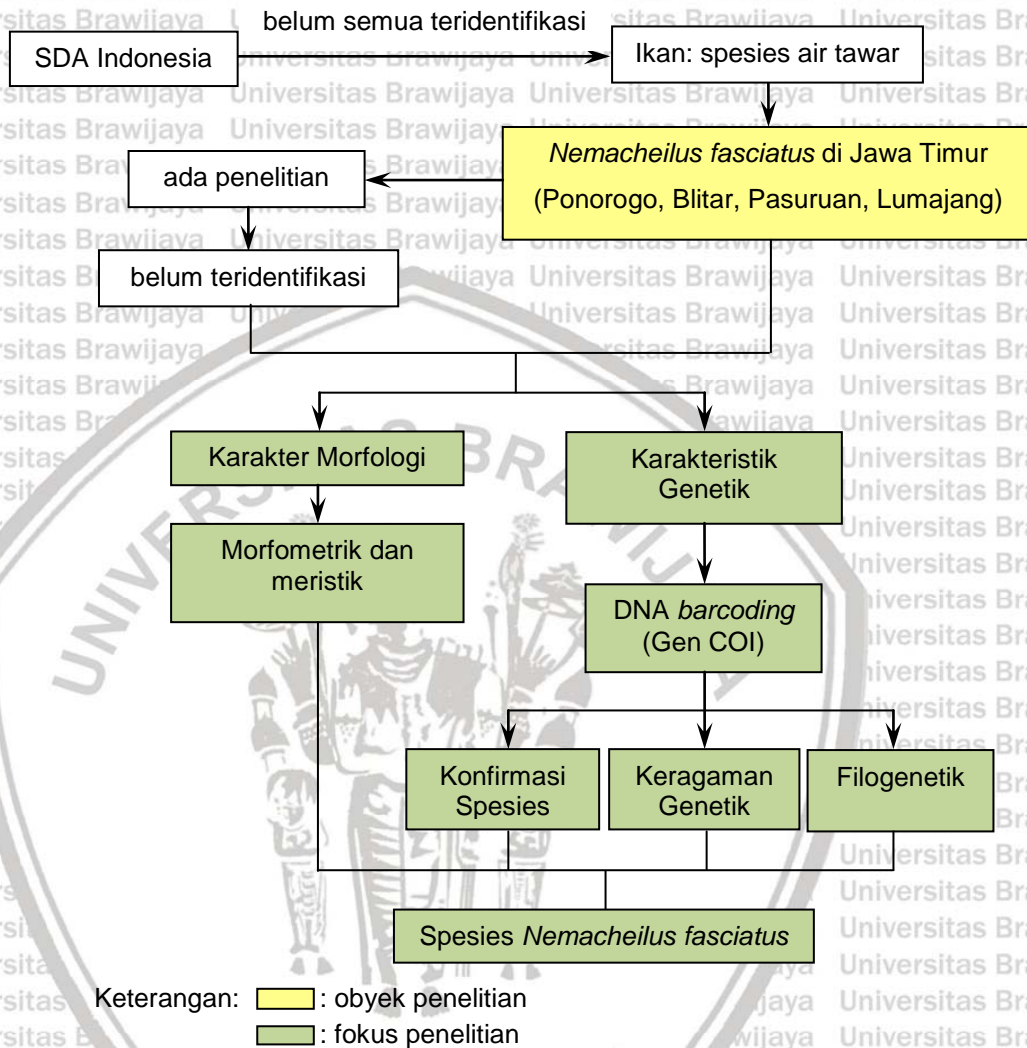
Secara garis besar, keunggulan COI jika dibandingkan dengan penanda lain antara lain gen COI dapat digunakan sebagai dasar pembeda antar hewan (Hebert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2006), tidak mengalami variasi yang besar (Hebert *et al.*, 2003), memiliki struktur yang kuat (Hebert *et al.*, 2003), tidak mengalami pengulangan nukleotida yang sering (Hebert *et al.*, 2003), berlokus tunggal dan menunjukkan tingkat diskriminasi yang tinggi (Kartavtsev *et al.*, 2007; Hollingsworth *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014).

3.2 Kerangka Konsep

Identifikasi spesies menyediakan informasi dasar yang berguna untuk mendukung kelangsungan keanekaragaman hayati. Identifikasi spesies bisa dilakukan berdasarkan morfologi dan berdasarkan informasi genetic yang penting dilakukan untuk mendukung program domestikasi. Domestikasi merupakan salah satu langkah penting dalam program pengembangan ikan-ikan liar menjadi ikan target budidaya. Untuk tujuan ini diperlukan informasi yang lengkap mengenai identifikasi spesies ikan berdasarkan morfologi, identifikasi molekuler dan karakteristik genetik.

Penelitian ini menggunakan karakter morfologi dan genetik (gen COI) untuk mengidentifikasi spesies *N. fasciatus* dan dilakukan analisis lebih lanjut.

Secara konseptual, kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kerangka Konsep

3.3 Kerangka Operasional dan Analisis Data

Kegiatan penelitian dilakukan secara bertahap dengan pelaksanaan di lapangan dan laboratorium. Hal ini bertujuan untuk memperoleh informasi untuk mengkonfirmasi penamaan spesies, melihat karakteristik dan keragaman genetik yang disajikan dalam bentuk matriks data serta rekonstruksi pohon filogenetik.

Kegiatan penelitian diawali dengan studi pustaka dan survei lapangan tentang

lokasi penangkapan *N. fasciatus*. di beberapa daerah di Jawa Timur yaitu di Ponorogo, Blitar, Pasuruan dan Lumajang.

Pada tahap I penelitian, sampel *N. fasciatus* dikumpulkan dari beberapa daerah tersebut. Pada lokasi pengumpulan sampel dilakukan penentuan titik koordinat lokasi menggunakan GPS dan dilakukan pengukuran parameter kualitas air secara *in situ* meliputi suhu, pH, DO, kecepatan arus dan jenis substrat. Kualitas air yang diukur secara *ex situ* yaitu TOM. Selanjutnya dilakukan pengukuran morfologi meliputi pengukuran morfometrik dan meristik.

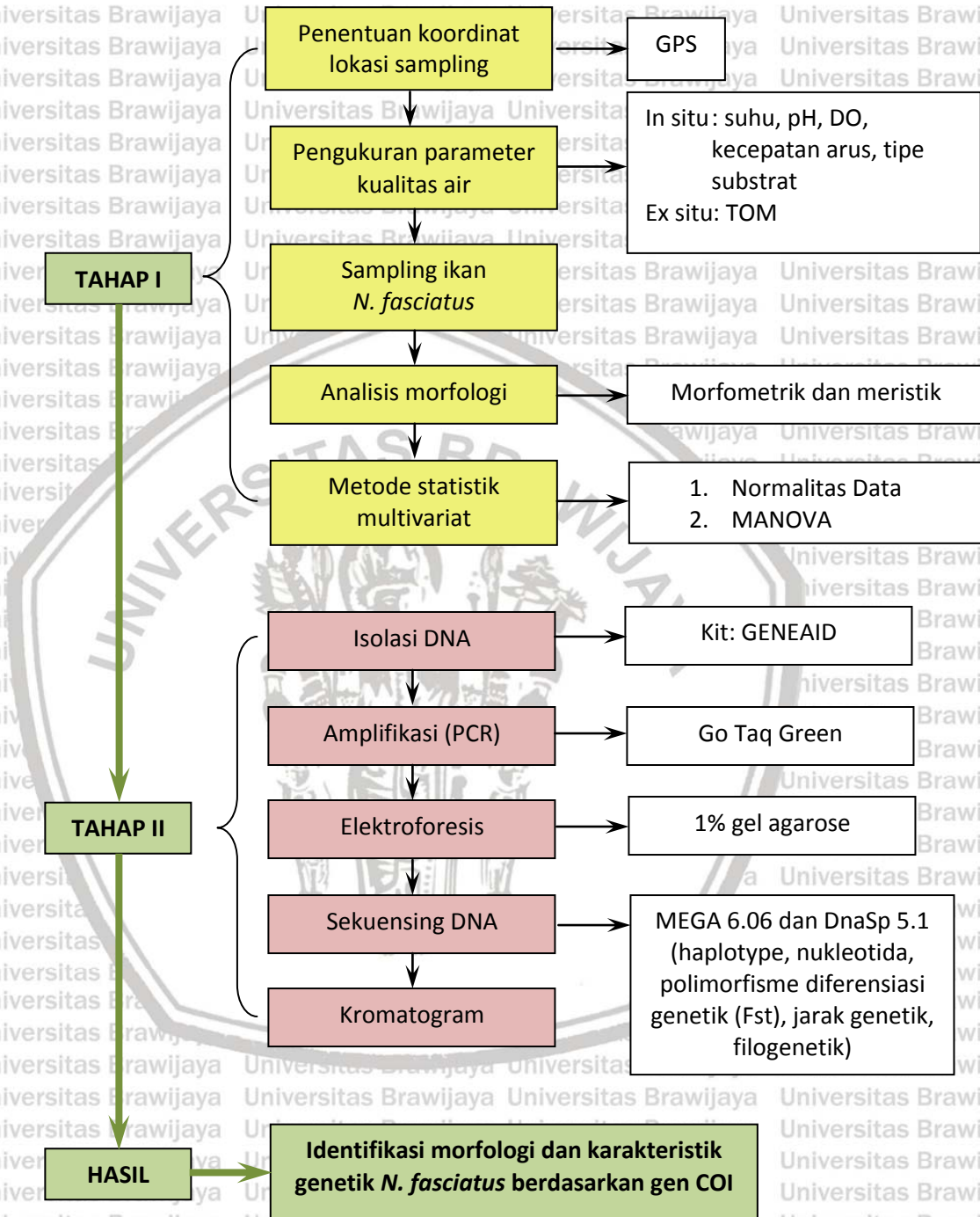
Variabel morfometrik diukur menggunakan metode *truss morphometric*. Variabel meristik yang diamati meliputi jumlah sirip keras dan lunak dorsal, pectoral, ventral dan anal. Pengamatan morfologis ikan *N. fasciatus* bertujuan untuk mengelompokkan ikan *N. fasciatus* yang berasal dari lokasi sampling. Hasil pengukuran *truss morphometric* dianalisis menggunakan uji statistik multivariat MANOVA, hasilnya dapat menunjukkan adanya perbedaan bentuk morfologi diantara populasi dalam satu spesies dapat menjadi suatu acuan untuk mengamati variasi di antara populasi ikan.

Penelitian tahap II, dilakukan dengan melakukan isolasi DNA dari sampel organ setelah itu amplifikasi PCR dengan gen COI kemudian dipurifikasi untuk memurnikan hasil PCR dan terakhir dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing selanjutnya dilakukan analisis data menggunakan beberapa perangkat lunak.

Kajian genetik dilakukan dengan teknik DNA *barcoding* dengan gen COI sebagai penanda. Kegiatan ini diawali dengan pengambilan jaringan pada sirip pectoral, kemudian dilakukan ekstraksi DNA genom dengan menggunakan metode KIT: Genomic DNA Mini Kit Animal Tissue (GENE AID).

Amplifikasi (PCR) gen lokus mitokondria COI dilakukan dengan menggunakan metode GO TAQ Green PCR Mix dengan pasangan primer LCO1490 5'-ggccaacaatcataaagatattgg3' dan HCO2198 5'-taaacttcagggtgacca

aaaaatca-3' (Folmer et.al., 1994). Keseluruhan kegiatan dan pengumpulan data penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kerangka Operasional

Pembuatan mastermix (Go Taq Green) dilakukan dengan menambahkan ddH₂O 14 µL, primer forward dan reverse masing-masing 2.5 µL, DMSO µL 1,

Go Taq Green 25 μ L dan ekstraksi DNA 5 μ L. Amplifikasi dilakukan pada volume akhir 50 μ L.

Hasil PCR selanjutnya dilakukan proses elektroferesis untuk memisahkan, mengidentifikasi dan mempurifikasi fragmen DNA, menggunakan gel agarose 1% dengan 50 mL Tris Borate EDTA (TBE). Hasil PCR yang telah berhasil diamplifikasi kemudian dikirim ke First Base Co. (Malaysia) menggunakan Big Dye[®] terminator chemistry (Perkin Elmer), untuk mendapatkan susunan basa yang membentuk DNA atau sekuen nukleotida.

Hasil sekuensing disejajarkan dengan menggunakan metode Clustal W yang terdapat pada software MEGA X. Data sekuen selanjutnya dicocokkan dengan data yang tersedia di genbank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) secara online dengan metode BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Analisis jarak genetik sekuen gen COI dihitung menggunakan metode *pairwise distance* yang terdapat pada program MEGA X.

Hasil perhitungan jarak genetik disajikan dalam bentuk matriks data yang dapat digunakan untuk analisis hubungan kekerabatan antar spesies berdasarkan pohon filogeni. Rekonstruksi filogenetik dengan metode Maximum Likelihood Trees (Lemey *et al.*, 2009), model Kimura-2 parameter dan nilai bootstrap 1000x dengan menggunakan software MEGA X (Tamura *et al.*, 2013).

3.4 Kebaruan Penelitian

Hadiaty (2014) mengidentifikasi secara lengkap berdasarkan karakteristik morfologi spesies-spesies dari Genus *Nemacheilus* dari seluruh perairan air tawar di Indonesia. Dahruddin (2016) mengkaji keanekaragaman dan kepadatan spesies ikan air tawar di perairan Jawa dan Bali dimana spesies *Nemacheilus fasciatus* termasuk salah satu bahasan dalam domain penelitiannya. Beberapa penelitian lain tentang identifikasi spesies *Nemacheilus fasciatus* baik melalui

karakter morfologi maupun karakter genetik yang pernah dilakukan antara lain dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kajian pustaka mengenai identifikasi *Nemacheilus fasciatus*

No	Authors	Judul	Jurnal	Tahun
1.	Hadiaty, R.	Doctoral Thesis of Science: Taxonomic Study of the Genus <i>Nemacheilus</i> (Teleostei: Nemacheilidae) in Indonesia	Zoologica Scripta	2014
2.	Dahrudin et al.	Revisiting the Ichthyodiversity of Java and Bali through DNA Barcodes: Taxonomic Coverage, Identification Accuracy, Cryptic Diversity and Identification of Exotic Species	Molecular Ecology Resources	2016

Di Indonesia, penelitian mengenai *N. fasciatus* mengkaji sifat biologi, karakter morfologi dan taksonomi tanpa mengkaji struktur genetiknya. Padahal kajian tentang struktur genetik penting untuk identifikasi takson-takson kriptik, mengkonfirmasi penamaan spesies, melihat karakteristik dan jarak genetik sehingga dapat memberikan informasi yang akurat dalam mendukung domestikasi sehingga menunjang keberhasilan usaha budidaya berkelanjutan terutama dalam pemilihan calon induk berdasarkan karakteristik dan jarak genetik yang disajikan dalam bentuk matriks data serta pohon filogenetik.

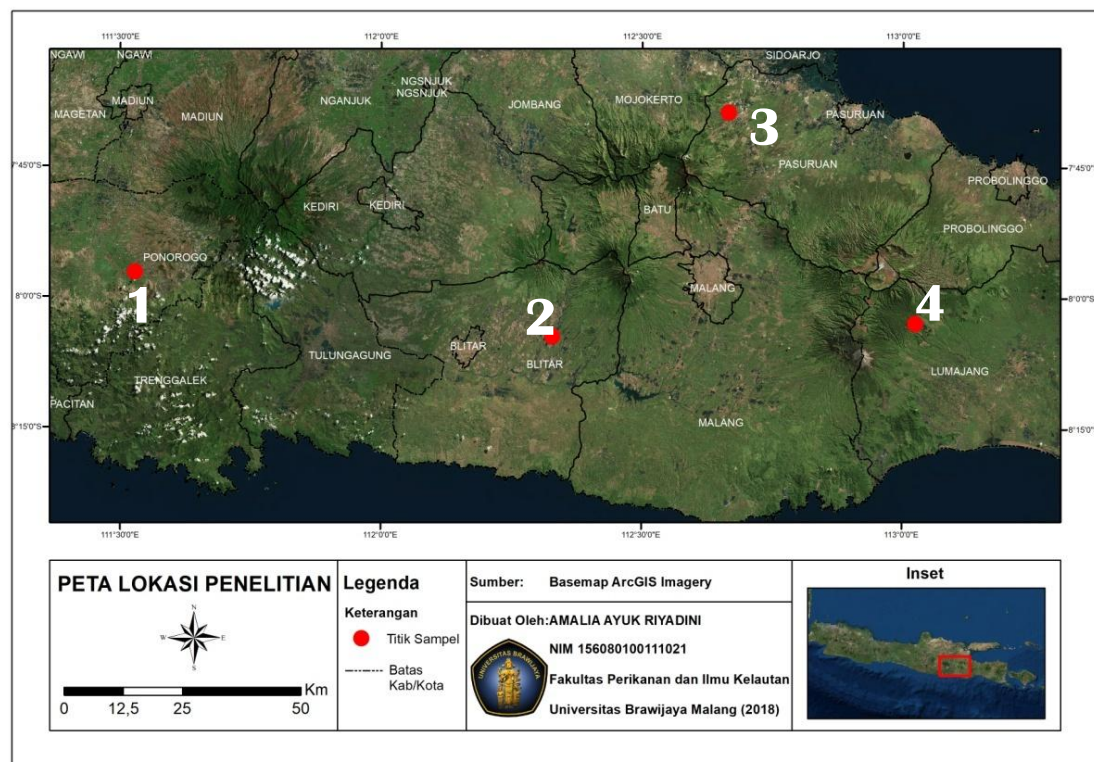
Kebaruan yang akan dihasilkan dalam penelitian ini yang belum pernah dilakukan sebelumnya antara lain sebagai berikut:

1. Kajian karakteristik genetik spesies *N. fasciatus* di Indonesia dengan menggunakan gen COI sebagai DNA *barcoding* belum ada, sehingga penelitian ini berusaha menganalisis karakteristik genetik berdasarkan sampel yang diperoleh di Jawa Timur.
2. Hubungan kekerabatan filogenetik *N. fasciatus* di Ponorogo, Blitar, Lumajang dan Pasuruan berdasarkan gen Cytochrome Oxidase subunit I (COI) belum pernah dilakukan sebelumnya.

4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan beberapa wilayah di Jawa Timur antara lain di Ponorogo, Blitar, Pasuruan dan Lumajang dengan peta seperti yang terlihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Lokasi pengambilan sampel. Keterangan: 1) Ponorogo; 2) Blitar; 3) Pasuruan; dan 4) Lumajang

Lokasi pengambilan sampel ditentukan berdasarkan ketersediaan ikan di aliran sungai di Jawa Timur. Hal tersebut dikarenakan oleh persebarannya yang tidak terdapat di seluruh sungai di Jawa Timur. Berdasarkan pengamatan lapang pada saat survey pendahuluan, ikan uceng (*N. fasciatus*) dapat ditemukan pada aliran sungai di keempat lokasi tersebut yaitu Ponorogo, Blitar, Pasuruan dan Lumajang. Keseluruhan lokasi sampling yang ditentukan beserta titik koordinat tempat pengambilan sampel yang dilakukan dan Daerah Aliran Sungai (DAS)

masing-masing sungai tempat pengambilan sampel dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Lokasi Sampling

Stasiun	Koordinat	Nama Wilayah/Sungai	DAS	Nama Kabupaten
1	S 07° 57' 14,34" E 111° 31' 43,22"	DAM Wilangan, Kec. Sambit	Bengawan Solo	Ponorogo
2	S 08° 04' 34,98" E 112 ° 19' 45,29"	Kali Lekso, Kec. Wlingi	Brantas	Blitar
3	S 08 ° 04' 95,00" E 113 ° 02' 50,90"	Kali Sumbergedang, Kec. Pandaan	Kedunglarangan	Pasuruan
4	S 7° 39' 20,0" E 112° 40' 21,5"	Sungai Betoto, Kec. Senduro	Bondoyudo	Lumajang

Koordinat lokasi ditentukan menggunakan GPS Garmin, dengan minimal empat satelit aktif tertangkap alat GPS untuk memastikan ketelitian titik lokasi (Endruweit, 2011). Sampel ikan yang diperoleh disimpan dalam kotak pendingin untuk diidentifikasi secara morfologi dan selanjutnya disimpan dalam etanol 96% untuk diidentifikasi secara molekuler. Tahap isolasi DNA sampai elektroforesis dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang. Hasil elektroforesis disekuensing menggunakan penyedia jasa sekuensing gen FirstBase Malaysia.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain GPS, alat tulis, penggaris, dissection kit, jangka sorong digital, botol sampel, vortex, bunsen, labu erlenmeyer, cawan petri, sarung tangan karet, gunting, gelas ukur, alat *sentrifuge*, *microtube*, *digital caliper*, *micropipet*, *pipet tips*, *thermocycler*, *UV transluminator* dan kalkulator.

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain sampel jaringan, *ethanol* 96%, tissue, aluminium foil, Kit DNA (yang berisi satu paket buffer,

proteinase-k, collection tube), PCR buffer, GO TAQ Green PCR Mix, dNTP, ddH₂O, pasangan primer LCO1490 dan HCO2198, agarose, TAE buffer, EtBr dan loading dye.

4.3 Metode dan Pendekatan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif dengan pendekatan kuantitatif. Metode deskriptif adalah metode penelitian yang ditujukan untuk menggambarkan fenomena yang ada tanpa manipulasi atau pengubahan pada variabel-variabel bebas, tetapi menggambarkan suatu kondisi apa adanya (Hamdi dan Bahrudin, 2015).

Pendekatan penelitian kuantitatif non-eksperimen menekankan fenomena-fenomena objektif dan dikaji secara kuantitatif atau menggunakan angka-angka, pengolahan statistik, struktur atau percobaan terkontrol (Hamdi dan Bahrudin, 2015).

Pada penelitian ini dilakukan pendekatan menggunakan beberapa metode untuk mendapatkan informasi yang diinginkan mengenai *N. fasciatus* di perairan sungai lokasi sampling. Pendekatan tersebut selain dilakukan di lapang juga dilakukan di laboratorium untuk mengetahui keragaman genetik *N. fasciatus* melalui morfologi dan molekuler.

Teknik pengumpulan data karakter morfologi dilakukan dengan teknik observasi dan pengukuran langsung terhadap sampel *N. fasciatus*, sedangkan informasi genetik diperoleh melalui berbagai tahapan perlakuan di laboratorium yang dimulai dengan isolasi DNA hingga sekuensing menggunakan jasa penyedia layanan tersebut. Pengukuran kualitas air dilakukan secara *in situ* dan *ex situ*. Teknik observasi merupakan salah satu teknik pengumpulan data yang digunakan untuk mengukur dan merekam berbagai fenomena yang terjadi.

Teknik ini merupakan teknik pengumpulan data, dimana peneliti melakukan

pengamatan secara langsung ke objek penelitian untuk melihat dari dekat kegiatan yang dilakukan.

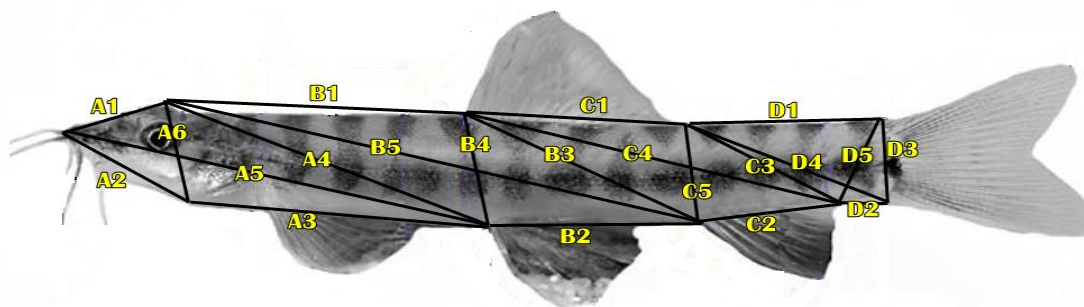
4.4 Prosedur Pengumpulan Data

4.4.1 Pengumpulan Data Morfometrik dan Meristik

Sampel *N. fasciatus* yang digunakan berjumlah 15 ekor yang di peroleh dari lokasi pengambilan sampel. Lima belas sampel tersebut digunakan untuk mengetahui variasi intraspecies dan interspecies. Selanjutnya pada tahap awal dilakukan identifikasi spesies melalui karakter morfologi. Identifikasi morfologi terhadap sampel dilakukan dengan menggunakan kunci identifikasi *N. fasciatus* menurut Kottelat (1990) sebagai pembanding.

Setelah itu dilakukan pengukuran morfometrik. Pengukuran morfometrik dilakukan dari titik ke titik lain pada sisi kiri tubuh ikan yang masih memungkinkan dilakukan pengukuran dengan menggunakan jangka sorong digital dan data tersebut dicatat dalam satuan milimeter. Pengukuran dilakukan menggunakan jangka sorong digital dengan ketelitian 0,1 mm.

Pengukuran morfometrik menggunakan metode *truss morphometric* (*The Truss Network System*), mengikuti Metode Affandi *et al.*, (1992); Kottelat *et al.*, (1993); Wood (1995); Turan, (1999); Zahorska *et al.*, (2009). Skema pengukuran morfometrik *N. fasciatus* dilakukan terhadap jarak antar bagian tubuh seperti terlihat pada Gambar 6 berikut.



Gambar 6. Skema pengukuran *truss morphometric* *N. fasciatus*

Pengukuran *truss morphometric N. fasciatus* meliputi 21 variabel morfometrik dilakukan terhadap seluruh sampel. Sesuai skema tersebut lebih lanjut dijelaskan selengkapnya pada Tabel 4 berikut ini (dimodifikasi dari Hadiaty, 2014).

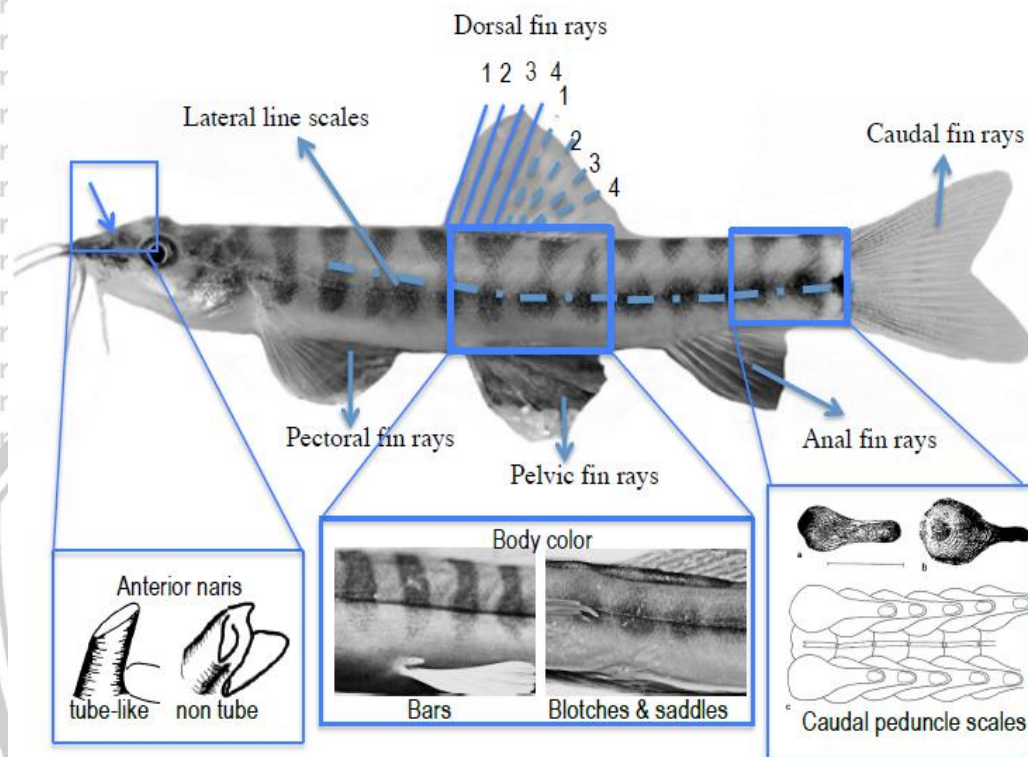
Tabel 4. Karakter Morfometrik *N. fasciatus*

No	Variabel Pengukuran	Penjelasan
1.	A1	Diukur dari ujung mulut bagian atas sampai bagian akhir tulang kepala
2.	A2	Diukur dari ujung mulut bagian atas sampai ujung bawah operculum
3.	A3	Diukur dari ujung bawah operculum sampai awal sirip perut
4.	A4	Diukur dari bagian akhir tulang kepala sampai awal sirip perut
5.	A5	Diukur dari ujung mulut bagian atas sampai awal sirip perut
6.	A6	Diukur dari ujung bawah operculum sampai bagian akhir tulang kepala
7.	B1	Diukur dari bagian akhir tulang kepala sampai awal sirip punggung
8.	B2	Diukur dari awal sirip perut sampai awal sirip anal
9.	B3	Diukur dari awal sirip punggung sampai awal sirip anal
10.	B4	Diukur dari awal sirip perut sampai awal sirip punggung
11.	B5	Diukur dari bagian akhir tulang kepala sampai awal sirip anal
12.	C1	Diukur dari awal sirip punggung sampai akhir sirip punggung
13.	C2	Diukur dari awal sirip anal sampai akhir sirip anal
14.	C3	Diukur dari akhir sirip punggung sampai akhir sirip anal
15.	C4	Diukur dari awal sirip punggung sampai akhir sirip anal
16.	C5	Diukur dari awal sirip anal sampai akhir sirip punggung
17.	D1	Diukur dari akhir sirip punggung sampai awal sirip ekor atas
18.	D2	Diukur dari akhir sirip anal sampai awal sirip ekor bawah
19.	D3	Diukur dari awal sirip ekor atas sampai awal sirip ekor bawah
20.	D4	Diukur dari akhir sirip punggung sampai awal sirip ekor bawah
21.	D5	Diukur dari akhir sirip anal sampai awal sirip ekor atas

Selanjutnya dilakukan pengukuran meristik *N. fasciatus* (Gambar 7). Pengukuran tersebut meliputi pengukuran jumlah sirip dan pengamatan pola warna tubuh yang dilakukan menurut Hadiaty (2014), yaitu sebagai berikut:

- Jumlah jari sirip dorsal dan anal dihitung jari keras dan keras lunak.

- Jumlah jari sirip pelvic dan caudal, semua jari dihitung bersama.
- Jumlah jari sirip caudal dihitung jari cabang tertinggi ditambah dengan jari cabang terendah.
- Pengamatan warna tubuh



Gambar 7. Skema pengukuran meristik *Nemacheilus* sp. (Hadiaty, 2014)

4.4.2 Pengumpulan Data Genetik

1. Pengambilan Sampel

Pengumpulan sampel koleksi menggunakan metode *random sampling* yaitu pengambilan sampel secara acak antara 2-5 ekor pada satu lokasi sampling. Ikan yang telah diidentifikasi secara morfologi diambil ± 30 mg pada bagian sirip pectoral. Pemilihan sirip pectoral sebagai bahan ekstraksi dikarenakan sirip tersebut adalah bagian tubuh yang sering mengalami pergerakan dimana mitokondria terdapat pada sel yang memiliki aktivitas metabolisme tinggi (Guo *et al.*, 2004). Jaringan

dipreservasi dalam etanol 96%. Tujuan preservasi ini adalah untuk mensterilkan sampel dari kontaminan serta menarik air dari dalam sel sehingga memudahkan proses ekstraksi DNA.

2. Isolasi DNA

Isolasi DNA mitokondria ikan *N. fasciatus* dilakukan menggunakan metode KIT: Genomic DNA Mini Kit Animal Tissue (GENE AID) yang dilakukan sesuai petunjuk manufaktur dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Tabung mikro ukuran 1,5 ml diberi label sesuai kode sampel.
- 2) Jaringan sampel dipotong menggunakan scalpel menjadi berukuran kira-kira 1 cm³ dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml.
- 3) Ditambahkan ke dalam tabung mikro 200 µL buffer lisis (GT-Buffer) dan 20 µL proteinase K
- 4) Tabung mikro divortex dan diinkubasi pada 60°C selama 30 menit.
- 5) Buffer elution 200 µL dimasukan dalam tabung baru dan diinkubasi pada suhu 60°C lalu dibiarkan.
- 6) Etanol 200 µL ditambahkan ke dalam tabung mikro (no. 4).
- 7) Kolom GS dimasukan ke dalam tabung penampung dan diberi label keterangan/kode.
- 8) Campuran dimasukan ke dalam kolom GS dan disentrifuge kecepatan 14.000-16.000 rpm selama 2 menit.
- 9) Kolom GS (no.8) dipindahkan ke tabung baru dan dicuci dengan cara menambahkan 400 µL buffer W1 kemudian disentrifugasi 15.000 rpm selama 30 detik.
- 10) Dicuci lagi menggunakan 600 µL buffer wash dan sentrifugasi 15.000 rpm selama 30 detik.
- 11) Dikeringkan dengan disentrifugasi 15.000 rpm selama 3 menit.

12) 100 μ L buffer elution panas (dari tahap no. 5) ditambahkan pada kolom GS dan inkubasi pada suhu ruang selama 3 menit untuk memastikan seluruh DNA yang terikat pada GS kolom telah terlarut dalam buffer elution. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 30 detik.

13) Filtrasi yang diperoleh adalah genom DNA yang diinginkan dan simpan dalam freezer.

Uji kuantitatif dilakukan dengan menggunakan UV spektrofotometer Nano Drop 2000. Kalibrasi dilakukan dengan menggunakan Elution Buffer sebagai pelarut stock DNA. DNA dalam keadaan murni apabila memiliki rentangan A 260/280 sebesar 1,8-2.

Uji kualitatif DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarose. Pembuatan gel agarose dilakukan dengan memakai 0,2 gram bubuk agarose ditambah 20 ml Tris Borate EDTA 1x. Larutan ini dipanaskan dalam microwave selama 2 menit. Lalu didiamkan sampai agak dingin dan ditambahkan 0,5 μ L ethidium bromida. Gel dituang ke dalam plate yang dipasang sisir, diamkan hingga mengeras. Setelah gel mengeras keluarkan sisir, gel dipindahkan ke dalam sumur elektroforesis dan ditambahkan TBE 1x hingga gel terendam.

Pada tiap sampel hasil isolasi DNA, diambil sebanyak 3 μ L dicampur dengan 1 μ L *loading dye* dengan 2 μ L aquades steril. Campuran DNA sampel, aquades steril dan *loading dye* dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose secara hati-hati dengan bantuan mikropipet.

Running DNA dilaksanakan dengan menghubungkan katoda dan anoda selama 1 jam. Pengamatan pita DNA yang terbentuk dilakukan memakai UV transiluminator. Setelah diperoleh DNA konsentrasi tinggi dilanjutkan dengan amplifikasi gen COI.

3. Amplifikasi (PCR)

PCR adalah teknik perbanyak (amplifikasi) sekuen DNA *copy* tunggal secara *in vitro* yang berlangsung cepat, dengan menggunakan DNA polymerase. Prinsip metode PCR adalah amplifikasi segmen DNA spesifik menggunakan pelekatan dua primer yang komplementer dengan sekuen khusus gen target. Kedua primer tersebut berlekatan dengan untai DNA target, sehingga memungkinkan DNA polymerase untuk melakukan elongasi sekuen DNA tersebut. Hasil dari setiap siklus menunjukkan peningkatan eksponensial dari keseluruhan jumlah *copy* yang disintesis (Agarwal, 2008).

Pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah LCO1490 5'-ggccaacaatcataaagatattgg3' dan HCO2198 5'-taaacttcagggtgacca aaaaatca-3' (Folmer et.al., 1994). Primer DNA LCO1490 dan HCO2198 pada awalnya dirancang dari tiga untaian pengkodean dan enam anticoding dengan membandingkan daerah gen COI mitokondria yang bersifat *converse* di 15 taksa (Sharma dan Kobayashi, 2014). Primer ini mampu mengamplifikasi secara spesifik gen COI pada *Nemacheilus montana* dengan panjang ampikon sekitar 680 bp (Pandey, 2016).

PCR melibatkan beberapa bahan utama yaitu DNA polymerase yang dapat mengamplifikasi untai baru DNA, dua primer oligonukleotida, kation bivalen (MgCL₂) sebagai aktivator DNA polymerase dan membantu dalam proses *annealing*, buffer PCR untuk menjaga kestabilan pH, kation monovalent dalam buffer PCR, dan template DNA yang mengandung sekuen target untuk diamplifikasi. Proses PCR biasanya terdiri atas 20 sampai 35 siklus dan dilakukan dalam tiga tahap (Toha et al., 2013), yaitu denaturasi, *annealing* dan elongasi.

Predenaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 4 menit, denaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 50°C selama 30 detik dan elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik. Pembuatan mastermix (*Go Taq Green*) dilakukan dengan menambahkan ddH₂O 18 µL, primer LCO1490 dan HCO2198 masing-masing 2,5 µL, *Go Taq Green* 25 µL dan ekstraksi DNA 2 µL. Amplifikasi dilakukan pada volume akhir 50µl.

Hasil PCR selanjutnya dilakukan proses elektroferesis untuk memisahkan, mengidentifikasi dan mempurifikasi fragmen DNA, kemudian ditampilkan di atas sinar UV. Produk PCR dikirim bersama primer-primernya untuk disequen oleh penyedia jasa FirstBase Malaysia.

4. Elektroforesis

Selanjutnya dilakukan pengamatan hasil PCR secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose 1%. Pembuatan gel agarose 1%, dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram bubuk agarose dengan 50 mL Tris Borate EDTA (TBE) ke dalam tabung erlenmeyer dan ditutup dengan plastik wrap. Larutan tersebut selanjutnya dipanaskan selama 2 menit di dalam microwave. Setelah larutan agak dingin, selanjutnya dituangkan ke dalam plate yang dipasang sisir. Larutan didiamkan sampai mengeras, setelah itu sisir dikeluarkan dan ditambahkan TBE 1x hingga gel terendam.

Setelah itu dilakukan *running* elektroforesis dengan memasukan 4 µL produk PCR dan DNA marka kedalam sumur gel. Marker DNA selanjutnya dimasukan dan diletakan di dasar sumur agarose paling awal sebelah kiri dan sumur berikutnya untuk sampel DNA. Setelah itu, katoda dan anoda dihubungkan pada tegangan 100 Volt, 200 Ampere

selama 30 menit. Visualisasi dilakukan dengan memasukan gel ke dalam larutan etidium bromide, didiamkan selama 20 menit.

5. Sekuensing DNA

Hasil PCR yang telah berhasil diamplifikasi kemudian dikirim ke FirstBase (Malaysia) untuk mendapatkan susunan basa yang membentuk DNA atau sekuen nukleotida. Hasil Sequencing DNA dicocokkan dengan data pada NCBI yang digunakan untuk mencari kesamaan sequence nukleotida atau protein dengan sequence database pada GenBank.

4.4.3 Pengumpulan Data Kualitas Air

Pengambilan data kualitas air bertujuan untuk mengetahui kondisi terkini perairan tersebut, meliputi kondisi perairan secara fisik dan kimia yang terkait dengan hubungan keragaman morfologi, genetik dan kondisi lingkungan *N. fasciatus*. Pengamatan dan pengambilan sampel kualitas air dilakukan secara langsung (*in situ*) yang mengacu pada APHA (1989) dan juga dilakukan secara (*ex situ*) di laboratorium. Pengumpulan data parameter kualitas air yang diamati, metode analisis dan tempat pengukuran dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengukuran Kualitas Air, Metode dan Tempat Pengukuran

Parameter	Metode Analisis	Lokasi Pengukuran
Arus (cm/dt)	-	<i>In-situ</i>
Tipe substrat	-	<i>In-situ</i>
DO (mg/l)	YSI/Hydrolab	<i>In-situ</i>
Suhu (°C)	YSI/Hydrolab	<i>In-situ</i>
pH	IKM/5.4.8/UPT-PBAP (Elektrometrik)	Laboratorium
TOM (mg/l)	IKM/5.4.58/UPT-PBAP (Titrimetrik)	Laboratorium

4.5 Analisis Data

4.5.1 Analisis Data Morfometrik dan Meristik

Setelah data morfometrik dan meristik diperoleh, lalu ditabulasi dan dipadukan dengan data morfologi kualitatif untuk menentukan spesies ikan

secara morfologi. Penetapan spesies didasarkan pada identifikasi menurut Kottelat (1993) dan Hadiaty (2014) dan konfirmasi spesies dari FishBase (2018).

Analisis data *truss morphometric* menggunakan analisis statistik multivariat. Sebelum analisis data, efek ukuran harus dihilangkan dari data yang diambil pada ikan yang bukan berasal dari usia dan ukuran yang sama (Kashyap *et al.*, 2016). Keragaman harus disebabkan perbedaan bentuk tubuh dan tidak terkait dengan jenis kelamin dan umur ikan (Turan, 1999). Langkah pertama untuk menghilangkan efek ukuran yaitu membandingkan data *truss morphometric* dengan panjang total ikan (TL) atau panjang baku (SL) sehingga diperoleh nilai nisbah masing-masing karakter. Nilai nisbah masing-masing karakter tersebut dilakukan uji normalitas dan digunakan untuk menghilangkan efek ukuran (Munasinghe and Senevirathna, 2015; Kashyap *et al.*, 2016), menggunakan metode Elliott *et al.* (1995).

Efisiensi penghilangan ukuran dinilai dengan uji Levene's korelasi koefisien antara variabel data yang telah ditransformasi dengan panjang standar (SL) atau panjang total (TL) ikan (Aktas *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2016).

Analisis dilanjutkan dengan ditentukan oleh nilai kurtosis yang dihasilkan ($P > 0,05$). Jika nilai P pada kurtosis lebih dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal multivariat, sehingga analisis dapat dilanjutkan (Munasinghe and Senevirathna, 2015).

Selanjutnya data variabel *truss morphometric N. fasciatus* dianalisis menggunakan metode statistik multivariat. Statistik multivariat merupakan metode statistik yang memungkinkan kita menganalisis pengaruh beberapa variabel terhadap variabel-variabel lainnya. Teknik analisis statistik multivariat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu analisis MANOVA. Analisis MANOVA digunakan untuk melihat signifikan perbedaan morfologi antar-kelompok atau populasi.

4.5.2 Analisis Data Genetik

1. Identifikasi Spesies

Kromatogram yang diperoleh (DNA hasil sekuensing) dilakukan penjarangan (*alignment*) dan pengeditan menggunakan *software* MEGA X (Tamura *et al.*, 2013) lalu dibandingkan dengan data yang tersedia di GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dengan metode BLAST sebagai konfirmasi spesies.

2. Analisis Keragaman Genetik

Analisis keragaman genetik dilakukan menggunakan *software* DnaSP 5.0 (Rozas *et al.*, 2003). Analisis struktur populasi dilakukan menggunakan *software* Arlequin 3.5 (Excoffier dan Lischer, 2010) untuk mendeskripsikan level jarak antar populasi dilakukan menggunakan fixation index (*Fst*) (Excoffier *et al.*, 1992). Deskripsi analisis statistik DnaSP 5.0 yaitu pengukuran keragaman *haplotype* (*Hd*) (Nei, 1987) dan keragaman nukleotida (π) (Lynch dan Crease, 1990).

Jarak genetik dalam dan antar populasi dianalisis berdasarkan parameter jarak (Nei, 1972) dan (Nei, 1978), dilakukan menggunakan *software* MEGA X (Tamura *et al.*, 2013). Jaringan haplotipe berdasarkan jarak berpasangan antara haplotipe yang dihasilkan menggunakan Network

5.1. Kategori nilai pembanding hasil yang diperoleh disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Nilai keragaman genetik, struktur populasi dan jarak genetik

Analisis	Kategori			Sumber
	Rendah	Sedang	Tinggi	
Keragaman Genetik (<i>Hd</i>)	0,1-0,4	0,5-0,7	0,8-1,00	Nei (1987)
Struktur Populasi (<i>Fst</i>)	0,1-0,3	0,4-0,7	0,8-1,00	Excoffier <i>et al.</i> (1992)
Jarak Genetik (<i>D</i>)	0,01-0,099	0,1-0,99	1,00-2,00	Nei (1972)

3. Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik bertujuan untuk melihat hubungan kekerabatan antara sampel *N. fasciatus* yang ditemukan dan hubungan kekerabatan antara sampel yang ditemukan dengan sekuen pembandingan yang diunduh dari GenBank. Analisis filogenetik dilakukan berdasarkan metode Maximum Likelihood dengan model Kimura-2 parameter. Rekonstruksi pohon filogenetik atau metode analisa jarak filogenetik bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan genetik antar individu dengan menggunakan menggunakan software MEGA X (Tamura *et al.*, 2013) dengan nilai bootstrap 1000x.

Sekuen pembandingan yang digunakan diunduh dari GenBank ditampilkan pada Tabel 7 berikut.

Tabel 7. Sekuen Genus *Nemacheilus* dari GenBank

Spesies	Location	Accession Number	Reference
<i>N. fasciatus</i>	Jepara	KT960790	Dahrudin <i>et al.</i> (2016)
<i>N. fasciatus</i>	Purwokerto	KT960792	Dahrudin <i>et al.</i> (2016)
<i>N. chrysolaimos</i>	Sukabumi	KU692664	Dahrudin <i>et al.</i> (2016)
<i>N. ruePELLI</i>	India	KT3808721	Pandey <i>et al.</i> (2016)
<i>N. palidus</i>	Thailand	MF289074	Singer <i>et al.</i> (2017)
<i>Schistura scyphovecteta</i>	India	K5988261	Sayyadzadeh <i>et al.</i> (2014)
<i>Schistura aizawlensis</i>	India	KF5988021	Jamshidi <i>et al.</i> (2013)

5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Identifikasi Spesies Berdasarkan Morfologi

Secara visual, identifikasi spesies dapat dilakukan melalui pengamatan morfologi sehingga dapat membedakan antara satu spesies dengan spesies yang lain. Keakuratan identifikasi menggunakan karakter morfologi sangat tergantung pada ketelitian pengamat dan wawasan taksonomik yang dimiliki. Pengamatan morfologi pada penelitian ini terdiri dari pengamatan pola warna dan ciri khusus, pengamatan meristik, serta pengamatan morfometrik. Identifikasi morfologi terhadap sampel dilakukan dengan menggunakan kunci identifikasi menurut Kottelat (1990) sebagai pembanding. Morfologi ikan sampel yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 8 berikut.



Gambar 8. *N. fasciatus* hasil pengamatan

Pengamatan pola warna dan ciri khusus pada ikan sampel dilakukan pertama kali pada ikan sampel yang diperoleh. Seluruh ikan sampel yang dikoleksi teridentifikasi secara morfologi sebagai *Nemacheilus fasciatus* dengan ciri antara lain tubuh ikan kecil memanjang berwarna coklat dan pada kanan dan kiri tubuhnya terdapat pola totol (band) memanjang garis longitudinal mengikuti gurat sisi dari bagian anterior ke arah posterior, bola mata berwarna hitam besar, lubang hidung dekat satu sama lain, tubular tapi tidak diperpanjang sebagai sungut. Mulut setengah lingkaran, bibir agak berdaging, berkerut dan memiliki barbel pada mulut. Hal tersebut sesuai menurut kunci identifikasi Kottelat (1990),

dengan modifikasi oleh Hadiaty dan Siebert (2001) bahwa *N. fasciatus* tidak memiliki tumpukan sisik pada caudal peduncle, anterior naris menonjol pada ujung sisi bagian depan, pola warna pada tubuhnya terdiri dari totol gelap dan memiliki pola berwarna hitam pada dorsal menyerupai pelana. Identifikasi dilanjutkan menggunakan karakter meristik ikan sampel. Hasil penghitungan karakter meristik tersebut terdapat ketidaksesuaian kunci identifikasi Kottelat (1990) dan penjelasan Hadiaty (2014) bahwa totol berwarna gelap (band) pada ikan ini berjumlah 14-18 dan memiliki pola menyerupai pelana pada dorsal berjumlah 11-12, sedangkan pada hasil pengamatan ditemukan totol berwarna gelap berjumlah 12 yaitu pada sampel Blitar 5. Namun secara garis besar, berdasarkan ciri meristik, identifikasi ikan ini mengarah pada *N. fasciatus* (Valenciennes 1842 dalam Kottelat, 1993). Kisaran nilai hasil pengukuran meristik terlihat pada Tabel 8 berikut (hasil keseluruhan pada Lampiran 1).

Tabel 8. Karakter Meristik *N. fasciatus*

Karakter Meristik	Jumlah
Jari-jari Sirip Dorsal Keras	1
Jari-jari Sirip Dorsal Lunak	7-9
Jari-jari Sirip Pectoral Keras	1
Jari-jari Sirip Pectoral Lunak	6-8
Jari-jari Sirip Anal Keras	1
Jari-jari Sirip Anal Lunak	4-5
Jari-jari Sirip Pelvic	5-7
Jari-jari Sirip Caudal	7-9
Jumlah Total	12-18

Pengamatan morfologi dilanjutkan dengan melakukan pengukuran karakter morfometrik. Karakter morfometrik adalah karakter yang berkaitan dengan ukuran tubuh atau bagian tubuh. Ukuran ini berupa jarak antara satu bagian tubuh dengan bagian tubuh yang lain dan disebut dengan ukuran mutlak. Pengukuran morfometrik menggunakan metode *truss morphometric* mengikuti Kottelat *et al.*, (1993); Wood (1995); Turan, (1999); Zahorska *et al.*, (2009). Hasil dari

pengukuran *truss morphometric* dapat dilihat pada Lampiran 2. Metode *truss morphometric* memberikan hasil dengan akurasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode konvensional serta karakterisasi geometrik ikan lebih sistematis (Turan *et al.*, 1999; Kashyap *et al.*, 2016).

Hasil pengukuran menggunakan *truss morphometric* kemudian dirasiakan dengan panjang standar (SL) ikan lalu dilakukan uji normalitas data dengan $\alpha=0,005$. Hasilnya nilai -P pada skewness 0,000109818 ($<0,05$) dan nilai -P pada kurtosis 0,925333 ($>0,05$). Tidak ada korelasi yang signifikan ($-P>0,05$) antara pengukuran *truss morphometric* dan panjang standar (SL), menunjukkan bahwa efek ukuran berhasil dihilangkan. Karena nilai -P pada kurtosis lebih dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal multivariat, sehingga analisis dapat dilanjutkan ke uji MANOVA. Hasil penghitungan selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 3.

MANOVA (menggunakan tiga uji yaitu Pillai's Trace, Wilks' Lambda dan Roy's Largest Root) menunjukkan perbedaan yang signifikan untuk vektor rata-rata antara populasi (data dapat dilihat pada Tabel 9). Dari output tersebut, diperoleh informasi bahwa tiga uji statistik di atas menunjukkan nilai $-P<0,05$ (Sig.), sehingga dapat disimpulkan dengan tingkat kesalahan sebesar 5% terdapat perbedaan pengaruh antara daerah lokasi pengambilan sampel terhadap panjang bagian-bagian tubuh ikan.

Tabel 9. Hasil Uji MANOVA

Uji MANOVA	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's Trace	2.989	51.093	48.000	9.000	.000
Wilks' Lambda	.000	57.547	48.000	3.768	.001
Roy's Largest Root	7006.878	1313.790	16.000	3.000	.000

Lebih lanjut dilakukan uji pengaruh antar subyek dengan $\alpha=0,005$, diketahui terdapat perbedaan pengaruh antara daerah terhadap panjang tertentu

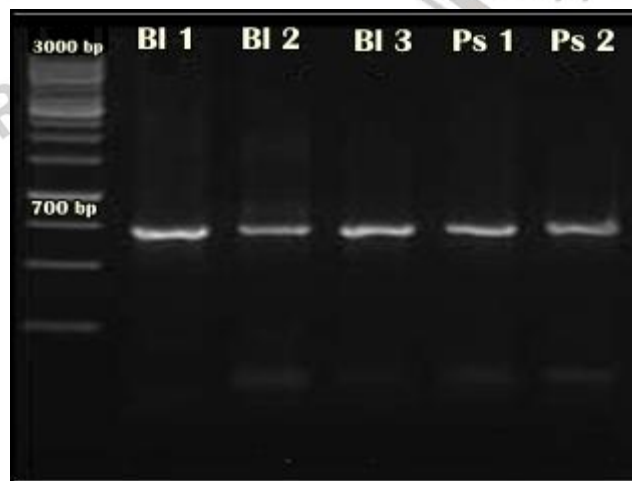
tubuh ikan. Berdasarkan hasil output, variabel pengukuran yang menunjukkan perbedaan antara lain A1, A2, C2 dan C5 (pengukuran *truss morphometric* pada Gambar 6) karena memiliki nilai $P < 0,05$. Sampel *N. fasciatus* yang diteliti dibagi menjadi empat grup sesuai titik pengambilannya yaitu grup Ponorogo, Blitar, Pasuruan dan Lumajang. Keempat titik pengambilan sampel tersebut berada pada aliran sungai dengan Daerah Aliran Sungai (DAS) yang berbeda. Kondisi tersebut sangat memungkinkan terjadinya perbedaan morfometrik *N. fasciatus* antar populasi. Penyebab perbedaan morfologis antara populasi seringkali cukup sulit untuk dijelaskan (Poulet *et al.*, 2004), tetapi diketahui bahwa karakter morfometrik dapat menunjukkan tingkat fleksibilitas yang tinggi dalam menanggapi kondisi lingkungan (Wimberger, 2008). Perbedaan morfologis antar populasi berbeda sangat terkait dengan perbedaan faktor habitat seperti suhu, kekeruhan, ketersediaan makanan, kedalaman dan aliran air (Allendorf, 1988, Swain *et al.*, 1991, Wimberger, 2008). Moyle dan Cech (1988) mengemukakan bahwa seringkali terdapat variasi pada karakter-karakter morfologi dalam satu spesies. Variasi-variasi ini dapat disebabkan oleh kondisi perkembangan larva ikan, faktor lingkungan dan ketersediaan makanan.

Identifikasi berdasarkan karakter morfologi memiliki banyak kelemahan karena sangat bergantung pada ketelitian pengamat dan keterbatasan wawasan yang dimiliki. Sehingga sebagai pembanding dilakukan identifikasi menggunakan gen COI sebagai penanda genetik (DNA *barcoding*) yang sangat membantu dalam mengidentifikasi spesies kriptik (Jaafar *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*, 2008).

5.2 Identifikasi Spesies Berdasarkan Gen COI

Identifikasi secara molekuler dilakukan menggunakan teknik DNA *barcoding*, dalam penelitian ini menggunakan gen COI sebagai gen penanda. Sampel diamplifikasi menggunakan pasangan primer HCO2198 dan LCO1490

kemudian hasilnya dielektroforesis. Hebert *et al.* (2003) menunjukkan fragmen sepanjang 658 bp menggunakan gen COI bisa digunakan sebagai dasar pembeda antar hewan. Elektroforesis merupakan metode standar yang sangat penting dalam teknologi DNA rekombinan untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan memurnikan molekul DNA/RNA atau protein (Toha, 2001). Proses visualisasi DNA (elektroforesis) dilakukan untuk mengecek ada atau tidaknya kandungan DNA (visualisasi DNA). Jika terdapat DNA pada sampel maka akan muncul band DNA pada hasil elektroforesis, hasilnya dapat dilihat pada Gambar 9 berikut.



Gambar 9. Hasil elektroforesis sampel *N. fasciatus*. Keterangan: BI1 (sampel Blitar 1), BI2 (sampel Blitar 2), BI3 (sampel Blitar 3), Ps1 (sampel Pasuruan 1), Ps2 (sampel Pasuruan 2)

Hasil elektroforesis kemudian disekuensing menggunakan jasa penyedia layanan. Hasil dari sekuensing menunjukkan panjang basa sekuen adalah 665-683 bp (*basepairs*). Menurut Folmer *et al.* (1994), hasil amplifikasi pasangan primer LCO1490 dan HCO2198 menunjukkan fragmen kurang lebih 700 bp secara konsisten. Perbedaan panjang basa hasil amplifikasi tidak mempengaruhi hasil analisis. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan kualitas DNA, komposisi basa primer, ukuran panjang primer yang digunakan hingga faktor lingkungan (Shizuka dan Lyon, 2008). Sekuen nukleotida selanjutnya

dianalisis menggunakan software MEGA X dan dilakukan penjajaran (*alignment*) dan panjang sekuen nukleotida setelah penjajaran ditentukan 640 bp.

Hasil sekuensing berupa kromatogram (Lampiran 4 s.d Lampiran 18) yang kemudian diidentifikasi menggunakan BLAST pada NCBI. NCBI merupakan server yang memuat data base tentang informasi kesehatan dan bioteknologi.

Data base terus menerus di update sesuai dengan penemuan-penemuan terkini yang menyangkut DNA, protein, senyawa aktif dan taksonomi. Hasil pencocokan sekuen sampel dengan sekuen pada NCBI menggunakan BLAST selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 19 s.d Lampiran 33.

Hasil identifikasi nukleotida sampel menggunakan BLAST ditunjukkan pada Tabel 10 berikut dengan disertai nilai *query cover*, *e-value* dan *identity*.

Tabel 10. Identifikasi Sampel Menggunakan BLAST

ID Sampel	Spesies	BLAST			
		Access code of NCBI	Query Cover	E-value	Identity
Ponorogo 1	<i>N. fasciatus</i>	KT960792.1	95%	0.0	99.23%
Ponorogo 2	<i>N. fasciatus</i>	KT960792.1	95%	0.0	99.23%
Ponorogo 3	<i>N. fasciatus</i>	KT960792.1	95%	0.0	98.77%
Blitar 1	<i>N. fasciatus</i>	KT960792.1	95%	0.0	99.39%
Blitar 2	<i>N. fasciatus</i>	KT960792.1	95%	0.0	99.08%
Blitar 3	<i>N. fasciatus</i>	KT960792.1	95%	0.0	99.54%
Blitar 4	<i>N. fasciatus</i>	KT960792.1	95%	0.0	99.54%
Blitar 5	<i>N. fasciatus</i>	KT960792.1	95%	0.0	99.39%
Pasuruan 1	<i>N. fasciatus</i>	KU692665.1	92%	0.0	100.00%
Pasuruan 2	<i>N. fasciatus</i>	KU692665.1	92%	0.0	100.00%
Pasuruan 3	<i>N. fasciatus</i>	KU692665.1	92%	0.0	99.37%
Pasuruan 4	<i>N. fasciatus</i>	KU692665.1	92%	0.0	100.00%
Pasuruan 5	<i>N. fasciatus</i>	KU692665.1	92%	0.0	100.00%
Lumajang 1	<i>N. fasciatus</i>	KU692665.1	92%	0.0	99.37%
Lumajang 2	<i>N. fasciatus</i>	KU692665.1	95%	0.0	98.93%

Nilai *query cover* pada hasil BLAST berada pada kisaran 92-95%. *Query cover* merupakan persentase kemiripan antara panjang nukleotida pada sampel

dengan panjang nukleotida pada *database* GenBank. Nilai *identity* pada hasil BLAST berada pada kisaran 98,77-100%. *Identity* merupakan persentase kemiripan sekuen sampel dengan *database* GenBank. *E-value* pada hasil BLAST menunjukkan nilai 0,0. *E-value* menunjukkan signifikansi antara sekuen sampel dengan sekuen pada GenBank. Semakin rendah *E-value* maka tingkat homolog antar sekuen semakin tinggi (Claverie dan Notredame, 2003).

Berdasarkan hasil tersebut, seluruh sampel yang diperoleh teridentifikasi sebagai spesies *N. fasciatus*, dengan kemiripan yang tinggi antara sekuen sampel dengan sekuen pada *database* GenBank.

5.3 Karakteristik Genetik *Nemacheilus fasciatus*

Salah satu karakteristik genetik yang perlu dilakukan adalah mengetahui komposisi basa nukleotida. Komposisi nukleotida dari kelima belas sampel *N. fasciatus* ditampilkan pada Tabel 11 berikut.

Tabel 11. Komposisi Basa Masing-masing Sampel *N. fasciatus*

ID Sampel	Basa (%)			
	T(U)	C	A	G
Ponorogo 1	24,06	18,91	25,94	31,09
Ponorogo 2	23,28	19,22	26,56	30,94
Ponorogo 3	23,44	18,91	26,88	30,78
Blitar 1	23,59	19,69	26,41	30,31
Blitar 2	23,44	19,69	26,56	30,31
Blitar 3	23,28	19,84	26,41	30,47
Blitar 4	23,44	19,69	27,19	29,69
Blitar 5	23,44	19,69	26,88	30,00
Pasuruan 1	23,44	19,69	26,56	30,31
Pasuruan 2	23,44	19,69	26,56	30,31
Pasuruan 3	23,44	19,53	26,72	30,31
Pasuruan 4	23,44	19,69	26,56	30,31
Pasuruan 5	23,44	19,69	26,56	30,31
Lumajang 1	23,44	19,38	26,88	30,31
Lumajang 2	23,44	19,38	26,72	30,47
Rata-rata	23,47	19,51	26,63	30,40

Variasi basa nukleotida penyusun DNA dapat digunakan untuk menggambarkan tingkat keanekaragaman genetik (Irawan, 2010). Variasi ini dapat berpengaruh pada fenotipe individu organisme yang dapat diamati secara langsung (Suryanto, 2003). Hasil analisis komposisi nukleotida pada *N. fasciatus* menunjukkan bahwa rata-rata jumlah guanin adalah yang paling tinggi. Komposisi guanin yang tinggi pada sampel penelitian berhubungan dengan kemungkinan terjadinya mutasi. Menurut Jusuf (2001), guanin memiliki ikatan hidrogen rangkap tiga sehingga kemungkinan terjadinya mutasi lebih kecil karena memiliki ikatan yang lebih kuat.

Menurut Toha (2011), dasar pembeda antar hewan dan identifikasi spesies dipengaruhi oleh perbedaan nukleotida, sehingga analisis nukleotida diperlukan karena merupakan penyusun sekuen DNA. Sebagai pembanding, komposisi nukleotida dari spesies lain pada genus yang sama yaitu spesies *N. guentheri* (Pereira *et al.*, 2016), komposisi sitosin dan timin adalah yang paling tinggi yaitu dengan prosentase sitosin 28,60% dan timin 28,40% seperti terlihat pada Tabel 12 berikut. Hal tersebut berbanding terbalik dengan komposisi basa *N. fasciatus* dimana basa guanin adalah yang paling tinggi dengan 30,40% diikuti timin 23,47% dan sitosin adalah yang terendah dengan 19,51%.

Tabel 12. Komposisi Basa Genus *Nemacheilus*

Spesies	T(U)	C	A	G
<i>Nemacheilus fasciatus</i>	23,47%	19,51%	26,63%	30,40%
<i>Nemacheilus guentheri</i>	28,40%	28,60%	25,60%	17,30%

Pada gen penyandi protein, substitusi transisi adalah perubahan antara basa purin (A dengan G) atau antara basa pirimidin (C dengan T), sedangkan transversi adalah perubahan dari basa purin menjadi basa pirimidin atau sebaliknya. Nilai probabilitas substitusi basa nukleotida juga dihitung dalam penelitian ini dimana kemungkinan substitusi yang paling tinggi ditemukan pada basa G, diikuti oleh basa A, T dan C, dengan estimasi bias (R) transisi/transversi

adalah 1,66. Hal ini berkaitan dengan frekuensi masing-masing nukleotida pada komposisi basa yang telah disebutkan di atas.

Probabilitas substitusi transisi lebih besar daripada substitusi transversi, karena substitusi transisi yang terjadi antara nukleotida purin dengan purin dan antara pirimidin dengan pirimidin lebih mudah terjadi dibandingkan dengan substitusi transversi antara purin dengan pirimidin. Hal ini dipengaruhi oleh kemiripan struktur molekulnya, nukleotida purin dan pirimidin memiliki perbedaan struktur molekul yang lebih besar. Hal ini sesuai dengan pendapat Kocher *et al.*

(1989) bahwa substitusi nukleotida pada tingkat spesies sebagian besar adalah transisi sebab memiliki struktur yang kurang lebih sama dan memiliki cincin karbon nitrogen yang sama. Sehingga dalam hal ini, basa G akan lebih mudah bersubstitusi dengan basa A yang sesama purin yaitu dengan nilai 18,65% dibandingkan dengan substitusi antara basa G dengan T ataupun dengan basa C.

Probabilitas Substitusi Nukleotida dilakukan menggunakan Analisis *Maximum Likelihood* (ML) model K80 (Kimura, 1980) hasilnya ditampilkan pada Tabel 13..

Tabel 13. Probabilitas Substitusi Nukleotida dengan Analisis *Maximum Likelihood* (ML)

	A	T	C	G
A	-	4,50	3,74	18,65
T	5,10	-	12,11	5,83
C	5,10	14,57	-	5,83
G	16,33	4,50	3,74	-

Keterangan: masing-masing nilai menunjukkan probabilitas substitusi dari satu basa (baris) dengan basa yang lain (kolom). Substitusi transisi ditunjukkan dengan huruf tebal dan substitusi transversi ditunjukkan dengan huruf miring.

Sebagaimana menurut Yang dan Rannala (2012), estimasi probabilitas substitusi nukleotida dapat menggunakan asumsi model rantai Markov. Selain K80 terdapat model JC69 (Jukes-Cantor, 1969) dan HKY85 (Hasegawa-Kishino-Yano, 85). Model JC69 lebih mengasumsikan tingkat substitusi yang sama antara dua nukleotida sedangkan model K80 mengasumsikan tingkat perbedaan transisi

dan transversasi seperti yang terlihat pada matriks probabilitas substitusi nukleotida. Kedua model tersebut memprediksi frekuensi keempat nukleotida.

Makin tinggi frekuensi basa nukleotida, maka kemungkinan terjadinya substitusi juga semakin besar.

Faktor-faktor yang dapat menyebabkan mutasi antara lain adalah terpapar ultraviolet (UV) dari cahaya matahari. Salah satu akibat terpapar UV adalah hidrolisis basa sitosin menjadi bentuk hidrat yang menyebabkan basa tersebut salah berpasangan dengan adenin dan pada replikasi berikutnya posisinya diganti oleh timin. Penyebab lain adalah terpapar bahan kimia seperti *Oxidizing agents* yang umum disebut sebagai radikal bebas di mana bahan ini dapat memodifikasi nukleotida sehingga merubah pasangan basa. Mutasi juga dapat terjadi secara spontan, misalnya depurinasi di mana basa purin hilang dari nukleotida melalui proses hidrolisis (Viguera *et al.*, 2001).

Berdasarkan asal (penyebab), mutasi diklasifikasikan sebagai mutasi spontan dan mutasi terinduksi. Mutasi spontan adalah mutasi yang terjadi saat aktivitas selular normal. Mutasi spontan disebabkan oleh kondisi alami selama replikasi, perbaikan dan rekombinasi DNA. Mutasi dapat terjadi secara spontan, karena hasil kesalahan jarang dalam replikasi dan rekombinasi DNA normal. Perubahan gen yang terjadi setelah waktu evolusi tidak hanya melibatkan substitusi nukleotida sederhana, delesi atau insersi, tetapi juga duplikasi dan perubahan gen ekstensif dari DNA antara gen-gen yang berbeda.

Selanjutnya juga dilakukan analisis keragaman haplotipe (Hd) dan nukleotida (π) menggunakan aplikasi *DnaSP 5.10* (Librado dan Rozas, 2009).

Diketahui indeks keragaman haplotipe *Nemacheilus fasciatus* adalah 1,0000 (termasuk kategori tinggi) untuk sampel dari daerah Ponorogo, Blitar dan Lumajang sedangkan untuk lima buah sampel dari daerah Pasuruan indeks Hd 0.40000 (termasuk kategori rendah). Indeks keragaman nukleotida (π) tertinggi

pada sampel dari daerah Ponorogo dengan 0,02188 dan terendah di Pasuruan dengan 0,00125. Indeks keragaman Pasuruan termasuk rendah dapat disebabkan oleh kondisi geografis Sungai Kedunglarangan yang memiliki panjang sungai relatif pendek yaitu sekitar 41 km (BPS Pemkab Pasuruan, 2016) dibandingkan dengan panjang Sungai Bengawan Solo tempat pengambilan sampel Ponorogo yang mencapai 600 km (Data Hidrologi Jawa Timur, 2018).

Selain itu lebar Sungai Kedunglarangan tidak selebar lokasi pengambilan sampel yang lain sehingga ruang gerak *N. fasciatus* lebih terbatas. Cakupan ruang gerak yang sempit tersebut mempengaruhi pola perkawinan yang berpotensi inbreeding sehingga tidak menghasilkan nukleotida yang bervariasi. Hal tersebut sesuai menurut Hobbs *et. al.* (2013), banyak kasus inbreeding di alam diduga karena adanya barrier geografis dalam reproduksi, dimana individu-individu cenderung bereproduksi dengan individu dari posisi geografis yang sama dalam wilayah yang lebih kecil. Hasil selengkapnya terlihat pada Tabel 14 berikut.

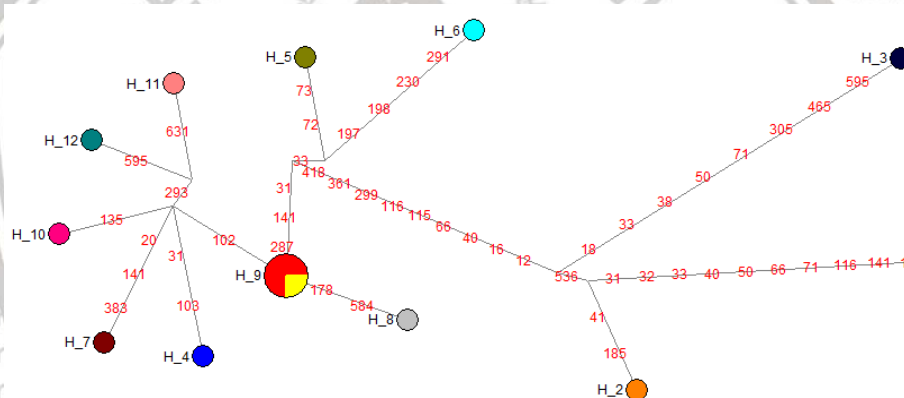
Tabel 14. Indeks Keragaman Haplotipe (Hd) dan Keragaman Nukleotida (π)

Lokasi	Jumlah Sekuen	Σ Haplotipe	Hd	π
Ponorogo	3	3	1.00000	0,02188
Blitar	5	5	1.00000	0,01188
Pasuruan	5	2	0.40000	0,00125
Lumajang	2	2	1.00000	0,00313

Walaupun nilai Hd Pasuruan termasuk rendah, nilai rata-rata Hd keseluruhan termasuk tinggi yaitu 0,9429 dengan jumlah total mutasi 44. Kelima belas sampel membentuk 12 haplotipe, dimana H₉ dibentuk oleh empat sampel berbeda. Sedangkan sisanya masing-masing membentuk haplotipe sendiri. Avise *et al.* (1989) menyebutkan bahwa keragaman haplotipe keseluruhan mtDNA untuk beberapa ikan berada dalam kisaran 0.473-0.998.

Sampel Pasuruan 1, Pasuruan 2, Pasuruan 4 dan Pasuruan 5 terdapat haplotipe yang sama. Sedangkan mutasi paling banyak terjadi pada sampel

Ponorogo 1, Ponorogo 2 dan Ponorogo 3. Suman *et al.*, (2013) menjelaskan bahwa perbedaan nilai haplotipe di antara dan di dalam populasi diakibatkan karena substitusi, insersi atau delesi genetik. Secara umum sumber variasi genetik disebabkan oleh perkawinan acak, ukuran populasi sangat besar, migrasi, mutasi, rekombinasi dan seleksi alam (Hartl dan Clark 1997; Hartl dan Jones 1998; Griffiths *et al* 2000; Anne *et al* 2007; Hamilton 2009). Sesuai dengan pembahasan sebelumnya, bahwa sampel dari Pasuruan memiliki keanekaragaman yang rendah dikarenakan besarnya inbreeding dan kecilnya cakupan migrasi ikan disebabkan oleh luasan sungai yang sempit sehingga tidak menghasilkan banyak ragam haplotipe. Keanekaragaman haplotipe kelima belas sampel ditunjukkan pada Gambar 10 berikut.



Gambar 10. Keragaman haplotipe *N. fasciatus*. Keterangan: Hap_1: 1 [Ponorogo 1]; Hap_2: 1 [Ponorogo 2]; Hap_3: 1 [Ponorogo 3]; Hap_4: 1 [Blitar 1]; Hap_5: 1 [Blitar 2]; Hap_6: 1 [Blitar 3]; Hap_7: 1 [Blitar 4]; Hap_8: 1 [Blitar 5]; Hap_9: 4 [Pasuruan 1, Pasuruan 2, Pasuruan 4, Pasuruan 5]; Hap_10: 1 [Pasuruan 3]; Hap_11: 1 [Lumajang 1]; Hap_12: 1 [Lumajang 2]

Selain itu kemiripan dan perbedaan nilai keragaman genetik juga disebabkan oleh beberapa faktor, yang salah satunya adalah jumlah sampel yang digunakan pada saat penelitian berbeda-beda, sebagaimana yang dijelaskan Nei, (1981) bahwa nilai keragaman genetik satu spesies tergantung pada ukuran sampel yang di temukan. Wigati *et. al.* (2003) mengemukakan pemakaian jumlah sampel yang digunakan dalam analisis mempunyai pengaruh yang besar, semakin sedikit sampel yang digunakan peluang untuk mendapatkan

lokus polimorfik akan sedikit sehingga nilai heterozigositasnya juga sedikit. Jika sampel yang digunakan jumlahnya banyak maka peluang mendapatkan lokus polimorfik semakin banyak. Pada sampel dari DAM Wilangan (grup Ponorogo), walaupun hanya terdiri dari 3 sampel namun memiliki ragam haplotipe yang bervariasi. Hal tersebut dapat disebabkan oleh banyaknya mutasi pada nukleotida sampel pada grup Ponorogo seperti yang terlihat pada gambar jaringan keragaman haplotipe tersebut. Tingginya mutasi pada grup sampel tersebut dapat disebabkan oleh kualitas air dan kondisi panjang dan lebar sungai, lebih lanjut dibahas dalam sub bab pengaruh kualitas air.

Selanjutnya dilakukan analisis jarak genetik dengan menggunakan metode Pairwise Analisis Kimura 2 Parameter (K2P). Jarak genetik antar sampel diketahui paling rendah 0,0000 yaitu jarak antara sampel Pasuruan 1, Pasuruan 2, Pasuruan 4 dan Pasuruan 5. Jarak genetik terjauh adalah 0,0371 yaitu jarak antara sampel Lumajang 1 dan Ponorogo 3. Hasil penghitungan jarak genetik ditampilkan dalam bentuk matriks pada Lampiran 34. Jarak genetik tersebut termasuk rendah. Menurut Nei, (1972), jarak genetik 0.010-0.099 termasuk dalam kategori rendah, 0.1-0.99 termasuk dalam kategori sedang dan jarak genetik 1.00-2.00 termasuk dalam kategori tinggi. Nilai 0.000 menunjukkan bahwa dari 1000 pasang basa, tidak satupun terdapat pasangan basa yang berbeda. Kedekatan jarak genetik ini disebabkan karena populasi mempunyai asal-usul induk yang sama (Iskandar *et al* 2010). Menurut Hobbs *et. al* (2013) inbreeding diduga karena adanya barrier geografis dalam reproduksi, dimana individu-individu cenderung bereproduksi dengan individu dari posisi geografis yang sama.

Rata-rata jarak genetik antar grup terendah diketahui pada sampel dari Lumajang dan Pasuruan dengan nilai 0,0031 sedangkan jarak genetik terjauh yaitu 0,0354 antara sampel dari daerah Ponorogo dan Lumajang. Secara

geografis, jarak antara Ponorogo dan Lumajang lebih jauh dibandingkan jarak antara Blitar dan Pasuruan. Masing-masing lokasi pengambilan sampel, berada pada Daerah Aliran Sungai (DAS) yang berbeda, kemungkinan untuk ikan ini bermigrasi dari sungai satu ke sungai lain sangat kecil. Namun kemungkinan pengaruh introduksi dari faktor manusia sangat mungkin mengingat ikan ini merupakan salah satu ikan air tawar yang gemar dikonsumsi oleh masyarakat dan juga sering digunakan sebagai ikan hias akuarium. Secara keseluruhan, menurut Nei (1972), rata-rata jarak genetik antar grup tergolong rendah, yang artinya semua populasi merupakan kerabat dekat. Hasil keseluruhan ditunjukkan pada Tabel 15 berikut.

Tabel 15. Jarak Genetik Antar Populasi *N. fasciatus*

	Ponorogo	Blitar	Pasuruan	Lumajang
Ponorogo	-			
Blitar	0,0207	-		
Pasuruan	0,0271	0,0320	-	
Lumajang	0,0354	0,0320	0,0031	-

Rata-rata jarak genetik dalam grup ditampilkan pada Tabel 16 berikut.

Jarak genetik terendah diketahui pada grup sampel Pasuruan. Jarak genetik dalam grup tertinggi diketahui pada sampel yang diperoleh di Ponorogo yaitu mencapai 0,0379.

Tabel 16. Jarak Genetik dalam Populasi *N. fasciatus*

Lokasi Pengambilan Sampel	Jarak Genetik
Ponorogo	0,0379
Blitar	0,0171
Pasuruan	0,0001
Lumajang	0,0132

Analisis perbedaan level jarak antar populasi dilakukan menggunakan Fixation Index (Fst) dengan menggunakan aplikasi Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2009). Analisis Fixation Index (Fst) merupakan salah satu analisis untuk

mengukur diferensiasi genetik antara populasi karena struktur genetik dan untuk mengidentifikasi adanya aliran gen. Memahami struktur genetik seperti adanya konektivitas maupun aliran gen (*genflow*) sangat penting untuk perencanaan konservasi karena dapat mengidentifikasi rute penyebaran atau penghalang terhadap penyebaran (Sale *et al.*, 2005). Hasil analisis *Fst* ditampilkan dalam Tabel 17 berikut ini.

Tabel 17. Analisis *Fixation Index (Fst) N. fasciatus*

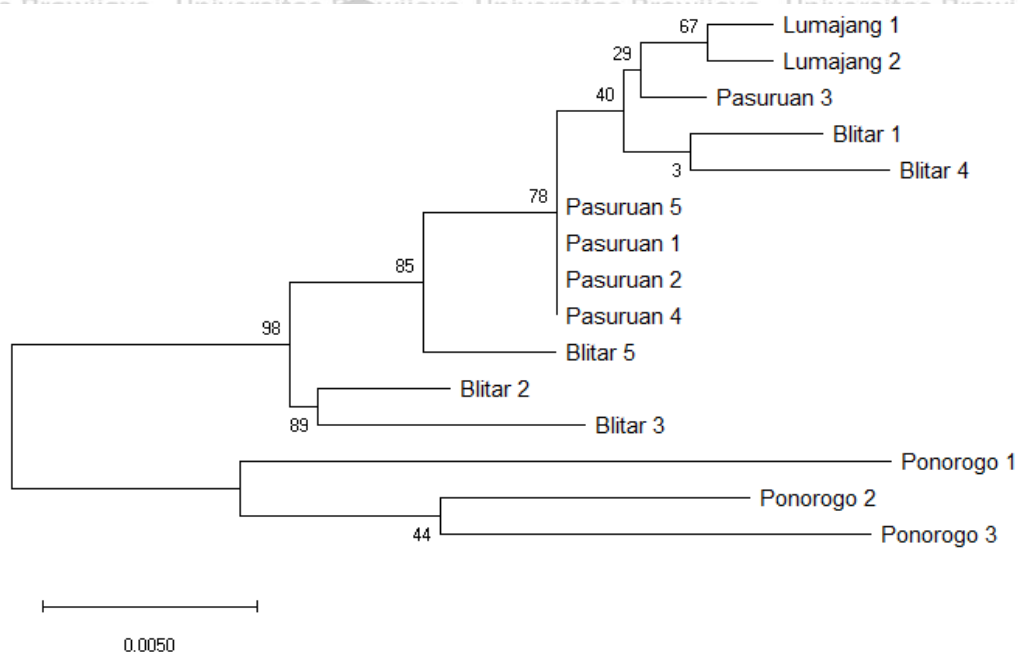
	Ponorogo	Blitar	Pasuruan	Lumajang
Ponorogo				
Blitar	0,4776			
Pasuruan	0,6922	0,1322		
Lumajang	0,5238	0,1328	0,6359	

Nilai *Fst* terendah antara Pasuruan dan Blitar dengan 0,1322 dan tertinggi antara Ponorogo dan Pasuruan dengan 0,6922. Menurut Excoffier *et al.* (1992), nilai *Fst* 0,1-0,3 termasuk rendah, *Fst* 0,4-0,7 termasuk sedang dan *Fst* 0,8-1,0 termasuk tinggi. Dengan demikian *Fst* antara Ponorogo dan Pasuruan termasuk tinggi. Nilai (*Fst*) yang besar menjelaskan bahwa terjadi aliran gen antar populasi yang sedang. Besarnya aliran gen kemungkinan disebabkan karena ketiga populasi saling memberikan pengaruh terhadap aliran genetik antar populasi. Selain itu tingginya aliran gen yang masuk kedalam populasi per generasi turut mempengaruhi kedekatan genetik kedua populasi. Mulyasari *et al.* (2010) menjelaskan bahwa populasi dengan tingkat differensiasi yang rendah, mungkin disebabkan oleh banyaknya kesamaan genetik antar populasi. Tingkat aliran gen yang rendah pada beberapa ikan per generasi cukup untuk mencegah diferensiasi genetik dengan pergeseran genetik (Hauser dan Ward 1998).

5.4 Filogenetik *Nemacheilus fasciatus*

Pohon filogenetik atau pohon evolusi adalah sebuah struktur matematika yang memodelkan sejarah evolusi berdasarkan sekuens DNA suatu kelompok

organisme (Page dan Holmes 1998). Analisis filogenetik populasi dilakukan dengan menggunakan metode Maximum Likelihood (ML) dengan model Kimura 2-parameter dan nilai *bootstrap* 1000x pada software MEGA X (Tamura *et al.*, 2013). Berdasarkan konstruksi pohon filogeni membentuk satu *clade* dengan nilai *bootstrap* 98%. Filogenetik kelima belas sampel ditampilkan pada Gambar 11 berikut.

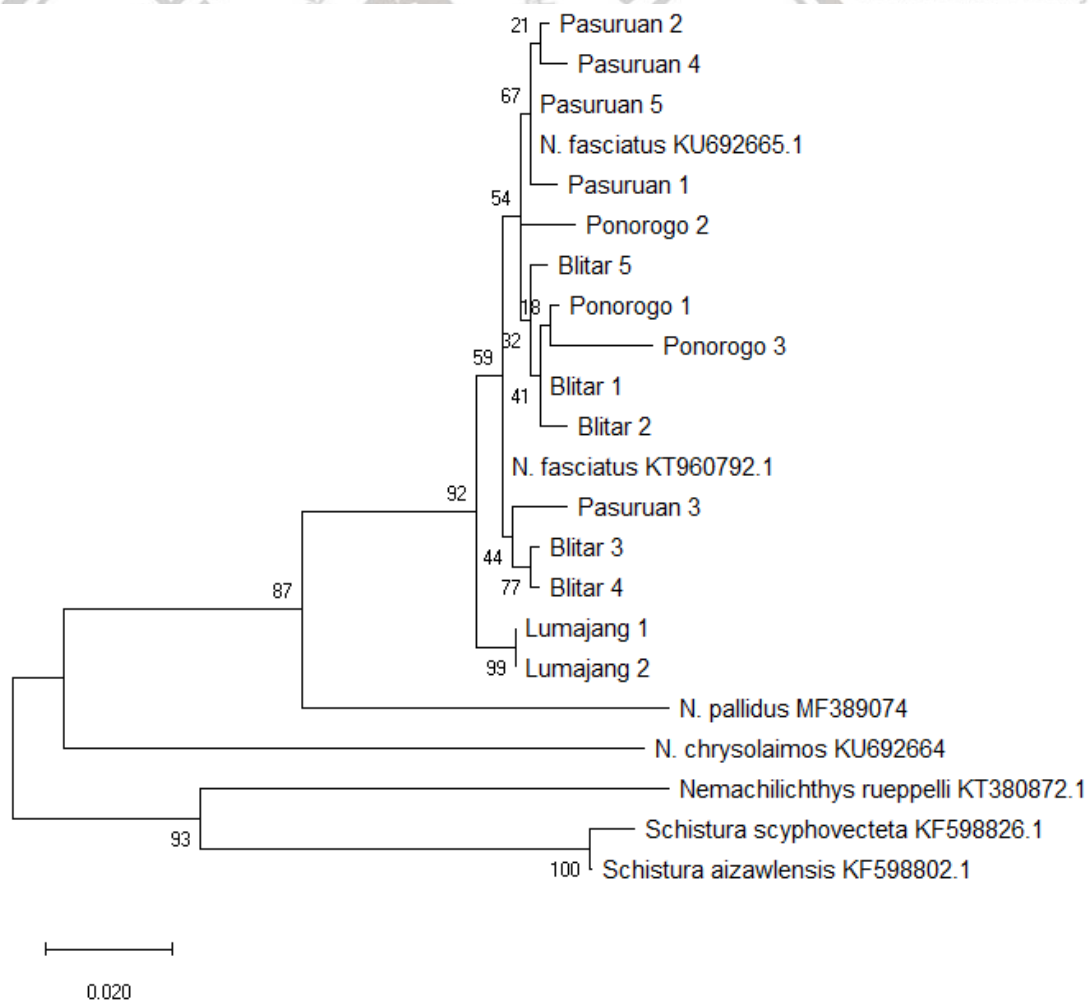


Gambar 11. Filogenetik sampel *N. fasciatus*

Hasil pengujian pohon filogeni dengan metode *bootstrapping* ditampilkan dalam bentuk dendrogram disertai nilai perhitungan *bootstrap* disetiap cabangnya. Pohon filogeni yang dibangun, didukung oleh nilai *bootstraps* yang tinggi (1000x) pada setiap cabang pada kelompok populasi. Hal ini menunjukkan bahwa konstruksi pohon kekerabatan yang dibangun memiliki tingkat keakuratan yang tinggi. Nilai *bootstraps* tersebut menunjukkan keakuratan percabangan pohon filogenetik (Hooriike et al 2009), nilai bootstrap lebih dari sama dengan 95% menunjukkan bahwa percabangan tersebut sangat akurat, konsisten, atau tidak akan berubah walaupun menggunakan metode penyusunan pohon

filogenetik lain. Nilai bootstrap lebih dari 70% menunjukkan bahwa percabangan bersifat signifikan dan tetap (Cooney & Vandamme 2003). Kekerbatan antara sampel Pasuruan 1, Pasuruan 2, Pasuruan 4 dan Pasuruan 5 terlihat sangat dekat. Sampel dari grup Ponorogo membentuk clade sendiri dengan nilai bootstrap 98% dan menunjukkan besarnya perbedaan nukleotida. Sampel dari grup Lumajang juga membentuk clade sendiri dengan nilai bootstrap 67%. Keseluruhan sampel *N. fasciatus* masih berada dalam satu grup.

Sebagai pembandingan, digunakan data spesies lain dari GenBank yang masih satu famili dengan *N. fasciatus*. Konstruksi pohon filogenetik dari 15 sampel yang diperoleh dengan dibandingkan data GenBank NCBI ditampilkan pada Gambar 12.



Gambar 12. Filogenetik *N. fasciatus* dibandingkan dengan spesies lain

Hasilnya terlihat dimana *N. pallidus* (Thailand) lebih dekat kekerabatannya dengan *N. fasciatus* jika dibandingkan dengan *N. chrysolaimos* (Sukabumi).

Menurut Brinkman (2001), percabangan pohon filogenetik yang lebih dari 70% merupakan percabangan yang memiliki kebenaran dengan selang kepercayaan 95%, sehingga individu-individu sampel dari kedua populasi yang diamati secara signifikan termasuk dalam gene pool yang sama. Gene pool merupakan populasi yang menampung berbagai alel yg tersedia dalam satu spesies.

Berdasarkan pohon filogenetik dan matriks jarak anatar populasi diketahui bahwa jarak genetik grup Pasuruan sangat rendah sehingga tidak dianjurkan untuk dilakukan program *breeding* karena dapat mengakibatkan *inbreeding* jika dilakukan perkawinan terhadap kedua spesies tersebut. *Inbreeding* merupakan persilangan antar individu yang memiliki hubungan keluarga yang dekat (Noor, 2008). Perkawinan *inbreeding* akan menyebabkan kehilangan variasi genetik (Allendorf dan Luikart, 2008). *Inbreeding* mengakibatkan peningkatan derajat homozigositas dan pada saat yang bersamaan menurunkan derajat heterozigositas. Peningkatan frekuensi homozigot resesif juga akan mengakibatkan penurunan performans atau produksi.

Keragaman genetik yang rendah akan mengurangi kemampuan spesies untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan (Frankham, 1999). Keragaman genetik yang rendah berakibat negatif dalam makhluk hidup seperti kecilnya sintasan suatu organisme, turunnya kemampuan dalam beradaptasi, dan pertumbuhan yang tidak baik. Spesies dengan kemampuan adaptasi yang baik dapat menghasilkan variasi fenotip dan genotip guna merespon terhadap perubahan kondisi lingkungan sehingga individu dapat bertahan hidup dan berkembang baik (Taylor dan Aarsen, 1988).

Kedekatan jarak genetik dalam suatu populasi memberikan dugaan bahwa populasi tersebut berasal dari keturunan yang sama. Semakin kecil nilai jarak

genetik antar individu di dalam maupun antar populasi, maka semakin dekat kekerabatan genetik (Koh *et al* 1999). Mayr (1970) menyatakan bahwa populasi yang memiliki tingkat hubungan kekerabatan yang tinggi mempunyai banyak persamaan morfologi dan genetik akibat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan.

Rendahannya keragaman genetik tersebut dapat disebabkan oleh habitat populasi yang terpisah satu sama lain karena berada pada Daerah Aliran Sungai (DAS) yang berbeda. Perbedaan DAS tersebut membuat kecil kemungkinan untuk ikan bermigrasi dari DAS satu ke DAS yang lain untuk melakukan perkawinan silang sehingga kemungkinan *indbreeding* lebih besar.

Penyebaran dan kedekatan genetik tersebut kemungkinan terjadi karena pengaruh wilayah Sunda memiliki landas kontinen yang dangkal dan perubahan permukaan laut secara eustatik telah berulang kali menghubungkan pulau-pulau besar di wilayah ini untuk membentuk Sundaland (Rainboth, 1996 *dalam* Kusuma, 2016). Sundaland merupakan wilayah di Asia Tenggara yang mencakup paparan Sunda, bagian dari landas benua Asia yang terbuka selama zaman es yang membentuk Sundaland, yang memungkinkan terjadinya migrasi ikan air tawar ke dalam dan luar Jawa yang terjadi 10-70 ribu tahun lalu (Voris, 2000 *dalam* Kusuma, 2016), sehingga mempunyai asal-usul induk yang sama mengakibatkan kedekatan secara genetik. Selain kemungkinan adanya introduksi spesies baik terjadi secara sengaja atau tidak sengaja terbawa oleh manusia ketika melakukan migrasi di tanah Sundaland juga menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi terjadinya penyebaran beberapa spesies ikan di kawasan Asia.

5.5 Kualitas Air

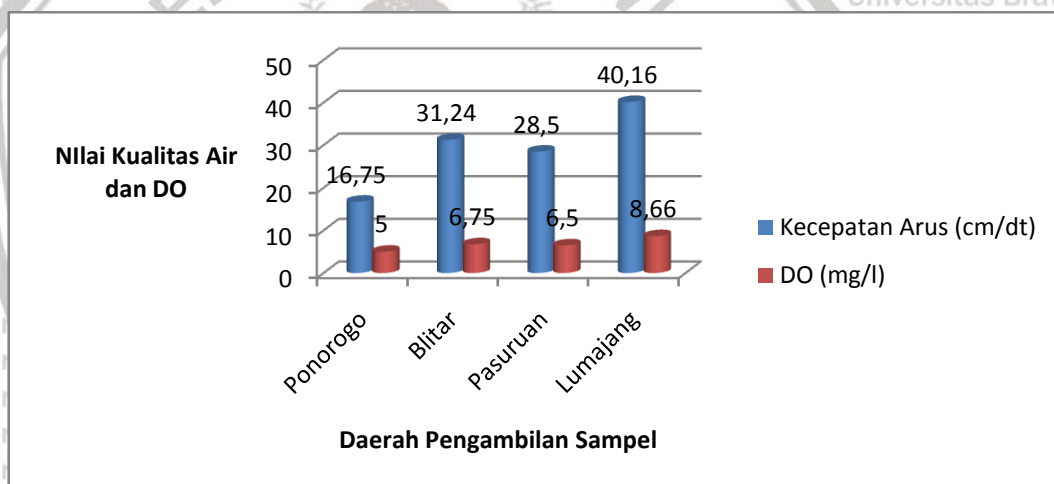
Ukuran panjang standar ikan (SL) dari Lumajang dan Blitar (5,70-6,90 cm) cenderung lebih besar dibandingkan dengan ikan dari Ponorogo dan Pasuruan

(4,0-5,20 cm). Perbedaan morfologis antar populasi berbeda mungkin terkait dengan perbedaan faktor habitat seperti suhu, kekeruhan, ketersediaan makanan, kedalaman dan aliran air (Allendorf, 1988, Swain et al., 1991, Wimberger, 2008).

Parameter kualitas air yang menunjukkan perbedaan pada keempat lokasi tersebut adalah kecepatan arus dan DO seperti yang terlihat pada Gambar 13.

Kecepatan arus pada lokasi penangkapan di Lumajang lebih tinggi dibandingkan dengan Ponorogo dan Pasuruan. Hal tersebut dikarenakan oleh daerah penangkapan yang merupakan hulu sungai di lereng gunung dengan kemiringan yang lebih besar. Tingginya kecepatan arus berbanding lurus dengan DO.

Kandungan oksigen yang tinggi inilah yang sangat mendukung pertumbuhan biota perairan.



Gambar 13. Diagram Kecepatan Arus dan DO

Kondisi fisik perairan yang juga mendukung keragaan fenotip *N. fasciatus* adalah tipe substrat. Tipe substrat Lumajang dan Blitar adalah pasir berbatu yang merupakan khas substrat daerah hulu sungai. Menurut Risyanto (2012), *N. fasciatus* tumbuh baik di perairan yang dangkal berbatu dengan kecepatan arus yang tinggi. Ukuran tubuhnya yang kecil dan habitatnya yang berupa bebatuan hingga perairan berkerikil menyebabkan ikan ini mudah untuk bersembunyi dan sangat susah ditangkap. Menurut Brown (1975) dalam Kottelat et al., (1993),

N. fasciatus memiliki badan memanjang, ditemukan pada perairan dengan kandungan oksigen terlarut tinggi, hidup di tepi sungai pada bagian dangkal dan dasar sungai batu, kerikil dan pasir. Spesies ini mampu berenang melawan arus. Macan (1980) mengemukakan bahwa kisaran arus yang termasuk dalam kategori kuat berkisar 30-80 cm/dt dan kategori sedang berkisar 10-30 cm/dt. Kecepatan arus merupakan ciri utama ekologi sungai dan merupakan faktor pembatas utama bagi kehidupan organisme. Kecepatan arus dipengaruhi oleh derajat kecuraman, gradien permukaan, substrat dasar dan lebar sungai (Odum, 1971).

Suhu perairan sungai terendah pada lokasi pengambilan sampel di Lumajang yaitu di Sungai Betoto dengan suhu 19 °C, sedangkan daerah lain berada pada kisaran 25-29 °C. Menurut Cholik *et al.*, (1982), suhu air untuk daerah tropis tidak banyak bervariasi dan yang terbaik untuk organisme perairan berada pada kisaran 25-32 °C. Suhu perairan Sungai Betoto termasuk rendah dan berada di bawah kisaran normal namun keragaan *N. fasciatus* di sungai tersebut memiliki ukuran paling besar dibandingkan daerah lain. Hal tersebut dapat dikarenakan oleh faktor kualitas air yang lain yang mendukung pertumbuhannya, misalnya kandungan oksigen, kecepatan arus dan substrat yang bagus. Selain itu, secara visual kondisi perairan di Sungai Betoto lebih bersih dan tidak terlihat adanya bahan pencemar fisik perairan. Berbeda halnya dengan daerah pengambilan sampel di Ponorogo yaitu di DAM Wilangan yang terlihat banyak limbah fisik di area filter pintu DAM. Sampel yang diperoleh dari DAM ini memiliki rata-rata ukuran morfologi yang paling kecil dibanding daerah lain yaitu pada kisaran 4,00-4,60 cm (panjang standar). Sesuai pembahasan karakteristik genetik pada subbab sebelumnya, pada grup sampel Ponorogo ini paling banyak ditemukan mutasi sehingga besar kemungkinan

mutasi yang terjadi disebabkan oleh kualitas air yang kurang sesuai dengan kebutuhan hidup *N. fasciatus* di alam.

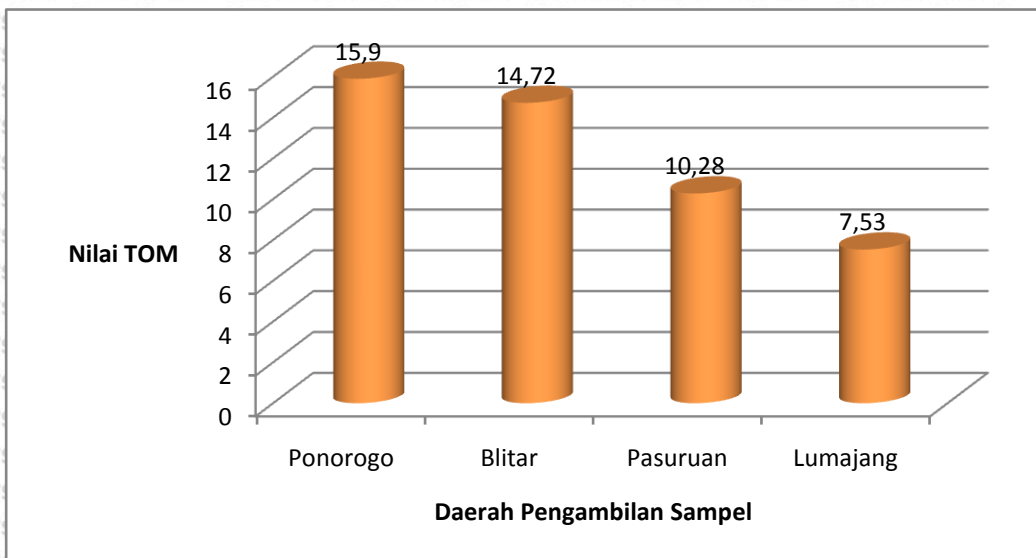
Pola temperatur ekosistem air juga dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti intensitas cahaya matahari, pertukaran panas antara air dengan udara sekelilingnya, ketinggian geografis dan juga faktor *canopy* (penutupan oleh vegetasi) dari pepohonan yang tumbuh di tepi (riparian) (Barrus, 2001; Secchi *et al.*, 2011). Ketinggian lokasi pengambilan sampel berbeda-beda, lokasi yang paling tinggi adalah Sungai Betoto Lumajang dengan ketinggian 634 mdpl. Faktor yang paling berpengaruh terhadap perbedaan suhu di keempat lokasi pengambilan sampel adalah ketinggian yang dapat dilihat pada Tabel 18 berikut.

Tabel 18. Ketinggian Lokasi Pengambilan Sampel

Stasiun	Sungai	Ketinggian	Lokasi
1	DAM Wilangan	135 mdpl	Ponorogo
2	Kali Lekso	305 mdpl	Blitar
3	Sungai Sumbergedang	411 mdpl	Pasuruan
4	Sungai Betoto	634 mdpl	Lumajang

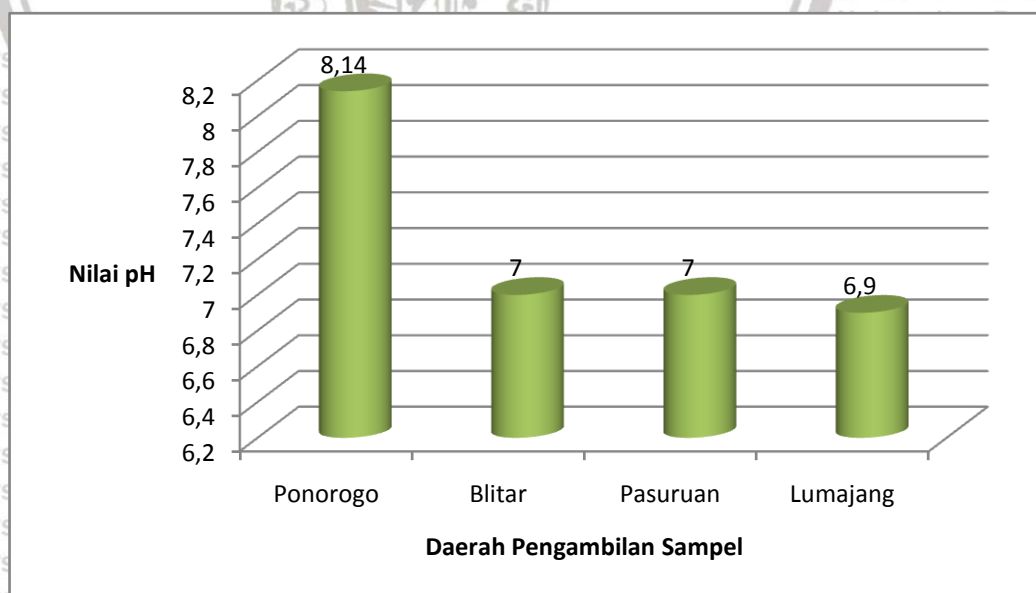
Total Organic Matter (TOM) juga diukur dalam penelitian ini. Nilai TOM di DAM Wilangan Ponorogo paling tinggi dan yang nilai TOM terendah pada Sungai Betoto Lumajang. Nilai TOM dalam peraturan pemerintah atau undang-undang memang tidak dicantumkan, namun Rakhman (1999) menyebutkan bahwa nilai TOM perairan yang ideal untuk budidaya adalah berkisar antara 20 -30 mg/l, maka dari itu bisa dikatakan bahwa nilai TOM pada semua lokasi pengambilan sampel berada pada di bawah batas normal. Walaupun demikian, *N. fasciatus* bisa bertahan di lingkungan perairan dengan TOM rendah. Pada lokasi di Kali Lekso Blitar, kelimpahan ikan ini adalah yang paling banyak. Dengan demikian, ada indikasi bahwa ikan *N. fasciatus* lebih menyukai perairan dengan bahan organik terlarut (TOM) yang rendah, namun hal ini perlu penelitian lebih lanjut. Nilai TOM di keempat lokasi pengambilan sampel ditampilkan pada Gambar 15

berikut ini.



Gambar 15. Diagram *Total Organic Matter* (TOM)

Parameter pH perairan berada pada batas normal yaitu pada kisaran 6,90-8,14 seperti yang terlihat pada Gambar 14 berikut. Swingle (1963) menyatakan bahwa nilai pH perairan umum di daerah tropis biasanya berkisar 4,0-9,0, kemudian Wardoyo (1978) mendukung bahwa kehidupan perairan secara wajar bila nilai pH 5,0 - 9,0.



Gambar 14. Diagram pH

6. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan penelitian dan analisis yang dilakukan antara lain sebagai berikut:

1. Hasil identifikasi sampel yang dikumpulkan berdasarkan karakter morfologi (morfometrik dan meristik) diketahui bahwa seluruh sampel merupakan spesies *Nemacheilus fasciatus*.
2. Hasil identifikasi sampel menggunakan gen COI sebagai DNA *barcoding* diketahui bahwa seluruh sampel merupakan spesies *Nemacheilus fasciatus*.
3. Karakteristik genetik *Nemacheilus fasciatus* berdasarkan gen COI sebagai penanda molekuler antara lain memiliki komposisi basa T=23,47%, C=19,51%, A=26,63% dan G=30,40%. Probabilitas substitusi transisi lebih besar yaitu dengan nilai tertinggi 18,65%, sedangkan substitusi transversal nilai tertinggi hanya 5,83%, dengan nilai koreksi dari total rasio transisi/transversal (R) sebesar 1,66 %. Keragaman haplotipe tertinggi 1.00000 dan keragaman nukleotida (π) tertinggi 0,02188. Jarak genetik antar sampel diketahui paling rendah 0,0000 yaitu jarak antara sampel Pasuruan 1, Pasuruan 2, Pasuruan 4 dan Pasuruan 5. Jarak genetik terjauh adalah 0,0354 yaitu jarak antara sampel Ponorogo dan Ponorogo dan Lumajang. Kekekabatan genetik *Nemacheilus fasciatus* termasuk dekat dengan nilai bootstrap 98%.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian dan analisis yang dilakukan, disarankan perlu dilakukan pengambilan sampel dalam jumlah yang lebih banyak untuk mendapatkan gambaran yang lebih lengkap mengenai *Nemacheilus fasciatus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharjee, M.L and S. Barat. 2014. Loaches of Darjeeling Himalaya and Adjoining Areas of West Bengal: Their Prospects as Ornamental Fish and Constraints. *Internatiional Journal of Pure and Applied Bioscience. Int. J. Pure App. Biosci.* 2 (3): 258-264
- Affandi, R., D.S. Sjafei, M.F. Raharjo and Sulistiono. 1992. *Iktiologi: Suatu Pedoman Kerja Laboratorium*. PAU Ilmu Hayat, IPB Bogor. 344 hal.
- Agarwal, M., N. Shrivastava and H. Padh. 2008. Advances in Molecular Marker Techniques and Their Applications in Plant Sciences. *Plant Cell Rep.* 2008 Apr;27(4):617-31.
- Allendorf, F.W., 1988. Conservation biology of fishes. *Conserv. Biol.* 2, 145–148.
- Allendorf, F.W., 1988. Conservation Biology of Fishes. *Conserv. Biol.* 2, 145–148.
- Anne R, Kapuscinski and Miller ML. 2007. *Genetic Guidelines for Fisheries Managment*. Second Edition. University of Minnesota Sea Grant Program.
- Aoyama, S., A. Satohi dan A. Kunisue. 2011. White Linear Markings on the Abdomen of River Loaches (Nemacheilidae) - Potential Usage for the Identification of Individuals. *Folia Zoologica*, 60(4):285-289
- APHA. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*
- Arunachalam, M. Dan M. Muralidharan. 2009. *Nemacheilus stigmofasciatus* A New Spesies of Nemacheiline Loach from the Western Ghats India. *Journal of Threatened Taxa* 1(3) 147-150
- Avise J.C, Bowen BW and Lamp T. 1989. DNA Fingerprint from Hypervariable Mitochondrial Genotypes. *Moleculer Biologi Evolution*, 6:258-269.
- Avise J.C., B.W. Bowen and T. Lamb. 1989. DNA Fingerprints from Hypervariable Mitochondrial Genotypes. *Molecular Biology Evoution* 6:258-269.
- Avise JC. 1994. *Molecular Marker, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall. United Stated America.
- Bachmaier, C., U. Brandes and Schlieper B. 2005. Drawing Phylogenetic Trees. di dalam: 16th International Symposium on Algorithm and Computation (ISAAC 2005); 19-21 Desember 2005; Sanya, Hainan, China. Berlin (DE): Springer. 1110-1121 hal.

Barus, I. T. A. 2001. Pengantar Limnologi. Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Jakarta. 164 hal.

Baxevanis, A.D. and Ouellette B.F.F. 2001. Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins. Edisi kedua. New York (US): Wiley-Interscience.

Bellwood, D.R., T.P. Hughes., C. Folke and M. Nystrom. 2004. Confronting the Coral Reef Crisis. *Nature* 429, 827-833.

Biswas, J. dan A.K. Ramteke. 2008. Timed Feeding Synchronizes Circadian Rhythm in Vertical Simming Activity in Cave Loach, *Nemacheilus evezei*. *Biological Rhythm Research* 39(5):405-412

BPS Pemkab Pasuruan. 2018. Statistik Daerah Kabupaten Pasuruan. No Publikasi 35140.1828

Brinkman F. S. L., 2001. Phylogenetic analysis, Departement of microbiology and immunology University Library of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada, 348p

Budiharjo, A. 2003. Pakan Tambahan Aternatif untuk Meningkatkan Pertumbuhan Ikan Wader (*Rasbora argyrotaena*). *Biodiversitas*. 3 (2) : 225-230.

Chin P.K. and A. Samat. 1992. A New Species of Loach, *Nemacheilus elegantissimus*, (Family Balitoridae, Subfamily Nemacheilinae) from Danum Valley, Sabah, Malaysia. *Malay Nat J* 46 (1): 25-33.

Cholik, F.T., Artati dan R. Arifuddin. 1982. Pengelolaan Kualitas Air Kolam Ikan. Direktorat Jenderal Perikanan Bekerjasama Dengan International Research Centre, Jakarta.

Claverie, J. and C. Notredame. 2003. Bioinformatics for Dummies, Wiley Publishing Inc. New York. 325

Clements, R., N.S. Sodhi and M. Schilthuizen. 2006. Limestone Karsts of Southeast Asia: Imperiled Arks of Biodiversity. *BioScience*, 56,733-742.

Coenye, T. and P. Vandamme. 2003. Extracting Phylogenetic Information from Wholegenome Sequencing Projects: The Lactic Acid Bacteria as a Test Case. *Microbiology*. 149:3507-3517.

Dahrudin, H., A. Utama, F. Busso, S. Sauri, R. Hanner, P. Keith, R. Hadiaty and N. Hubert. 2016. Revisiting the Ichthyodiversity of Java and Bali through DNA Barcodes: Taxonomic Coverage, Identification Accuracy,



- Cryptic Diversity and Identification of Exotic Species. *Journal Molecule Ecology Resource*: In press
- Data Hidrologi Jawa Timur. 2018. Pola Pengelolaan sumber daya air Wilayah sungai brantas. Kementerian Pekerjaan Umum Republik Indonesia.
- De Bruyn, M., L. Reuber and S. Nylinder. 2013. Paleo-drainage Basin Connectivity Predicts Evolutionary Relationships Across Three Southeast Asian Biodiversity Hotspots. *Systematic Biology*. 62, 398–410.
- Dick, C.W. dan W.J. Kress. 2009. Dissecting Tropical Plant Diversity with Forest Plots and a Molecular Toolkit. *BioScience* 59(9):745-755
- Dudu, A., S.E. Georgescu and M. Costache. 2015. Molecular Approaches to Genetic Diversity. London. Intech Open. 1934 hal.
- Ebihara, A., J.H. Nitta and M. Ito. 2010. Molecular Species Identification with Rich Floristic Sampling: DNA *Barcoding* the Pteridophyte Flora of Japan. *Plos ONE* 5(12): e15136.
- Ekrem T, E. Willassen and E. Stur. 2007. A Comprehensive DNA Sequence Library is Essential for Identification with DNA Barcodes. *Mol Phylogenet Evol* 43:530–542
- Ekrem T, Willassen E, Stur E. 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Mol Phylogenet Evol* 43:530–542
- Elliot, N.G., K. Haskard and J.A. Koslow. 1995. Morphometric Analysis of Orange Roughy (*Hoplostethus atlanticus*) Off the Continental Slope of Southern Australia. *Journal of Fish Biology*. Volume46, Issue2
- Endruweit, M. *Schistura portos* Kottelat, 2000, A New Record of Nemacheilid Loach for China. *Zoological Research* 32(5): 572-574
- Esmaeili, H.R., G. Sayyadzadeh, S. Ghasemian, S. Mirghiyasi, R.Z. Nejad and J. Freyhof. 2012. Length-Weight Relationships of *Turcinoemacheilus kosswigi* Bănărescu and Nalbant, 1964 (Teleostei:Nemacheilidae) in Southwestern Iran and Its Relation to Habitat Structure. *Journal of Applied Ichthyology*, 32, 2,(391-392)
- Excoffier, L and H.E. Lischer. 2010. Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses Under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*.10(3):564-7.
- Excoffier, L., P.E. Smouse and J.M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes:

- Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131: 479–491.
- Ferguson, M. 1995. The Role of Molecular Genetic Markers in the Management of Cultured Fish. G.R. Carvalho and T.J. Pitcher (Eds.), *Molecular Genetics in Fisheries*. London: Chapman & Hall: 81-104.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek R. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3 (5), 294–299.
- Frankham, R. 1999. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology*. 10(6):1500-1508.
- Fraser, S. 2006. Threats to Biodiversity. In: *The Ecology of Indonesia* (eds Marshall AJ, Beehler BM), pp. 1199–1229. Singapore. Periplus Editions.
- Froese, R. And Pauly D. 2014. FishBase. World Wide Web Electronic Publication.
- Ginneken, M.V.A.N., E. Decru, E. Verheyen and J. Snoeks. 2017. Morphometry and DNA *Barcoding* Reveal Cryptic Diversity in the Genus *Enteromius* (Cypriniformes : Cyprinidae) from the Congo Basin, Africa, 1–32.
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller and D.T. Suzuki. 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. W.H. Freeman. New York.
- Griffiths, S.P. 2010. Stock Assessment and Efficacy of Size Limits on Longtail Tuna (*Thunnus tonggol*) Caught in Australian Waters. *Fisheries Research*, 102:248-257.
- Guo, X.H., S.L.Q. Liu and Y. Liu. 2004. New Progresses on Mitochondrial DNA in Fish. *Acta Genetica Sinica* 31(9):983-1000
- Hadiaty R.K. and D.J. Siebert. 2001. A New Species of Loach, Genus *Nemacheilus* (Osteichthyes, Balitoridae) from Aceh, Sumatra, Indonesia. *Bulletin of the Natural History Museum, Zoology Series*, 67: 183-189.
- Hadiaty, R.K. 2014. Taxonomic Study of the Genus *Nemacheilus* (Teleostei: Nemacheilidae) in Indonesia. *Doktoral Thesis of Sciences*. 92 hal.
- Hadiaty, R.K. dan M. Kottelat. 2009. *Nemacheilus tebo*, A New Loach from Sangkulirang Karst, East Kalimantan, Indonesia. (Teleostei: Nemacheilidae). *The Raffles Bulletin of Zoology* 57(1):119-125

Hadiaty, R.K. dan M. Kottelat. 2010. *Nemacheilus marang*, A New Loach (Teleostei: Nemacheilidae) from Sangkulirang Karst, Eastern Borneo. *Zootaxa* 2257: 39-48

Hajibabaei, M., D.H.Jansen., J.M. Burns., W. Hallwachs and P.D.N. Hebert. 2006. DNA Barcodes Distinguish Species of Tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 968-971.

Hajibabaei, M., G.A.C. Singer, E.L. Clare and P.D.N. Hebert. 2007. Design and Applicability of DNA Arrays and DNA Barcodes in Biodiversity Monitoring. *Biomed Central Biology*. 5:24

Hamdi, A.S. dan E. Bahrudin. 2015. *Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi dalam Pendidikan*. Yogyakarta: Deepublisher

Hamilton, M.B. 2009. *Population Genetics*. A John Wiley & Sons, Ltd Publication.

Hartl D.L. and E.W. Jones. 1998. *Genetics: Principles and Analysis*. Fourth edition. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Canada and America.

Hartl, D.L. 1988. *A Primer of Population Genetics*. Second edition. Longman, London and New York.

Hartl, D.L. and G.A. Clark. 1997. *Principle of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publisher. Sunderland, Massachusetts. Canada.

Hauser L. And R.D. Ward. 1998. Population Identification in Pelagic Fish: The Limits of Molecular Markers. In: Carvalho GR (ed) *Advances in Molecular Ecology*. NATO Science Series. IOS Press, Amsterdam, 306: 191-22.

Hebert, P.D.N., A. Cywinski and S. L. Ball. 2003. Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 270 (151), 313-321.

Hebert, P.D.N., E.H. Penton., J.M. Burns., D.H. Jaanzen and W. Hallwachs. 2004. Ten Species In One: DNA Barcoding Reveals Cryptic Species In The Neotropical Skipper Butterfly *Astrartes Fulgerator*. *Proc natl acad sci USA* 101:14812-14817

Hobbs, J.P., Lynne V. H., Dean R. J., Geoffrey, P.J. and Philip, L.M. 2013. High Genetic Diversity in Geographically Remote Populations of Endemic and Widespread Coral Reef Angelfish. *Diversity* 5: 39-50

Hollingsworth, P.M., S.W. Graham and D.P. Little. 2011. Choosing and Using A Plant DNA *Barcode*. *PLoS ONE* (6): e19254

Horiike T, Miyata D, Hamada K, Saruhashi S, Shinozawa T, Kumar S, Chakraborty R, Komiyama T and Tateno Y. 2009. Phylogenetic



- Construction of 17 Bacterial Phyla by New Method and Carefully Selected Orthologs. *Genetic*. 429: 59-64.
- Hubert ,N., Kadarusman and A. Wibowo. 2015. DNA Barcoding Indonesian Freshwater Fishes: Challenges and Prospects. *DNA Barcodes*, 3, 144–169.
- Hubert, N., C. Meyer , and J.H. Bruggemann. 2012. Cryptic Diversity in Indo-Pacific Coral Reef Fishes Revealed by DNA Barcoding Provides New Support to the Centre of Overlap Hypothesis. *PLoS ONE*, 7, e28987.
- Hughes, A.R., B.D. Inouye, M.T.J. Johnson, N. Underwood and M. Vellend. 2008. Ecological Consequences of Genetic Diversity. *Ecology Letters*. 11: 609-623.
- Irawan, B. 2010. *Genetika: Penjelasan Mekanisme Pewarisan Sifat*. Airlangga University Press. Surabaya
- Jaafar, T.N.A.M., M.I. Taylor, S.A. Mohd Nor, M. De Bruyn and G.R. Carvalho 2012. DNA Barcoding Reveals Cryptic Diversity within Commercially Exploited Indo-Malay Carangidae (Teleostei: Perciformes). *PLoS ONE*, 7, e49623.
- Jamshidi S., A. Abdoli , M. Sherafatian and Golzarianpour K. 2012. Analysis of Mitochondrial DNA Sequences of *Turcinoemacheilus* Genus (Nemacheilidae; Cypriniformes) in Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12(3) 592-604
- Jusuf, M. 2001. *Genetika I: Struktur dan Ekspresi Gen*. Jakarta: Agung Seto.
- Karim, A., R. Akhtar, M. Rizwan, A. Amar, U. Qamar and S. Jahan. 2015. Barcoding of Fresh Water Fishes from Pakistan. *Mitochondrial DNA* 58(5):1-4
- Kartavtsev, Y.P, S.O. Jung, Y.M. Lee, H.K. Byeon and J.S. Lee. 2007. Complete Mitochondrial Genome of the Bullhead Torrent Catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome Description and Phylogenetic Considerations Inferred from the Cyt b and 16S rRNA genes. *Gene* 396:13–27
- Kashyap, A., M. Awasthi and M. Serajuddin. 2016. Phenotypic Variation in Freshwater Murrel, *Channa punctatus* (Bloch, 1793) from Northern and Eastern Regions of India Using Truss Analysis. *International Journal of Zoology* Volume 2016, Article ID 2605404, 6 pages.
- Keskar, A., Padhye and N. Dahanukar. 2014. Fighting Against All Odds: The Struggle for Existence Among Hill Stream Loaches of Northern Western Ghats. *MIN–Newsl. FFSG South Asia Office* 2 (2014) 25–29.

Kharat, S.S., Y.K. Khilare and N. Dahanukar. 2008. Allometric Scaling in Growth and Reproduction of A Freshwater Loach *Nemacheilus mooreh*. Electronic Journal of Ichthyology 1:8-178

Kishore, B., J.P. Bhatt, V.S. Rawat and P. Nautiyal. 1998. Variations in Food and Feeding Habit of the Himalayan Mahseer - *Tor putitora* (Ham.) Inhabiting the Ganga River System in Garhwal Region. Indian J. Fish., 45(1): 113-118.

KKP. 2016. Kajian Komoditas Prospektif Ikan Uceng (*Nemacheilus fasciatus*) sebagai Kandidat Ikan Budidaya. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, dan AC Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 86: 6196-6200.

Kocher, T. and N.T. Perna. 1995. Unequal Base Frequencies and the Estimation of Substitution Rates. Molecular Biology and Evolution 12(2)

Koh T.L, Khoo G, Li Qun Fan and Phang V.P.E. 1999. Genetic Diversity Among Wild Fand Culvated Variates of Discus (*Symphysodon* Spp) as Revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fingerprinting. Aquaculture, 173: 485-497.

Kottelat M. 1990. *Indochinese nemacheilines*. A Revision of Nemacheiline Loaches (Pisces: Cypriniformes) of Thailand, Burma, Laos, Cambodia and Southern Viet Nam. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München. 262 p.

Kottelat, M. and E. Widjanarti 2005. The Fishes of Danau Sentarum National Park and the Kapuas Lakes Area, Kalimantan Barat, Indonesia. Raffles Bulletin of Zoology Suppl. No. 13: 139-173. [Lectotype designated by Roberts 1972 [ref. 12567].]

Kottelat, M. and K.K.P. Lim 1995. Freshwater Fishes of Sarawak and Brunei Darussalam: a Preliminary Annotated Checklist. The Sarawak Museum Journal (New Series) Vol. 48 (No. 69): 227-256.

Kottelat, M. 1984. A Review of the Species of Indochinese Freshwater Fishes Described by H.E. Sauvage. Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle Ser. 4: Section A: Zoologie, Biologie et Écologie Animales Vol. 6 (No. 4): 791-822.

Kottelat, M. 1998. Fishes of the Nam Theun and Xe Bangfai basins, Laos, with Diagnoses of Twenty-two New Species (Teleostei: Cyprinidae, Balitoridae, Cobitidae, Coiidae and Odontobutidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters Vol. 9 (No. 1): 1-128.

Kottelat, M. 2000. Diagnoses of A New Genus and 64 New Species of Fishes from Laos (Teleostei: Cyprinidae, Balitoridae, Bagridae, Syngnathidae, Chaudhuriidae and Tetraodontidae). *Journal of South Asian Natural History* Vol. 5 (No. 1): 37-82.

Kottelat, M. 2001. *Fishes of Laos*. WHT Publications, Colombo. 1-198, Pls. 1-48.

Kottelat, M. 2013. The Fishes of the Inland Waters of Southeast Asia: A Catalogue and Core Biography of the Fishes Known to Occur in Freshwaters, Mangroves and Estuaries. *Raffles Bulletin of Zoology Supplement No. 27*: 1-663.

Kottelat, M. 2015. The Fishes of the Nam Theun and Xe Bangfai Drainages, Laos. *Hydroécologie Appliquée (Paris)* Vol. 19:[1-51]271-320. [First published online, p. 1-51, 25 Sept. 2015; journal and page numbers added in 2016.]

Kottelat, M., A.J. Whitten, S.R. Kartikasari and Wirjoatmodjo S. 1993. *Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. Periplus Editions, Singapore.

Kusuma W. E., S. Ratmuangkhwang and Y. Kumazawa. 2016. Department of Information and Basic Science and Research Center for Biological Diversity, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine Science, University of Brawijaya, Andaman Coastal Research Station for Development, Faculty of Fisheries, Kasetsart University. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

Kusuma, W. E. and Y. Kumazawa. 2015. Complete Mitochondrial Genome Sequences of Two Indonesian Rasboras (*Rasbora aprotaenia* and *Rasbora lateristriata*). *Mitochondrial DNA*, 0(0), 1–2.

Lahaye, R., M. Van der Bank, D. Bogarin, J. Warner, F. Pupulin, G. Gigot, O. Maurin, S. Duthoit, T.G. Barraclough and V. Savolainen. 2008. DNA Barcoding the Floras of Biodiversity Hotspot. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105(8): 2923-2928

Lambert, D.M., A. Backer, L. Huynen, O. Haddarth and P.D.N. Hebert. 2005. Is a Largest-scale DNA-based Inventory of Ancient Life Possible? *J Hered* 96: 279-284.

Lemey, Philippe, Marco S. and Anne M. V. 2009. *The Phylogenetic Handbook : A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. United States of America: Cambridge University Press.

Liao, T.Y., S.O. Kullander and F. Fang. Phylogenetic Analysis of the Genus *Rasbora* (Teleostei: Cyprinidae). *Zoologica Scripta*. Volume 39, Issue 2

Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452

Liu, S., Z. Yang., D. Wang and M. Liu. 2014. The Mitochondrial Genome of *Mystacoleucus* (Cypriniformes, Cyprinidae). *Mitochondrial DNA*.

Lunt, D.H., D.X. Zhang, J.M. Szymura and G.M. Hewit. 1996. The Insect Cytochrome Oxidase I Gene: Evolutionary Patterns and Conserved Primers for Phylogenetic Studies. *Insect Mol Biol* 5:153-165

Lynch, M. and T.J. Crease. 1990. The Analysis of Population Survey Data on DNA Sequence Variation. *Mol. Biol. Evol.* 7:377-394.

Macan, T.T. 1980. *Freshwater Biology*. Logman, London.

Mayden, R. L., R.H. Hanner and Bernatchez, L. 2011. Genetic Calibration of Species Diversity among North America's Freshwater Fishes. USA. Meganatham.

Mayr, E. 1970. *Population Species and Evolution*. Harvard University Press. England.

Mayr, E. 2002. *Principles of Systematic Zoology*. Tata McGraw-Hill Publishing Company. New Delhi, 20.

Meier, R., K. Shiyang, G. Vaidya and K.L.N. Peter. 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Syst Biol* 55:715-28.

Misra, R.K and Easton, M.D.L. 1999. A Note on the Number of Morphometric Characters Used in Fish Stock Delineation Studies Employing a Manova. *Journal Fisheries Research*. 4 : 191-194.

Moyle, P.B. and J.J Cech, 1988. *Fishes: An Introduction to Ichthyology*. Second Edition, Prentice Hall. Engelwood Cliffs, New Jersey. 559.

Muchlisin, Z.A., Z. Thomy, N. Fadli, M.A. Sarong and M.N. Sitiadzah. 2013. DNA Barcoding of Freshwater Fishes from Lake Laut Tawar, Aceh Province, Indonesia. *Acta Ichthyol Piscatoria* 43:21-9.

Mulyasari, Soelistyowati DT, Kristanto AH dan Kusmini II. 2010. Karakteristik Genetic Enam Populasi Nilem (*Osteochilus hasselti*) di Jawa Barat. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5 (2): 175-182.

Munasinghe, D.H.N. 2015. Morphological and Genetic Diversity Levels of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) Populations in Three Coastal Regions of Sri Lanka, 62(1), 12-17.

- Munzner, T., F. Guimbretière, S. Tasiran, L. Zhang and Y. Zhou. 2003. TreeJuxtaposer: Scalable Tree Comparison Using Focus+ Context with Guaranteed Visibility. *ACM SIGGRAPH Papers* July 27-31 2003; San Diego, California. New York (US). hlm 453-462.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance between Population. *American Nature*, 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from A Small Number of Individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York. Columbia University. Press. New York.
- Nei, M. and Tajimi F. 1981. DNA Polymorphism Detectable by Restriction Endonucleases. *Genetics*, 97:145-163.
- Neigel, J., A. Domingo and J. Stake. 2007. DNA Barcoding as A Tool for Coral Reef Conservation. *Coral Reefs* 26: 487-499.
- Nguyen, T.T.T., U. Na-Nakorn, S. Sukmanomon and C. ZiMing. 2008. A Study on Phylogeny and Biogeography of Mahseer Species (Pisces: Cyprinidae) Using Sequences of Three Mitochondrial DNA Gene Regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 48, 1223–1231.
- Noor, R.R. 2008. *Genetika Ternak*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Normile, D. 2010. Saving Forests to Save Biodiversity. *Science*: 329, 1278–1280.
- Novacek, M.J. and E.E. Cleland. 2001. The Current Biodiversity Extinction Event: Scenarios for Mitigation and Recovery. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 98, 5466-5470
- Nurhidayat, L., B. Retnoaji and Febrina N.A. 2017. Indeks Gonadosomatik dan Struktur Histologis Gonad Ikan *Nemacheilus* sp. (*Nemacheilus fasciatus*, Valenciennes in Cuvier and Valenciennes, 1846). *Biosfera* Vol 34, No 2 Mei 2017 : 67-74
- Page R.D.M. and E.C. Holmes. 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science Ltd., Liverpool
- Page, R.D.M. and Holmes, E.C. 1998. *Molecular Evolution a Phylogenetic Approach*. Oxford (UK): Blackwell Publishing Ltd.
- Palumbi, S.R. 1996. *Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction*. D.M. Hillis, C. Moritz and B.K. Mable (Eds.), *Molecular Systematics* 2nd edition. Massachusetts: Sinauer Associates

Pandey A., R.P. Thapliyal and W.S. Lakra. 2016. Intra- Specific Morphometric and Genetic Comparisons in Hillstream Loach, *Nemacheilus montana* (McClelland 1838) from Western Himalaya, India. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. Vol. 5, Issue 8, August 2016

Pati, A.K. and Agrawal A. 2002. Studies on the Behavioural Ecology and Physiology of A Hypogean Loach, *Nemacheilus evezardi*, from the Kotumsar Cave, India. Current Science, Vol. 83, No. 9.

Patil, T.S., A.S. Tamboli, S.M. Patil, A.R. Bhosale, S.P. Govindwar and Muley, D.V. 2016. Relative Profile Analysis of Molecular Markers for Identification and Genetic Discrimination of Loaches (Pisces, Nemacheilidae). Elsevier: C. R. Biologies 339 (2016) 364–370

Pereira, J., R.J. Shakila, B. Ahilan, K.K. Marx, C.B.T. Rajagopalsamy and A.A. Jenifer. Generation of DNA Barcode Database for Gunther's Loach, *Nemacheilus guentheri* (day, 1867). 2016. *J. Aqua Trop.* Vol. 31, No. (1-2) 2016, Pages 1-12

Poulet, N., Berrebi, P., Crivelli, A.J., Lek, S., Argillier, C., 2004. Genetic and morphometric variations in the pikeperch (*Sander lucioperca* L.) of a fragmented delta. *Arch. Hydrobiol.* 159, 531– 554.

Poulet, N., P. Berrebi, A.J. Crivelli, S. Lek and C. Argillier. 2004. Genetic and Morphometric Variations in the Pikeperch (*Sander lucioperca* L.) of a Fragmented Delta. *Arch. Hydrobiol.* 159, 531– 554.

Prakoso, V.A., M.H.F. Ath-thar, J. Subagja dan A.H. Kristanto. 2016. Pertumbuhan Ikan Uceng (*Nemacheilus fasciatus*) dengan Padat Tebar Berbeda dalam Lingkungan *Ex Situ*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 11 (4), 2016, 355-362

Rakhman, A. 1999. Studi Penyebaran Bahan Organik pada Berbagai Ekosistem di Perairan Pantai Pulau Bonebatang. Universitas Hasanuddin, Makassar

Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. The Barcode of Life Data Systems (www.barcodinglife.org). *Mol Ecol Notes* 7:355–364.

Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. The Barcode of Life Data Systems. *Mol Ecol Notes* 7:355–364.

Reyes, A., C. Gissi, G. Pesole and C. Saccone. 1998. Asymmetric by A Biotechnology and Biological Sciences Research Council (United Directional Mutation Pressure in the Mitochondrial Genome of Kingdom) Research Grant (31/G10434). *Mol. Biol. Evol.* 15: 957–966.

Risyanto, S., I. Sulistio and E. R. Ardli. 2012. Ekologi Ikan *Nemacheilus* sp. (*Nemacheilus fasciatus* C.V.) di Sungai Banjaran Kabupaten Banyumas. *Journal fakultas biologi*. 32-37.

Roe, A.D. and F.A.H. Sperling. 2007. Patterns of Evolution of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase I and II DNA and Implications for DNA Barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44 (2007) 325–345

Rozas J, J.C. Sanches-Del, Messeguer X and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods. *Bioinformatics Applications Note*. 19:2496-2497.

Sabu K., D. Prasad and S. Darsana. 2013. Feeding Habits and Length-Weight Relationship of *Nemacheilus triangularis* (Day, 1865) from Kallar Stream in Southern Western Ghats. *Journal of Aquatic Biology and Fisheries* Vol. 2/2014/ pp. 564 to 569

Sale PF, Cowen RK, Danilowicz BS and Jones GP. 2005. Critical Science Gaps Impede Use of No-take Fishery Reserves. *Trends Ecol Evol* 20:74–80

Sanger F, Nicklen S. & Coulson AR. 1977. DNA Sequencing with Chainterminating inhibitors. *National Academical Science, United States of America*, 74 (12): 5463-5467.

Savolainen, V., R.S. Cowan, A.P. Vogler, G.K. Roderick and R. Lane. 2005. Towards Writing the Encyclopedia of Life: An Introduction to DNA Barcoding. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lon. Ser. Bbiol. Sci.* 360:1850-1811

Sayyadzadeh, G., S. Eagderi dan H.R. Esmaeli. 2016. A New Loach of the Genus *Oxynoemacheilus* from the Tigris River Drainage and Its Phylogenetic Relationships Among the Nemacheilid Fishes (Teleostei: Nemacheilidae) in the Middle East Based on mtDNA COI Sequences. *Iran Journal Ichthyology* 3(4): 236-250

Secchi, S., Gassman, P.W., Jha, M., Kurkalova, L. and Kling, C.L. 2011. Potential water quality changes due to corn expansion in the Upper Mississippi River Basin. *Ecological Society of America Journal* 21(4).

Sharma, P and T. Kobayashi. 2014. Are “Universal” DNA Primers Really Universal? *Journal of Applied Genetics*. Volume 55, Issue 4 pp 485–496

Shearer, T.L. and M.A. Coffroth. 2008. Barcoding Corals: Limited by Interspecific Divergence, Not Intraspecific Variation. *Molecular Ecology Resources*. 8:247-255.

Shizuka D, Lyon B.E. 2008. Improving the reliability of molecular sexing using a W-specific marker. *Molecular Ecology Resources* (8): 1249-1253.

Shizuka D, Lyon B.E. 2008. Improving the Reliability of Molecular Sexing Using a W-specific Marker. *Molecular Ecology Resources* (8): 1249-1253.

Shizuka, D and B.E. Lyon. 2008. Improving the Reliability of Molecular Sexing Using A W-specific Marker. *Molecular Ecology Resources* (8): 1249-1253.

Sodhi, N.S. L.P. Koh, R. Clements. 2010. Conserving Southeast Asian Forest Biodiversity in Human-Modified Landscapes. *Biological Conservation*, 143, 2375–2384.

Stocle, M.Y., C.C. Gamble., R. Kirpekar., G. Young., S. Ahmed and D.P little. 2011. Comercials Teas Highlight Plant DNA Barcode Identification Succes and Obstaclesses and Obstacles. *Sci. Rep.* 1(42):1-7.

Suman A, Irianto HE, Amri K and B. Nugraha. 2013. Population Structure and Reproduction of Bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in Indian Ocean at Western Part of Sumatera and Southern Part of Java and Nusa Tenggara. *Indian Ocean Tuna Commission*, 8 oktober 2013, hal 1-14.

Suryanto D. 2003. Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler. *Biodiversitas*, 4(2): 73-79

Suryanto, D. and A. Suwanto. 2001. Characterization of Three Benzoate Degrading Anoxygenic Photosynthetic Bacteria Isolated from the Environment. *Biotropia* 17: 9-17.

Swain, D.P., B. Riddell and C. Murray. 1991. Morphological Differences Between Hatchery and Wild Populations of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Environmental Versus Genetic Origin. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 48, 1783–1791.

Swain, D.P., Riddell, B., Murray, C., 1991. Morphological differences between hatchery and wild populations of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): environmental versus genetic origin. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 48, 1783–1791.

Swingle, H. 1969. Standardization of Chemical Analyses for Water and Pond Muds. *FAO Fish*

Tamura, K, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology Evolution*, 28(10):2731-2739.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipksi and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Tang, K. L., M.K. Agnew, W. Chen, M.V. Hirt, M.E. Raley, T. Sado and R.L. Mayden. 2011. Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogeny of the Gudgeons (Teleostei : Cyprinidae : Gobioninae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(1), 103–124

Tang, Q., H. Liu, R. Mayden and B. Xiong. 2006. Comparison of Evolutionary Rates in the Mitochondrial DNA Cytochrome *b* Gene and Control Region and their Implications for Phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 347-357.

Taylor DR. and L.W. Aarssen. 1988. An Interpretation of Phenotypic Plasticity in *Agropyron epens* (Gramminae). *American Journal of Botany*, 75 (3): 401-413.

Teletchea, F. 2009. Molecular Identification Methodes of Fish Species: Reassessment and Posible Applications. *Rev Fish Biol Fish* 19: 265-293.

Thacker, C.E. 2003. Molecular Phylogeny of the Gobioid Fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26 : 354-368.

Toha, Abdul Hamid A. 2001. Deoxyribo Nucleac Acid Keanekaragaman, Ekspresi, Rekayasa dan Efek Pemanfaatannya. Bandung: Alfabeta

Trontelj, P., Y. Machino and B. Sket. 2005. Phylogenetic and Phylogeographic Relationships in the Cray Genus *Austropotamobius* Inferred from Mitochondrial COI Gene Sequences, 34, 212–226.

Turan C. 1999. A Note on The Examination of Morphometric Differentiation Among Fish Population: the Truss System. *Journal of Zoology*, (23):259-263.

Turan, C. 1998. A Note on The Examination of Morphometric Differentiation Among Fish Populations : The Truss System. *Journal of The University of Mustafa Kemal, Faculty of Fisheries, Hatay-Turkey*. 259-263.

Turan, CD, F. Ergüden, Turan and M. Gurlek. 2004. Genetic and Morphologic Structure of *Liza abu* (Heckel, 1843) Populations from the Rivers Orontes, Euphrates and Tigris. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28:729–734.

Viguera, E., Cancell, D., & Ehrlich, S.D. (2001). Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO Journal*, 20, 2587–2595.

Wardoyo, S.T.H. 1978. Kriteria Kualitas Air untuk Keperluan Pertanian dan Perikanan *dalam* : Prosiding Seminar Pengendalian Pencemaran Air. (eds Dirjen Pengairan Dep. PU.), hal 293-300.

- Wigati E, Sutarno dan Haryanti. 2003. Variasi Genetik Ikan Anggoli (*Pristipomoides multidentis*) Berdasarkan Pola Pita Allozim. Biodiversitas, 4(2): 73-79
- Wijaya, H., M.S. Widodo and A. Soeprijanto. 2019. The Effect of Difference Temperature on Cortisol, Glucose and Glycogen Level of Uceng Fish (*Nemacheilus fasciatus*). J.Exp. Life Sci. Vol. 9 No. 1, 2019
- Willet, C.E., J.J. Cherry and L.A. Steiner. 1995. Characterization and Expression of the Recombination Activating Genes (*rag1* and *rag2*) of Zebrafish. Immunogenetics. 45 : 394-404.
- Wilson, E.O. 2003. The Encyclopedia of Life. Trends Ecol. Evol. 18, 77-80.
- Wimberger, P.H. 2008. Plasticity of Fish Body Shape. The Effects of Diet, Development, Family and Age in Two Species of Geophagus (Pisces: Cichlidae). Biol. J. Linnean Soc. 45, 197–218.
- Wimberger, P.H., 2008. Plasticity of fish body shape. The effects of diet, development, family and age in two species of Geophagus (Pisces: Cichlidae). Biol. J. Linnean Soc. 45, 197–218.
- Wong, E.H.K and R.H. Hanner. 2008. DNA Barcoding Detects Market Substitution in North American Seafood. Food Res Int 41: 828–837.
- Wood, B.M., M.B. Bain. 1995. Morphology and Microhabitat use in Stream Fish. Can. J Fish Aquat Sci. 1995; 52:1487- 1498. 10.
- Xue, C.Y. and D.Z. Li. 2011. Use of DNA Barcode *sensulato* to Identify Traditional Tibetan Medicinal Plant *Gentianopsis paludosa* (Gentianaceae). Journal of Systematics and Evolution, 49 (3): 267 – 270.
- Yang, Z and B. Rannala. 2012. Molecular Phylogenetics: Principles and Practice. Nature Reviews: Genetics. Volume 13. Macmillan Publisher Limited.
- Zahorska, E., V. Kovac, I. Falka, K. Beyer, S. Katina, G.H. Copp and R.E. Gozlan. 2009. Morphological Variability of the Asiatic Cyprinid, Topmouth Gudgeon *Pseudorasbora parva*, in its Introduced European Range. Journal of Fish Biology. Volume 74, Issue 1 January 2009
- Zhang, J.B., L.M. Huang and H.Q. Huo. 2004. Larval Identification of Lutjanus Bloch in Nansha Coral Rees by AFLP Molecular Method. J Exp Mar Biol Ecol. 298: 3-20

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Penghitungan Karakter Meristik *Nemacheilus fasciatus*

Sampel	Jari-jari Sirip Dorsal Keras*	Jari-jari Sirip Dorsal Lunak*	Jari-jari Sirip Pectoral Keras*	Jari-jari Sirip Pectoral Lunak*	Jari-jari Sirip Anal Keras*	Jari-jari Sirip Anal Lunak*	Jari-jari Sirip Pelvic*	Jari-jari Sirip Caudal*	Jumlah Total*
Ponorogo 1	1	7	1	6	1	5	5	7	17
Ponorogo 2	1	7	1	6	1	5	6	8	14
Ponorogo 3	1	7	1	6	1	5	7	8	14
Blitar 1	1	8	1	7	1	5	7	8	14
Blitar 2	1	9	1	8	1	5	7	8	17
Blitar 3	1	9	1	8	1	5	7	8	18
Blitar 4	1	8	1	7	1	5	6	7	15
Blitar 5	1	8	1	7	1	5	7	8	17
Pasuruan 1	1	8	1	7	1	4	6	8	12
Pasuruan 2	1	8	1	6	1	4	5	9	14
Pasuruan 3	1	8	1	7	1	4	6	9	17
Pasuruan 4	1	7	1	7	1	5	6	8	14
Pasuruan 5	1	8	1	7	1	5	6	8	14
Lumajang 1	1	8	1	8	1	5	7	8	16
Lumajang 2	1	8	1	8	1	5	7	9	18
Rata-rata**	1	7	1	7	1	5	6	9	15

Keterangan: *satuan dalam cm

**pembulatan desimal 0 angka di belakang koma

Lampiran 2. Hasil Penghitungan Karakter Morfometrik *Nemacheilus fasciatus*

Variabel Pengukuran	Po1	Po2	Po3	Bl1	Bl2	Bl3	Bl4	Bl5	Ps1	Ps2	Ps3	Ps4	Ps5	Lu1	Lu2
A1	0,90	0,60	0,75	1,10	1,20	1,25	1,30	1,20	0,70	1,00	0,85	0,90	0,95	0,90	1,20
A2	0,60	0,40	0,70	1,00	1,10	1,10	1,20	1,10	0,60	0,70	0,70	0,85	0,75	0,70	1,00
A3	1,55	1,80	1,30	1,50	2,00	2,05	2,10	2,10	1,65	1,65	1,45	1,80	1,90	1,80	2,00
A4	1,40	1,40	1,30	2,00	2,40	2,45	2,50	2,50	1,80	1,70	1,60	2,20	2,00	2,50	2,50
A5	2,10	1,80	1,40	2,50	3,40	3,40	3,40	3,40	1,90	2,40	2,20	2,60	2,90	3,50	3,00
A6	0,90	0,55	0,40	0,70	0,90	0,95	1,00	1,00	0,70	0,80	0,70	0,70	0,80	1,00	1,20
B1	1,50	1,10	1,35	2,90	2,00	2,00	2,00	2,00	1,15	1,60	1,40	2,00	2,00	2,10	2,20
B2	1,20	0,80	1,25	1,50	1,60	1,60	1,60	1,60	1,40	1,40	1,40	1,45	1,40	1,20	1,50
B3	1,50	1,10	1,35	1,10	2,10	2,15	2,20	2,15	1,50	1,60	1,60	1,80	1,40	2,40	2,00
B4	0,80	1,10	1,10	0,90	2,20	2,25	2,30	2,25	0,85	1,00	0,80	1,20	0,60	2,20	1,30
B5	2,70	2,10	2,40	3,50	2,80	2,80	2,80	2,80	3,10	2,80	2,90	3,40	3,40	3,60	4,00
C1	0,75	0,40	0,40	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,35	1,00	1,50	3,50
C2	0,55	0,60	0,35	0,30	0,50	0,55	0,60	0,55	0,45	0,45	0,50	0,60	0,60	1,00	1,70
C3	1,40	1,35	1,30	1,10	1,50	1,50	1,60	1,50	1,10	1,00	1,00	1,30	1,40	1,50	1,30
C4	2,00	1,60	1,40	1,60	2,40	2,40	2,40	2,40	2,10	2,00	2,00	1,80	2,10	2,50	2,20
C5	1,10	0,70	1,00	0,80	1,30	1,30	1,30	1,30	0,80	0,90	0,70	1,00	0,80	1,60	1,50
D1	1,80	1,80	1,85	1,00	2,00	2,10	2,20	2,10	1,40	1,60	1,40	2,00	2,10	2,50	2,00
D2	0,70	0,45	0,50	0,70	1,00	1,10	1,20	1,10	0,80	0,80	0,60	0,80	0,80	1,00	1,50
D3	0,40	0,40	0,40	0,50	0,70	0,75	0,80	0,75	0,50	0,60	0,65	0,60	0,60	1,30	1,00
D4	2,00	1,80	1,80	1,30	2,40	2,40	2,45	2,40	0,90	1,80	1,50	2,10	2,00	2,50	2,50

Lanjutan Lampiran 2

Variabel Pengukuran	Po1	Po2	Po3	BI1	BI2	BI3	BI4	BI5	Ps1	Ps2	Ps3	Ps4	Ps5	Lu1	Lu2
D5	1,35	0,70	0,80	1,00	1,20	1,20	1,30	1,20	1,70	1,10	0,90	1,10	1,00	1,60	1,50
Standar Length	4,60	4,00	4,20	5,70	6,00	5,90	5,90	6,00	4,70	5,10	5,00	5,20	5,10	6,90	6,50

Lampiran 3. Hasil Penghitungan Data *Truss Morphometric*

a. Pendeteksian Asumsi MANOVA

1. Uji Normalitas Data

	Multivariate skewness	Multivariate kurtosis
b1	97,5135	143,709
z1	382,919	0,0937179
pvalue	0,000109818	0,925333

2. Homogenitas Matriks Kovarian

Levene's Test of Equality of Error Variances

	F	df1	df2	Sig.
A1	2.090	3	16	.142
A2	2.026	3	16	.151
A3	1.878	3	16	.174
A4	3.847	3	16	.030
A5	2.584	3	16	.089
A6	2.417	3	16	.104
B1	2.062	3	16	.146
B2	.533	3	16	.666
B3	1.899	3	16	.170
B4	.728	3	16	.550
B5	1.032	3	16	.405
C1	5.469	3	16	.009
C2	4.115	3	16	.024
C3	7.912	3	16	.002
C4	1.240	3	16	.328
C5	1.567	3	16	.236
D1	1.083	3	16	.384
D2	1.479	3	16	.258
D3	2.834	3	16	.071
D4	1.211	3	16	.338
D5	2.790	3	16	.074



Lanjutan Lampiran 3

b. Interpretasi Output

1. Multivariate Tests

Effect	Value	F	Error df	Sig.
Pillai's Trace	2.989	51.093	9.000	.000
Wilks' Lambda	.000	57.547	3.768	.001
Hotelling's Trace
Roy's Largest Root	7006.878	1313.790	3.000	.000

2. Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
A1	.006	3	.002	6.247	.005
A2	.010	3	.003	6.938	.003
A3	.006	3	.002	.915	.456
A4	.019	3	.006	2.071	.144
A5	.042	3	.014	2.920	.066
A6	.007	3	.002	2.808	.073
B1	.011	3	.004	.563	.647
B2	.010	3	.003	2.540	.093
B3	.021	3	.007	1.784	.191
B4	.055	3	.018	3.116	.056
B5	.080	3	.027	3.130	.055
C1	.063	3	.021	2.854	.070
C2	.031	3	.010	13.167	.000
C3	.003	3	.001	.441	.727
C4	.031	3	.010	3.148	.054
C5	.014	3	.005	3.707	.034
D1	.016	3	.005	1.001	.418
D2	.011	3	.004	5.802	.007
D3	.015	3	.005	4.448	.019
D4	.021	3	.007	1.328	.300
D5	.016	3	.005	1.504	.252

Lampiran 4. Jarak Genetik *Nemacheilus fasciatus*

	Po1	Po2	Po3	Bl1	Bl2	Bl3	Bl4	Bl5	Ps1	Ps2	Ps3	Ps4	Ps5	Lu1	Lu2
Po1															
Po2	0,0255														
Po3	0,0240	0,0175													
Bl1	0,0304	0,0271	0,0354												
Bl2	0,0305	0,0239	0,0289	0,0126											
Bl3	0,0338	0,0271	0,0321	0,0158	0,0095										
Bl4	0,0353	0,0271	0,0353	0,0079	0,0126	0,0158									
Bl5	0,0321	0,0239	0,0321	0,0110	0,0094	0,0126	0,0094								
Ps1	0,0288	0,0239	0,0321	0,0047	0,0094	0,0126	0,0063	0,0063							
Ps2	0,0288	0,0239	0,0321	0,0047	0,0094	0,0126	0,0063	0,0063	0,0000						
Ps3	0,0321	0,0271	0,0354	0,0047	0,0126	0,0158	0,0063	0,0094	0,0031	0,0031					
Ps4	0,0288	0,0239	0,0321	0,0047	0,0094	0,0126	0,0063	0,0063	0,0000	0,0000	0,0031				
Ps5	0,0288	0,0239	0,0321	0,0047	0,0094	0,0126	0,0063	0,0063	0,0000	0,0000	0,0031	0,0000			
Lu1	0,0338	0,0288	0,0371	0,0063	0,0142	0,0174	0,0079	0,0110	0,0047	0,0047	0,0047	0,0047	0,0047		
Lu2	0,0338	0,0288	0,0337	0,0063	0,0142	0,0174	0,0079	0,0110	0,0047	0,0047	0,0047	0,0047	0,0047	0,0047	0,0031

Keterangan:

Po = Ponorogo

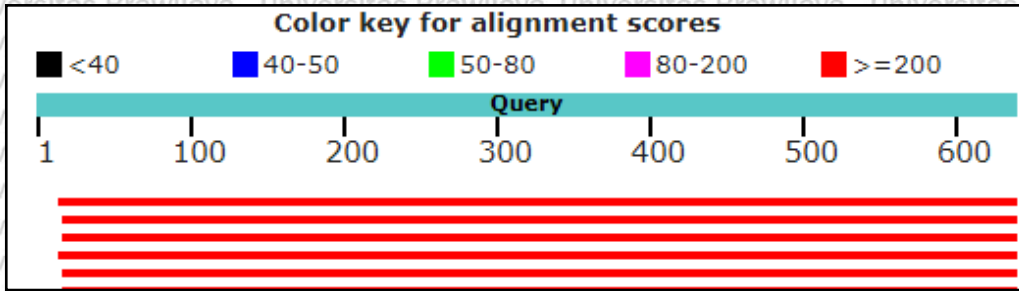
Bl = Blitar

Ps = Pasuruan

Lu = Lumajang

Lampiran 5. Hasil BLAST Sampel Ponorogo 1

RID	H86RUHJX014 (Expires on 06-28 09:25 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_148993	Description	Nucleotide collection (nr)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



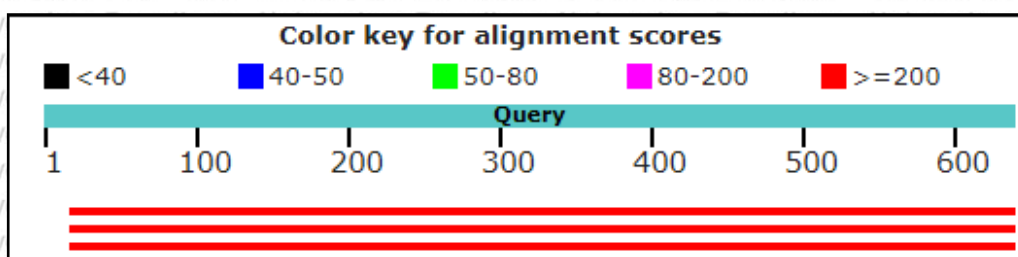
Nemacheilus fasciatus voucher BIF0832 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KT960792.1](#) Length: 652 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 652 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1177 bits(637)	0.0	647/652(99%)	0/652(0%)	Plus/Minus
Query 18	CAGGTGCTGATATTTGATTGGGTCTCTCCTCCGGCCGGGTCAAAGAATGGTGTTTAA	77		
Sbjct 652	CAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCTCCTCCGGCCGGGTCAAAGAATGGTGTTTAA	593		
Query 78	ATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCAG	137		
Sbjct 592	ATTCGGTCTGTTAAGAGCATGTAATCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCAG	533		
Query 138	AAGGACTGCTGTTACCAAGACCAGCCATACGAAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGATGGC	197		
Sbjct 532	AAGGACTGCTGTTACCAAGACCAGCCATACGAAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGATGGC	473		
Query 198	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAAATAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAAGACAC	257		
Sbjct 472	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAAATAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAAGACAC	413		
Query 258	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGTT	317		
Sbjct 412	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGTT	353		
Query 318	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCAGGCTCCGGCTCAACACCTGATGA	377		
Sbjct 352	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCAGGCTCCGGCTCAACACCTGATGA	293		
Query 378	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGCGGCGAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGG	437		
Sbjct 292	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGCGGCGAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGG	233		
Query 438	GAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCCCAAT	497		
Sbjct 232	GAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCCCAAT	173		
Query 498	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	557		
Sbjct 172	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	113		
Query 558	GTAGATTTGGTCATCTCCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	617		
Sbjct 112	GTAGATTTGGTCATCTCCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	53		
Query 618	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGCTCAGGCACCGAAAACTAAATATAGG 669			
Sbjct 52	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGCTCAGGCACCGAAAACTAAATATAGG 1			

Lampiran 6. Hasil BLAST Sampel Ponorogo 2

RID	H870AK3U014 (Expires on 06-28 09:29 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_173127	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



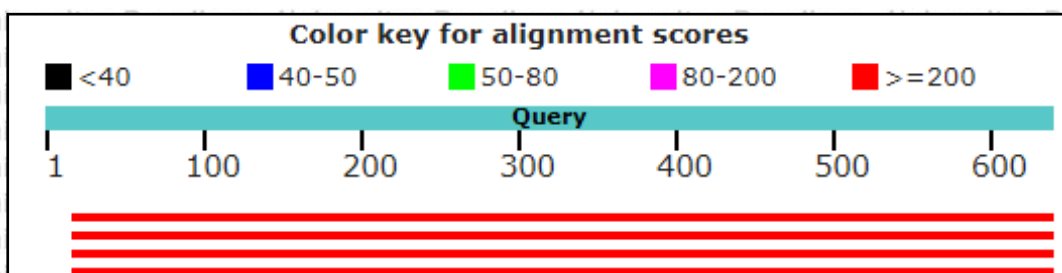
Nemacheilus fasciatus voucher BIF0832 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KT960792.1](#) Length: 652 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 652 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1177 bits(637)	0.0	648/653(99%)	2/653(0%)	Plus/Minus
Query 18	CAGGTGCTGATATGGAATTGG-TCGTCTCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGGTGTTTA	76		
Sbjct 652	CAGGTGCTGATATAGAATTGGGTC-TCCTCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGGTGTTTA	594		
Query 77	AATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCA	136		
Sbjct 593	AATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAAATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCA	534		
Query 137	GAAGGACTGCTGTTACCAAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGG	196		
Sbjct 533	GAAGGACTGCTGTTACCAAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGG	474		
Query 197	CTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAGACA	256		
Sbjct 473	CTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAGACA	414		
Query 257	CACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGT	316		
Sbjct 413	CACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGT	354		
Query 317	TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATG	376		
Sbjct 353	TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATG	294		
Query 377	AGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGG	436		
Sbjct 293	AGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGG	234		
Query 437	GGAAATGCCATGTCCGGGGCCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAA	496		
Sbjct 233	GGAAATGCCATGTCCGGGGCCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAA	174		
Query 497	TAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGGTGTGCAAGTAAACAATAACAT	556		
Sbjct 173	TAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGGTGTGCAAGTAAACAATAACAT	114		
Query 557	TGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAA	616		
Sbjct 113	TGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAA	54		
Query 617	GGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCCGGCTCAGGCACCGAAAATAAATATAGG	669		
Sbjct 53	GGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCCGGCTCAGGCACCGAAAATAAATATAGG	1		

Lampiran 7. Hasil BLAST Sampel Ponorogo 3

RID	H871NU13015 (Expires on 06-28 09:30 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_133837	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



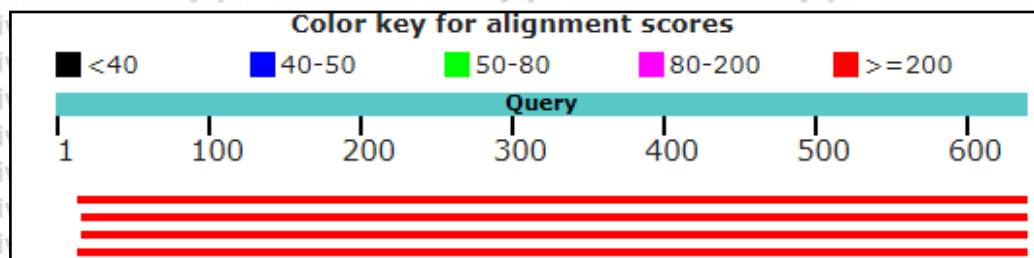
Nemacheilus fasciatus voucher BIF0832 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KT960792.1](#) Length: 652 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 652 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1155 bits(625)	0.0	642/650(99%)	2/650(0%)	Plus/Minus
Query 18	CAGGTGCTGATATTGGATGGTGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGTTTAA	77		
Sbjct 652	CAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGTTTAA	593		
Query 78	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCAG	137		
Sbjct 592	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAAATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCAG	533		
Query 138	AAGGACTGCTGTTACAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGGC	197		
Sbjct 532	AAGGACTGCTGTTACAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGGC	473		
Query 198	TGGGGTTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATGCCCCGAGGATGGAAGACAC	257		
Sbjct 472	TGGGGTTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATGCCCCGAGGATGGAAGACAC	413		
Query 258	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGTT	317		
Sbjct 412	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGTT	353		
Query 318	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATGA	377		
Sbjct 352	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATGA	293		
Query 378	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTATTTCGGGG	437		
Sbjct 292	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTATTTCGGGG	233		
Query 438	GAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAAT	497		
Sbjct 232	GAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAAT	173		
Query 498	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAGATTATAACAAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	557		
Sbjct 172	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAGATTATAACAAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	113		
Query 558	GTAGATTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	617		
Sbjct 112	GTAGATTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	53		
Query 618	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCCGGCTCAGGCACCGAAA-CTAAACTAT 666			
Sbjct 52	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCCGGCTCAGGCACCGAAAATAA-TAT 4			

Lampiran 8. Hasil BLAST Sampel Blitar 1

RID	H87AZRS0015 (Expires on 06-28 09:35 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_109763	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ > Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



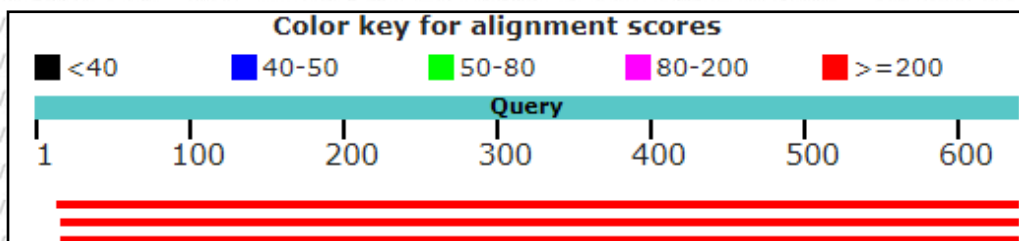
Nemacheilus fasciatus voucher BIF0832 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KT960792.1](#) Length: 652 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 652 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1182 bits(640)	0.0	648/652(99%)	0/652(0%)	Plus/Minus
Query 18	CAGGTGCTGATATTGGATTGGGCTCCTCCTCCGGCGGGTCAAGAAGTGGTGTAA	77		
Sbjct 652	CAGGTGCTGATATAGAATTGGGCTCCTCCTCCGGCGGGTCAAGAAGTGGTGTAA	593		
Query 78	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTATCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCAG	137		
Sbjct 592	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAAATCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCAG	533		
Query 138	AAGGACTGCTGTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGGC	197		
Sbjct 532	AAGGACTGCTGTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGGC	473		
Query 198	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGAAGACAC	257		
Sbjct 472	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGAAGACAC	413		
Query 258	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTCGCTGGGCAAGGTT	317		
Sbjct 412	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTCGCTGGGCAAGGTT	353		
Query 318	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTCAACACCTGATGA	377		
Sbjct 352	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTCAACACCTGATGA	293		
Query 378	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTATTTCGGGG	437		
Sbjct 292	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTATTTCGGGG	233		
Query 438	GAATGCCATGTCCGGGGCCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAAT	497		
Sbjct 232	GAATGCCATGTCCGGGGCCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAAT	173		
Query 498	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	557		
Sbjct 172	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	113		
Query 558	GTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	617		
Sbjct 112	GTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	53		
Query 618	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTCAGGCACCGAAAACTAAATATAGG	669		
Sbjct 52	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTCAGGCACCGAAAACTAAATATAGG	1		

Lampiran 9. Hasil BLAST Sampel Blitar 2

RID	H87GDM22015 (Expires on 06-28 09:38 am)	Database Name	nr
Query ID	lcl Query_214439	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



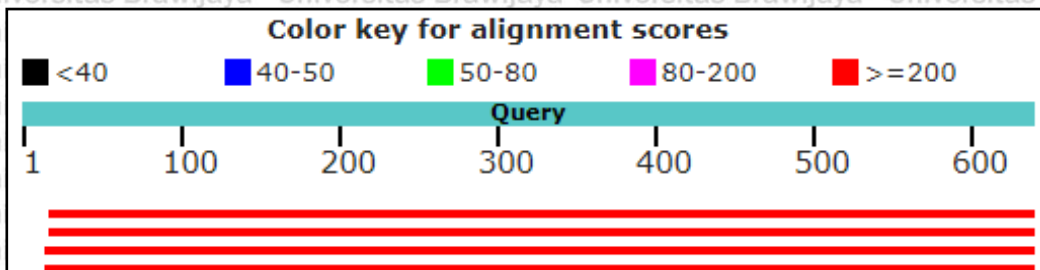
Nemacheilus fasciatus voucher BIF0832 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KT960792.1](#) Length: 652 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 652 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1171 bits(634)	0.0	647/653(99%)	2/653(0%)	Plus/Minus
Query 18	CAGGTGCTGATATTGGATTGGGCTCTCTCCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTG-TTA	76		
Sbjct 652	CAGGTGCTGATATAGAATTGGGCTCTCTCCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGG-TGTTTA	594		
Query 77	AATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCA	136		
Sbjct 593	AATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCA	534		
Query 137	GAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGG	196		
Sbjct 533	GAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGG	474		
Query 197	CTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAGACA	256		
Sbjct 473	CTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAGACA	414		
Query 257	CACCTGCCAGGTGAAGGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCCCTGCGTGGGCAAGGT	316		
Sbjct 413	CACCTGCCAGGTGAAGGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCCCTGCGTGGGCAAGGT	354		
Query 317	TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCTGTCCCGGCTCCGGCTCAACACCTGATG	376		
Sbjct 353	TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCTGTCCCGGCTCCGGCTCAACACCTGATG	294		
Query 377	AGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTAGTTGTTTATTCGGG	436		
Sbjct 293	AGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTAGTTGTTTATTCGGG	234		
Query 437	GGAATGCCATGTCCGGGGCCCAATATCAGCGGCACTAGTCAGTTCCAAATCCCCCAA	496		
Sbjct 233	GGAATGCCATGTCCGGGGCCCAATATCAGCGGCACTAGTCAGTTCCAAATCCCCCAA	174		
Query 497	TAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACAT	556		
Sbjct 173	TAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACAT	114		
Query 557	TGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTGGCTTAGTTCCGGCTCGAATTAGAA	616		
Sbjct 113	TGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTGGCTTAGTTCCGGCTCGAATTAGAA	54		
Query 617	GGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGCTCAGGCACCGAAAACAAATATAGG 669			
Sbjct 53	GGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGCTCAGGCACCGAAAACAAATATAGG 1			

Lampiran10. Hasil BLAST Sampel Blitar 3

RID	H87WYZHH015 (Expires on 06-28 09:45 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_242877	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



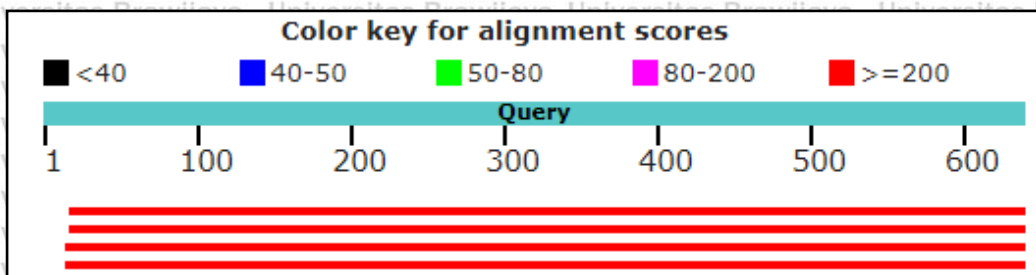
Nemacheilus fasciatus voucher BIF0832 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KT960792.1](#) Length: 652 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 652 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1188 bits(643)	0.0	649/652(99%)	0/652(0%)	Plus/Minus
Query 18	CAGGTGCTGATATGGATTGGGTCCTCCTCCGGCGGGTCAAAGAATGGGTGTTAA	77		
Sbjct 652	CAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCCTCCTCCGGCGGGTCAAAGAATGGGTGTTAA	593		
Query 78	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAATCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATGGAGCAG	137		
Sbjct 592	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAATCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATGGAGCAG	533		
Query 138	AAGAACTGCTGTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGATGGC	197		
Sbjct 532	AAGAACTGCTGTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGATGGC	473		
Query 198	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGAAGACAC	257		
Sbjct 472	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGAAGACAC	413		
Query 258	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCTGGGCAAGGTT	317		
Sbjct 412	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCTGGGCAAGGTT	353		
Query 318	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATGA	377		
Sbjct 352	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATGA	293		
Query 378	GGTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTATTCGGGG	437		
Sbjct 292	GGTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTATTCGGGG	233		
Query 438	GAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAAT	497		
Sbjct 232	GAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAAT	173		
Query 498	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	557		
Sbjct 172	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	113		
Query 558	GTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	617		
Sbjct 112	GTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	53		
Query 618	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTCAGGCACCGAAAATAAATATAGG	669		
Sbjct 52	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTCAGGCACCGAAAATAAATATAGG	1		

Lampiran11. Hasil BLAST Sampel Blitar 4

RID	H884B9JM015 (Expires on 06-28 09:48 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_242699	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



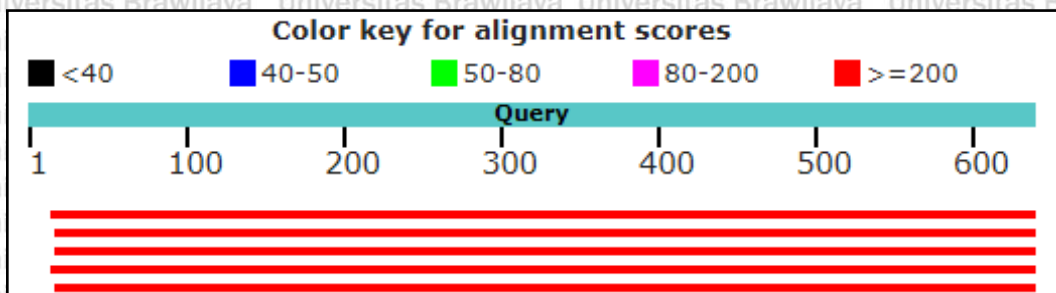
Nemacheilus fasciatus voucher BIF0832 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KT960792.1](#) Length: 652 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 652 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1188 bits(643)	0.0	650/653(99%)	2/653(0%)	Plus/Minus
Query	18	CAGGTGCTGATATTAG-ATTGGGCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGGGTGTTA	76		
Sbjct	652	CAGGTGCTGATAT-AGAATTGGGCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGGGTGTTA	594		
Query	77	AATTTGCGTCTGTTAAGAGCATGGTAATCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCA	136		
Sbjct	593	AATTTGCGTCTGTTAAGAGCATGGTAATCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCA	534		
Query	137	GAAGAACTGCTGTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGATGG	196		
Sbjct	533	GAAGAACTGCTGTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGATGG	474		
Query	197	CTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAGACA	256		
Sbjct	473	CTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAGACA	414		
Query	257	CACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGT	316		
Sbjct	413	CACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGT	354		
Query	317	TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACGGTTTATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATG	376		
Sbjct	353	TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACGGTTTATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATG	294		
Query	377	AGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGCGGCAAGGAGTCAAGAAGCTATGTTGTTATTTCGGG	436		
Sbjct	293	AGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGCGGCAAGGAGTCAAGAAGCTATGTTGTTATTTCGGG	234		
Query	437	GGAATGCCATGTGCGGGGCCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTCCAAATCCCCAA	496		
Sbjct	233	GGAATGCCATGTGCGGGGCCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTCCAAATCCCCAA	174		
Query	497	TAAGGATAGGCATTAATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACAT	556		
Sbjct	173	TAAGGATAGGCATTAATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACAT	114		
Query	557	TGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCCGCTCGAATTAGAA	616		
Sbjct	113	TGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCCGCTCGAATTAGAA	54		
Query	617	GGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGCTCAGGCACCGAAAATAAATATAGG	669		
Sbjct	53	GGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGCTCAGGCACCGAAAATAAATATAGG	1		

Lampiran 12. Hasil BLAST Sampel Blitar 5

RID	H889CDWV015 (Expires on 06-28 09:51 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_82835	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



Nemacheilus fasciatus voucher BIF0832 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KT960792.1](#) Length: 652 Number of Matches: 1

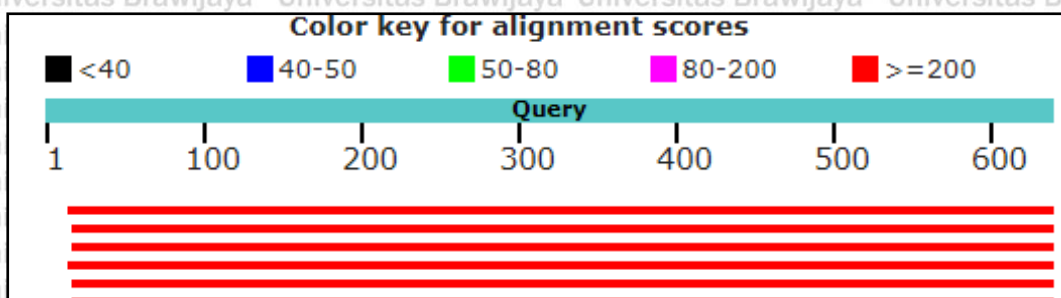
Range 1: 1 to 652 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1182 bits(640)	0.0	648/652(99%)	0/652(0%)	Plus/Minus

Query	18	CAGGTGCTGATATAAGATTGGGCTCTCCTCCCGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGTTTAA	77
Sbjct	652	CAGGTGCTGATATAGAATTGGGCTCTCCTCCCGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGTTTAA	593
Query	78	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCAG	137
Sbjct	592	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAAATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAGCAG	533
Query	138	AAGGACTGCTGTTACCCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGGC	197
Sbjct	532	AAGGACTGCTGTTACCCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGGC	473
Query	198	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGAAGACAC	257
Sbjct	472	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGAAGACAC	413
Query	258	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCGCGTGGGCAAGGTT	317
Sbjct	412	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCGCGTGGGCAAGGTT	353
Query	318	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATGA	377
Sbjct	352	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATGA	293
Query	378	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTATTTCGGGG	437
Sbjct	292	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTATTTCGGGG	233
Query	438	GAATGCCATGTCCGGGGCCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCCCAAT	497
Sbjct	232	GAATGCCATGTCCGGGGCCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCCCAAT	173
Query	498	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	557
Sbjct	172	AAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATT	113
Query	558	GTAGATTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	617
Sbjct	112	GTAGATTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG	53
Query	618	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTCAGGCACCGAAAATAAATATAGG	669
Sbjct	52	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTCAGGCACCGAAAATAAATATAGG	1

Lampiran 13. Hasil BLAST Sampel Pasuruan 1

RID	H88ECGZW014 (Expires on 06-28 09:54 am)	Database Name	nr
Query ID	lcl Query_23025	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



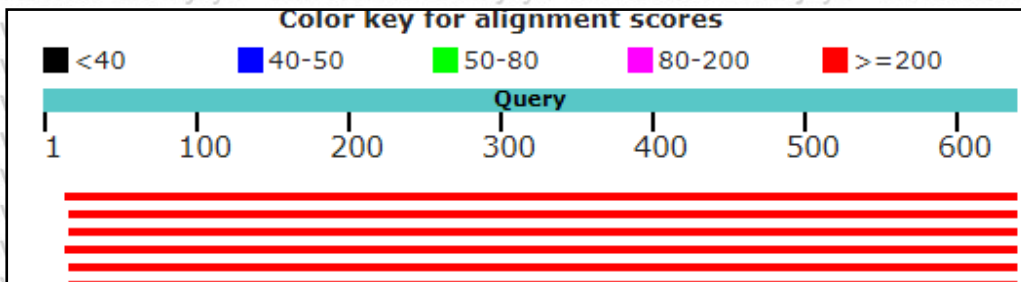
Nemacheilus fasciatus voucher BIF3609 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KU692665.1](#) Length: 632 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 632 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1146 bits(620)	0.0	628/632(99%)	0/632(0%)	Plus/Minus
Query 15	GAACAGGTGCTGATATTGGATGGTGTCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGT	74		
Sbjct 632	GAACAGGTGCTGATATAGAATGGGTCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGT	573		
Query 75	TAAATTTTCGGTCTGTAAAGAGCATGGTGATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	134		
Sbjct 572	TAAATTTTCGGTCTGTAAAGAGCATGGTGATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	513		
Query 135	CAGAAGGACTGCTGTACCAGGACCGCCATACGAAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGAT	194		
Sbjct 512	CAGAAGGACTGCTGTACCAGGACCGCCATACGAAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGAT	453		
Query 195	GGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATGCCCCGAGGATGGAAGA	254		
Sbjct 452	GGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATGCCCCGAGGATGGAAGA	393		
Query 255	CACACCTGCCAGGTGAAGGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTGCGTGGGCAAG	314		
Sbjct 392	CACACCTGCCAGGTGAAGGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTGCGTGGGCAAG	333		
Query 315	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGA	374		
Sbjct 332	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGA	273		
Query 375	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCG	434		
Sbjct 272	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCG	213		
Query 435	GGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATATCCCC	494		
Sbjct 212	GGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATATCCCC	153		
Query 495	AATAAGGATAGGCATTAATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAAC	554		
Sbjct 152	AATAAGGATAGGCATTAATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAAC	93		
Query 555	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTGAAATTAG	614		
Sbjct 92	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTGAAATTAG	33		
Query 615	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTC 646			
Sbjct 32	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTC 1			

Lampiran 14. Hasil BLAST Sampel Pasuruan 2

RID	H8813N4X014 (Expires on 06-28 09:56 am)	Database Name	nr
Query ID	lcl Query_70303	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



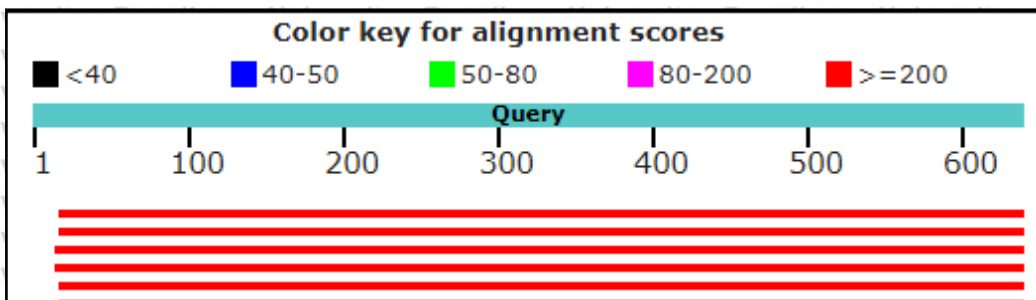
Nemacheilus fasciatus voucher BIF3609 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KU692665.1](#) Length: 632 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 632 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1146 bits(620)	0.0	628/632(99%)	0/632(0%)	Plus/Minus
Query 15	GAACAGGTGCTGATATTGGATGGTGTCTCTCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGT	74		
Sbjct 632	GAACAGGTGCTGATATAGAATGGGTCTCTCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGT	573		
Query 75	TAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	134		
Sbjct 572	TAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	513		
Query 135	CAGAAGGACTGCTGTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGAT	194		
Sbjct 512	CAGAAGGACTGCTGTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGAT	453		
Query 195	GGCTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATGCCCGGAGGATGGAAGA	254		
Sbjct 452	GGCTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATGCCCGGAGGATGGAAGA	393		
Query 255	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTGCGTGGGCAAG	314		
Sbjct 392	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTGCGTGGGCAAG	333		
Query 315	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGA	374		
Sbjct 332	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCATCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGA	273		
Query 375	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCGAGGATCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCG	434		
Sbjct 272	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCGAGGATCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCG	213		
Query 435	GGGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCC	494		
Sbjct 212	GGGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCC	153		
Query 495	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGGTGTGCAGTAACAATAAC	554		
Sbjct 152	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGGTGTGCAGTAACAATAAC	93		
Query 555	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAG	614		
Sbjct 92	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAG	33		
Query 615	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTC 646			
Sbjct 32	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTC 1			

Lampiran 15. Hasil BLAST Sampel Pasuruan 3

RID	H89F9B8F014 (Expires on 06-28 10:11 am)	Database Name	nr
Query ID	lcl Query_125283	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		

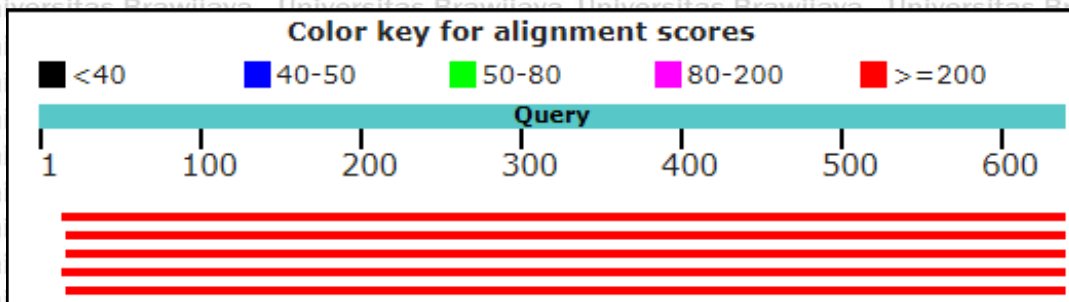


Nemacheilus fasciatus voucher BIF3609 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KU692665.1](#) Length: 632 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1146 bits(620)	0.0	628/632(99%)	0/632(0%)	Plus/Minus
Query 15	GAACAGGTGCTGATATGGATGGTGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGT	74		
Sbjct 632	GAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGT	573		
Query 75	TAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGTATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	134		
Sbjct 572	TAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGTATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	513		
Query 135	CAGAAGGACTGCTGTTACCGAGCCGCCCATACGAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGAT	194		
Sbjct 512	CAGAAGGACTGCTGTTACCGAGCCGCCCATACGAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGAT	453		
Query 195	GGCTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGCAGGATGGAAGA	254		
Sbjct 452	GGCTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGCAGGATGGAAGA	393		
Query 255	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAG	314		
Sbjct 392	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAG	333		
Query 315	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTCAACACCTGA	374		
Sbjct 332	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTCAACACCTGA	273		
Query 375	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCG	434		
Sbjct 272	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCG	213		
Query 435	GGGGAATGCCATGTGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCC	494		
Sbjct 212	GGGGAATGCCATGTGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCC	153		
Query 495	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAAC	554		
Sbjct 152	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAAC	93		
Query 555	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAG	614		
Sbjct 92	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAG	33		
Query 615	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTC 646			
Sbjct 32	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTC 1			

Lampiran 16. Hasil BLAST Sampel Pasuruan 4

RID	H8ATN9BN014 (Expires on 06-28 10:34 am)	Database Name	nr
Query ID	lcl Query_84999	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



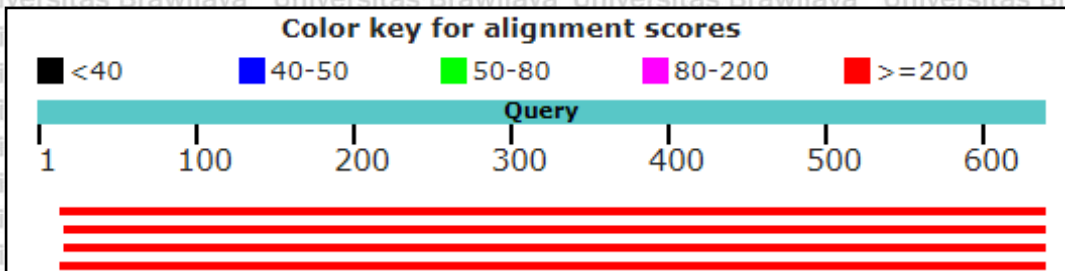
Nemacheilus fasciatus voucher BIF3609 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KU692665.1](#) Length: 632 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 632 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1146 bits(620)	0.0	628/632(99%)	0/632(0%)	Plus/Minus
Query 15	GAACAGGTGCTGATATTGGATGGTGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGT	74		
Sbjct 632	GAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGT	573		
Query 75	TAAATTTCCGGTCTGTAAAGAGCATGGTGATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	134		
Sbjct 572	TAAATTTCCGGTCTGTAAAGAGCATGGTGATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	513		
Query 135	CAGAAGGACTGCTGTACCAGGACCCCCATACGAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGAT	194		
Sbjct 512	CAGAAGGACTGCTGTACCAGGACCCCCATACGAACAGGGGAGTTGGTATTGAGAGAT	453		
Query 195	GGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCCGAGGATGGAAGA	254		
Sbjct 452	GGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCCGAGGATGGAAGA	393		
Query 255	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTGCGTGGGCAAG	314		
Sbjct 392	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTGCGTGGGCAAG	333		
Query 315	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGA	374		
Sbjct 332	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGA	273		
Query 375	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGGCGGCAAGGAGTCAAGAAGCTATGTTGTTTATTCG	434		
Sbjct 272	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGGCGGCAAGGAGTCAAGAAGCTATGTTGTTTATTCG	213		
Query 435	GGGGAATGCCATGTCCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCCC	494		
Sbjct 212	GGGGAATGCCATGTCCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCCC	153		
Query 495	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGGTGTGCAGTAACAATAAC	554		
Sbjct 152	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGGTGTGCAGTAACAATAAC	93		
Query 555	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCCGGCTCGAATTAG	614		
Sbjct 92	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCCGGCTCGAATTAG	33		
Query 615	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCCGGCTC 646			
Sbjct 32	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCCGGCTC 1			

Lampiran 17. Hasil BLAST Sampel Pasuruan 5

RID	H8AYVZT3015 (Expires on 06-28 10:37 am)	Database Name	nr
Query ID	lcl Query_25447	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



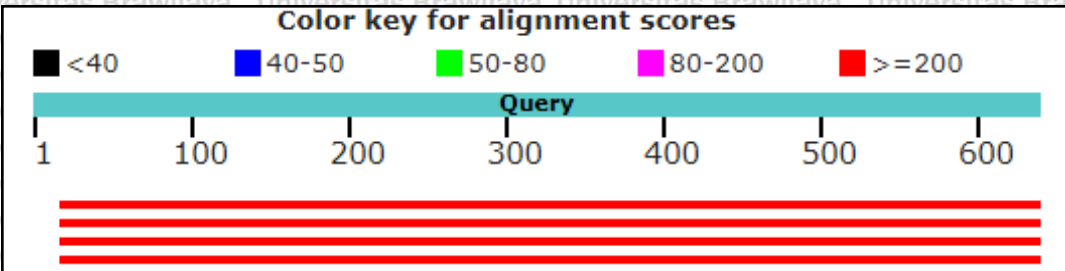
Nemacheilus fasciatus voucher BIF3609 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KU692665.1](#) Length: 632 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 632 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1146 bits(620)	0.0	628/632(99%)	0/632(0%)	Plus/Minus
Query 15	GAACAGGTGCTGATATTGGATGGTGTCTCCTCTCCGGCGGGGTCAAAGAAATGTGGTGT	74		
Sbjct 632	GAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCTCTCCGGCGGGGTCAAAGAAATGTGGTGT	573		
Query 75	TAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	134		
Sbjct 572	TAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	513		
Query 135	CAGAAGGACTGCTGTTACCAAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGATTGAGAGAT	194		
Sbjct 512	CAGAAGGACTGCTGTTACCAAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGATTGAGAGAT	453		
Query 195	GGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGGAAGA	254		
Sbjct 452	GGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGGAAGA	393		
Query 255	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAG	314		
Sbjct 392	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAG	333		
Query 315	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCAGGCTCCGGCTCAAACCTGA	374		
Sbjct 332	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCAGGCTCCGGCTCAAACCTGA	273		
Query 375	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGAGGAGTCAAGACTTATGTTGTTATTTCG	434		
Sbjct 272	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGAGGAGTCAAGACTTATGTTGTTATTTCG	213		
Query 435	GGGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCC	494		
Sbjct 212	GGGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCC	153		
Query 495	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGACAGTAAACAATAAC	554		
Sbjct 152	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGACAGTAAACAATAAC	93		
Query 555	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCCGGCTCGAATTAG	614		
Sbjct 92	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCCGGCTCGAATTAG	33		
Query 615	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCCGGCTC	646		
Sbjct 32	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCCGGCTC	1		

Lampiran 18. Hasil BLAST Sampel Lumajang 1

RID	H8B2PXA0014 (Expires on 06-28 10:39 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_91767	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		



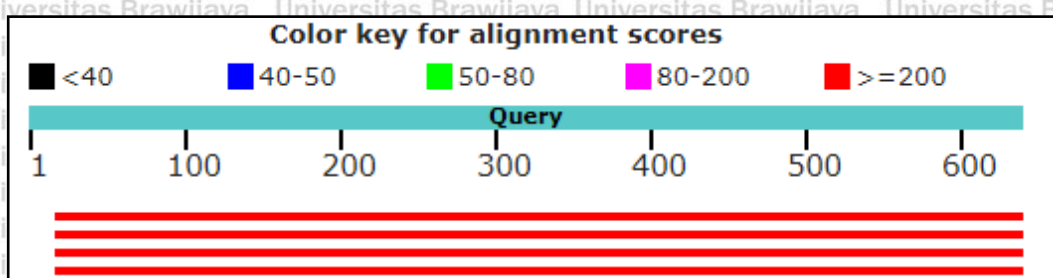
Nemacheilus fasciatus voucher BIF3609 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KU692665.1](#) Length: 632 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 632 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1146 bits(620)	0.0	628/632(99%)	0/632(0%)	Plus/Minus
Query 15	GAACAGGTGCTGATATTGGATGGTGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGTT	74		
Sbjct 632	GAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGTT	573		
Query 75	TAAATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	134		
Sbjct 572	TAAATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGATAGGAG	513		
Query 135	CAGAAGGACTGCTGTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGATTGAGAGAT	194		
Sbjct 512	CAGAAGGACTGCTGTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGATTGAGAGAT	453		
Query 195	GGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATGCCCGGAGGATGGGAAGA	254		
Sbjct 452	GGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATGCCCGGAGGATGGGAAGA	393		
Query 255	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCCTGCGTGGGCAAG	314		
Sbjct 392	CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCCTGCGTGGGCAAG	333		
Query 315	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGCTCCGGCTCAACACCTGA	374		
Sbjct 332	GTTTCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGCTCCGGCTCAACACCTGA	273		
Query 375	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGAGGAGTCAAGACTTATGTTGTTTATTTCG	434		
Sbjct 272	TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGAGGAGTCAAGACTTATGTTGTTTATTTCG	213		
Query 435	GGGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCCC	494		
Sbjct 212	GGGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCCC	153		
Query 495	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAAC	554		
Sbjct 152	AATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAAC	93		
Query 555	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAG	614		
Sbjct 92	ATTGTAGATTTGGTCATCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAG	33		
Query 615	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTC 646			
Sbjct 32	AAGGCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGGCTC 1			

Lampiran 19. Hasil BLAST Sampel Lumajang 2

RID	H8B70BVN014 (Expires on 06-28 10:41 am)	Database Name	nr
Query ID	lcl Query_31835	Description	Nucleotide collection (nr)
Description	None	Program	BLASTN 2.9.0+ ▶ Citation
Molecule type	dna		
Query Length	640		

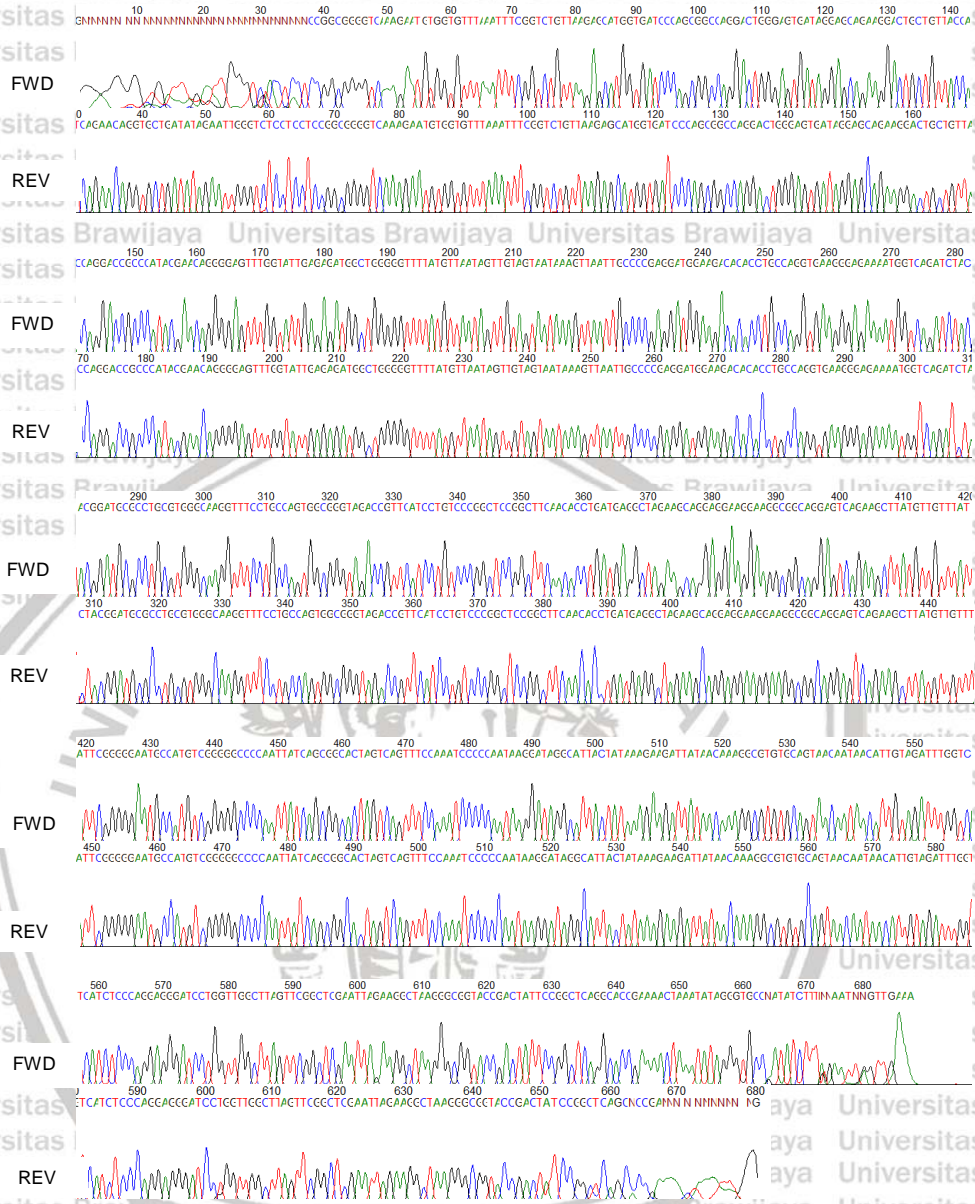


Nemacheilus fasciatus voucher BIF2197 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
 Sequence ID: [KT960795.1](#) Length: 652 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 652 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

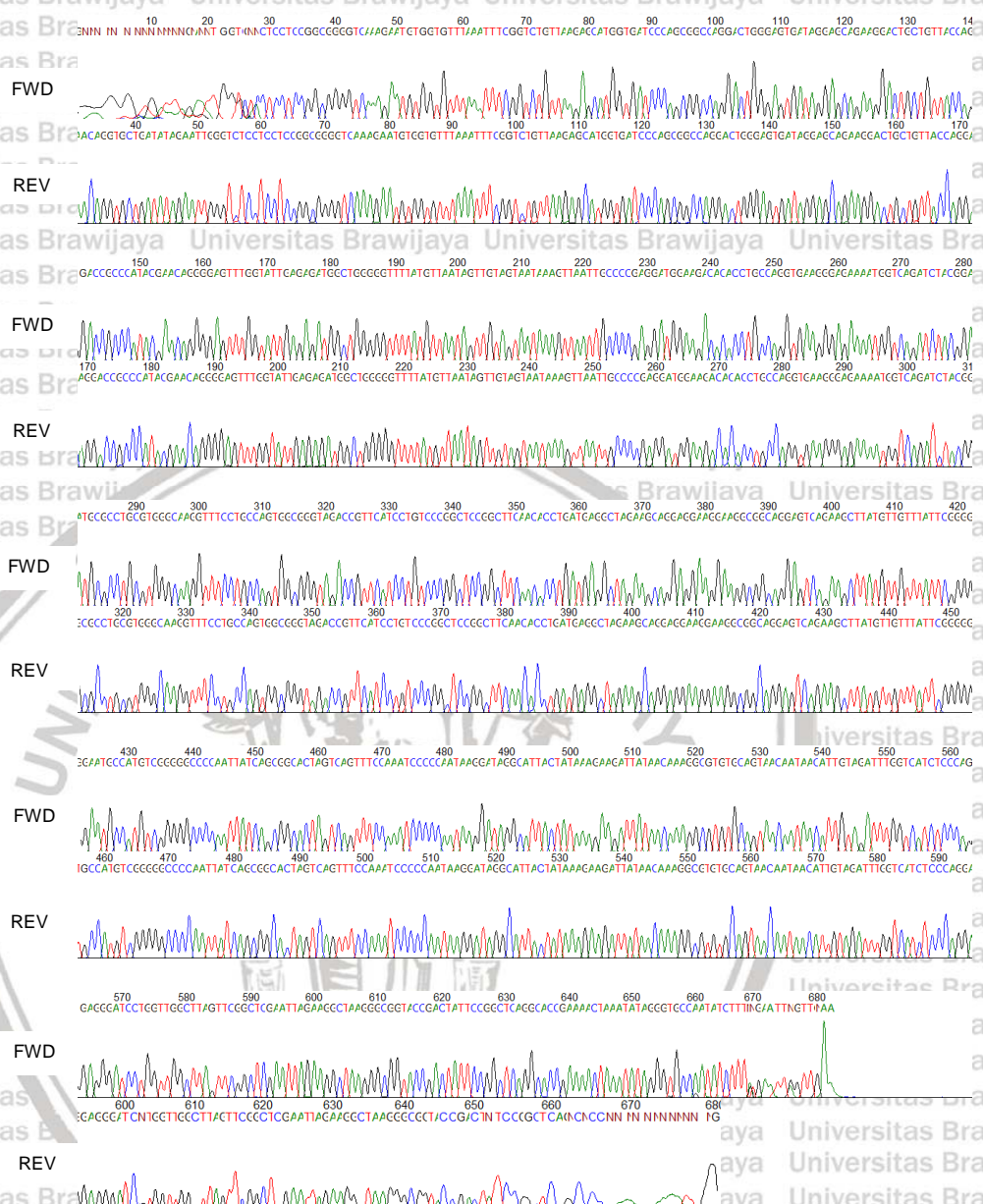
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1205 bits(652)	0.0	652/652(100%)	0/652(0%)	Plus/Minus
Query 18	CAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCGCCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGTTTAA				77
Sbjct 652	CAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCGCCCTCCGGCGGGGTCAAAGAATGTGGTGTTTAA				593
Query 78	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAATTCAGCGGGCCAGGACTGGGAGTGACAGGAGCAG				137
Sbjct 592	ATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAATTCAGCGGGCCAGGACTGGGAGTGACAGGAGCAG				533
Query 138	AAGGACTGCTGTTACCAAGGACCGCCACACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGGC				197
Sbjct 532	AAGGACTGCTGTTACCAAGGACCGCCACACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGAGATGGC				473
Query 198	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGAAGACAC				257
Sbjct 472	TGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGAAGACAC				413
Query 258	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTCGCTGGGCAAGGTT				317
Sbjct 412	ACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTCGCTGGGCAAGGTT				353
Query 318	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTATCCTCTGCCCGCTCCGGCTTCAACACCTGATGA				377
Sbjct 352	TCCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTATCCTCTGCCCGCTCCGGCTTCAACACCTGATGA				293
Query 378	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAGGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGG				437
Sbjct 292	GGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAGGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGG				233
Query 438	GAATGCCATGTCGGGGGCCCGGATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAAT				497
Sbjct 232	GAATGCCATGTCGGGGGCCCGGATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCCAAT				173
Query 498	AAGGATAGGTATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGCGGTGTCAGTAACAATAACATT				557
Sbjct 172	AAGGATAGGTATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGCGGTGTCAGTAACAATAACATT				113
Query 558	GTAGACTGGTCACTCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG				617
Sbjct 112	GTAGACTGGTCACTCTCCAGGAGGGATCCTGGTTGGCTTAGTTCGGCTCGAATTAGAAG				53
Query 618	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGCTCAGGCACCGAAAACTAAATATAGG				669
Sbjct 52	GCTAAGGGCGGTACCGACTATTCGGCTCAGGCACCGAAAACTAAATATAGG				1

Lampiran 20. Kromatogram Kode Sampel Ponorogo 1



TGACCAAAAAAGCAGAACAGGTGCTGATATTTGATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAA
 GAATGTGGTGTTTAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGCCAGGACTG
 GGAGTGATAGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGT
 TTGGTATTGAGAGATGGCTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGC
 CCCGAGGATGGAAGACACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGAT
 GCGCCTGCGTGGGCAAGGTTTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCTGTCCCGGC
 TCCGGCTTCAACACCTGATGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCA
 GAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGGGAATGCCATGTCCGGGGCCCCAATTATCAGCGGCA
 CTAGTCAGTTTCAAATCCCCCAATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAA

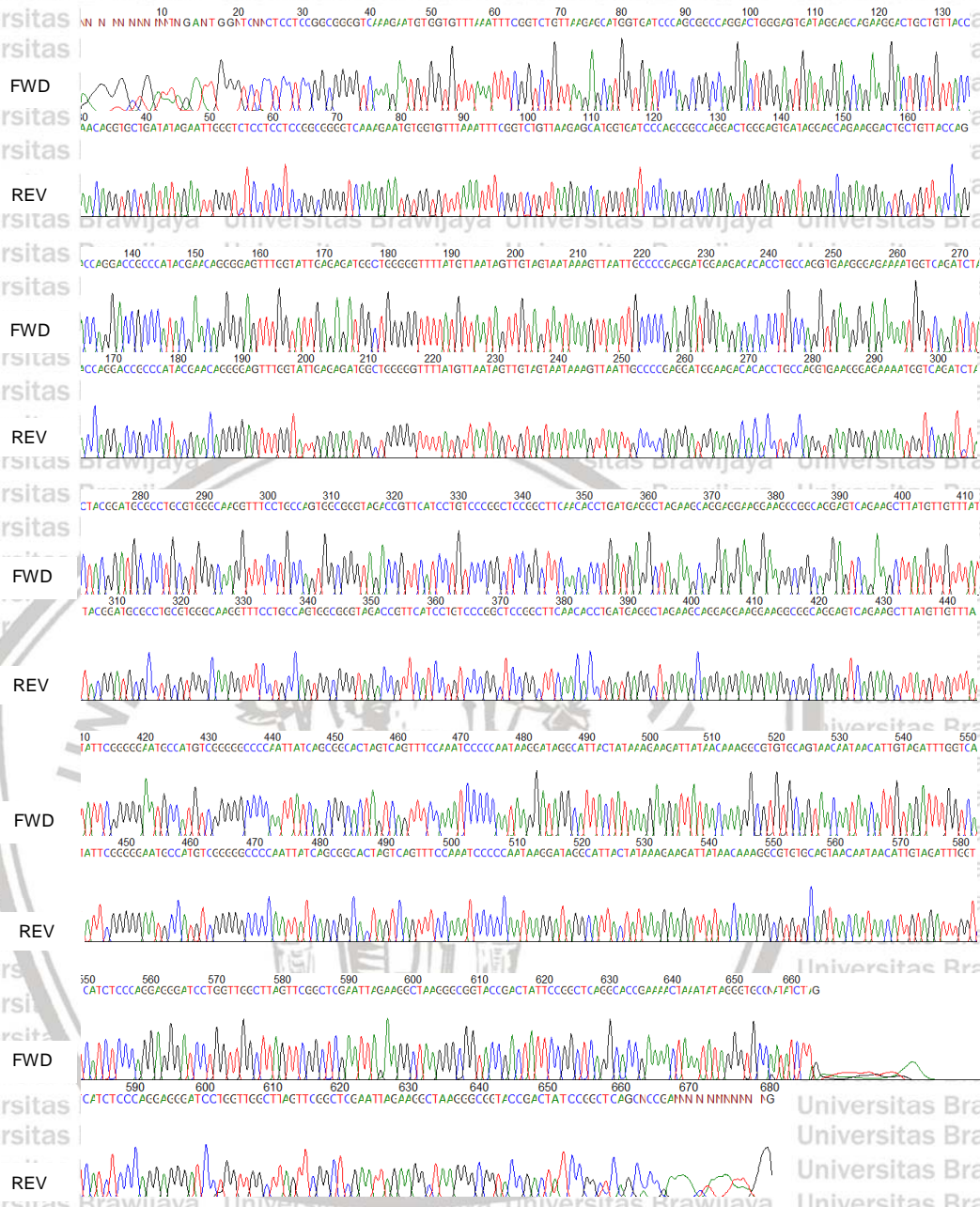
Lampiran 21. Kromatogram Kode Sampel Ponorogo 2



```

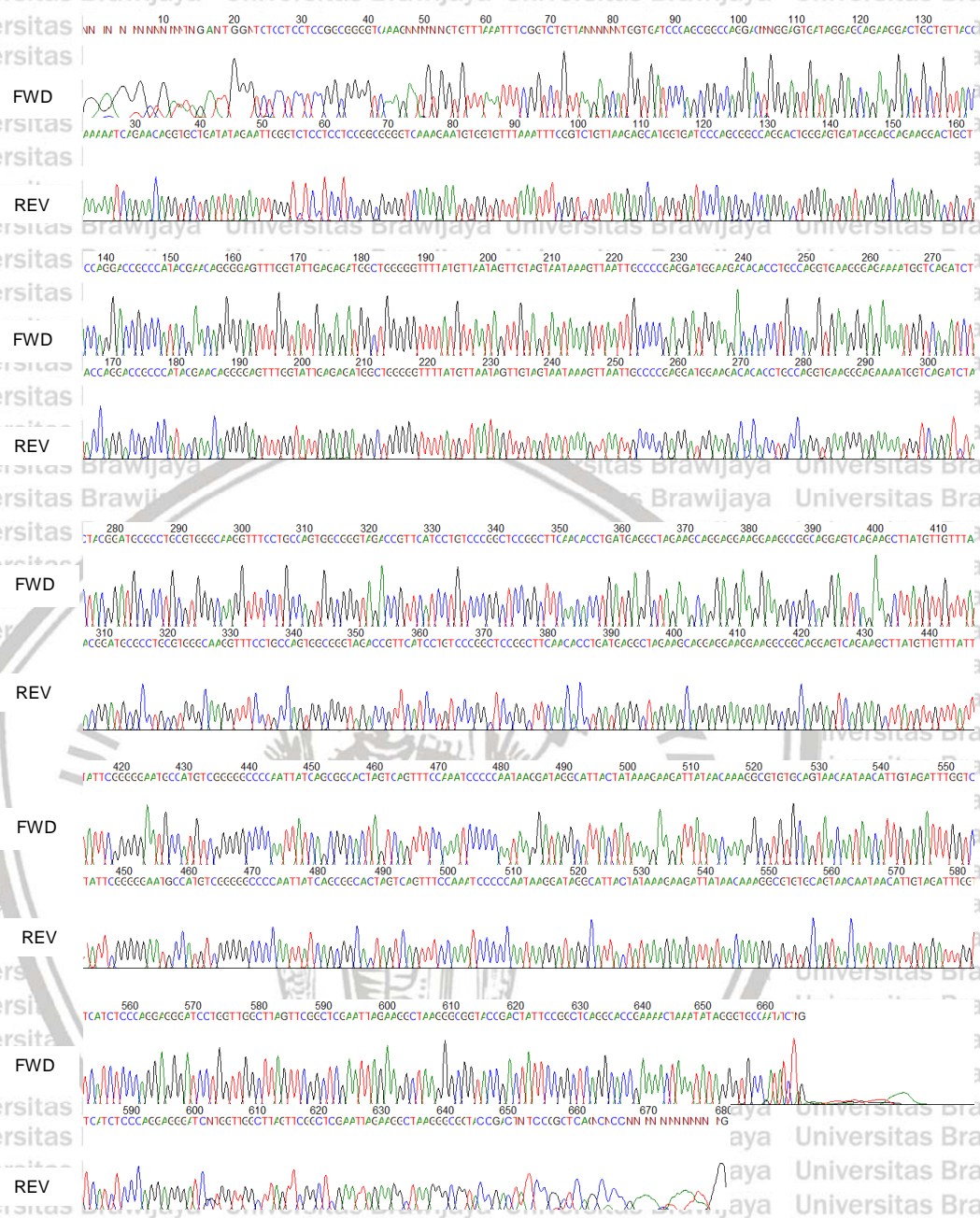
TGACCAAAAAGCAGGACAGGTGCTGATATGGAATTGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAA
GAATGTGGTGTAAATTTTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGTATCCAGCGCCAGGACTG
GGAGTGATAGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGT
TTGGTATTGAGAGATGGCTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGC
CCCGAGGATGGAAGACACACTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGAT
GCGCCTGCGTGGGCAAGGTTTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGC
TCCGGCTTCAACACTGATGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCA
GAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCA
CTAGTCAGTTTCAAATCCCCAATAAGGATAGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAA
  
```


Lampiran 23. Kromatogram Kode Sampel Blitar 1



TGACCAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATTGGATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGA
 ATGTGGTGTAAATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGCCAGGACTGGGAG
 TGATAGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTAT
 TGAGAGATGGCTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGA
 TGGAAGACACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGT
 GGGCAAGGTTTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCTGTCCGGCTCCGGCTTCAACA
 CCTGATGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTT
 ATTCGGGGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATC
 CCGCAATAAGGATAGCATTACTATAAGAGATTATAAAGGCGGTGTCCAGTAACAAT

Lampiran 24. Kromatogram Kode Sampel Blitar 2

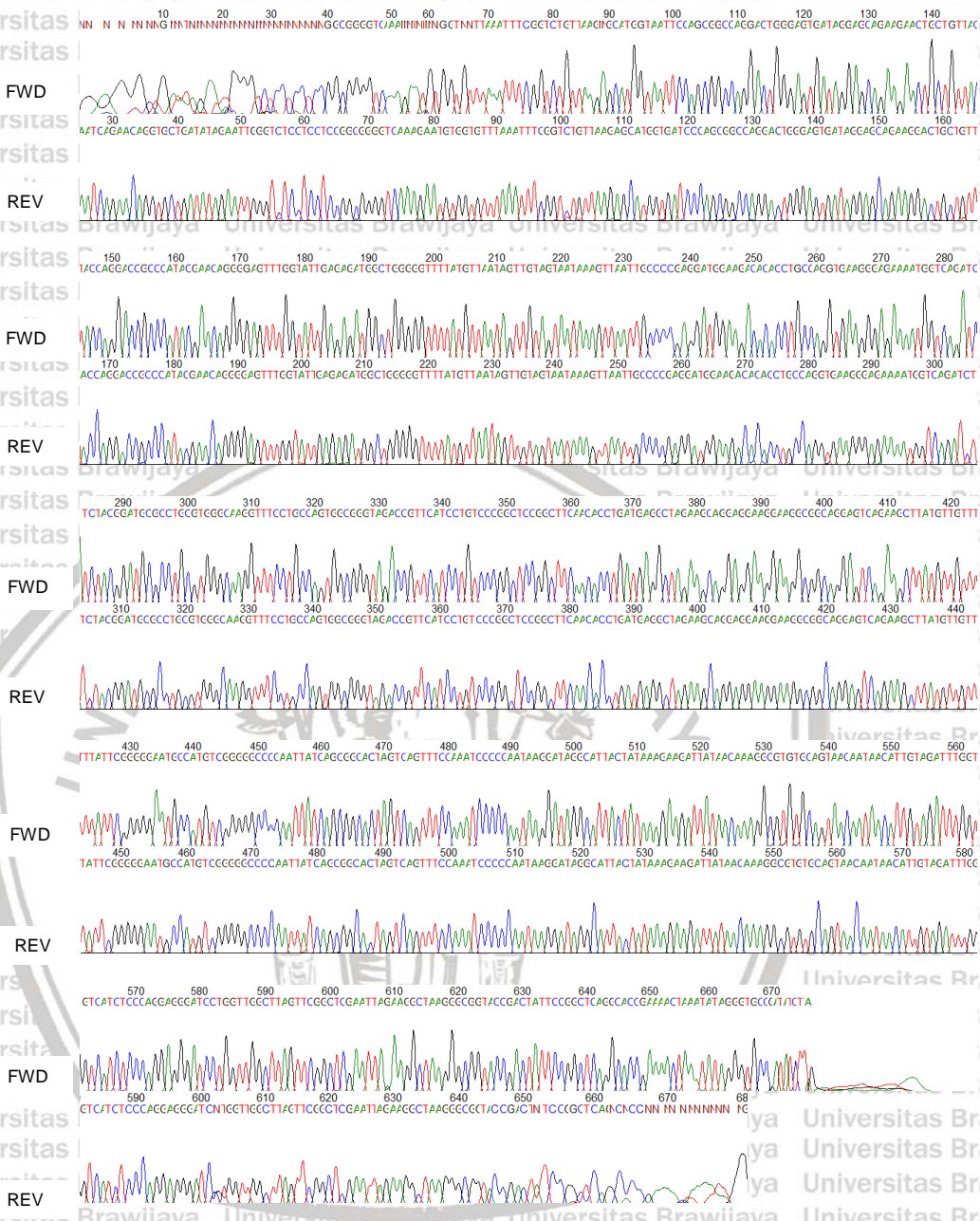


```

TGACCAAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATTGGATTGGGTCTCCTCCTCCGCGGGGTCAAAGAAT
GTGGGTGTTAAATTTGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGA
TAGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAG
AGATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAA
GACACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAA
GGTTTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTCAACACCTGATG
AGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGG
GAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCAAATCCCCAATAAG

```

Lampiran 25. Kromatogram Kode Sampel Blitar 3

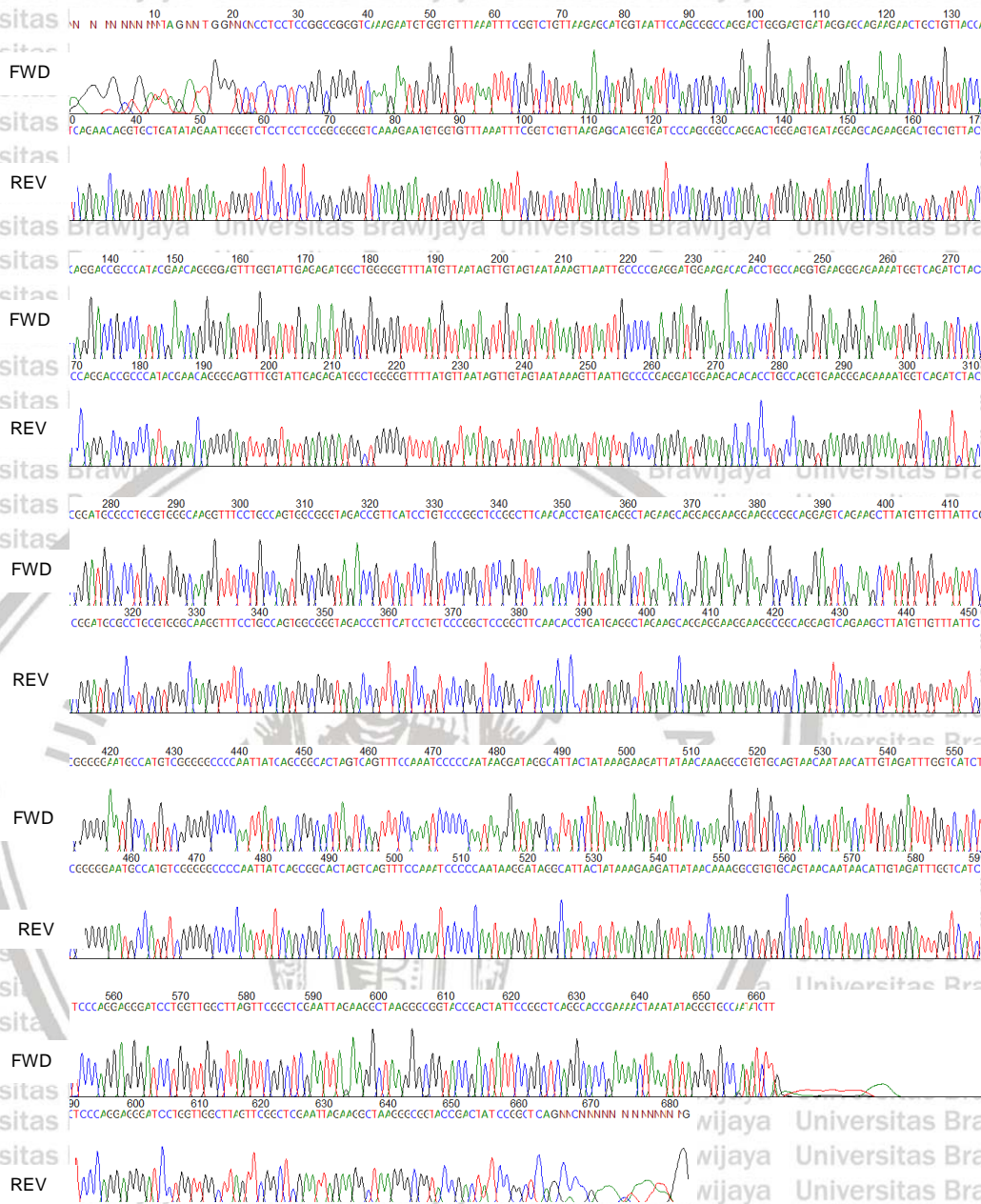


```

TGACCAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATTGGATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAA
TGTGGTGTTAAATTTGGTCTGTTAAGAGCATGGTAATTCAGCGGCCAGGACTGGGAGTG
ATAGGAGCAGAAGAAGTCTGTTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTG
AGAGATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGG
AAGACACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGG
CAAGGTTTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCTGTCCGGCTCCGGCTTCAACACCT
GATGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATT
CGGGGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCAAATCCCCC

```

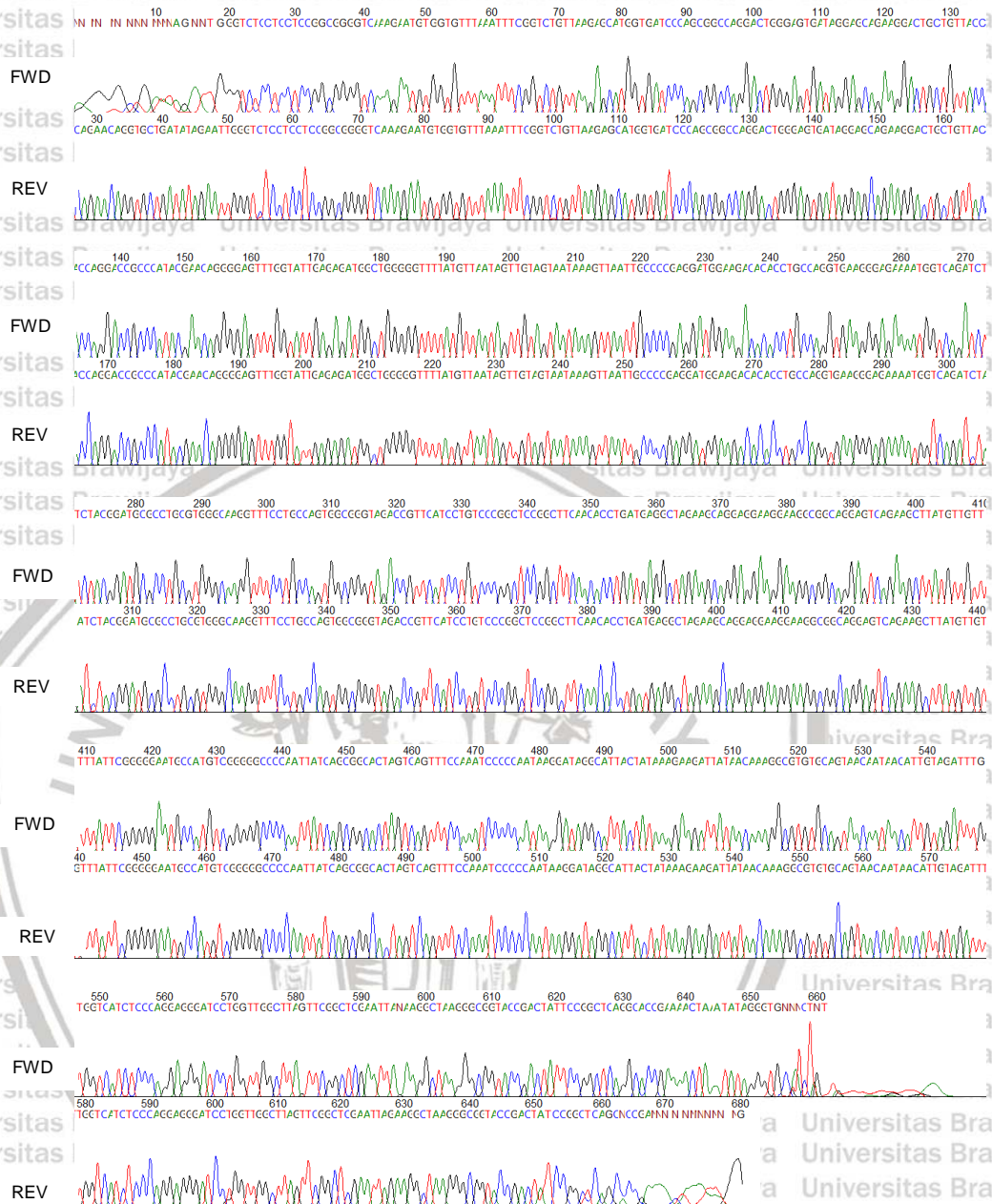
Lampiran 26. Kromatogram Kode Sampel Blitar 4



```

TGACCAAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATTAGATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGA
ATGTGGTGTTTAAATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGTTAATCCAGCGGCCAGGACTGGGAG
TGATAGGAGCAGAAGAAGTCTGTTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTAT
TGAGAGATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGA
TGAAGACACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGT
GGGCAAGGTTTCTGCCAGTGCGGGGTAGACCGTTCATCTGTCCGGCTCCGGCTTCAAC
ACCTGATGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTT
TATTCGGGGGAATGCCATGTCCGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCAAAT
    
```


Lampiran 27. Kromatogram Kode Sampel Blitar 5

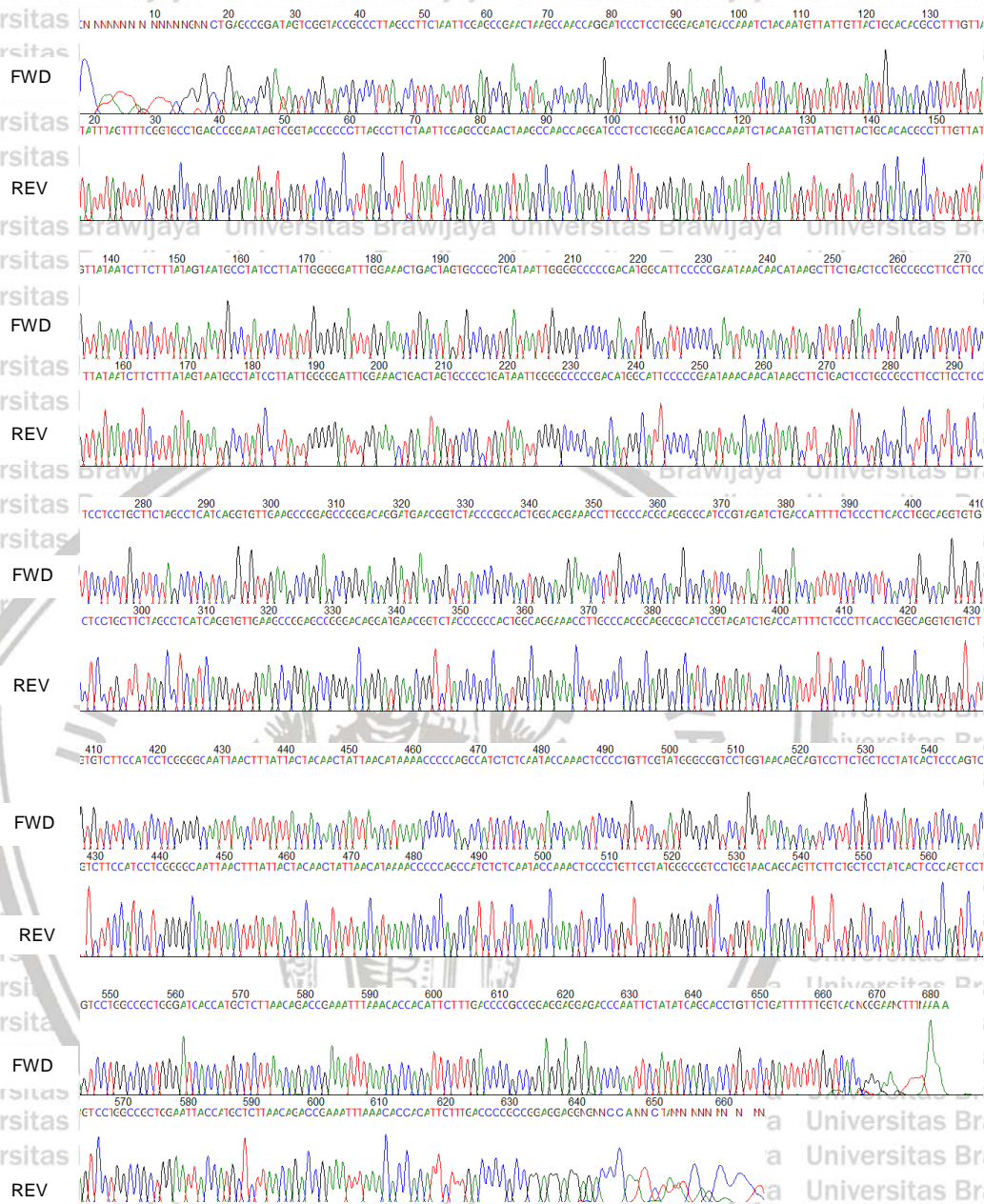


```

TGACCAAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATAAGATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAAT
GTGGTGTTTAAATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTATCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGAT
AGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGA
GATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAGA
CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGT
TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATGAGGC
TAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGGGAAT
GCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCAAATCCCCAATAAGGATA
GGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATTGTAGATTTGG

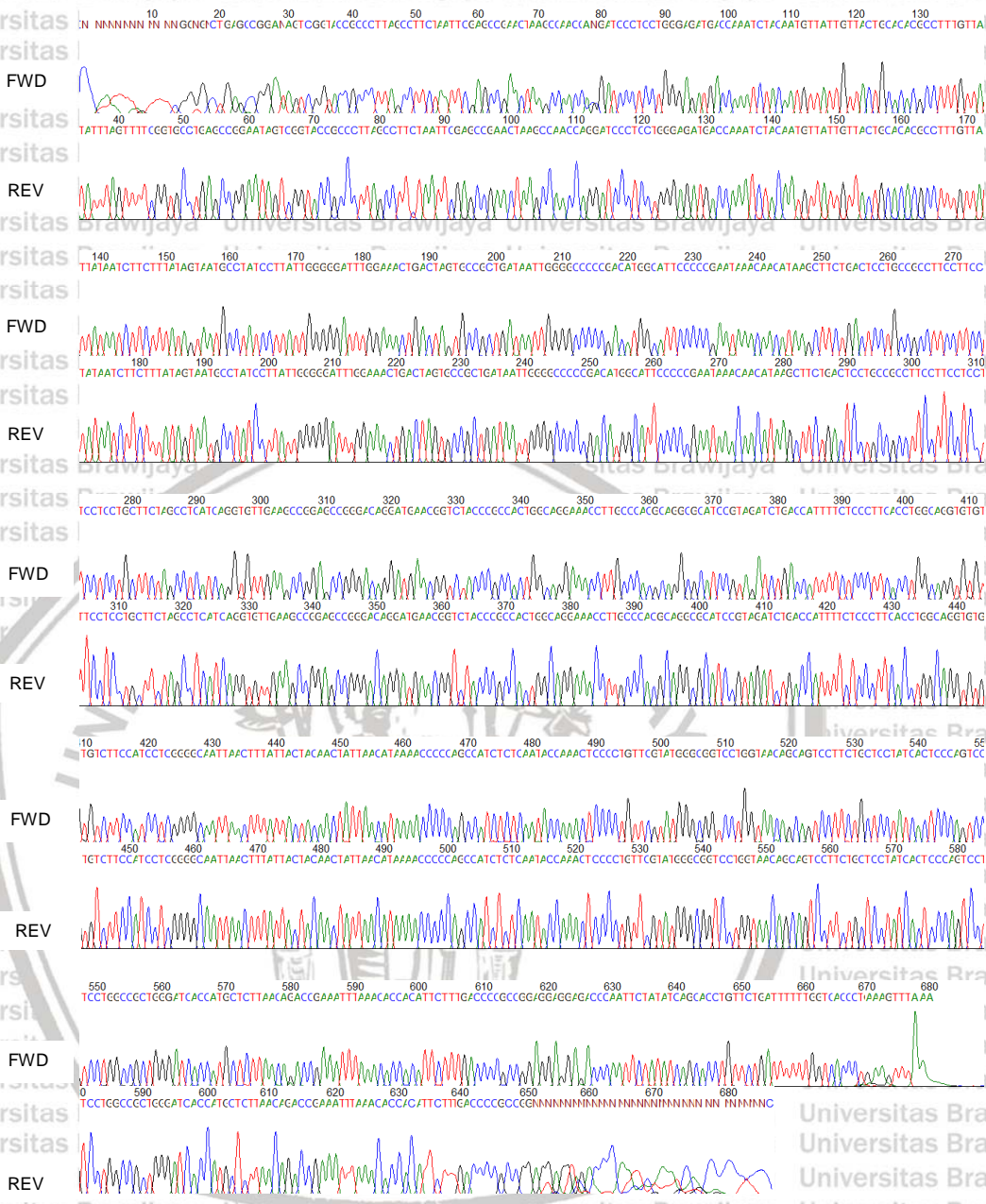
```

Lampiran 28. Kromatogram Kode Sampel Pasuruan 1



TGACCAAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGTCAAAGAA
 TGTGGTGTAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTG
 ATAGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTGGTATTGA
 GAGATGGCTGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCCGAGGATGGA
 AGACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTGCGTGGGCA
 AGGTTTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCTGTCCCGCTCCGGCTTAACACCTGAT
 GAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGG
 GGAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCAAATCCCCAATAA

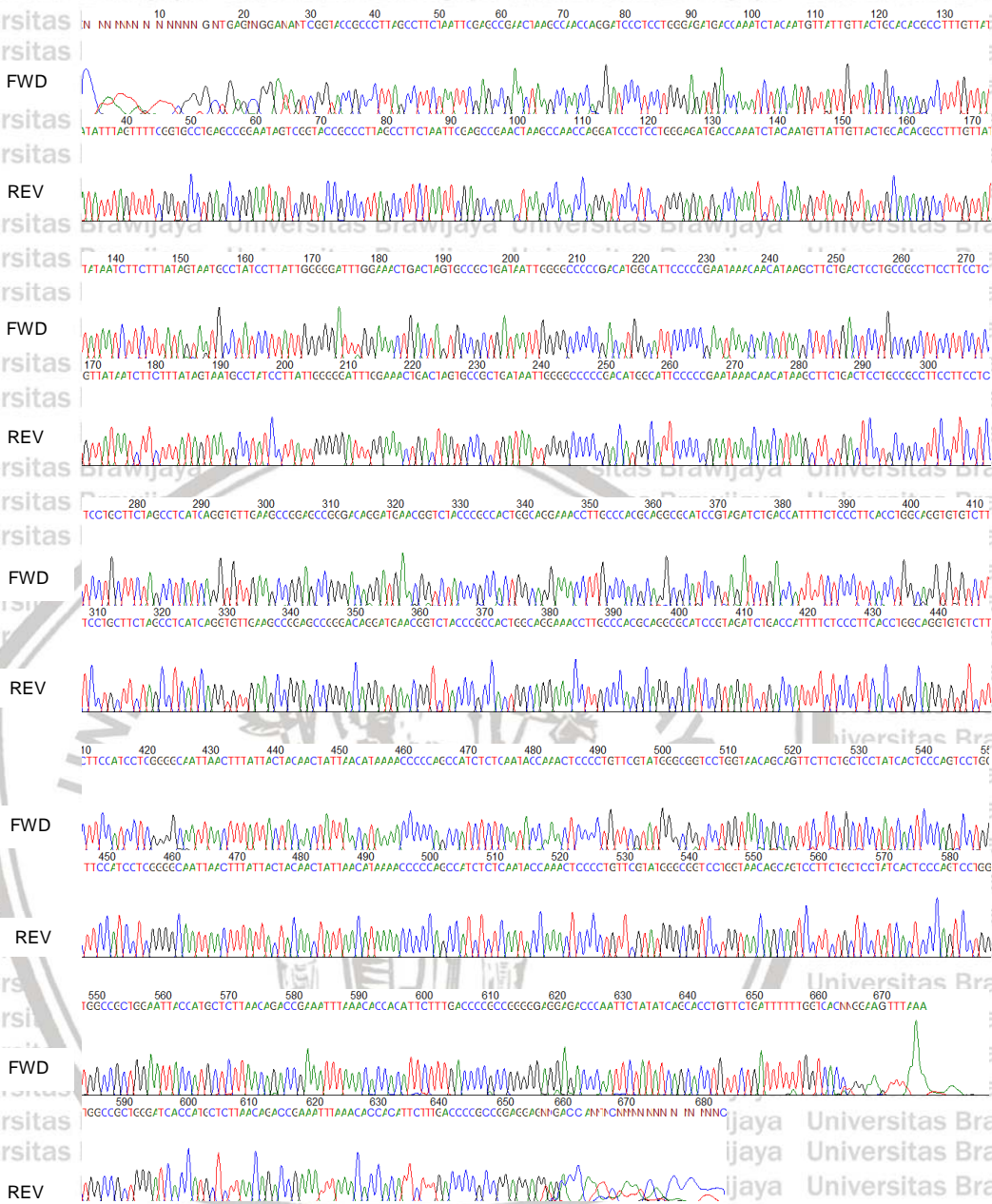
Lampiran 29. Kromatogram Kode Sampel Pasuruan 2



```

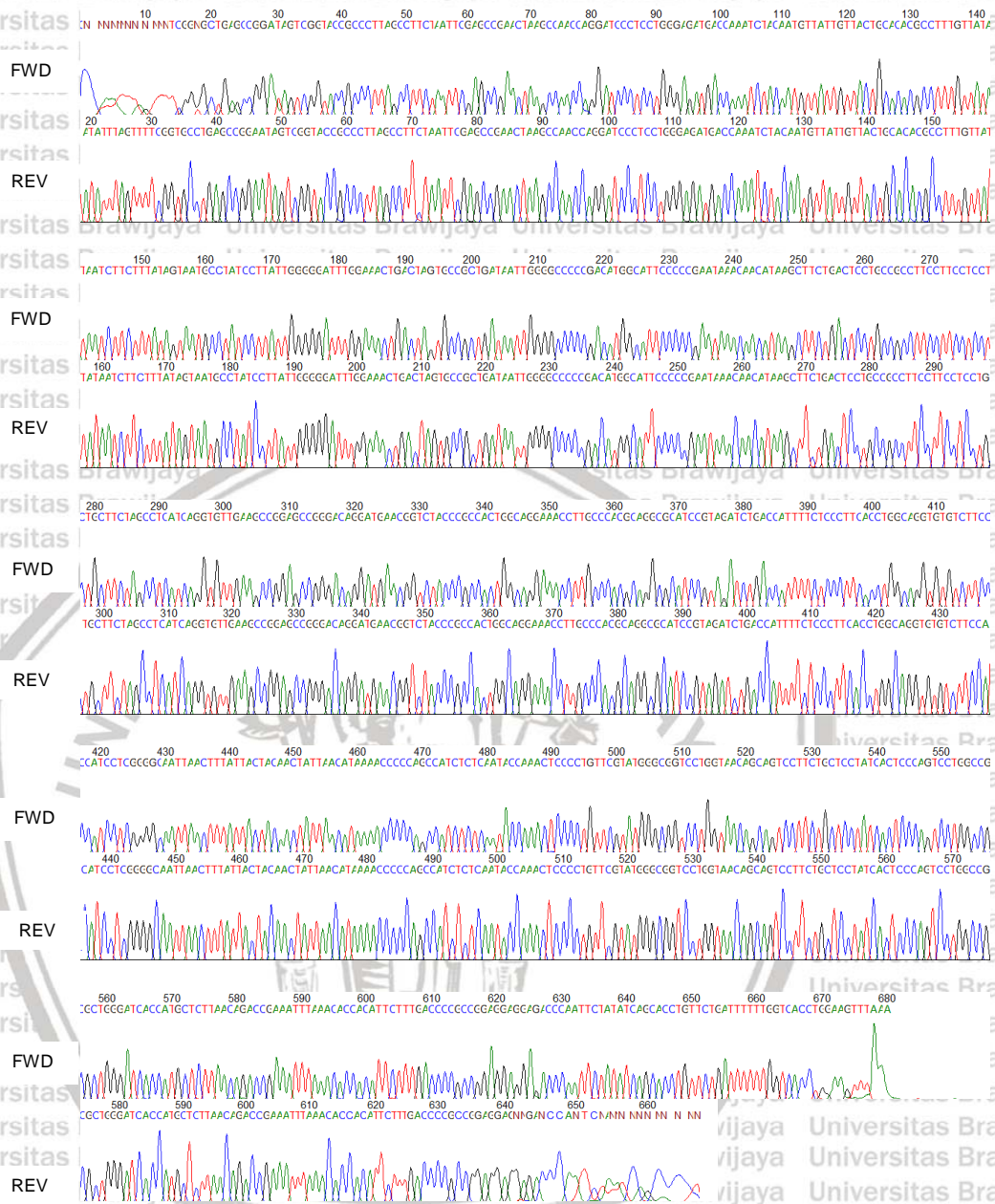
TGACCAAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCTCTCCGGCGGGGTCAAAGAAT
GTGGTGTTTAAATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGA
TAGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAG
AGATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAA
GACACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAA
GGTTTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTATCCTGTCCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGATG
AGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGG
GAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCAAATCCCCAATAAG
CATACCCATTACTATAAACAACATTATAACAACCCCTCTCCACTAACAATAACATTCTACAT
  
```

Lampiran 30. Kromatogram Kode Sampel Pasuruan 3



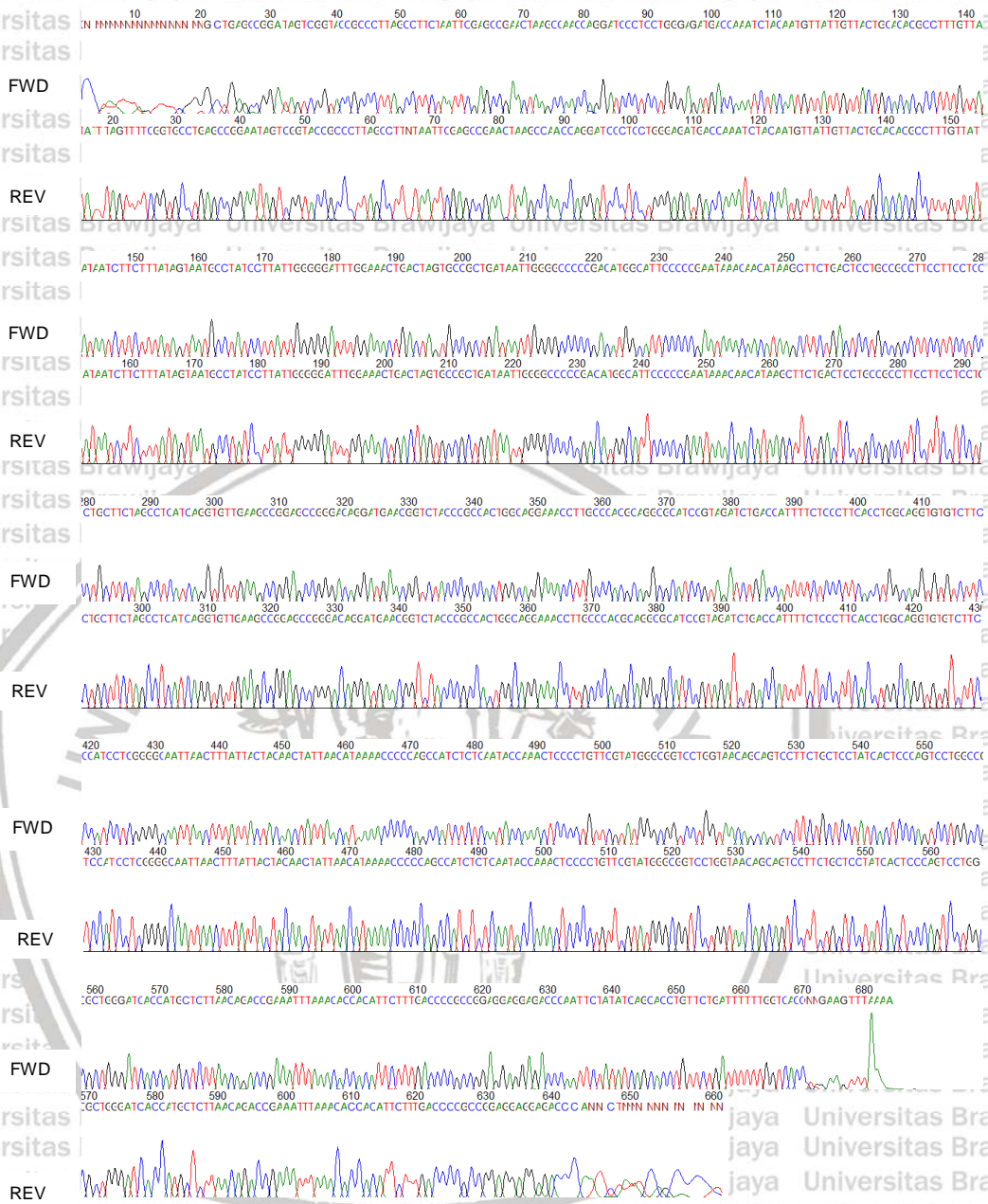
TGACCAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCTCCCCGGGGTCAAAGAAT
 GTGGTGTAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGTTAATCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGTAT
 AGGAGCAGAAGAAGTCTGTTACCAGGACCCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGA
 GATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAGA
 CACACCTGCCAGGTGAAGGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGT
 TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGCTCCGGCTCAACACCTGATGAGG
 CTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGGGAA
 TGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCAAATCCCCAATAAGGAT
 AGGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATTGTAGATTTG

Lampiran 31. Kromatogram Kode Sampel Pasuruan 4



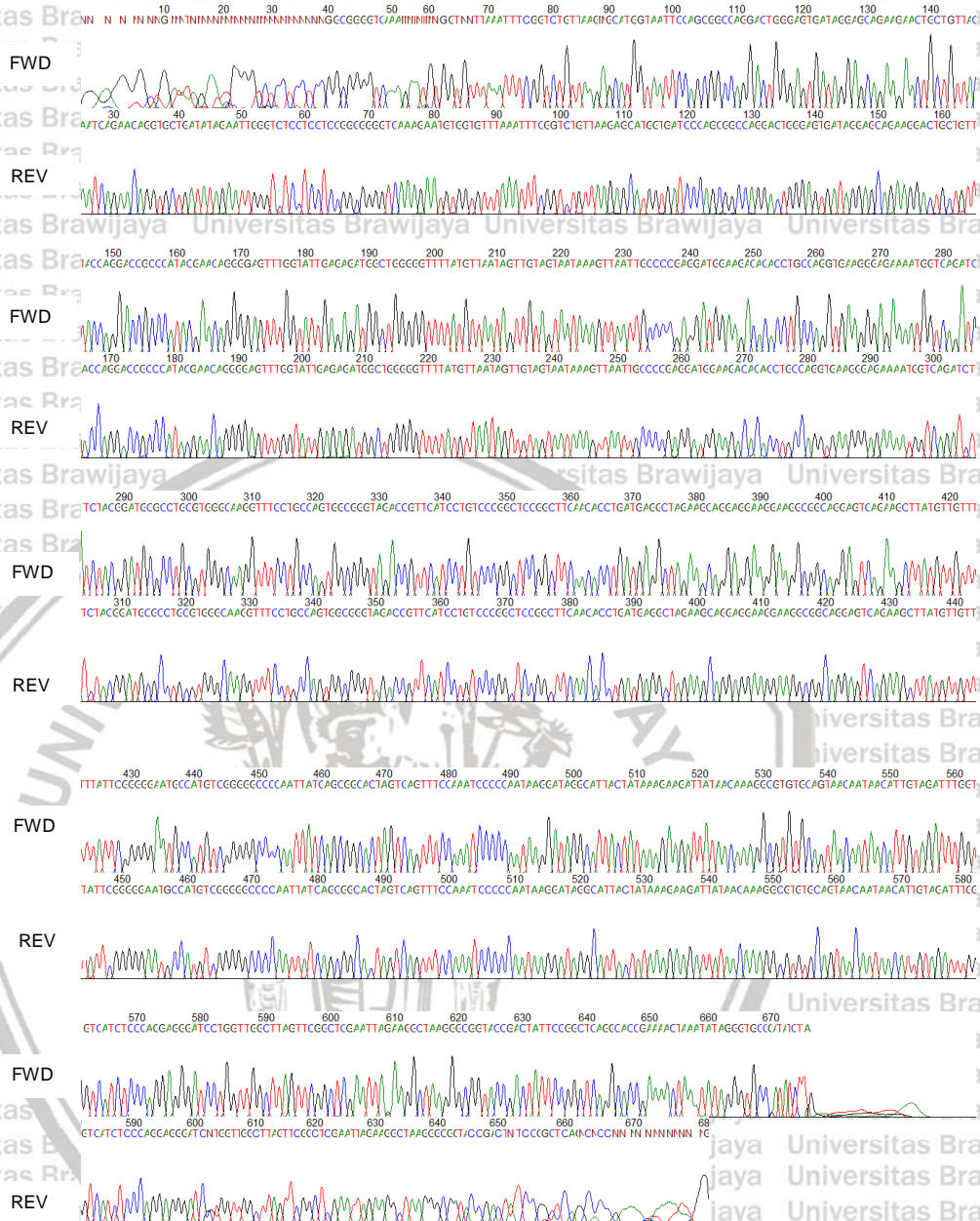
TGACCAAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGGTCAAAGAAT
 GTGGTGTAAATTCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGCCAGGACTGGGAGTGAT
 AGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCCATACGAACAGGGAGTTTGGTATTGAGA
 GATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGGAAGA
 CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAAGGT
 TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCCTGTCCCGCTCCGGCTCAACACCTGATGAGGC
 TAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGGGAAT
 GCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAATCCCCAATAAGGATA
 GGCATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGCGTGTGCAGTAACAATAACATTGTAGATTGG

Lampiran 32. Kromatogram Kode Sampel Pasuruan 5



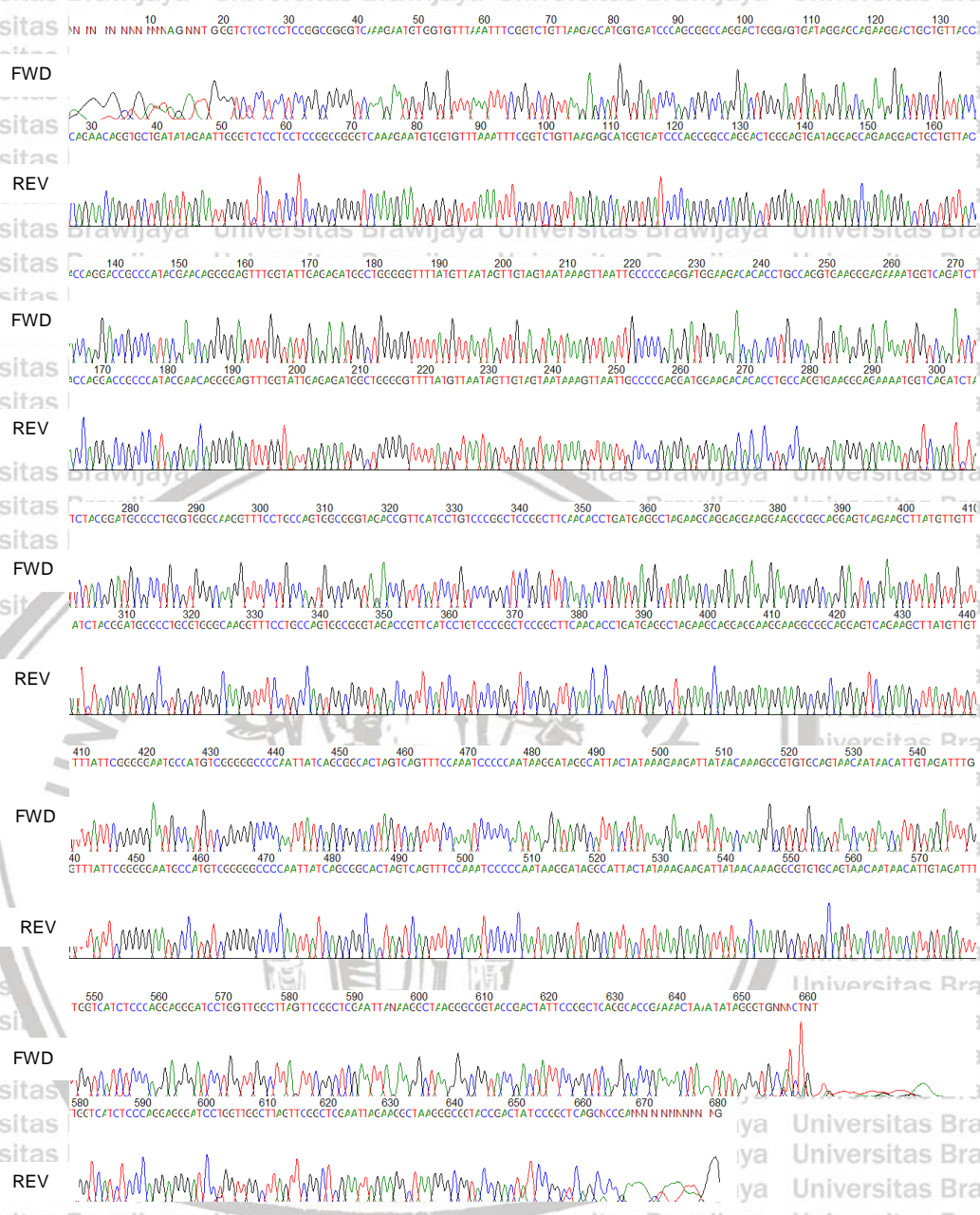
TGACCAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCTCCTCCGGCGGGTCAAAGAAT
 GTGGTGTTTAAATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTGATCCCAGCGGCCAGGACTGGGAGTGA
 TAGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCATACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAG
 AGATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGGAGGATGGAA
 GACACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGCAA
 GGTTTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCTGTCCCGGCTCCGGCTTAACACCTGATG
 AGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAAGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTATTCGGGG
 GAATGCCATGTCGGGGGCCCAATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCAAATCCCCAATAAG
 GATAGGCATTAATAAAGAAGATTATAACAAGGCGTGTGCAGTAACAATAACATTGTAGAT

Lampiran 33. Kromatogram Kode Sampel Lumajang 1



TGACCAAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCGCCTCCGGCGGGGTCAAAGAAT
 GTGGTGTAAATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAATTCAGCGCCAGGACTGGGAGTGAC
 AGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCACACGAACAGGGGAGTTTGGTATTGAGA
 GATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCCGAGGATGGAAGA
 CACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCTGCGTGGGCAAGGT
 TTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTTCCTGTCCCGGCTCCGGCTTAACACCTGATGAGG
 CTAGAAGCAGGAGGAAGGAGGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGGGGGAA
 TGCCATGTCGGGGGCCCGATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCAAATCCCCAATAAGGAT
 AGGTATTACTATAAAGAAGATTATAACAAAGCGTGTGCAGTAACAATAACATTGTAGATCTG

Lampiran 34. Kromatogram Kode Sampel Lumajang 2



```

TGACCAAAAAATCAGAACAGGTGCTGATATAGAATTGGGTCTCCGCCTCCGGCGGGGTCAAAGAA
TGTGGTGTTTAAATTTCCGGTCTGTTAAGAGCATGGTAATTCAGCGGCCAGGACTGGGAGTG
ACAGGAGCAGAAGGACTGCTGTTACCAGGACCGCCACACGAACAGGGGAGTTTGGTATTG
AGAGATGGCTGGGGGTTTTATGTTAATAGTTGTAGTAATAAAGTTAATTGCCCGAGGATGG
AAGACACACCTGCCAGGTGAAGGGAGAAAATGGTCAGATCTACGGATGCGCCTGCGTGGGC
AAGGTTTCTGCCAGTGGCGGGTAGACCGTTCATCTGTCCGGCTCCGGCTTCAACACCTGA
TGAGGCTAGAAGCAGGAGGAAGGAGGGCGGCAGGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATTCGG
GGGAATGCCATGTCGGGGGCCCGATTATCAGCGGCACTAGTCAGTTTCCAAATCCCCAAT

```


Lampiran 35. Kualitas Air Sungai Habitat *Nemacheilus fasciatus*

Parameter	Ponorogo	Blitar	Pasuruan	Lumajang
Tipe substrat	Batu berlumpur	Pasir berbatu	<i>Batu berlumpur</i>	<i>Pasir berbatu</i>
Arus (cm/dt)	16,75	31,24	28,50	40,16
DO (mg/l)	5,00	6,75	6,50	8,66
Suhu (°C)	29	27	25	19
pH	8,14	7,00	7,00	6,90
TOM (mg/l)	15,90	14,72	10,28	7,53

