

**ANALISIS IDENTIFIKASI DAN HUBUNGAN
KEKERABATAN IKAN PARI LONTAR (*Rhynchobatus
australiae*) MELALUI PENDEKATAN MARKA GENETIK
MOLEKULER DI PERAIRAN ACEH BARAT**

SKRIPSI

**ELSA ARJAYANDA
NIM. 18059040400001**



**JURUSAN ILMU KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS TEUKU UMAR
MEULABOH
2022**

**ANALISIS IDENTIFIKASI DAN HUBUNGAN
KEKERABATAN IKAN PARI LONTAR (*Rhynchobatus
australiae*) MELALUI PENDEKATAN MARKA GENETIK
MOLEKULER DI PERAIRAN ACEH BARAT**

SKRIPSI

**Diajukan untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana
Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Teuku Umar**

**ELSA ARJAYANDA
NIM. 18059040400001**



**JURUSAN ILMU KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS TEUKU UMAR
MEULABOH
2022**

LEMBARAN PENGESAHAN

Dengan ini kami menyatakan bahwa kami telah mengesahkan skripsi saudara:

NAMA : ELSA ARJAYANDA

NIM : 1805904040001

JUDUL : Analisis Identifikasi dan Hubungan Kekerabatan Ikan Pari Lontar (*Rhynchobatus australiae*) melalui Pendekatan Marka Genetik Molekuler di Perairan Aceh Barat

Yang diajukan memenuhi sebagai dari syarat-syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Ilmu Kelautan Pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Teuku Umar

Mengesahkan
Komisi Pembimbing

Samsul Bahri, S.Kel., M.Si
NIP. 19900201 201903 1 018

Mengetahui

Dekan Fakultas
Perikanan dan Ilmu Kelautan

Ketua Jurusan
Ilmu Kelautan

Prof. Dr. M. Ali Sarong, M.Si
NIP. 19590325 198603 1 003

Mohamad Gazali, S.Pi., M.Si
NIP. 19851205 205201903 1 008

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Elsa Arjayanda
NIM : 1805904040001
Jurusan : Ilmu Kelautan
Fakultas : Perikanan dan Ilmu Kelautan
Judul Skripsi : Analisis Identifikasi dan Hubungan Kekerabatan Ikan Pari Lontar (*Rhynchobatus australiae*) melalui Pendekatan Marka Genetik Molekuler di Perairan Aceh Barat

Dengan ini menyatakan sesungguhnya bahwa di dalam skripsi adalah hasil karya saya sendiri dan tidak terdapat bagian atau satu kesatuan yang utuh dari skripsi, buku atau bentuk lain yang saya kutip dari orang lain tanpa saya sebutkan sumbernya yang dapat dipandang sebagai tindakan penjiplakan. Sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat reproduksi karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain yang dijadikan seolah-olah karya asli saya sendiri. Apabila ternyata dalam skripsi saya terdapat bagian-bagian yang memenuhi unsur penjiplakan, maka saya menyatakan kesediaan untuk dibatalkan sebahagian atau seluruh hak gelar kesarjanaan saya.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Meulaboh, 15 Juli 2022

Elsa Arjayanda
NIM. 1805904040001

RIWAYAT HIDUP



Elsa Arjayanda, Lahir di Desa Trieng Meuduro Tunong, Kecamatan Sawang, Kabupaten Aceh Selatan, Provinsi Aceh pada tanggal 16 November 2000. Penulis adalah anak kedua dari dua bersaudara pasangan dari bapak M. Jamal (Alm) dan Ibu Armaini. Sekolah Dasar lulus pada Tahun 2012 di SDN Trieng Meuduro Tunong Kecamatan Sawang, melanjutkan SMP di SMP Sirajul Ibad Meukek pada Tahun 2015, Pendidikan SMA lulus pada Tahun 2018 di SMAN 1 Sawang. Setelah menyelesaikan pendidikan di SMA penulis mengikuti seleksi penerimaan mahasiswa baru di Universitas Teuku Umar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan lulus sebagai mahasiswa Ilmu Kelautan Universitas Teuku Umar pada tahun 2018. Selama menjadi mahasiswa sudah berbagai macam kegiatan yang diikuti, mulai dari kegiatan ilmiah dan organisasi. Kegiatan yang pernah diikuti diantaranya menjadi mentor P3AI (pendidikan pengembangan pembelajaran agama islam). Peserta KKN Kebangsaan-Bersama PTN Wilayah Barat di Jambi. Sekretaris BEM (Badan Eksekutif Mahasiswa) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Teuku. Pada tahun 2022 penulis melakukan penelitian dengan judul Analisis Identifikasi dan Hubungan Kekerabatan Ikan Pari Lontar (*Rhynchobatus australiae*) melalui Pendekatan Marka Genetik Molekuler di Perairan Aceh Barat sebagai skripsi untuk memperoleh Gelar Sarjana pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Teuku Umar.

ANALISIS IDENTIFIKASI DAN HUBUNGAN KEKERABATAN IKAN PARI LONTAR (*Rhynchobatus australiae*) MELALUI PENDEKATAN MARKA GENETIK MOLEKULER DI PERAIRAN ACEH BARAT

Elsa Arjayanda¹, Samsul Bahri¹

¹Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Teuku Umar, Meulaboh

ABSTRAK

Ikan pari merupakan ikan yang termasuk ke dalam sub kelas *Elasmobranchii*, salah satunya adalah ikan pari *Rhynchobatus australiae*. Penelitian ini bertujuan menganalisis pari *R. australiae* melalui pendekatan identifikasi marka molekuler serta menganalisis hubungan kekerabatan antar spesies *R. australiae* dari hasil penelitian dengan *R. australiae* lain pada pusat data *GenBank* berdasarkan pendekatan filogenetik. Pengambilan sampel ikan *R. australiae* dilakukan di Pangkalan Pendaratan Ikan (PPI) Ujong Baroh, Aceh Barat. Sampel diambil bagian daging sirip punggung dari 2 individu *R. australiae*. Analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Genetik dan Biodiversitas Akuatik, Fakultas Kelautan dan Perikanan, Universitas Syiah Kuala. Analisis molekuler dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu, proses ekstraksi DNA menggunakan metode modifikasi CTAB (*Cetyltrimethylammonium Bromide*) amplifikasi DNA dilakukan melalui teknik PCR. Produk PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 2%. Hasil analisis menggunakan BLAST menyatakan bahwa spesies merupakan *R. australiae*. Nilai *Query Cover* sebesar 93% serta nilai *Per Ident* sebesar 99,70% - 99,85% yang menghasilkan panjang *base pair* 629 untuk sampel pertama dan 630 untuk sampel kedua. Komposisi nukleotida *R. australiae* memiliki rata - rata T = 30,8%, C = 24,9%, A = 27,4% dan G = 16,9%. Hubungan kekerabatan berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik menghasilkan 4 *clade* dan menyatakan bahwa hubungan kekerabatan sampel *R. australiae* Meulaboh 1 dan 2 mempunyai kedekatan dengan *R. australiae* dari India1, India2, India3, Malaysia1, Indonesia3 dan Indonesia5. Jarak genetik antar populasi nilai paling rendah ditemukan antara populasi *R. australiae* Meulaboh dengan populasi *R. australiae* India yang mempunyai nilai 0,000. Jarak genetik yang terjauh didapatkan pada populasi *R. australiae* Meulaboh dengan populasi *R. australiae* Australia yaitu 0,004.

Kata kunci: Aceh Barat, Filogenetik, Identifikasi Molekuler, *R. australiae*

IDENTIFICATION AND RELATIONSHIP ANALYSIS OF LONTAR FISH (*Rhynchobatus australiae*) THROUGH MOLECULAR GENETIC MARKETS APPROACH IN WEST ACEH WATERS

Elsa Arjayanda¹, Samsul Bahri¹

¹ *Department of Marine Sciences, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Teuku Umar University, Meulaboh*

ABSTRACT

Stingrays are fish that belong to the sub-class Elasmobranchi, one of them is *Rhynchobatus australiae*. This research aims to analyze *R. australiae* through the identification of molecular markers and analyze the relationship between *R. australiae* species to other results of *R. australiae* in the GenBank data center based on a phylogenetic approach. The sampling of *R. australiae* were carried out at Ujong Baroh Landing Base, West Aceh. Samples were taken from the dorsal fin flesh of 2 individuals of *R. australiae*. Molecular analysis was carried out at the Genetics and Aquatic Biodiversity Laboratory, Faculty of Marine science and Fisheries, Syiah Kuala University. Molecular analysis was carried out through stages, which was the DNA extraction process used the modified CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) DNA amplification were carried out through the PCR technique. The PCR product was electrophoresed using 2% agarose gel. The results of the analysis using BLAST stated that the species was *R. australiae*. The Query Cover value is 93% and the Per Ident value is 99.70% - 99.85% which produces a base pair length of 629 for the first sample and 630 for the second sample. The nucleotide composition of *R. australiae* had an average of T = 30.8%, C = 24.9%, A = 27.4% and G = 16.9%. The kinship relationship based on the results of the phylogenetic tree reconstruction resulted in 4 clades and stated that the kinship samples of *R. australiae* Meulaboh 1 and 2 were close to *R. australiae* from India1, India2, India3, Malaysia1, Indonesia3 and Indonesia5. The lowest genetic distance between populations were found between the population of *R. australiae* Meulaboh and the population of *R. australiae* India which had a value of 0.000. The farthest genetic distance was found in the population of *R. australiae* Meulaboh with the population of *R. australiae* Australia which was 0.004.

Keywords: Aceh Barat, phylogenetic, Molecular Identification, *R. australiae*

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **“Analisis Identifikasi dan Hubungan Kekerabatan Ikan Pari Lontar (*Rhynchobatus australiae*) melalui Pendekatan Marka Genetik Molekuler di Perairan Aceh Barat”**. Skripsi disusun dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada prodi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Teuku Umar.

Proses penyelesaian penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan serta bimbingan dan pengarahan berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu, terutama:

1. Kedua orang tua Bapak M. Jamal (Alm) dan Ibu Armaini serta kakak kandung Mutia Arjayanda yang selalu memberikan dukungan baik moril maupun materil terhadap penulis.
2. Bapak Samsul Bahri, S.Kel., M.Si selaku dosen pembimbing yang telah memberikan saran, arahan dan masukan dalam menyelesaikan skripsi.
3. Bapak Prof. Dr. M. Ali Sarong, M.Si selaku penguji yang telah memberikan kritik dan saran untuk menyelesaikan skripsi.
4. Bapak Mohamad Gazali, S.Pi., M.Si selaku dosen penguji serta dosen pembimbing akademik yang sudah sangat banyak memberikan arahan serta dukungan kepada penulis.

5. Enumerator *Wildlife Conservation Society* Bapak Romi Andrian, S.Pi, tim penelitian hiu pari serta tim lab biogen Universitas Syiah Kuala yang telah membantu dalam penelitian dan memberikan masukan serta dukungan untuk penulis.

Semoga bantuan, kebaikan, dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis selama penyelesaian skripsi ini mendapat balasan yang tiada terkira dari Allah SWT.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan sangat jauh dari kata sempurna. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Meulaboh, 15 Juli 2022

Elsa Arjayanda

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	2
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Deskripsi Ikan Pari Lontar (<i>Rhynchobatus australiae</i>)	4
2.2. Habitat dan Sebaran	5
2.3. DNA (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)	5
2.4. Pohon Filogenetik	6
2.5. Penelitian Terdahulu	7
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1. Waktu dan Tempat.....	9
3.2. Alat dan Bahan.....	9
3.3. Bagan Alir Penelitian.....	11
3.4. Prosedur Penelitian	12
3.4.1. Pengambilan Sampel.....	12
3.4.2. Preservasi Sampel	12
3.4.3. Ekstraksi DNA	13
3.4.4. Amplifikasi DNA	14
3.4.5. Elektroforesis	15
3.4.6. Translasi DNA	16
3.5. Analisa Data.....	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Identifikasi <i>R.australiae</i>	18
4.1.1. Identifikasi <i>R.australiae</i> melalui BLAST	18
4.1.2. Komposisi Nukleotida.....	20
4.2. Hubungan Kekerabatan.....	22
4.2.1. Pohon Filogenetik	22
4.2.2. Jarak Genetik Antar-Intra Populasi.....	24
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	27

5.2. Saran	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN.....	32

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat serta kegunaannya.....	9
2. Bahan serta kegunaannya	10
3. Primer yang digunakan pada penelitian.....	14
4. Hasil analisis BLAST sampel <i>R. australiae</i>	19
5. Persentase komposisi nukleotida yang diteliti dibandingkan dengan <i>database</i> dari <i>GenBank</i> panjang fragmen 629 dan 630.....	21
6. Jarak genetik antar populasi.....	26
7. Jarak genetik intra populasi	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi ikan <i>R. australiae</i>	4
2. Peta lokasi pelaksanaan penelitian di PPI Ujong Baroh.....	9
3. Bagan alir tahapan pelaksanaan penelitian	11
4. Visualisasi produk PCR hasil elektroforesis sampel <i>R. australiae</i> dengan gel agarosa 2,0%	18
5. Pohon Filogenetik <i>R. australiae</i> dengan menggunakan metode <i>Neighbor Joining 2</i> - Parameter Kimura model 1000 <i>bootstrap</i>	22

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Ikan pari merupakan ikan yang termasuk kedalam sub kelas *Elasmobranchii*, yaitu ikan yang bertulang rawan. Memiliki keragaman sangat banyak, di perairan Indonesia terdapat 101 jenis pari (Sadili 2015). Salah satunya adalah ikan pari *Rhynchobatus australiae*. Ikan pari *R. australiae* ini banyak diminati karena sirip punggung dan ekor memiliki nilai jual yang tinggi dalam perdagangan sirip hiu global (Giles *et al.* 2016). Pemanfaatan ikan pari jika tidak diimbangi dengan upaya konservasi dapat menyebabkan penurunan populasi dan spesies yang cepat dan membutuhkan waktu lama untuk pulih.

Berdasarkan data *Red List International Union for Conservation of Nature* (IUCN), ikan pari *R. australiae* memiliki status konservasi *Critically Endangered* (CR) atau sangat terancam yang disebabkan oleh pemanfaatan dan eksploitasi secara besar-besaran terutama dibagian daging, kulit serta sirip sehingga menyebabkan populasinya terus menurun. Ikan pari *R. australiae* juga masuk ke dalam appendix II CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) pada Agustus 2019, yang berarti perdagangan antar negara harus dikelola agar pemanfaatannya tidak mengancam kelestariannya (Rahman *et al.* 2017). Rata-rata produksi hiu dan pari di Indonesia sebesar 106.034 ton/tahun atau sekitar 13% dari total produksi hiu dan pari di dunia pada tahun 2000 hingga 2011 (Dent dan Clarke 2015).

Identifikasi makhluk hidup secara konvensional awalnya dilakukan menggunakan membandingkan aspek morfologi dan anatomi. Beberapa informasi

mengenai DNA pari, saat ini telah berkembang pendekatan ke arah molekuler, yang memberikan alternatif cepat dan tepat mengungkapkan spesies. Secara umum penggunaan teknik molekuler untuk tujuan identifikasi suatu organisme mempunyai keunggulan seperti lebih akurat, lebih cepat (Setiati *et al.* 2018). Filogenetik adalah suatu teknik untuk mengklasifikasikan suatu spesies dengan spesies lainnya, yang digunakan untuk mengetahui hubungan antar spesies. Hingga saat ini, studi filogenetik pada *R. australiae* masih terbatas (Zain dan Mutalib 2018). Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan spesies ikan *R. australiae* dari hasil penelitian dengan *R. australiae* lain yang diambil pada pusat data *GenBank*.

Perairan Aceh Barat merupakan salah satu wilayah yang berhubungan langsung dengan Samudera Hindia. *R. australiae* dapat ditemukan di Samudera Hindia (Lesmana *et al.* 2018). Informasi mengenai kajian Analisis Identifikasi dan Hubungan Kekerabatan *R. australiae* melalui Pendekatan Marka Genetik Molekuler belum ada di perairan Aceh Barat. Oleh sebab itu, penulis tertarik untuk mengkaji mengenai “Analisis Identifikasi dan Hubungan Kekerabatan Ikan Pari Lontar (*Rhynchobatus australiae*) melalui Pendekatan Marka Genetik Molekuler di Perairan Aceh Barat”.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan maka dapat dirumuskan masalah penelitian :

1. Bagaimanakah analisis pari *R. australiae* melalui pendekatan identifikasi marka molekuler ?

2. Bagaimanakah analisis hubungan kekerabatan antar spesies ikan *R. australiae* dari hasil penelitian dengan *R. australiae* lain pada pusat data *GenBank* ?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian analisis filogenetik ikan pari lontar (*R. australiae*) melalui pendekatan marka genetik molekuler adalah:

1. Mengalisis pari *R. australiae* melalui pendekatan identifikasi marka molekuler.
2. Menganalisis hubungan kekerabatan antar spesies *R. australiae* dari hasil penelitian dengan *R. australiae* lain pada pusat data *GenBank* berdasarkan pendekatan filogenetik.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dalam penelitian analisis filogenetik ikan pari lontar (*R. australiae*) melalui pendekatan marka genetik molekuler adalah:

Memberikan informasi awal terhadap stakeholder mengenai hubungan kekerabatan antar spesies ikan *R. australiae* dari hasil penelitian dengan *R. australiae* lain pada pusat data *GenBank*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Deskripsi Ikan Pari Lontar (*Rhynchobatus australiae*)

Rhynchobatus australiae memiliki karakteristik yang unik yaitu bentuk tubuh menyerupai dengan ikan hiu dan ikan pari. Namun, karakteristik yang membedakan antara hiu dan pari umumnya terletak di insangnya. Letak insang pari selalu berada di bawah (*ventral*), letak insang hiu selalu berada pada bagian sisi kiri serta kanan tubuhnya (*lateral*). *R. australiae* memiliki sirip ekor bagian bawah yang jelas, bentuk moncong seperti botol yaitu semakin mengecil ke bagian ujungnya, kemudian juga terdapat bintik-bintik putih pada tubuh dengan dua bintik hitam di sirip dada. Insang terletak di bagian bawah tubuhnya dekat dengan mulut.



Gambar 1. Morfologi ikan *R. australiae*

Klasifikasi *R. australiae* berdasarkan taksonominya adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Chondrichthyes
Ordo : Rhinopristiformes

Famili : Rhinidae
Genus : *Rhynchobatus*
Spesies : *R. australiae*

2.2. Habitat dan Sebaran

Rhynchobatus australiae dapat ditemukan pada dasar perairan yang bersubstrat lunak, kemudian juga dapat ditemukan di dekat terumbu karang. *R. australiae* merupakan hewan vivipar yaitu ikan yang berkembang biak dengan cara melahirkan. *R. australiae* memiliki jumlah anak 7-19 ekor dalam satu kali reproduksi. Makanan utamanya terdiri dari krustasea dan moluska. *R. australiae* dapat ditemukan di perairan Barat samudra Pasifik, termasuk wilayah Indonesia, Thailand, Filipina dan Australia (Compagno dan Last 2008).

2.3. DNA (*Deoxyribonucleic Acid*)

DNA merupakan materi genetik yang diturunkan serta persenyawaan kimia terpenting bagi makhluk hidup. Menurut Madduppa *et al.* (2021) DNA mitokondria (mtDNA) merupakan materi genetik yang diturunkan secara maternal yang dapat digunakan sebagai penanda genetik. Gen pada DNA mitokondria yang digunakan untuk identifikasi adalah COI (*Cytochrome c Oxidase Subunit 1*). Hubungan kekerabatan antara 2 individu atau lebih dapat diukur berdasarkan kesamaan karakteristik atau bisa disebutkan bahwa karakter yang berbeda diakibatkan oleh adanya perbedaan susunan genetik.

Hubungan filogenetik suatu spesies dapat ditentukan berdasarkan sekuen DNA mitokondria (Khan 2017). Penggunaan DNA mitokondria sebagai penanda genetik dalam studi variabilitas genetik intraspesifik (*Interpopulasi*) telah

memberikan informasi kualitatif maupun kuantitatif (Solihin 1994). Identifikasi molekuler spesies sangat umum dilakukan melalui DNA organisme terkait. Namun, dalam beberapa tahun terakhir penggunaan mtDNA sebagai alat identifikasi molekuler telah menjadi populer. mtDNA mulai dikenal efektifitasnya dalam identifikasi molekuler pada akhir 1970-an dan 1980-an (Muthiadin *et al.* 2018).

2.4. Pohon Filogenetik

Pohon filogenetik adalah deskripsi klasifikasi yang menunjukkan hubungan kekerabatan suatu spesies dengan nenek moyang dan hubungan evolusioner antara organisme. Filogenetik merupakan metode yang paling sering digunakan dalam sistematika untuk memahami keanekaragaman makhluk hidup melalui rekonstruksi hubungan filogenetik (Twindiko *et al.* 2013).

Di dalam filogenetik, sekelompok organisme yang memiliki banyak kesamaan ciri atau karakter dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat, dan dianggap berasal dari nenek moyang yang sama. Pohon filogenetik adalah pendekatan logis untuk menunjukkan hubungan evolusi antara organisme (Schadt *et al.* 1998). Salah satu tujuan penyusunan filogenetik adalah untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan memperkirakan perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya (Li *et al.* 2000).

Filogenetik menurut Campbell *et al.* (2003) dibagi dalam beberapa kelompok yaitu:

1. Monofiletik: jika satu nenek moyang hanya dapat menghasilkan semua spesies turunan dalam takson itu dan bukan spesies dalam takson lain.

2. Polifiletik: jika anggota diturunkan dari dua atau lebih bentuk leluhur yang tidak sama untuk semua anggotanya.
3. Parafiletik: jika takson itu tidak termasuk spesies yang memiliki nenek moyang yang sama menurunkan spesies yang termasuk dalam takson tersebut.

2.5. Penelitian Terdahulu

Penelitian tentang ikan *R. australiae* melalui pendekatan marka genetik molekuler telah dilakukan sebelumnya oleh Zain dan Mutalib (2018), dimana penelitian ini melihat analisis filogenetik molekuler *white-spotted guitarfish* (*R. australiae*) yang dikumpulkan dari pasar ikan lokal Malaysia, bertujuan untuk menentukan filogenetik *R. australiae* menggunakan COI, yang menggunakan 9 sampel *R. australiae* dan 14 sampel dari family hiu dan pari lainnya dengan menggunakan primer *FishF2*, *FishR2*, *VF2* dan *Innova*. Analisis data menggunakan software MEGA dan PAUP. Hasil yang didapatkan adalah *R. australiae* lebih dekat dengan *Sphyrnidae* dan *Carcharhinidae* dari pada dengan pari *Dasyatidae*.

Keragaman genetik hiu barong (*Rhina ancylostoma*) dan potensi kepunahan di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis kekerabatan genetik berdasarkan sekuens gen COI. Analisis filogenetik menggunakan mega X, konstruksi filogenetik menggunakan metode *Maximum Likelihood* dengan pengulangan 1000 replikasi *bootstrap*, menggunakan Kimura 2 Parameter model. Hasil yang diperoleh yaitu *R. ancylostoma* dari Indonesia memiliki keragaman *haplotype* rendah pada satu *haplotype* yang sama dan memiliki jarak genetik 1,24% dengan India dan 0,16% dengan Papua New Guinea (Triswiyana 2021).

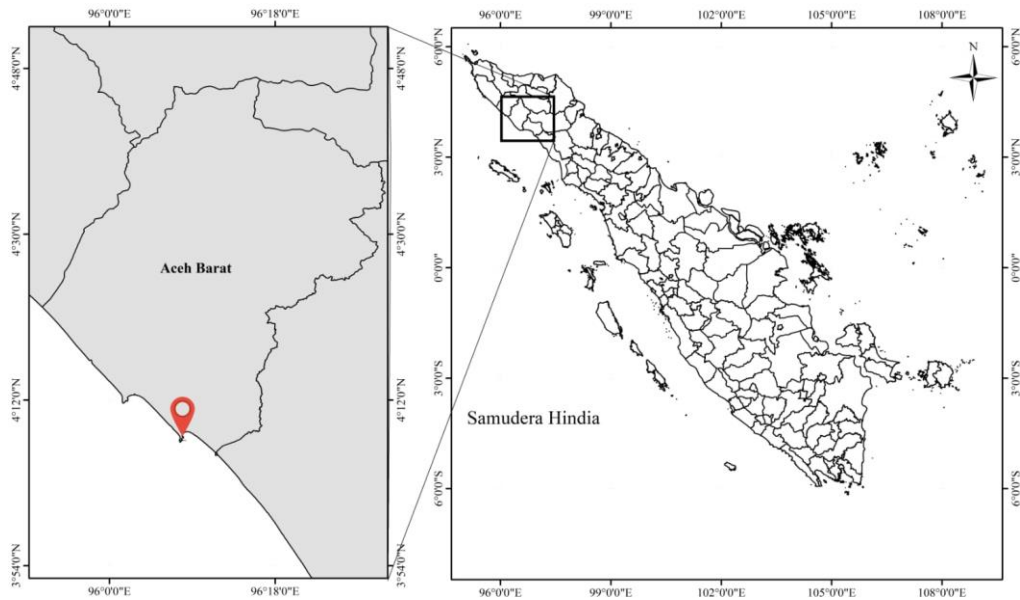
Identifikasi molekuler dan status konservasi ikan pari hiu (*Rhinidae*) yang didaratkan di pulau Bangka, yang bertujuan melakukan identifikasi pari hiu dengan metode molekuler untuk mengetahui status konservasi dan perdagangan pari hiu yang didaratkan di Pulau Bangka. Identifikasi molekuler menggunakan mtDNA gen COI. Primer yang digunakan adalah *FishF2* dan *FishR2*. Kemudian hasilnya dicocokkan dengan menggunakan BLAST. Analisis filogenetik sampel menggunakan MEGA7, dengan metode *Neighbor-Joining*. Hasil menyatakan bahwa sampel yang digunakan teridentifikasi sebagai spesies *Rhina ancylostoma* dengan kemiripan 100%. Status konservasi berdasarkan IUCN termasuk dalam kategori *critically endangered*. Status perdagangan CITES termasuk kedalam tingkatan Appendix II. Filogenetik dari semua sampel yang didaratkan di Pulau Bangka memiliki urutan sekuen yang identik dan beberapa tergolong dalam *cluster* yang sama (Aisyah dan Farhaby 2021).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober - Desember 2021. Pengambilan sampel ikan *R. australiae* dilakukan di Pangkalan Pendaratan Ikan (PPI) Ujong Baroh, Aceh Barat. Analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Genetik dan Biodiversitas Akuatik, Fakultas Kelautan dan Perikanan, Universitas Syiah Kuala.



Gambar 2. Peta lokasi pelaksanaan penelitian di PPI Ujong Baroh

3.2. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Alat serta kegunaannya

No	Alat	Kegunaan
1.	Kamera	Untuk mengambil dokumentasi
2.	Alat Tulis	Untuk mencatat hal yang penting
3.	<i>Tube</i>	Untuk penyimpanan sampel
4.	<i>Cutter</i>	Untuk pengambilan sampel

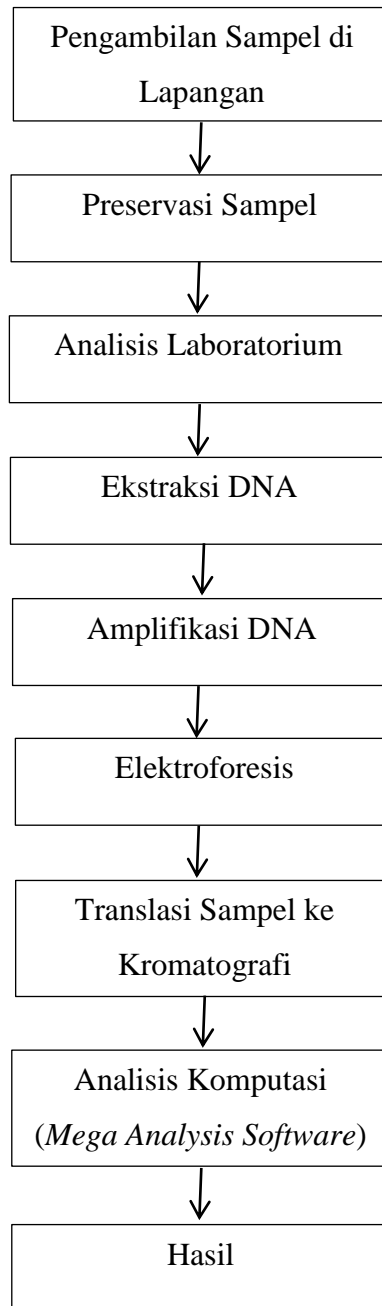
5.	Mesin Vortex	Untuk menyeragamkan cairan dalam volume kecil
6.	<i>Centrifuge</i>	Untuk memisahkan organel berdasarkan massa jenisnya melalui pengendapan
7.	Mesin PCR	Memanjangkan DNA
8.	Inkubator	Tempat isolasi sampel ekstraksi
9.	<i>Gloves</i>	Menjaga terkontaminasinya sampel
10.	Gelas kimia	Wadah alat sterilisasi
11.	Timbangan	Menimbang gel agarosa
12.	Alat elektroforesis	Memisahkan senyawa kimia dengan prinsip laju pergerakan molekul dalam aliran listrik
13.	Kulkas pembeku	Wadah penyimpanan sampel dan <i>reagen</i>
14.	<i>Cryobox</i>	Wadah koleksi sampel
15.	Form PCR	Panduan kerja PCR
16.	Form ekstraksi	Panduan kerja ekstraksi
17.	Cetakan agarosa	Mencetak agarosa
18.	<i>Microwave</i>	Pemanas gel agarosa
19.	Transiluminator UV	Melihat DNA
20.	Jas laboratorium	Perlindungan dari cairan kimia

Tabel 2. Bahan serta kegunaannya

No	Bahan	Kegunaan
1.	Etanol 96%	Untuk pengawetan
2.	ddH ₂ O	Pelarut DNA
3.	TAE (1x) <i>Buffer</i>	Larutan penyangga
4.	Bubuk gel agarosa	Matrix migrasi DNA
5.	<i>Gel doc</i>	Memvisualisasi hasil elektroforesis
6.	Sampel <i>R.australiae</i>	Sampel yang diteliti
7.	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> (CTAB)	Mendegradasi dinding sel, denaturasi protein, memisahkan karbohidrat, merusak membran dan melarutkan DNA
8.	<i>proteinase K</i>	Melisiskan membrane pada sel, mendegradasi protein maupun rantai polipeptida sel
9.	<i>Chloroform- Isoamyl Alcohol</i> (CIA)	Komponen polisakarida di dalam buffer ekstraksi yang mengkontaminasi DNA
10.	Etanol (absolut EtOH)	Membuat DNA naik dan melayang-layang di permukaan
11.	Pewarna gel agarosa asam nukleat	Pewarna pita DNA
12.	NaCl 3 M	Mencuci endapan DNA agar tidak terkontaminasi
13.	Alkohol 70%	Sebagai bahan untuk sterilisasi
14.	<i>Master mix red 1000 reaction</i>	Sebagai campuran larutan DNA Taq, dNTP dan <i>Buffer</i> dalam reaksi amplifikasi DNA target

3.3. Bagan Alir Penelitian

Bagan alir yang dilakukan pada penelitian ini dapat ditampilkan pada gambar 3.



Gambar 3. Bagan alir tahapan pelaksanaan penelitian

3.4. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui dua tahapan yaitu tahapan pengambilan sampel di lapangan dan analisis DNA di laboratorium. Adapun tahapan kerja yang dilakukan tersebut sebagai berikut:

3.4.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di perairan samudera Hindia wilayah Aceh Barat tepatnya sampel di ambil di PPI Ujong Baroh. Pengambilan sampel dengan cara mengambil 1 cm daging bagian sirip punggung dari 2 individu *R. australiae*. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil sebagian kecil organ tubuh ikan pari (Aisyah dan Farhaby 2021). Sampel diambil dengan menggunakan *cutter*, kemudian dilakukan preservasi sampel.

3.4.2. Preservasi Sampel

Preservasi merupakan suatu proses yang dilakukan untuk menjaga kesegaran dan keberhasilan dari sampel, serta meminimalisir resiko terjadinya kontaminasi dari organisme lain terhadap sampel. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan dalam tahapan preservasi sampel; gunting, pinset, tisu, cawan petri, bunsen, etanol 96%, serta alkohol 70% yang digunakan untuk sterilisasi. Tahapan pertama yang dilakukan adalah disterilkan semua alat yang akan dipakai. Kemudian dituangkan sampel ke dalam cawan petri, dicincang sampel menjadi 9 bagian menggunakan penjepit dan gunting. Selanjutnya sampel dimasukkan kedalam 3 *tube* baru yang berukuran 1,5 ml setiap 1 *tube* terdapat 3 bagian potongan sampel, berfungsi untuk koleksi maupun untuk proses dilakukan tahapan ekstraksi. Selanjutnya ditambahkan etanol 96% untuk pengawetan. Larutan diganti ketika larutan etanol mengalami perubahan warna (Bahri *et al.*

2017). Diberikan label keterangan disetiap *tube*, kemudian disterilkan kembali semua alat yang telah digunakan. Sampel yang telah dipreservasi selanjutnya disimpan untuk digunakan pada tahapan ekstraksi.

3.4.3. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan suatu teknik untuk mengeluarkan DNA genom dari organel sel baik itu DNA mitokondria maupun DNA kloroplas, yang berfungsi untuk memisahkan DNA dari zat-zat yang tidak diinginkan. DNA dapat diekstraksi dari berbagai bentuk sampel, baik itu yang masih segar, sudah pernah dikeringkan maupun disimpan dalam alkohol (Pharmawati 2009).

Proses ekstraksi DNA menggunakan metode modifikasi CTAB (Grewe *et al.* 1993) sehingga didapatkan DNA genom. Metode modifikasi CTAB dapat menghasilkan nilai kemurnian DNA yang baik dengan konsentrasi DNA tinggi (Ariyanti dan Sianturi 2019). Tahapan ekstraksi *modified Cetyltrimethylammonium Bromide* (CTAB), yaitu disiapkan pinset, gunting, bunsen, gelas beaker, alkohol 70%, etanol 96%, *tube* ekstraksi, CTAB dan *proteinase K*. *Tube* ekstraksi 1,5 mm yang telah steril disiapkan dan diberi label. Dinyalakan bunsen terlebih dahulu, kemudian sterilkan pinset dan gunting dengan cara direndam ke dalam alkohol 70% yang telah dituang ke dalam gelas beaker. Selanjutnya, dipanaskan ujung pinset dan gunting di atas bunsen, kemudian direndam dan dibakar lagi.

Sampel yang sudah dipreservasi diambil sebesar 2 mm, kemudian dimasukkan ke dalam *tube* yang sudah diberi label dan digunting hingga halus. Selanjutnya ditambahkan 700 μL 2x *buffer* CTAB dan 3 μL *proteinase K*, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 60°C selama 4 jam. Selanjutnya

ditambahkan 700 μL *Chloroform - Isoamyl Alcohol* dan kocok kuat - kuat dengan menggunakan tangan selama 15 detik. Disentrifugasi pada 11000 rpm selama 15 menit. Setelah itu dipindahkan 560 μL supernatan atas ke dalam *tube* 1,5 ml baru (yang telah dibuat label sesuai *tube* awal). Kemudian ditambahkan 1 volume EtOH absolut dan diaduk secara rata dengan membalikkan beberapa kali. Inkubasi sampel pada suhu - 20°C selama 1 jam (dapat langsung melanjutkan ke langkah berikutnya tanpa inkubasi pada suhu - 20°C / simpan pada suhu - 20°C selama semalaman dan lanjutkan ke langkah berikutnya keesokan harinya).

Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 1300 rpm selama 15 menit dan setelah itu dibuang supernatannya dan biarkan peletnya. Kemudian ditambahkan 600 μL 70% EtOH dan 25 μL 3 M NaCl dan dibalikan larutan beberapa kali. Kemudian disentrifugasi kembali pada 13000 rpm selama 15 menit. Lalu dibuang EtOH dan ditandai terlebih dahulu pelet dan dikeringkan pelet selama 4 jam. Setelah pelet kering maka dilarutkan kembali pelet dengan ddH₂O sebanyak 20 - 100 μL . Kemudian dilanjutkan ke tahapan selanjutnya yaitu amplifikasi DNA.

3.4.4. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA merupakan proses melipatgandakan sekuens DNA spesifik menjadi ribuan hingga jutaan sekuens DNA. Amplifikasi DNA menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan sepasang primer *FishF2* dan *FishR2*.

Tabel 3. Primer yang digunakan pada penelitian

Nama primer	Kode sekuen	Referensi
<i>FishF2</i>	5'TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC3'	(Ward <i>et al.</i> 2005)
<i>FishR2</i>	5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3'	(Ward <i>et al.</i> 2005)

Reagen yang dibutuhkan dalam tahapan PCR adalah sebagai berikut: ddH₂O sebanyak 8,5 µL, *Red master mix* 12,5 µL, primer COI *FishF2* 1 µL, primer COI *FishR2* 1 µL serta template DNA hasil ekstraksi digunakan sebanyak 2 µL. Kontrol positif adalah bahan yang telah dicampur kemudian ditambahkan template DNA *R. australiae*, kontrol negatif adalah semua bahan yang dicampur tanpa adanya DNA. Kemudian dilakukan vortex selama 15 detik dan dilanjutkan tahapan sentrifugasi 15 detik. Setelah itu sampel dimasukkan ke alat PCR dengan pengaturan denaturasi awal 94 °C selama 3 menit, diikuti dengan 35 siklus berikut masing - masing denaturasi 94 °C selama 30 detik, dengan menggunakan suhu *annealing* 51°C 30 detik, dilanjutkan dengan ekstensi pada 72 °C selama 1 menit, kemudian diakhiri dengan satu siklus ekstensi akhir 72°C selama 10 menit (Kumar *et al.* 2015).

Denaturasi awal berfungsi untuk meyakinkan bahwa molekul DNA yang ingin dilipatgandakan jumlahnya benar-benar terdenaturasi. Denaturasi berfungsi sebagai pemisahan untai DNA ganda menjadi DNA tunggal. *Annealing* berfungsi untuk penempelan primer pada untai DNA tunggal, ekstensi yaitu proses pemanjangan DNA. Kemudian proses terakhir ekstensi akhir berfungsi untuk pematangan. Proses pelaksanaan PRC ini menggunakan mesin PCR *Labcycler*.

3.4.5. Elektroforesis

Elektroforesis adalah metode pemisahan senyawa kimia yang berdasarkan laju pergerakan molekul dalam arus listrik (Madduppa 2014). Proses elektroforesis dilakukan bertujuan untuk melihat komponen DNA yang terdapat pada sampel *R.australiae* dari hasil PCR. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa 2,0%. Sebelum melakukan tahapan elektroforesis maka

harus dilakukan pembuatan gel agarosa terlebih dahulu. Adapun tahapan - tahapan yang dilakukan adalah: ditimbang gel agarosa seberat 1.2 g dengan menggunakan timbangan digital, selanjutnya bubuk dimasukkan ke dalam gelas beker dan dimasukkan 60 ml TAE (*Tris Acetic Acid EDTA*) lalu diaduk sebentar, kemudian dipanaskan dalam *microwave* selama 3 menit. Ditambahkan *GelRed* sebanyak 2 μL diaduk rata yang berfungsi untuk memancarkan pita DNA pada saat penyinaran *Ultraviolet*. Kemudian dituang ke dalam baki gel agarosa yang berfungsi untuk mencetak gel agarosa sebagai tempat DNA sampel yang ditempatkan dalam sumur - sumur dan dimasukkan sisir elektroforesis di salah satu ujung baki gel agarosa yang digunakan untuk membuat sumuran, kemudian ditunggu selama 40 menit untuk proses pengerasan gel.

Tahapan elektroforesis selanjutnya adalah gel yang telah keras dicabut sisirnya lalu gel dipindahkan dalam cetakan mesin *running*. Dimasukkan TAE ke dalam bak elektroforesis sampai semua gel terendam. Kemudian dimasukkan sebanyak 2 μL DNA hasil dari PCR ke dalam sumur gel agarosa, dan dimasukkan 2 μL kontrol negatif. Cetakan ditutup dan mesin dihidupkan dengan pengaturan tegangan sebesar 100 volt, arus listrik sebesar 500 mA, waktu selama 30 menit, *running* dan ditunggu hingga proses selesai. Jika sudah selesai *running* maka gel dikeluarkan dan dipindahkan ke alat UV *transilluminator*, mesin ditutup kemudian dinyalakan untuk memvisualisasikan data. Selanjutnya pita - pita DNA yang tervisualisasi diamati.

3.4.6. Translasi DNA

Translasi DNA merupakan suatu proses penerjemahan basa nukleotida yang terdapat dalam DNA. Proses ini merupakan tahapan dimana DNA yang telah

dianalisis laboratorium ditranslasikan ke dalam data visual dalam bentuk kromatogram. Produk PCR dengan hasil elektroforesis yang bagus dikirim ke *First Base* Laboratorium, Malaysia untuk dilakukan translasi DNA (Madduppa *et al.* 2019)

3.5. Analisa Data

Hasil translasi berupa file ABI yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan aplikasi MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) 6.0. Urutan basa yang sudah diedit dan di sejajarkan dengan ClustalW, kemudian dicocokkan kemiripannya di web NCBI (*National Center For Biotechnology Informasi*) dengan cara memasukkan kode genetik ke dalam fasilitas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dan bandingkan dengan referensi data urutan hasil lainnya (Rahim dan Madduppa 2020). Data genetik yang digunakan sebagai pembanding didownload dari *GenBank*. *GenBank* merupakan *database* utama dalam biologi molekuler, yang bisa di akses pada laman (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), data pembanding diambil berasal dari Indonesia, Australia, India, Malaysia dan Taiwan.

Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) 2 – parameter Kimura model (Zain dan Mutalib 2018). Diuji dengan 1000 kali *bootstrap* untuk mendapatkan tingkat kepercayaan *bootstrap*. Perhitungan jarak genetik antar grup dan intra grup juga menggunakan aplikasi Mega 6 (Tamura *et al.* 2013). Penggunaan Mega 6 ini dikarenakan keterbatasan komputer penulis.

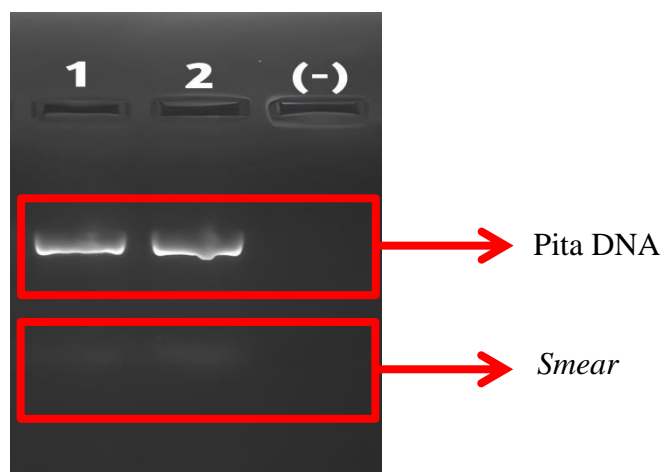
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Identifikasi *R.australiae*

4.1.1. Identifikasi *R.australiae* melalui BLAST

Hasil amplifikasi selanjutnya diuji kualitasnya dengan melakukan tahapan elektroforesis menggunakan gel agarosa 2,0%. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada gambar :



Gambar 4. Visualisasi produk PCR hasil elektroforesis sampel *R. australiae* dengan gel agarosa 2,0%
Keterangan: 1 = Individu 1 *R. australiae*; 2 = Individu 2 *R. australiae*; (-) = Kontrol negative

Sampel yang berhasil teramplifikasi ditandai dengan munculnya pita DNA pada gel. Berdasarkan hasil elektroforesis gambar diatas menunjukkan, 2 sampel tersebut menghasilkan pita DNA yang tebal dan *smear* yang sedikit. Kualitas DNA yang dihasilkan tergantung pada konsentrasi template DNA sampel, sedangkan *smear* tergantung pada kemurnian template DNA sampel. Kualitas DNA yang baik bisa dilihat pada tingginya ukuran pada pita DNA yang dihasilkan serta rendahnya ukuran pada *smear* (Utami *et al.* 2012). Kontrol negatif yang

tidak menghasilkan pita dapat diartikan bahwa sampel tidak terkontaminasi oleh bakteri. Ada beberapa hal yang dapat berpengaruh besar terhadap hasil amplifikasi yaitu: pemilihan primer yang tepat, pengaturan suhu *annealing* juga harus diperhatikan agar primer bisa menempel secara spesifik pada kedua ujung DNA target. Suhu *annealing* adalah suhu yang diperlukan agar primer dapat menempel pada DNA template (Hewajuli dan Dharmayanti 2014). Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan produk PCR rusak atau tidak terbentuk karena penempelan primer pada template DNA lepas kembali.

Identifikasi *R. australiae* menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). BLAST merupakan suatu *software* yang digunakan untuk membandingkan sekuen yang telah diteliti dengan *database* DNA. Hasil identifikasi *R. australiae* secara genetik berdasarkan hasil pencocokan nukleotida dengan menggunakan BLAST dari 2 sampel *R. australiae* dikatakan spesies *R. australiae*. Berikut adalah tabel hasil BLAST dari 2 sampel *R. australiae*:

Tabel 4. Hasil analisis BLAST sampel *R. australiae*

<i>Description</i>	<i>Scientific name</i>	<i>Query Cover</i>	<i>Per. Ident</i>	<i>Accession</i>
<i>Rhynchobatus australiae</i> voucher NBFGR-CHN-D30 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	<i>R.australiae</i>	93%	99.85%	JN022595.1
<i>Rhynchobatus australiae</i> voucher RA4 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial	<i>R.australiae</i>	93%	99.85%	MW509728.1
<i>Rhynchobatus australiae</i> voucher RA9 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds;	<i>R.australiae</i>	93%	99.70%	MW509724.1

<i>mitochondrial</i>				
<i>Rhynchobatus australiae</i> voucher RA12 cytochrome <i>c oxidase subunit I</i> (<i>COX1</i>) gene, partial cds; <i>mitochondrial</i>	<i>R.australiae</i>	93%	99.85%	MW509721.1
<i>Rhynchobatus australiae</i> voucher RA17 cytochrome <i>c oxidase subunit I</i> (<i>COX1</i>) gene, partial cds; <i>mitochondrial</i>				
<i>Rhynchobatus australiae</i> voucher RA17 cytochrome <i>c oxidase subunit I</i> (<i>COX1</i>) gene, partial cds; <i>mitochondrial</i>	<i>R.australiae</i>	93%	99.85%	MW509716.1

Berdasarkan Tabel diatas menunjukkan bahwa nilai *Query Cover* sampel Meulaboh 1 dan Meulaboh 2 sebesar 93%. Hal ini menyatakan bahwa penyajian panjang nukleotida yang selaras dengan *database* yang terdapat pada BLAST, karena nilainya mendekati 100%. Semakin tinggi nilai *Query Cover*, semakin tinggi juga tingkat homologinya (Nugraha *et al.* 2014). *Per Ident* adalah nilai presentasi identitas antara urutan nukleotida dengan urutan *database* yang tersejajarkan. Semakin tinggi nilainya maka dapat disimpulkan bahwa spesiesnya sama. Dari Tabel diatas dapat kita lihat bahwa nilai *Ident* sebesar 99.70% - 99.85% dapat dinyatakan bahwa spesiesnya sama yaitu *R. australiae*. Hal ini sama seperti yang dijelaskan oleh (Bhattacharjee *et al.* 2012) yaitu angka homologi berkisar antara 98% - 100% memiliki homologi spesies, dan nilai 93% - 97% memiliki homologi genus.

4.1.2. Komposisi Nukleotida

Data sekuens yang didapatkan dari hasil teliti kemudian digabung dengan data sekuens *R.australiae* yang didownload dari *GenBank* disejajarkan, maka didapatkan panjang fragmen 629 untuk sampel pertama dan 630 untuk sampel kedua. Hal ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Setiati *et al.* (2018)

bahwa produk PCR berkisar 600 - 700 *base pair*. Komposisi nukleotida sampel *R.australiae* diambil dari semua sampel yang dianalisis diuraikan dalam tabel berikut ini:

Tabel 5. Persentase komposisi nukleotida yang diteliti dibandingkan dengan *database* dari *GenBank* panjang fragmen 629 dan 630.

Nama Spesies	Urutan Basa Nukleotida			
	T	C	A	G
<i>Rhynchobatus australiae</i> Meulaboh 1	30,8	24,8	27,3	17,0
<i>Rhynchobatus australiae</i> Meulaboh 2	30,8	24,8	27,3	17,1
EU399007.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Australia2	30,8	24,8	27,3	17,0
EU399008.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Australia1	30,7	25,0	27,3	17,0
EU399009.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Australia3	30,8	24,8	27,3	17,0
JN022596.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> India2	30,8	24,8	27,3	17,0
JN108018.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> India1	30,8	24,8	27,3	17,0
JN108019.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> India3	30,8	24,8	27,3	17,0
MG774925.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Malaysia1	30,8	24,8	27,3	17,0
MG774928.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Malaysia3	30,8	24,8	27,3	17,0
MG792126.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Malaysia2	30,7	25,0	27,5	16,9
KP719753.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Taiwan	30,9	26,1	27,6	15,4
MW509726.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Indonesia1	30,8	24,8	27,5	16,9
MW509727.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Indonesia2	30,8	24,8	27,5	16,9
MW509728.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Indonesia3	30,8	24,8	27,3	17,0
MW509729.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Indonesia4	30,8	24,8	27,3	17,0
MW509730.1 <i>Rhynchobatus australiae</i> Indonesia5	30,8	24,8	27,5	16,9
Rata-rata.	30,8	24,9	27,4	16,9

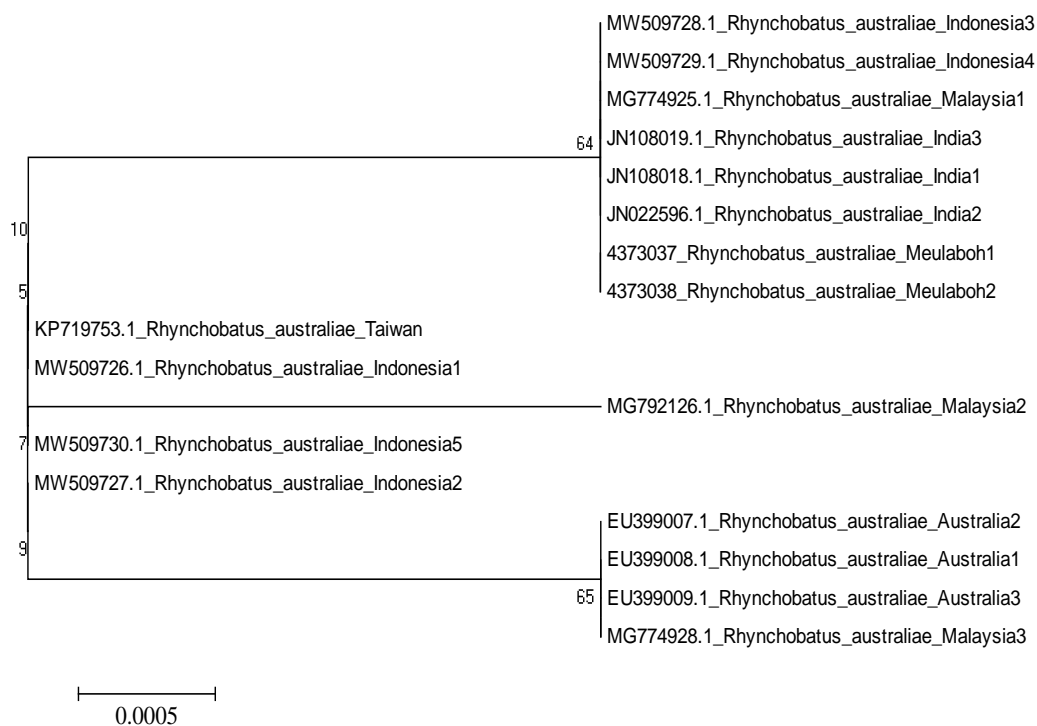
Hasil dari Tabel diatas menunjukkan bahwa *R. australiae* memiliki rata-rata komposisi nukleotida Timin (T) = 30,8%, Sitosin (C) = 24,9%, Adenin (A) = 27,4% dan Guanin (G) = 16,9%. Perbedaan komposisi nukleotida pada *R. australiae* memperlihatkan adanya indikasi variasi genetik. Variasi genetik memiliki peran yang sangat penting, karena ikan - ikan yang variasi genetik tinggi

akan bertahan dengan adanya tekanan lingkungan termasuk serangan penyakit. Pola adaptasi organisme terhadap perubahan lingkungan dapat mengubah nukleotida (Prehadi *et al.* 2015).

4.2. Hubungan Kekerabatan

4.2.1. Pohon Filogenetik

Analisis pohon filogenetik dilakukan untuk melihat kekerabatan antar spesies *R. australiae* Meulaboh dengan spesies *R. australiae* yang diambil dari *database*. Analisis filogenetik dilakukan untuk merekonstruksi 17 sekuen DNA *R. australiae* asal Meulaboh 2 sekuen *R. australiae* dan menggunakan sekuen organisme pembanding dari *database* yang diambil asal Indonesia 5 sekuen, India 3 sekuen, Malaysia 3 sekuen, Australia 3 sekuen serta Taiwan 1 sekuen yang diperoleh dari data *GenBank* NCBI menghasilkan pohon berikut ini:



Gambar 5. Pohon Filogenetik *R. australiae* dengan menggunakan metode *Neighbor Joining 2* - Parameter Kimura model 1000 *bootstrap*

Kelompok yang memiliki banyak kesamaan ciri dianggap mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang yang sama atau bisa juga disebut dengan *monophyletic*. Organisme yang membentuk satu kelompok atau satu cabang disebut *clade*. Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining*, dengan persentase *bootstrap* 1000 kali ulangan. Ubaidillah dan Sutrisno (2009) menyatakan bahwa semakin besar nilai *bootstrap* yang digunakan, semakin tinggi kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi berdasarkan distribusi karakter dalam data sangat dipengaruhi oleh efek acak.

Dari hasil rekonstruksi pohon filogenetik didapatkan nilai *bootstrap* 5-65% pada percabangan, hal ini dapat dinyatakan bahwa cabang memiliki dua kategori yaitu sangat lemah dengan nilai 5-10% serta kategori lemah 64-65%. Kategori nilai *bootstrap* termasuk tinggi (>85%), sedang (70–85%), lemah (50-69%), atau sangat lemah (<50%) (Kress *et.al* 2002). Apabila memiliki nilai diatas 80% pada percabangan dinyatakan hasil yang sangat baik karena nilai tersebut mendukung secara kuat bahwa sampel yang berada dalam satu cabang adalah berada dalam satu spesies (Hrbek *et al.* 2007).

Hasil konstruksi pohon filogenetik tersebut menunjukkan bahwa *R. australiae* membentuk 4 *clade*. Pada *clade* pertama terdiri dari spesies *R. australiae* yang berasal dari Indonesia³, Indonesia⁴, Malaysia¹, India³, India², India¹ serta Meulaboh 1 dan Meulaboh 2 juga terdapat di *clade* pertama. Hal ini diduga karena *clade* tersebut secara geografis tidak terbatas antara satu dengan yang lainnya. Keadaan ini menyebabkan proses migrasi dan pertukaran gen antar kelompok sampel bisa terjadi. *Clade* kedua terdiri dari spesies *R. australiae* yang

berasal dari Taiwan, Indonesia1, Indonesia2 dan Indonesia3. *Clade* ketiga hanya terdiri dari satu yaitu Malaysia2. *Clade* keempat terdiri dari Australia1, Australia2, Australia3 serta Malaysia3.

4.2.2. Jarak Genetik Antar-Intra Populasi

Jarak genetik digunakan untuk melihat kekerabatan antar-intra populasi *R. australiae*. Adapun jarak genetik antar populasi memiliki nilai yang berbeda-beda, berikut telah disajikan dalam Tabel 6:

Tabel 6. Jarak genetik antar populasi

No	Nama spesies	Spesies					
		1	2	3	4	5	6
1.	<i>Rhynchobatus_australiae</i> _Meulaboh						
2.	<i>Rhynchobatus_australiae</i> _Australia	0,004					
3.	<i>Rhynchobatus_australiae</i> _India	0,000	0,004				
4.	<i>Rhynchobatus_australiae</i> _Malaysia	0,003	0,003	0,003			
5.	<i>Rhynchobatus_australiae</i> _Taiwan	0,002	0,002	0,002	0,002		
6.	<i>Rhynchobatus_australiae</i> _Indonesia	0,001	0,003	0,001	0,002	0,001	

Jarak genetik antar populasi memperlihatkan pengelompokan antar populasi berdasarkan kedekatan jarak genetik. Semakin dekat jarak genetik maka semakin dekat hubungan kekerabatannya, sebaliknya semakin jauh jarak genetik maka semakin jauh kekerabatannya. Berdasarkan Tabel diatas menunjukkan bahwa jarak genetik antara populasi satu dengan populasi lainnya mempunyai jarak genetik yang rendah, dengan artian setiap populasi memiliki kekerabatan yang dekat. Hal ini disebabkan karena tidak adanya perbedaan basa nukleotida secara signifikan. Berikut jarak genetik antar populasi *R. australiae* Meulaboh

dengan populasi Australia mempunyai nilai 0,004, populasi Meulaboh dengan populasi India 0,000, populasi meulaboh dengan populasi Malaysia yaitu 0,003, populasi Meulaboh dengan populasi Taiwan yaitu 0,002, dan antara populasi Meulaboh dengan Indonesia yaitu 0,001.

Populasi Australia dengan populasi India 0,004, populasi Australia dengan populasi Malaysia 0,003, populasi Australia dengan populasi Taiwan 0,002, populasi Australia dengan populasi Indonesia 0,003. Kemudian jarak genetik antar populasi India dengan populasi Malaysia 0,003, populasi India dengan populasi Taiwan 0,002, populasi India dengan populasi Indonesia 0,001. Jarak genetik populasi Malaysia dengan populasi Taiwan 0,002, populasi Malaysia dengan populasi Indonesia 0,002, serta jarak genetik populasi Taiwan dengan populasi Indonesia adalah 0,001. Jarak genetik yang nilainya paling rendah ditemukan antara populasi *R. australiae* Meulaboh dengan populasi *R. australiae* India yang mempunyai nilai 0,000. Hal ini menyatakan bahwa adanya hubungan kekerabatan yang sangat dekat antar populasi *R. australiae* Meulaboh dengan *R. australiae* populasi India. Jarak yang terjauh didapatkan pada *R. australiae* Meulaboh dengan *R. australiae* Australia yaitu 0,004, lebih kecil dari jarak genetik antar populasi ikan nilem di Jawa Barat (Mulyasari *et al.* 2016).

Analisis hubungan kekerabatan dapat dilihat dari jarak genetik antar individu (Yuliani *et al.* 2017). Berikut adalah jarak genetik intra populasi yang telah disajikan dalam Tabel 7:

Tabel 7. Jarak genetik intra populasi

No	Nama Spesies	Jarak
1.	<i>Rhynchobatus australiae</i> _Meulaboh	0
2.	<i>Rhynchobatus australiae</i> _Australia	0
3.	<i>Rhynchobatus australiae</i> _India	0
4.	<i>Rhynchobatus australiae</i> _Malaysia	0,004192897
5.	<i>Rhynchobatus australiae</i> _Taiwan	n/c
6.	<i>Rhynchobatus australiae</i> _Indonesia	0,001255232

Jarak individu intra populasi memperlihatkan kedekatan genetik yang sangat dekat, yaitu mempunyai nilai 0. Jarak genetik intra populasi yang mempunyai nilai 0 ini meliputi beberapa populasi, dimulai dari populasi *R. australiae* Meulaboh, populasi Australia, dan populasi India. Berbeda dengan populasi Malaysia yang memiliki nilai 0,004 serta *R. australiae* Indonesia 0,001. Jarak genetik intra populasi Taiwan tidak terdeteksi (n/c), hal ini terjadi karena sekuen yang didapatkan dari *GenBank* hanya satu sekuen sehingga tidak memiliki bandingan intra populasinya. Semakin besar nilai jarak genetik antar sampel, maka semakin jauh kekerabatannya, juga sebaliknya semakin kecil nilai jarak genetik antar sampel maka semakin dekat kekerabatannya (Nugroho dan Rahayu 2015).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan beberapa kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini:

1. Hasil analisis *Rhynchobatus australiae* melalui pendekatan identifikasi marka molekuler menyatakan bahwa spesies tersebut adalah *Rhynchobatus australiae*
2. Hubungan kekerabatan berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik menyatakan bahwa hubungan kekerabatan sampel *Rhynchobatus australiae* Meulaboh 1 dan 2 mempunyai kedekatan dengan *Rhynchobatus australiae* dari India1, India2, India3, Malaysia1, Indonesia3 dan Indonesia5.

5.2. Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai hubungan kekerabatan ikan pari lontar (*Rhynchobatus australiae*) di perairan Aceh Barat, baik dari sisi penggunaan sampel yang lebih beragam serta dari berbagai populasi sehingga data yang dihasilkan lebih detail.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah, S., & Farhaby, A. M. (2021). identifikasi molekuler dan status konservasi ikan pari hiu (rhinidae) yang didaratkan di pulau bangka. *JFMR (Journal of Fisheries and Marine Research)*, 5(1), 61–69.
- Ariyanti, Y., & Sianturi, S. (2019). Ekstraksi DNA total dari sumber jaringan hewan (Ikan Kerapu) menggunakan metode kit for animal tissue. *Journal of Science and Applicative Technology*, 3(1), 40–45.
- Bahri, S., Atmadipoera, A. S., & Madduppa, H. H. (2017). Genetic diversity of olive ridley *Lepidochelys olivacea* associated with current pattern in cendrawasih bay, papua. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis*, 9(2), 747–760.
- Bhattacharjee, M. J., Laskar, B. A., Dhar, B., & Ghosh, S. K. (2012). Identification and re-evaluation of freshwater catfishes through DNA barcoding. *PloS One*, 7(11), e49950.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Amalia, S., & Manalu, W. (2003). *Biologi jilid 2*.
- Compagno, L. J. V., & Last, P. R. (2008). A new species of wedgefish, *rhynchobatus palpebratus* sp. nov.(Rhynchobatoidei: Rhynchobatidae), from the indo-west pacific. *Descriptions of New Australian Chondrichthyans. CSIRO Marine and Atmospheric Research Paper*, 22, 227–240.
- Dent, F., & Clarke, S. (2015). State of the global market for shark products. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 590, I.
- Giles, J. L., Riginos, C., Naylor, G. J. P., & Ovenden, J. R. (2016). Genetic and phenotypic diversity in the wedgefish *rhynchobatus australiae*, a threatened ray of high value in the shark fin trade. *Marine Ecology Progress Series*, 548, 165–180.
- Grewe, P. M., Krueger, C. C., Aquadro, C. F., Bermingham, E., Kincaid, H. L., & May, B. (1993). Mitochondrial DNA variation among lake trout (*Salvelinus namaycush*) strains stocked into Lake Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(11), 2397-2403.
- Hewajuli, D. A., & Dharmayanti, N. (2014). Perkembangan Teknologi Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction dalam Mengidentifikasi Genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases. *Wartazoa*, 24, 16–29.
- Hrbek, T., Seckinger, J., & Meyer, A. (2007). A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(3), 986–998.
- Kress, W.J., Prince, L.M. & Willianms, K.J. 2002. The Phylogeny and a New Classification of Gingers (Zingiberaceae): Evidence from Molecular Data.

American Journal of Botany 89(10): 1682-1689. doi: 10.3732/ajb.89.10.1682

- Khan, M. F., Khattak, M. N. K., He, D., Rehman, A. ur, & Chen, Y. (2017). Mitochondrial genome sequence and gene organization of kunar snow trout (*Schizothorax labiatus*) with phylogenetic consideration. *Gene Reports*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.02.002>
- Lesmana, F., Ulfah, M., & Rizwan, R. (2018). Identifikasi spesies hiu yang tertangkap di perairan utara aceh. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kelautan Perikanan Unsyiah*, 3(1).
- Li, S., Pearl, D. K., & Doss, H. (2000). Phylogenetic tree construction using markov chain monte carlo. *Journal of the American Statistical Association*, 95(450), 493–508.
- Madduppa, H. H., Bahri, S., Subhan, B., Anggraini, N. P., Ohoiulun, H., Abdillah, T., Arafat, D., Santoso, P., & Sangadji, I. M. (2019). DNA barcoding of sea turtles (Dermochelyidae and Cheloniidae) and its protocol using different tissues quality: implication to conservation managers. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 278(1), 12041.
- Madduppa, H. (2014). Bioekologi dan biosistematika ikan terumbu. *Bogor: IPB PRESS. Hlm*, 296.
- Madduppa, Hawis, Bahri, S., Ghozali, A. T., Atmadipoera, A. S., Subhan, B., Santoso, P., Natih, I. N. M., & A, D. A. (2021). Population genetic structure of olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) across Indonesian archipelago revealed by mitochondrial DNA: Implication for management. *Regional Studies in Marine Science*, 41, 101600.
- MD-Zain, B. M., & Abdul-Mutalib, S. A. (2018). Molecular phylogenetic inference of white-spotted guitarfish (*rhynchobatus australiae*) collected from local malaysian fish markets. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 19(4). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d190426>
- Mulyasari, M., Soelistyowati, D. T., Kristanto, A. H., & Kusmini, I. I. (2016). Karakteristik genetik enam populasi ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) di jawa barat. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5(2), 175–182.
- Muthiadin, C., Aziz, I. R., & Darajat, A. Z. (2018). DNA mitokondria untuk identifikasi ikan yang kaya spesies. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 4(1).
- Nugraha, F., Roslim, D. I., & Ardilla, Y. P. (2014). Analisis sebagian sekuen gen ferritin2 pada padi (*Oryza sativa* l.) Indragiri hilir, riau. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 6(2), 70–79.
- Nugroho, E. D., & Rahayu, D. A. (2015). Status taksonomi ikan nomei dari perairan tarakan, kalimantan utara berdasarkan gen 16S rRNA sebagai

- upaya konservasi ikan laut lokal Indonesia. *Jurnal Harpodon Borneo*, 8(2).
- Pharmawati, M. (2009). Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *grevillea* spp.(Proteaceae). *Jurnal Biologi*, 13(1), 12–16.
- Prehadi, P., Sembiring, A., Kurniasih, E. K. A. M., Rahmad, R., Arafat, D., Subhan, B., & Madduppa, H. H. (2015). DNA barcoding and phylogenetic reconstruction of shark species landed in m uncar fisheries landing site in comparison with Southern Java fishing port. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 16(1).
- Rahim, Z., & Madduppa, H. (2020). Identifikasi ikan sardin komersial (*Dussumieria elopsoides*) yang didaratkan di pasar muara angke, jakarta menggunakan pengamatan morfologi, morfometrik dan DNA barcoding. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 13(2), 93–99.
- Rahman, A., Haryadi, J., Sentosa, A. A., & Mujiyanto, M. (2017). Kajian Awal Kemunculan Hiu Paus (*Rhyncodon typus*, Smith 1828) di Teluk Tomini Dihubungkan dengan Faktor Fisik dan Biologi Perairan. *Akuatika Indonesia*, 2(2). <https://doi.org/10.24198/jaki.v2i2.23425>
- Sadili, D. (2015). Pedoman identifikasi dan pendataan hiu apendiks ii cites. *Direktorat Konservasi Kawasan dan Jenis Ikan*.
- Schadt, E. E., Sinsheimer, J. S., & Lange, K. (1998). Computational advances in maximum likelihood methods for molecular phylogeny. *Genome Research*, 8(3), 222–233.
- Setiati, N., Peniati, E., & Maharani, R. I. (2018). Status konservasi jenis ikan pari yang diperdagangkan di tpi di kota semarang berdasarkan gen coi mitokondria. *Seminar Nasional Biologi Dan Pendidikan Biologi UKSW*, 233–239.
- Solihin, D. D. (1994). *Peran DNA Mitokondria (mtDNA) dalam Stuid Keragaman Genetik dan Biologi Populasi pada Hewan*.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Triswiyana, I. (2021). Keragaman genetik hiu barong (*rhina ancylostoma*) dan potensi kepunahannya di indonesia: Review berdasarkan gen COI. *Jurnal Biogenerasi*, 6(2), 109–115.
- Twindiko, A. F., Wijayanti, D. P., & Ambariyanto, A. (2013). Studi filogenetik ikan karang genus *pseudochromis* dan *pictichromis* di perairan indo-pasifik. *Buletin Oseanografi Marina*, 2(3), 29–37.
- Ubaidillah, R. dan Sutrisno H. 2009. Pengantar Biosistemik: Teori dan Praktikum.

LIPI Press, Jakarta.

- Utami, A., Meryalita, R., Prihatin, N. A., Ambarsari, L., Asri, P., & Kurniatin, W. N. (2012). Variasi metode isolasi DNA daun temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) *Prosiding Seminar Nasional Kimia Unesa*.
- Pavan-Kumar, A., Gireesh-Babu, P., Suresh Babu, P. P., Jaiswar, A. K., Prasad, K. P., Chaudhari, A., & Lakra, W. S. (2015). DNA barcoding of elasmobranchs from Indian coast and its reliability in delineating geographically widespread specimens. *Mitochondrial DNA*, 26(1), 92-100.
- Prehadi, P., Sembiring, A., Kurniasih, E. M., Rahmad, R., Arafat, D., Subhan, B., & Madduppa, H. H. (2015). DNA barcoding and phylogenetic reconstruction of shark species landed in Muncar fisheries landing site in comparison with Southern Java fishing port. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 16(1).
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847–1857.
- Yuliani, Y., Yuniaty, A., & Susanto, A. H. (2017). Variasi Sekuens DNA yang diamplifikasi menggunakan primer ATPB-RBCL pada beberapa kultivar kacang tanah. *Scripta Biologica*, 4(1), 11–14.

LAMPIRAN



Pengambilan sampel di lapangan



Pengambilan sampel di lapangan



Melakukan Preservasi sampel



Melakukan Ekstraksi



Melakukan PCR



Melakukan Elektroforesis

