

**IDENTIFIKASI DAN ANALISIS VARIASI GENETIK INTERSPESIES IKAN
MEDAKA GENUS *ORYZIAS* PADA DANAU TOWUTI BERDASARKAN
KODE BATANG DNA**

***IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF INTERSPECIES GENETIC
VARIATION OF MEDAKA FISH OF THE GENUS *ORYZIAS* IN LAKE
TOWUTI BASED ON DNA BARCODING***



REZKI ASYA NUR

H052221010



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**IDENTIFIKASI DAN ANALISIS VARIASI GENETIK INTERSPESIES IKAN
MEDAKA GENUS *ORYZIAS* PADA DANAU TOWUTI BERDASARKAN
KODE BATANG DNA**

***IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF INTERSPECIES GENETIC
VARIATION OF MEDAKA FISH OF THE GENUS *ORYZIAS* IN LAKE
TOWUTI BASED ON DNA BARCODING***

**REZKI ASYA NUR
H052221010**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**IDENTIFIKASI DAN ANALISIS VARIASI GENETIK INTERSPESIES IKAN
MEDAKA GENUS *ORYZIAS* PADA DANAU TOWUTI BERDASARKAN
KODE BATANG DNA**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Biologi

REZKI ASYA NUR
H052221010

Kepada

**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

IDENTIFIKASI DAN ANALISIS VARIASI GENETIK INTERSPESIES IKAN MEDAKA
GENUS *ORYZIAS* PADA DANAU TOWUTI BERDASARKAN KODE BATANG DNA

REZKI ASYA NUR

H052221009

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada tanggal Agustus 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Pada

Program Studi Magister Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama

Dr. Irma Andriani, S.Pi., M.Si.
NIP. 197108091999032002

Pembimbing Pendamping

Dr. Ir. Andi Parenrengi, M.Si.
NIP. 196708181982031006

Ketua Program Studi
Magister Biologi

Dr. Juhrah, M.Si.
NIP. 196312311988102001

Dekan Fakultas MIPA
Universitas Hasanuddin

Dr. Eng. Amiruddin, M.Si.
NIP. 197205151997021002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Identifikasi Morfologi dan Analisis Variasi Genetik Interspesies Ikan Medaka Genus *Oryzias* Pada Danau Towuti Berdasarkan Kode Batang DNA" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Irma Andriani, S.Pi.M.Si dan Dr. Ir. Andri Parenrengi, M.Si). Karya ini belum di ajukan dan sedang tidak di ajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau di kutip dari karya yang di terbitkan maupun tidak di terbitkan dari penulis lain telah di sebutkan dalam teks dan telah dicantumkan dalam daftar pustaka tesis ini. Tesis ini telah dipublikasikan di jurnal Biodiversitas (Biodiversitas, under riview) sebagai artikel dengan judul "Unveiling the Genetic Diversity of Medaka Fish *Oryzias marmoratus* in Lake Towuti: A DNA Barcoding Approach" apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian besar atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar 20 Agustus 2024



REZKI ASYA NUR
NIM: H052221010

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini dapatterampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan dari Ibu Dr. Irma Andriani, S.Pi., M.Si sebagai Pembimbing Pertama dan Bapak Dr. Ir. Andi Parenrengi, M.Si sebagai Pembimbing Kedua. Saya mengucapkan banyak terima kasih kepada yang bersangkutan. Ucapan terima kasih juga saya hanturkan kepada Ibu Prof. Dr. Dirayah R. Husain, DEA (sekaligus pembimbing akademik), Bapak Dr. Eddyman W. Ferial, M.Si, dan Ibu Dr. A. Masniawati, M.Si sebagai dosen penguji yang telah memberikan banyak masukan terhadap penelitian dan penulisan tesis ini. Saya juga mengucapkan banyak terima kasih kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah memfasilitasi saya dalam menempuh program magister ini serta kepada para dosen yang telah melimpahkan banyak ilmu selama saya duduk dibangku perkuliahan.

Saya mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset dan Teknologi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi, Republik Indonesia, yang telah memberikan hibah bantuan tesis pada tahun 2024 dengan nomor: 02035/UN4.22.2/PT.01.03/2024.

Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada Bapak Daniel Frikli Mokodongan atas arahan dan bantuannya selama proses penelitian. Tidak lupa juga saya menghanturkan banyak terima kasih kepada Kak Triska Lamba, S. Si., M.Si dan Kak Nur Afiyah Sulaiman, S.Si., M.Si atas bantuan dan saran selama proses penelitian ini.

Tidak lupa saya hanturkan banyak terima kasih kepada Yaumil Akhir, S.Pd selaku partner penelitian, teman perjuangan semasa kuliah, yang selalu menemani dan memotivasi mulai dari awal masa studi, hingga saat ini. Dan tidak lupa juga kepada Kak Elina Suryani, S.Si, Nurfadila, S.Si, Nuhidayah, S.Si, Ratna Sari, S.Si, Nurhidayah Syarifuddin, S.Pd, Siti Rofiah, S.Pd, Sopia Lacuba, S.Si, Ardiansa, S.Si., M.Si, serta teman-teman magister biologi, terima kasih banyak atas seluruh bantuan dan memori yang telah diukirkan selama saya menempuh program magister.

Akhirnya, kepada kedua orang tua dengan ketulusan yang tidak melebihi apapun kepada penulis, Ayah Nur Yasin dan Ibu Hasni, bahkan kata terima kasih pun tidak cukup, tidak ada pengorbanan yang lebih besar yang pernah penulis rasakan selain darimu. Terimakasih.

Makassar, 5 Agustus 2024

Rezki Asya Nur

ABSTRAK

REZKI ASYA NUR. **Identifikasi dan Analisis Variasi Genetik Interspesies Ikan Medaka Genus *Oryzias* Pada Danau Towuti Berdasarkan Kode Batang DNA** (dibimbing oleh Irma Andriani dan Andi Parenrengi).

Ikan medaka (genus *Oryzias*) merupakan salah satu ikan endemik yang diidentifikasi menghuni perairan Indonesia sehingga disebut *homeland of Oryzias*. Menurut IUCN populasi ikan medaka di Danau Towuti hampir terancam, sehingga diperlukan kajian secara genetik untuk menyajikan data agar tidak terjadi penurunan populasi. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengetahui variasi genetik interspesies ikan medaka dari Danau Towuti dengan DNA barcoding menggunakan gen COI. Sampel ikan medaka (n=12) didapatkan dari 3 stasiun di Danau Towuti. Pada penelitian ini digunakan metode PCR dengan menggunakan primer COI FishF1 dan FishR1. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan Bioedit, BLAST-N, Mega11, DnaSP, dan Network. Analisis data sekuens DNA gen COI dilakukan untuk mendapatkan konsensus sekuens, identifikasi spesies, variasi genetik, jarak genetik, pohon filogenetik, dan *haplotype networking*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 12 sampel ikan medaka yang teridentifikasi dalam satu genus yaitu *Oryzias* dan terdiri dari 3 spesies yaitu *O. marmoratus*, *O. profundicola*, dan *O. loxolepis*. Variasi genetik interspesies menunjukkan nilai yang tinggi dengan *haplotype diversity* yaitu 0,95, *nucleotide diversity* rendah yaitu 0,021, dan 9 haplotipe. Rata-rata keseluruhan jarak genetik interspesies sebesar 0,020. Analisis filogenetik membentuk tiga klad. *Haplotype network* interspesies menunjukkan angka mutasi tertinggi yaitu 28 antara H8 dan H4, sedangkan angka mutasi terendah yaitu satu antara H8 dan H3. Informasi variasi genetik interspesies ikan medaka dari Danau Towuti dapat menjadi pertimbangan untuk konservasi genetik. Hasil yang diperoleh juga diharapkan dapat digunakan untuk menyusun DNA *barcode library* khususnya spesies *O. profundicola* dan *O. loxolepis* dari Danau Towuti.

Kata Kunci: COI, Danau Towuti, DNA barcoding, Ikan Medaka, Variasi genetik.

ABSTRACT

REZKI ASYA NUR. **Identification and Analysis of Interspecies Genetic Variation of Medaka Fish of the Genus *Oryzias* in Lake Towuti Based on DNA Barcoding** (guided by Irma Andriani and Andi Parenrengi).

Medaka fish (genus Oryzias) is one of the endemic fishes identified as inhabiting Indonesian waters, hence the name homeland of Oryzias. According to IUCN, the medaka fish population in Lake Towuti is almost threatened, so genetic studies are needed to provide data to prevent population decline. Therefore, this study aims to identify and determine the interspecies genetic variation of medaka fish from Lake Towuti by DNA barcoding using the COI gene. Medaka fish samples (n=12) were obtained from 3 stations in Lake Towuti. This study used the PCR method using COI FishF1 and FishR1 primers. The data obtained were then analyzed using Bioedit, BLAST-N, Mega11, DnaSP, and Network. COI gene DNA sequence data was analyzed to obtain sequence consensus, species identification, genetic variation, genetic distance, phylogenetic tree, and haplotype networking. The results showed that of the 12 medaka fish samples identified in one genus, namely Oryzias, it consists of 3 species, namely O. marmoratus, O. profundicola, and O. loxolepis. Interspecies genetic variation showed high values with haplotype diversity of 0.95, low nucleotide diversity of 0.021, and 9 haplotypes. The overall average interspecies genetic distance was 0.020. Phylogenetic analysis established three clades. The interspecies haplotype network showed the highest mutation rate of 28 between H8 and H4, while the lowest mutation rate was one between H8 and H3. Information on interspecies genetic variation of medaka fish from Lake Towuti can be considered for genetic conservation. The results obtained are also expected to be used to compile a DNA barcode library, especially for O. profundicola and O. loxolepis species from Lake Towuti.

Keywords: COI, DNA barcoding, Genetic variation, Lake Towuti, Medaka fish.

DAFTAR ISI

| | |
|--|-----------|
| Sampul | i |
| Halaman Judul | ii |
| Halaman Pengajuan Tesis | iii |
| Halaman Pengesahan | iv |
| Pernyataan Keaslian Tesis dan Pelimpahan Hak Cipta | v |
| Ucapan Terima Kasih | vi |
| Abstrak | vii |
| <i>Abstract</i> | viii |
| Daftar Isi | ix |
| Daftar Tabel | xi |
| Daftar Gambar | xii |
| Daftar Lampiran | xiii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 2 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 3 |
| 1.5 Kerangka Konseptual | 3 |
| BAB II METODE PENELITIAN | 4 |
| 2.1 Waktu dan Tempat Penelitian | 4 |
| 2.2 Alat dan Bahan | 5 |
| 2.2.1 Alat | 5 |
| 2.2.2 Bahan | 5 |
| 2.3 Prosedur Penelitian | 5 |
| 2.3.1 Pengambilan Sampel | 5 |
| 2.3.2 Identifikasi Berdasarkan Karakter Morfologi | 5 |
| 2.3.3 Ekstraksi DNA | 7 |
| 2.3.4 Amplifikasi DNA | 8 |
| 2.3.5 Elektroforesis | 8 |
| 2.4 Analisis Data | 9 |
| BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN | 10 |
| 3.1 Identifikasi Berdasarkan Karakter Morfologi | 10 |
| 3.2 Visualisasi Amplifikasi DNA dan Similaritas Sampel | 15 |
| 3.3 Variasi Genetik Interspesies | 19 |
| 3.3.1 Variasi Genetik | 19 |
| 3.3.2 Jarak Genetik | 20 |
| 3.3.3 Filogenetik | 23 |
| 3.3.4 <i>Haplotype Network</i> | 25 |
| 3.4 Variasi Intraspesies | 26 |
| 3.4.1 <i>Oryzias marmoratus</i> | 26 |
| 3.4.2 <i>Oryzias profundicola</i> | 29 |
| 3.5 Variasi Genetik Sampel dan <i>Outgroups</i> | 30 |
| 3.5.1 Variasi Genetik | 30 |
| 3.5.2 Jarak Genetik | 32 |
| 3.5.3 Filogenetik | 35 |
| 3.5.4 <i>Haplotype Network</i> | 36 |
| 3.6 Pengamatan Parameter Lingkungan | 38 |
| BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN | 40 |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 4.1 Kesimpulan | 40 |
| 4.2 Saran | 40 |
| DAFTAR PUSTAKA | 41 |
| LAMPIRAN | 51 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Pengukuran morfometrik dan meristik pada ikan medaka | 6 |
| 2 | Pengaturan siklus amplifikasi sampel DNA ikan medaka | 8 |
| 3 | Primer COI yang digunakan pada amplifikasi ikan medaka | 8 |
| 4 | Perhitungan meristik dan morfometrik pada sampel ikan medaka di Danau Towuti | 12 |
| 5 | Panjang fragmen (bp) gen COI dan jumlah asam amino yang ditranslasi pada sampel ikan medaka | 15 |
| 6 | Hasil analisis BLAST dan BOLD 12 sampel ikan medaka dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 17 |
| 7 | Variasi genetik sampel ikan medaka dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 19 |
| 8 | Grup haplotipe ikan medaka dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 19 |
| 9 | Jarak genetik ikan medaka dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 22 |
| 10 | Variasi genetik <i>O. marmoratus</i> dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 26 |
| 11 | Grup haplotipe <i>O. marmoratus</i> dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 26 |
| 12 | Jarak genetik <i>O. marmoratus</i> dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 27 |
| 13 | Variasi genetik <i>O. profundicola</i> dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 29 |
| 14 | Grup haplotipe <i>O. profundicola</i> dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 29 |
| 15 | Jarak genetik <i>O. profundicola</i> dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 30 |
| 16 | Variasi genetik 12 sampel dari Danau Towuti dan <i>outgroups</i> yang terdata di Genbank dan BOLD berdasarkan sekuens gen COI | 31 |
| 17 | Grup haplotipe 12 sampel dari Danau Towuti dan <i>outgroups</i> yang terdata di Genbank dan BOLD berdasarkan sekuens gen COI | 31 |
| 18 | Jarak genetik 12 sampel dari Danau Towuti dan <i>outgroups</i> yang terdata di Genbank dan BOLD berdasarkan sekuens gen COI | 34 |
| 19 | Hasil pengamatan parameter lingkungan di Danau Towuti | 38 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Kerangka konseptual | 3 |
| 2 | Lokasi pengambilan sampel ikan medaka di Danau Towuti, Luwu Timur, Sulawesi Selatan | 4 |
| 3 | Pengukuran 21 morfometrik ikan medaka mengikuti penomoran Tabel 1 | 7 |
| 4 | Morfologi <i>O. marmoratus</i> dengan kode sampel 1T1,1T2,1T3,1T4,2B1,2B3,2B4,2B5 pada Danau Towuti | 13 |
| 5 | Morfologi <i>O. profundicola</i> dengan kode sampel 3S1 (diawetkan dalam alkohol 96%), 3S2, 3S3 (belum diawetkan) pada Danau Towuti | 14 |
| 6 | Morfologi <i>O. loxolepis</i> dengan kode sampel 2B2 (diawetkan dalam alkohol 96%) pada Danau Towuti | 14 |
| 7 | Visualisasi hasil amplifikasi gen COI. Sampel 2B3 – 3S3 merupakan ikan medaka dari Danau Towuti dan M merupakan marker (GENEAID-1 kbp)..... | 15 |
| 8 | Rekonstruksi pohon filogenetik 12 sampel ikan medaka dari Danau Towuti berdasarkan topologi <i>Neighbour-Joining</i> berdasarkan sekuens gen COI. Node menunjukkan nilai bootstrap | 23 |
| 9 | <i>Haplotype network</i> 12 sampel ikan medaka dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI | 25 |
| 10 | <i>Haplotype network O. marmoratus</i> dari Danau Towuti berdasarkan sekuens gen COI..... | 28 |
| 11 | Rekonstruksi pohon filogenetik 12 sampel dari Danau Towuti beserta <i>outgroups</i> yang terdata di Genbank dan BOLD berdasarkan topologi <i>Neighbour-Joining</i> berdasarkan sekuens gen COI | 35 |
| 12 | <i>Haplotype network</i> 12 sampel dari Danau Towuti dan <i>outgroups</i> yang terdata di Genbank dan BOLD berdasarkan sekuens gen COI | 37 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Skema kerja penelitian | 52 |
| 2 | Skema kerja ekstraksi DNA, amplifikasi, dan elektroforesis | 53 |
| 3 | Stasiun penelitian | 54 |
| 4 | Pengamatan | 56 |
| 5 | Sekuens gen COI ikan medaka dari Danau Towuti | 59 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Genus Oryzias adalah salah satu ikan endemik yang telah diidentifikasi menghuni perairan Indonesia sehingga disebut dengan *homeland of Oryzias*. Ikan medaka dikenal dengan *ricefish* karena ukurannya yang kecil dan umumnya menempati ekosistem sawah, tambak, selokan dan juga danau. Ikan medaka juga merupakan family *Adrianiichthyidae* (Fahmi et al., 2015; Sari et al., 2020). Para ilmuwan menggunakan ikan medaka sebagai hewan model dalam mempelajari organogenesis, genetika, evolusi, dan penelitian terkait penyakit manusia (Kinoshita et al., 2009; Murata et al., 2020).

Distribusi ikan ini tersebar luas di Asia khususnya Thailand, Kamboja, Cina, Jepang, Filipina, dan Indonesia (Magtoon & Aphichart, 2009; Serdiati et al., 2023). Sedangkan di Indonesia *Oryzias* sp. tersebar dari Pulau Sumatera, Jawa, Kalimantan, dan Sulawesi (Parenti, 2008; Mokodongan et al., 2014; Mandagi et al., 2018). Sebanyak 34 spesies *Oryzias* sp. valid tercatat di dunia (Fricke et al., 2022). Diantaranya endemik di perairan Sulawesi sebanyak 18 spesies dan menyebar di tiga provinsi yaitu Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, dan Sulawesi Tengah (Serdiati et al., 2023). Secara umum terdapat beberapa spesies *Oryzias* sp. di Sulawesi Selatan yang statusnya hampir terancam (*Near Threatened*) menurut *IUCN* dan dua diantaranya ditemukan di Danau Towuti yaitu *Oryzias profundicola* dan *Oryzias marmoratus* (*IUCN*, 2023). Adapun spesies baru yang ditemukan di Danau Towuti yaitu *Oryzias loxolepis* (Kobayashi et al., 2023).

Danau Towuti merupakan danau terbesar kedua di Indonesia dan terbesar dalam sistem danau malili dari sekumpulan lima danau tektonik di Sulawesi (Wicaksono et al., 2015; Russel et al., 2020). Danau Towuti adalah salah satu danau yang berada di kawasan *Wallace* dan memiliki berbagai jenis ikan endemik (Kottelat et al., 1993; Parenti et al., 2013; Nursyahran et al., 2023). Menurut penelitian Nursyahran et al. (2022), dan Nursyahran et al. (2023), Danau Towuti memiliki keanekaragaman hayati yang unik dan spesies-spesies yang endemik, serta terdapat beberapa spesies ikan endemik yang rentan terhadap kepunahan dan penurunan populasi karena keterbatasan daerah penyebarannya, eksploitasi berlebihan yang tidak ramah lingkungan, kondisi habitat yang tercemar, dan keberadaan spesies ikan invasif sebagai pesaing ikan endemik dalam memperebutkan makanan.

Untuk mencegah terjadinya penurunan populasi dari genus *oryzias* diperlukan suatu pendekatan secara morfologi dan genetik yang dapat memberikan informasi mengenai varietas yang ada pada ikan tersebut untuk monitoring keanekaragaman dan konservasi serta perubahan yang terjadi pada alam (Schwartz et al., 2006; Muchlisin et al., 2012). Identifikasi secara morfologi dapat dilakukan menggunakan karakter meristik dan morfometrik. Karakter meristik merupakan karakter yang berhubungan dengan banyaknya bagian tubuh ikan yaitu banyaknya sisik dan sirip

ikan, sedangkan karakter morfometrik berhubungan dengan ukuran tubuh ikan (Affandi et al., 1992). Beberapa spesies *Oryzias* sp. pernah diidentifikasi dengan menggunakan karakter meristik dan morfometrik yaitu *O. javanicus*, *O. celebensis*, *O. dancena*, *O. minutillus*, *O. mekongensis*, *O. latipes* (Magtoon and Aphichart, 2009), *O. marmoratus*, *O. profundicola*, dan *O. loxolepis* (Parenti, 2008; Kobayashi et al., 2023). Sedangkan pendekatan genetik yang digunakan adalah dengan DNA barcoding (Hebert et al., 2003; Bingpeng et al., 2018). DNA barcoding menggunakan urutan sekuen gen pendek yang dapat menunjukkan variasi genetik serta hubungan kekerabatan baik intra maupun interspesies pada level molekuler dalam suatu spesies. Teknik ini menggunakan urutan basa nukleotida gen *Cytochrome Oxidase Subunit I* (COI) (Kress et al., 2015; DeSalle & Goldstein, 2019). Gen COI merupakan gen yang dianggap paling sesuai untuk DNA barcoding hewan karena sesuai dengan kriteria CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*), yaitu bersifat universal, kualitas sekuens yang baik, dan dapat membedakan spesies dengan baik (Lou et al., 2011). Beberapa ikan telah diidentifikasi pada tingkat spesies menggunakan DNA barcoding dengan gen COI termasuk ikan lele (Abdullah et al., 2017), ikan hias (Khomdram, 2018), ikan kerapu (Fadli et al., 2020), dan *Oryzias nigrimas* (Serdiati et al., 2020). Selain itu, DNA barcoding juga digunakan untuk melihat keragaman genetik pada family ikan Cyprinidae di China (Shen et al., 2016) dan ikan laut dalam di Barat Laut Pasifik (Teramura et al., 2022). Sedangkan untuk genus *Oryzias*, belum semua memiliki informasi mengenai data barcode yang terdapat di *Barcode of Life Data System*, khususnya di Danau Towuti (Bold, 2023).

DNA barcoding memiliki peranan penting untuk mendapatkan informasi dasar gen-gen yang memiliki keragaman tinggi sehingga dapat berguna pada proses seleksi pemuliaan ikan (Arifin & Kurniasih, 2007). Hal ini sesuai dengan pernyataan Dunham (1995), bahwa keberhasilan seleksi pemuliaan ikan dipengaruhi oleh tingkat dan potensi keragaman genetik. DNA barcoding juga sebagai alat bantu taksonomi untuk mengungkapkan secara genetik spesies *Oryzias* sp. yang berbeda secara tepat dan akurat, sekuens nukleotida dari suatu spesies dan perbandingannya dengan spesies lain serta dapat menentukan struktur filogenetik. Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian yang berjudul "Identifikasi dan Variasi Genetik Interspesies Ikan Medaka Genus *Oryzias* Pada Danau Towuti Berdasarkan DNA Barcoding".

1.2 Rumusan Masalah

Ikan medaka merupakan salah satu ikan endemik yang berada di Pulau Sulawesi. Populasi ikan ini mulai menurun sementara itu, ikan ini adalah salah satu ikan endemik yang ada di Danau Towuti. Oleh karena itu, dibutuhkan informasi terkait variasi genetik interspesies sebagai informasi pengembangbiakan dan informasi mengenai DNA barcoding pada ikan medaka sangat penting dalam pemetaan sumberdaya genetik untuk keperluan konservasi. Berdasarkan uraian di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. Apakah ada lebih dari satu spesies ikan medaka genus *Oryzias* yang ditemukan di Danau Towuti?

2. Apakah ada variasi genetik interspesies ikan medaka genus *Oryzias* di Danau Towuti berdasarkan DNA barcoding?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengidentifikasi spesies ikan medaka genus *Oryzias* yang ditemukan di Danau Towuti
2. Menganalisis variasi genetik interspesies ikan medaka genus *Oryzias* di Danau Towuti berdasarkan DNA barcoding

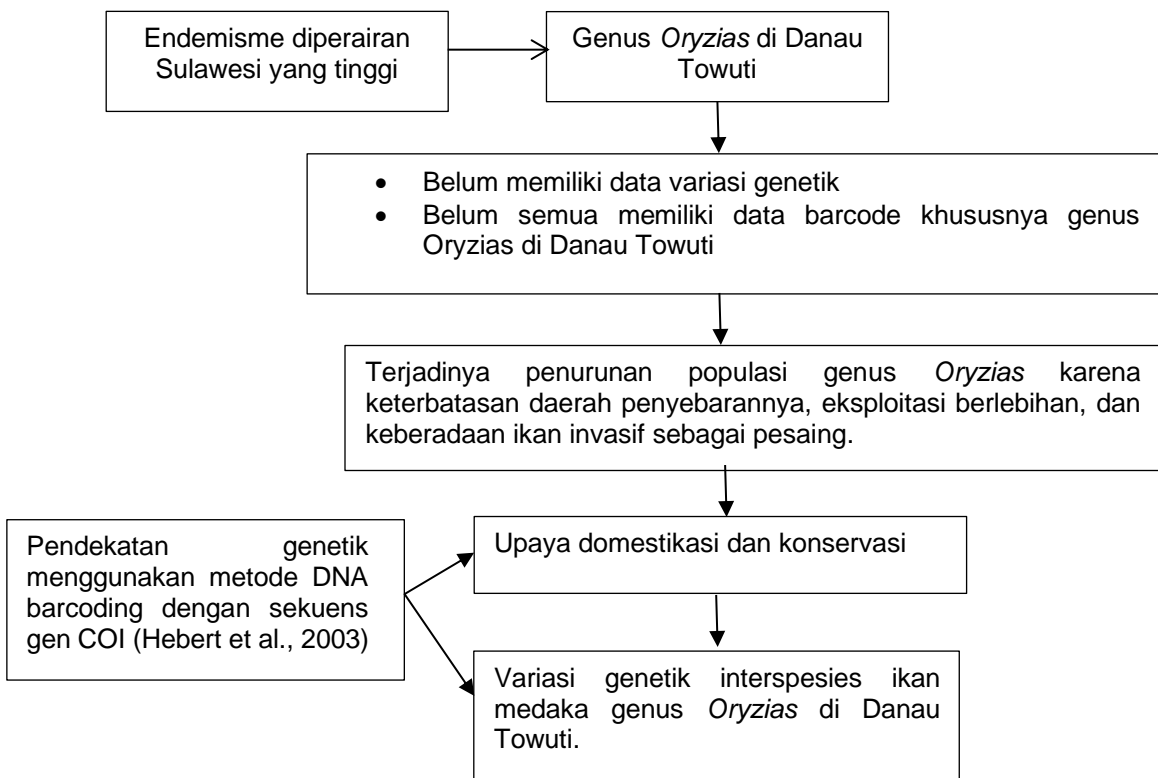
1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat berupa:

1. Informasi variasi morfologi dan genetik interspesies ikan medaka dari Danau Towuti dapat menjadi pertimbangan untuk konservasi genetik.
2. Memberikan kontribusi untuk menyusun *DNA barcode library* khususnya spesies *O. profundicola* dan *O. loxolepis* dari Danau Towuti.

1.5 Kerangka Konseptual

Berdasarkan uraian diatas, maka adapun kerangka konseptual dalam penelitian ini adalah:



Gambar 1. Kerangka konseptual

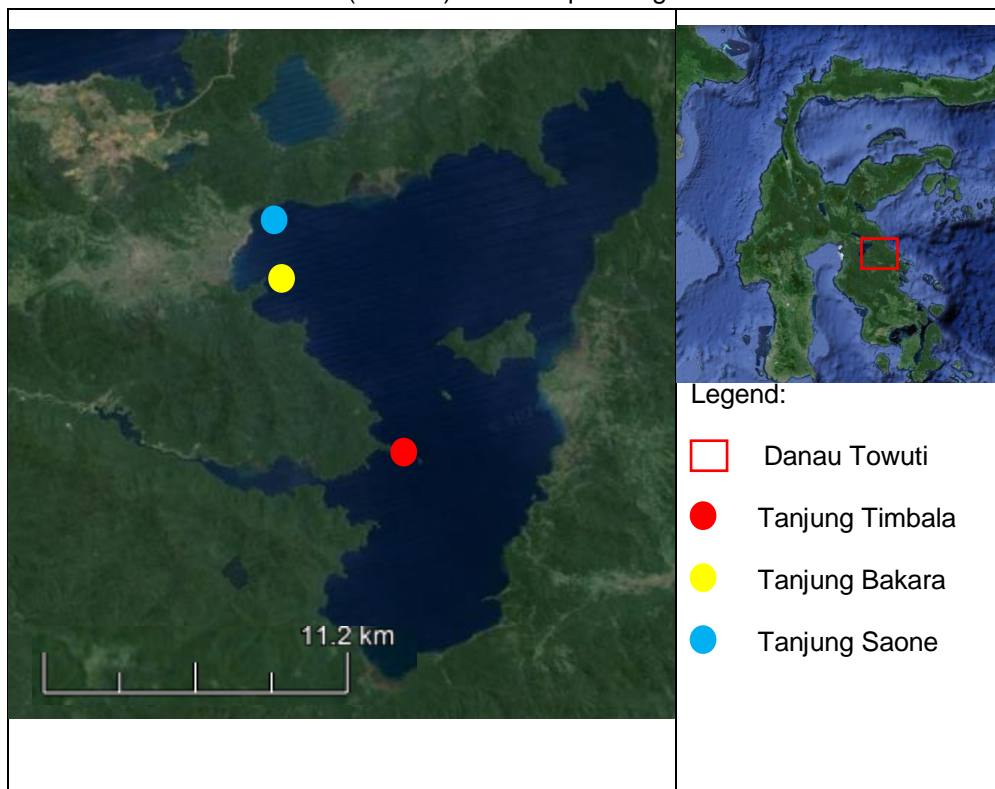
BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2023 – April 2024. Pengambilan sampel ikan medaka yaitu di Danau Towuti Kecamatan Towuti, Kabupaten Luwu Timur, Provinsi Sulawesi Selatan. Terdapat 3 stasiun penelitian di Danau Towuti yaitu 1. Tanjung Timbala (2'42.5720'S 121'25.7850'E), 2. Tanjung Bakara (2'41.3470'S 121'25.5330'E), 3. Tanjung Saone (2'38.5840'S 121'27.7510'E) (Gambar 2).

Identifikasi meristik dan morfometrik dilakukan di Pusat Studi Medaka, LPPM UNHAS. Selanjutnya proses ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, dan elektroforesis dikirim ke laboratorium Genetika dan Pemuliaan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada (Yogyakarta), sedangkan produk PCR (*amplicon*) dikirim ke *First Base* PT Genetika *Science* Indonesia (Jakarta) untuk sequencing secara *bi-direction*.



Gambar 2. Lokasi pengambilan sampel ikan medaka di Danau Towuti, Luwu Timur, Sulawesi Selatan

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk pengambilan sampel antara lain jaring ikan, *coolbox*, akuarium pipih, spidol, dan kamera. Alat yang digunakan untuk pengukuran morfometrik yaitu *digital caliper*, sedangkan untuk pengukuran meristik yaitu *loop* dan peniti. Dan alat yang digunakan dalam proses isolasi DNA, amplifikasi DNA serta elektroforesis antara lain *dissecting kit*, *microcentrifuge tube*, *freezer*, mikropipet berukuran 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, dan 100-1000 μ l, *centrifuge*, inkubator, autoklaf, bunsen, *vortex mixer*, *thermocycler* (Biorad), timbangan digital, microwave, *tray* dan sisir, *electrophoresis chamber*, dan *UV transluminator* dengan *gel documentation system*, dan komputer.

2.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya: 12 ekor ikan medaka, alkohol 96%, parafilm, dan botol sampel. Bahan lain yang digunakan yaitu untuk proses isolasi DNA, amplifikasi DNA, dan elektroforesis adalah: etanol 70%, etanol absolut 96%, *Qiagen DNeasy blood and tissue kit*, primer universal gen COI yaitu FishF1 dan FishR1, buffer Tris-EDTA, MyTaq HS Red Mix PCR kit (Bioline), MgCl₂ (KAPA Biosystem), aquades steril, agarose, buffer Tris-Acetate-EDTA, *FloroSafe*, dan DNA ladder (Bioline).

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Danau Towuti dengan tiga stasiun yaitu Tanjung Timbala (1T1,1T2,1T3,1T4), Tanjung Bakara (2B1,2B2,2B3,2B4,2B5), Tanjung Saone (3S1,3S2,3S3) dengan 12 sampel yang dikelompokkan dalam genus *Oryzias*. Sampel ikan medaka yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel ikan medaka yang ditangkap oleh nelayan dengan menggunakan jaring ikan, kemudian didokumentasikan dan identifikasi berdasarkan Parenti (2008); Kobayashi et al. (2023); dan web *fishbase* secara online (<https://www.fishbase.se/search.php>), sebelum diawetkan menggunakan alkohol 96% dalam botol sampel per-ekor. Pengamatan parameter lingkungan yang dilakukan adalah suhu, pH, dan oksigen terlarut (DO).

2.3.2 Identifikasi Berdasarkan Karakter Morfologi

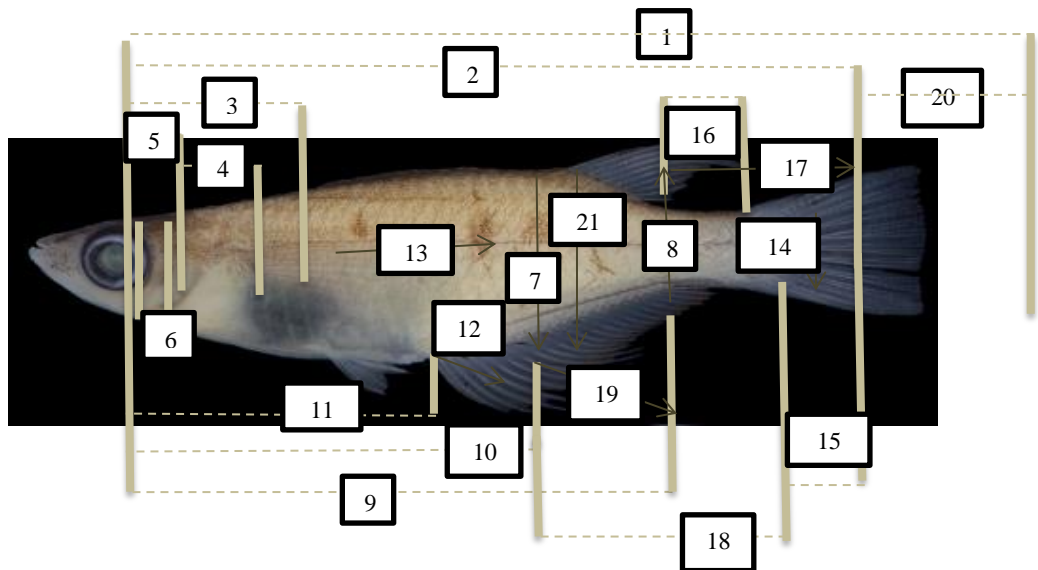
Menurut Caillet et al., (1986), Karakter morfologi meliputi meristik dan morfometrik. Pengukuran meristik merupakan karakter yang berkaitan dengan bagian tubuh yang dapat dihitung, misalnya ruas tulang belakang, barisan sisik, jari-jari lemah dan duri sirip (Hossain et al., 2009). Pengukuran morfometrik dilakukan berdasarkan morfometrik atau bagian dari morfologi organisme air, baik ukuran maupun bentuk dengan mengukur jarak tubuh bagian eksternal tertentu secara

kuantitatif (Maurya et al., 2018). Pada penelitian ini, dilakukan identifikasi berdasarkan pengukuran 4 karakter meristik dan 21 karakter morfometrik dengan mengacu kepada Parenti (2008), dan Kobayashi et al., (2023). Pengukuran meristik diamati menggunakan kaca pembesar (*loops*), dan pengukuran morfometrik menggunakan *digital caliper* dengan ketelitian 0,01 mm. Definisi dari masing-masing karakter meristik dan morfometrik yang diukur tersaji dalam Tabel 1. Karakter meristik yang dihitung adalah jumlah jari-jari sirip dorsal, jari-jari sirip anal, jari-jari sirip pectoral, dan jari-jari sirip pelvic. Berikut pengukuran karakter meristik dan morfometrik pada Tabel 1 dan Gambar 3.

Tabel 1. Pengukuran 4 karakter meristik dan 21 karakter morfometrik pada ikan medaka

| No | Pengukuran | Keterangan |
|--------------------|------------------------------------|---|
| Meristik | | |
| 1 | Jari-jari sirip dorsal | Jumlah jari-jari sirip dorsal |
| 2 | Jari-jari sirip anal | Jumlah jari-jari sirip anal |
| 3 | Jari-jari sirip pectoral | Jumlah jari-jari pectoral |
| 4 | Jari-jari sirip pelvic | Jumlah jari-jari pelvic |
| Morfometrik | | |
| 1 | Panjang total | Jarak garis lurus antara ujung kepala yang terdepan ujung sirip ekor yang paling belakang |
| 2 | Panjang standar | Jarak ujung mulut paling depan sampai vertebral column |
| 3 | Panjang kepala | Jarak ujung kepala yang terdepan sampai bagian yang terbelang kecelah tutup insang |
| 4 | Diameter mata | Panjang garis tengah bola mata setengah tinggi dari rongga mata |
| 5 | Panjang moncong | Jarak dari ujung depan mulut sampai tepi depan tulang pelindung mata |
| 6 | Panjang rahang atas | Jarak dari ujung rahang atas sampai posterior mulut |
| 7 | Lebar tubuh di sirip anal origin | Garis lurus vertikal diukur dari bagian anterior sirip dorsal kearah ventral |
| 8 | Lebar tubuh di sirip dorsal origin | Garis lurus vertikal diukur dari bagian anterior sirip anal kearah dorsal |
| 9 | Panjang sirip predorsal | Jarak dari ujung mulut bagian depan sampai ujung depan dasar sirip dorsal |
| 10 | Panjang sirip preanal | Jarak dari ujung mulut bagian depan sampai ujung depan dasar sirip anal |
| 11 | Panjang sirip prepelvic | Jarak dari ujung mulut bagian depan sampai ujung depan dasar sirip pelvic |
| 12 | Panjang sirip pelvic | Jarak antara pangkal sirip hingga ujung terpanjang dari sirip pelvic |
| 13 | Panjang sirip pectoral | Jarak antara pangkal sirip hingga ujung terpanjang dari sirip pectoral |
| 14 | Tinggi caudal peduncle | Tinggi batang ekor |
| 15 | Panjang caudal peduncle | Jarak miring antara ujung dasar sirip anal sampai pangkal jari-jari tengah sirip caudal |
| 16 | Panjang dasar sirip dorsal | Jarak garis yang diukur dari pangkal dasar sirip dada sampai keujungnya |
| 17 | Panjang sirip dorsal | Jarak antara pangkal sirip hingga ujung terpanjang dari sirip dorsal |
| 18 | Panjang dasar sirip anal | Jarak garis yang diukur dari pangkal dasar sirip anal sampai keujungnya |
| 19 | Panjang sirip anal | Jarak antara pangkal sirip hingga ujung terpanjang dari sirip anal |
| 20 | Panjang sirip ekor | Jarak antara pangkal sirip hingga ujung terpanjang dari sirip ekor |
| 21 | Lebar badan | Jarak antara badan yang terlebar |

(Sumber: dimodifikasi dari Parenti, 2008; Kobayashi et al., 2023)



Gambar 3. Pengukuran 21 karakter morfometrik ikan medaka mengikuti penomoran pada Tabel 1.

2.3.3 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengambil jaringan otot ikan medaka yang diawetkan dalam alkohol 96% untuk dilakukan ekstraksi DNA berdasarkan protokol kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, 2023). Potongan daging diambil sebanyak 20 mg fillet dari bagian tubuh sampel yang telah dilakukan preservasi dalam etanol absolut 96%, fillet dihancurkan memakai gunting steril yang telah direndam dengan etanol 70% dan disterilisasi dengan api bunsen. Setelah itu, fillet dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml dan ditambahkan 180 μL larutan buffer ATL serta 20 μL proteinase K 600 mAU/mL, divortex hingga homogen dan dispin-down selama 20 detik.

Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 12 jam sampai larutan terlihat jernih. Pada tiga jam pertama inkubasi, sampel dibolak-balik setiap 30 menit. Setelah itu sampel divortex dan dipulse menggunakan centrifuge dan ditambah 200 μL buffer AL dan 200 μL etanol absolut dingin serta divortex dan dipulse menggunakan centrifuge. Campuran larutan kemudian dimasukkan ke dalam *spin column* dan ditempatkan pada *collection tube* ukuran 2 ml serta disentrifugasi 8.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya cairan yang terkumpul dalam *collection tube* dibuang. *Spin column* ditempatkan pada *collection tube* yang baru dan ditambahkan 500 μL Buffer AW-1 dan disentrifugasi 8.000 rpm selama 1 menit, kemudian cairan dalam *collection tube* dibuang. Setelah itu *spin column* yang sudah ditempatkan di *collection tube* baru ditambahkan buffer AW-2 sebanyak 500 μL dan disentrifugasi 13.500 rpm selama 3 menit. Selanjutnya cairan dalam *collection tube* dibuang. *Spin column* ditempatkan pada *microtube* 1,5 ml yang baru dan kemudian diinkubasi 50°C selama 2 menit. Tube ditambahkan 250 μL buffer AE dan diinkubasi pada suhu ruang

selama 2 menit. Setelah diinkubasi, sampel disentrifugasi 8.000 rpm selama 1 menit. *Spin column* kemudian dibuang dan tube disimpan sebagai hasil isolasi DNA. Sampel DNA disimpan pada freezer dengan suhu -20°C untuk menjaga kestabilan DNA.

2.3.4 Amplifikasi DNA

Hasil isolasi DNA diamplifikasi menggunakan primer COI dapat dilihat pada Tabel 3. Amplifikasi PCR yang digunakan sebanyak 25 μL reaksi yang terdiri dari 12,5 μL Ready Mix PCR (MyTaq™ HS Red Mix Biorline); 1,5 μM tiap primer; 1 mM MgCl_2 ; 5,5 μL ddH₂O steril; dan 5 μL DNA. Seluruh larutan tersebut dicampur dalam sebuah PCR *tube* untuk masing-masing sampel dan dimasukkan ke dalam *Thermocycler* dengan siklus yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaturan siklus amplifikasi sampel DNA ikan medaka

| No | Reaksi | Suhu | Waktu | Siklus |
|----|-------------------------|------|----------|--------|
| 1 | <i>Pre-denaturation</i> | 95°C | 1 menit | 1 |
| 2 | <i>Denaturation</i> | 95°C | 15 detik | } 35 |
| 3 | <i>Annealing</i> | 50°C | 30 detik | |
| 4 | <i>Extension</i> | 72°C | 30 detik | |
| 5 | <i>Postextension</i> | 72°C | 5 menit | 1 |
| 6 | <i>Hold</i> | 4°C | ∞ | |

(Sumber: Arisuryanti et al., 2020).

Adapun primer gen COI yang digunakan adalah F1 dan R1 disajikan pada tabel berikut:

Tabel 3. Primer COI yang digunakan pada amplifikasi ikan medaka

| Primer | Sekuens Nukleotida |
|--------|------------------------------------|
| F1 | (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') |
| R1 | (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') |

(Sumber: Ward, et al., 2005).

2.3.5 Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 1% (Surzycki, 2012). Pembuatan gel dilakukan dengan menimbang agarosa sebanyak 0,2 gram, kemudian dilarutkan dengan 20 ml buffer TAE 1x. Larutan kemudian dipanaskan menggunakan *microwave* hingga larutan menjadi bening. Pada larutan tersebut *FloroSafe* sebanyak 2 μL ditambahkan untuk proses staining pada chamber. Sisir dipasang pada tray elektroforesis untuk mencetak well (sumur) sebelum gel elektroforesis menjadi padat akibat didiamkan pada suhu ruangan.

Gel kemudian dimasukkan ke dalam tangki elektroforator yang berisi TAE 1x. Pada sumuran pertama dimasukkan *Ladder* DNA yang berfungsi sebagai marker. Setelah itu, sumuran diisi dengan sampel DNA yang telah diamplifikasi sebanyak 2 μ L. Selanjutnya tangki elektroforator ditutup dan mesin elektroforesis dinyalakan dengan tegangan 50 volt selama 17-20 menit. Setelah itu, gel diangkat dari tangki elektroforator dan diamati dengan *UV transluminator* dan *gel documentation system* untuk melihat pita-pita (*band*) DNA. Hasil yang diperoleh kemudian didokumentasikan. Sampel hasil amplifikasi kemudian dikirimkan ke PT. Genetika Science Indonesia (Jakarta) untuk dilakukan proses sekuensing.

2.4 Analisis Data

Hasil sekuensing dua arah yaitu *forward* dan *reverse* dianalisis menggunakan program Bioedit untuk mendapatkan konsensus sekuens nukleotida. Hasil konsensus sekuens disejajarkan dengan yang tersedia di web NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) secara online (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dengan *Nucleotide BLAST* dan *BOLD Identification Engine* pada web BOLDSYSTEMS (https://v3.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine). Hasil analisis secara online tersebut digunakan untuk memprediksi spesies ikan medaka dengan melihat *query cover* dan *identity* yang dapat menunjukkan kemiripan sampel dengan data yang ada di GenBank dan BOLD. Proses *alignment* dilakukan menggunakan *software* MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) untuk mengkonstruksi filogenetik dengan metode *Neighbour-Joining*.

Data sekuens sampel kemudian dihitung estimasi jarak genetik (*Genetic Distance*) interspesies menggunakan *Pairwise Distance* dengan model Kimura 2-parameter dan diekspor menjadi format MEGA“.meg”. Selanjutnya variasi genetik interspesies maupun intraspesies dari masing-masing spesies ikan medaka dianalisis dengan menggunakan program DnaSP 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017). Data variasi genetik yang diamati yaitu jumlah haplotipe, keragaman haplotipe, keragaman nukleotida, dan situs polimorfisme. Hubungan antar haplotipe interspesies masing-masing spesies ikan medaka dianalisis dengan menggunakan *Median Joining Network* pada program *Network* ver.10.1.