

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Ikan kerapu termasuk dalam famili Epinephelidae (Moazzam & Osmany, 2023), merupakan predator puncak yang memangsa berbagai jenis ikan kecil, plankton hewani (zooplankton), udang, cumi-cumi dan hewan-hewan kecil lainnya. Saat masih muda, ikan ini mendiami perairan dangkal seperti pada ekosistem estuari, mangrove, dan lamun (Farmer & Ault, 2011; Nadiarti et al., 2015; Rodemann et al., 2023) kemudian saat dewasa akan menyelam lebih dalam. Kehadiran ikan kerapu dapat berperan dalam menjaga keseimbangan ekosistem laut (Sadovy de Mitcheson et al., 2013; Sadovy de Mitcheson et al., 2020).

Selain memiliki nilai ekologi, ikan kerapu juga memiliki nilai ekonomis yang tinggi karena banyak diminati oleh konsumen. Hal ini membuatnya menjadi favorit di pasar lokal maupun internasional. Permintaan pasar yang tinggi telah mendorong peningkatan upaya penangkapan ikan kerapu (Sadovy de Mitcheson et al., 2020; Ugarković & Dragičević, 2023). Kabupaten Pangkep, yang terletak di Sulawesi Selatan merupakan salah satu sentra perdagangan ikan kerapu di Sulawesi Selatan. Ikan-ikan yang diperdagangkan berasal dari pulau-pulau di perairan Selat Makassar seperti Pulau Samatellu, Pulau Pala, Pulau Sabangko, dan Pulau Salemo.

Genus *Plectropomus* merupakan salah satu komoditas utama dalam perdagangan konsumsi global, terutama di wilayah Indo-Pasifik yang menjadi pusat distribusinya (Leigh et al., 2014). Permintaan yang tinggi, terutama dari pasar Asia seperti China, Hong Kong, dan Singapura (Andamari et al., 2007; Hidayani et al., 2022), mendorong kegiatan ekspor terutama dalam keadaan hidup karena lebih menguntungkan (Sadovy de Mitcheson et al., 2013). Bagi masyarakat Hong Kong, warna merah pada tubuh *Plectropomus* dipercaya membawa keberuntungan. *Plectropomus leopardus* merupakan salah satu spesies dari genus *Plectropomus* yang banyak diekspor saat menjelang perayaan tahun baru China (imlek) (Khasanah et al., 2019) sekitar bulan Desember-Februari (Sadovy, 2000; Soemarjati et al., 2015). Ukuran tubuhnya yang besar juga menjadi salah satu alasan kerapu ini banyak diminati, dimana ukurannya dapat mencapai hingga 2,5 meter (Heemstra & Randall, 1993).

Tingginya permintaan ikan kerapu dari tahun ke tahun, mendorong terjadinya aktivitas penangkapan berlebihan (*overfishing*) (Herdiana et al., 2024; Khasanah et al., 2019), *illegal fishing*, penangkapan tidak ramah lingkungan (Bailey & Sumaila, 2015; Khasanah et al., 2020; Nadiarti. et al., 2021; Sadovy de Mitcheson et al., 2013), dan eksploitasi juvenil (Achmad et al., 2023; Gobert et al., 2005; Kadir et al., 2023) yang telah mengancam keberlangsungan populasi ikan kerapu. Dampaknya, terjadi penurunan jumlah dan variasi spesies ikan kerapu (Hughes et al., 2020; Morris et al., 2000). Sementara, identifikasi spesies ikan kerapu juga menjadi tantangan karena variasi morfologi yang kompleks, terutama saat fase juvenil (Ariyanti & Farajallah, 2019; Fadli et al., 2024).

Fase juvenil merupakan tahap awal dalam siklus kehidupan, transformasi dari larva ke bentuk yang lebih mirip dewasa (Giudice et al., 2009). Umumnya, juvenil kerapu berukuran sekitar 10-30 cm atau $<1/3$ dari panjang maksimum dari tiap spesies (Kadir et al., 2023; Nagelkerken & van der Velde, 2002). Dimana panjang maksimum masing-masing spesies mengacu pada Froese & Pauly (2024). Sampai saat ini, data hasil inventarisasi yang tersedia menunjukkan bahwa ikan kerapu banyak diperdagangkan pada fase juvenil (Alias, 2023; Kadir et al., 2023; Rismayani, 2023), sementara juvenil merupakan fase dimana ikan belum layak tangkap atau belum matang gonad. Selain itu, spesies yang masih berada pada fase juvenil relatif sulit untuk diidentifikasi, misalnya spesies *Plectropomus leopardus* dan *P. maculatus* sulit diidentifikasi karena kemiripan fenotip yang tinggi (Frisch & Hobbs, 2007; Harrison et al., 2017; He et al., 2018).

Untuk mengidentifikasi spesies ikan kerapu, dapat dilakukan dengan pengukuran morfologi (Darwin et al., 2020). Identifikasi morfologi biasanya didasarkan pada warna, variasi bentuk, dan pola tubuh. Pengukuran morfologi terdiri pengukuran morfometrik dan meristik. Morfometrik dapat didefinisikan sebagai metode untuk mendeskripsikan bentuk tubuh. Metode ini banyak digunakan dalam studi taksonomi dengan mengukur panjang atau jarak antar ciri-ciri fisik (Nurdalila et al., 2015). Perhitungan meristik dapat dicirikan sebagai jumlah bagian luar tubuh ikan seperti perhitungan jumlah jari-jari sirip dan jumlah sisik yang dapat digunakan sebagai pembanding dalam penentuan spesies ikan dalam satu genus (Soliman et al., 2018). Adanya data morfologi dapat menjadi informasi dasar untuk mengidentifikasi ciri dan nama spesies.

Analisis morfometrik dan meristik secara tradisional telah digunakan sebagai alat untuk mengidentifikasi spesies (Greenfield & Randall, 2011; Xing et al., 2011). Namun, adanya perubahan signifikan sepanjang siklus hidup sering menyebabkan adanya kesalahan identifikasi pada spesies (Ding et al., 2006; Heemstra & Randall, 1993). Kemiripan morfologi terutama pada fase juvenil menunjukkan bahwa beberapa spesies kerapu yang berbeda mungkin masuk dalam deskripsi spesies yang sama (Zhu & Yue, 2008).

DNA barcoding juga digunakan untuk mengatasi kesalahan identifikasi morfologi (Hebert et al., 2003; Ward et al., 2005) seperti kesalahan identifikasi pada tahap larva maupun dewasa (Sachithanandam et al., 2012) dengan akurasi keakuratan mendekati 100%. Analisis DNA barcoding telah banyak diterapkan dalam identifikasi spesies (Macaulay et al., 2005; Zhu & Yue, 2008; Zhuang et al., 2009). Gen yang banyak digunakan pada DNA barcoding untuk identifikasi ikan kerapu adalah gen COI (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) (Ariyanti & Farajallah, 2019; Gobert et al., 2005). Hasil dari DNA barcoding ini akan dibuat pohon filogenetik untuk melihat dan memodelkan kedekatan antar spesies organisme (Makarenkov et al., 2006). Pada suatu filogenetik, terdapat kelompok organisme yang memiliki kesamaan karakter atau ciri sehingga dianggap memiliki hubungan kekerabatan yang dekat (Ding et al., 2006; Koch et al., 2021). Hasil dari DNA barcoding juga dapat digunakan untuk melihat keragaman genetik dalam bentuk *haplotype network* (Leigh & Bryant, 2015). Dengan menggabungkan antara karakter morfologi dan DNA

barcoding diharapkan dapat memberikan data hasil identifikasi secara akurat, membantu mengidentifikasi biogeografi, dan memudahkan dalam membuat pembatasan kelompok stok ikan (Cuéllar-Pinzón et al., 2016; Fadli et al., 2023).

Penelitian mengenai DNA barcoding dan karakter morfologi dari Kabupaten Pangkep khususnya perairan Selat Makassar hingga saat ini masih terbatas. Meskipun terdapat beberapa penelitian terdahulu mengenai ikan kerapu di Selat Makassar, namun masih terfokus pada inventarisasi dan keragaman spesies berbasis fase hidup (Alias, 2023; Kadir et al., 2023; Rismayani, 2023) analisis morfologi (Kadir et al., 2022) dan analisis genetik (Parenrengi, 2006; Parenrengi & Tenriulo, 2008) secara terpisah. Beberapa hasil studi lain telah menyoroti pentingnya pendekatan gabungan antara DNA barcoding dan analisis morfometrik-meristik dalam identifikasi spesies dengan tingkat akurasi yang lebih tinggi (Madduppa et al., 2020; Milam et al., 2020). Namun data DNA yang tersedia dari Selat Makassar masih minim, dan penelitian masih terbatas pada spesies tertentu saja (Parenrengi, 2006; Parenrengi & Tenriulo, 2008) dan belum merepresentasikan populasi ikan kerapu terutama pada fase juvenil dari perairan Selat Makassar.

Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilakukan dengan memanfaatkan teknologi biologi molekuler dan pendekatan morfologi. Dengan adanya penelitian ini, diharapkan dapat memberikan kontribusi yang signifikan dalam pemahaman dan konservasi ikan kerapu di Selat Makassar serta menyediakan landasan bagi penelitian lebih lanjut dalam bidang ini.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dipaparkan di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana variasi morfometrik-meristik dari spesies *Plectropomus leopardus* dan *P. oligacanthus* yang tertangkap pada fase juvenil dari Kabupaten Pangkep?
2. Bagaimana hubungan kekerabatan dan keragaman genetik *Plectropomus leopardus* dan *P. oligacanthus* yang tertangkap pada fase juvenil dari Kabupaten Pangkep dengan kerapu sejenis dari GenBank?
3. Bagaimana kesesuaian identifikasi secara morfologi dengan identifikasi berdasarkan DNA barcoding terhadap *Plectropomus leopardus* dan *P. oligacanthus* yang tertangkap pada fase juvenil dari Kabupaten Pangkep?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menganalisis variasi morfometrik-meristik dari spesies *Plectropomus leopardus* dan *P. oligacanthus* yang tertangkap pada fase juvenil dari Kabupaten Pangkep.
2. Menganalisis hubungan kekerabatan dan keragaman genetik *Plectropomus leopardus* dan *P. oligacanthus* yang tertangkap pada fase juvenil dari Kabupaten Pangkep dengan kerapu sejenis dari GenBank.

3. Menganalisis kesesuaian identifikasi secara morfologi dengan identifikasi berdasarkan DNA barcoding terhadap *Plectropomus leopardus* dan *P. oligacanthus* yang tertangkap pada fase juvenil dari Kabupaten Pangkep.

1.4. Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi mengenai spesies dari genus *Plectropomus* secara lebih akurat dan berkontribusi secara signifikan dalam pembatasan ukuran layak tangkap sebagai upaya untuk mendukung perikanan kerapu yang berkelanjutan. Selain itu, juga dapat digunakan sebagai referensi database yang berguna dalam melakukan identifikasi spesies kerapu yang ditemukan di Kabupaten Pangkep tepatnya perairan Selat Makassar.

1.5. Teori

1.5.1. Ikan Kerapu (Grouper)

Klasifikasi ikan kerapu menurut Froese & Pauly (2024) sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Infraphylum	: Gnathostomata
Parvphylum	: Osteichthyes
Gigaclass	: Actinopterygii
Superclass	: Actinopteri
Class	: Teleostei
Order	: Perciformes
Suborder	: Percoidei
Family	: Epinephelidae
Genus	: <i>Plectropomus</i>

Ikan kerapu (genus *Plectropomus*) memiliki bentuk tubuh yang ramping, gigi lancip dan kuat pada rahang atas dan bawahnya, serta mulut yang lebar. Memiliki sirip ekor berbentuk bundar, sirip punggung tunggal dan memanjang serta sirip perut yang berada di bawah sirip dada. Ikan kerapu dapat hidup dari ukuran 30 cm hingga 2,5 meter (Heemstra & Randall, 1993) dan berat mencapai 400 kg apabila telah berada pada fase dewasa (Kordi, 2009).

Kerapu dapat diidentifikasi dengan melihat morfologi ikan antara lain bentuk operkulum, corak dan warna tubuhnya (Ding et al., 2006). Genus *Plectropomus* memiliki pola yang mencolok dengan bintik-bintik cerah, garis-garis yang bervariasi. Secara umum, kecerahan (kemerahan) kulit meningkat seiring dengan peningkatan kedalaman air, tampaknya tidak mudah berubah dalam jangka waktu singkat. Beberapa spesies dari genus *Plectropomus*, antara lain *P. leopardus*, *P. laevis*, *P. areolatus*, *P. maculatus*, *P. oligacanthus*, *P. punctatus*, dan *P. pessuliferus*.



Gambar 1. Spesies dari genus *Plectropomus*. (a) *Plectropomus leopardus*, (b) *P. laevis*, (c) *P. areolatus*, (d) *P. maculatus*, (e) *P. oligacanthus*, (f) *P. punctatus*, (g) *P. pessuliferus* (Sumber: Frisch et al. (2016)).

Ikan kerapu dapat hidup dan berkembang biak di perairan terumbu karang dengan temperatur 24-31°C, salinitas 30-33 ppt, oksigen terlarut >3,5 ppm dan pH 7,8-8. Ikan kerapu muda hidup pada kedalaman 0,5-3,0 m, kemudian berpindah pada kedalaman 7 sampai 40 m saat dewasa. Genus *Plectropomus* biasanya hidup pada kedalaman 3–30 m, meskipun telah tercatat ditemukan pada kedalaman hingga 150 m (Heemstra & Randall, 1993). *Plectropomus leopardus* ditemukan di kedalaman 30–200 m, sedangkan *P. maculatus* dan *P. laevis* ditemukan di terumbu karang, pesisir dan pantai (Frisch et al., 2016). Spesies dari genus *Plectropomus* banyak ditemukan di wilayah Indo-Pasifik dan Laut Merah. Dua spesies (*P. laevis*, *P. areolatus*) tersebar luas di Indo-Pasifik Barat (*P. areolatus* juga ditemukan di Laut Merah), tiga spesies (*P. leopardus*, *P. maculatus*, dan *P. oligacanthus*) terbatas pada wilayah Nusantara, dua spesies (*P. pessuliferus* dan *P. punctatus*) hanya ditemukan di Samudra Hindia (Frisch et al., 2016; Heemstra & Randall, 1993).

1.5.2. Karakteristik Morfometrik dan Meristik

Morfometrik dapat didefinisikan sebagai metode untuk mendeskripsikan bentuk tubuh. Metode ini banyak digunakan dalam studi taksonomi dengan melihat pada komponen yang dapat diukur (yaitu mengukur panjang atau jarak antar ciri-ciri fisik atau landmark) anatomi ikan seperti ukuran bagian tubuh dan sirip dan rasio panjang tubuh (Nurdalila et al., 2015). Hasil pengukuran morfometrik digunakan sebagai ciri taksonomik untuk mengidentifikasi jenis ikan. Tiap jenis ikan memiliki ukuran yang berbeda-beda. Hal ini dipengaruhi oleh faktor umur, jenis kelamin, dan faktor lingkungan misalnya kesediaan makanan, dan suhu.

Meristik dapat dicirikan sebagai jumlah bagian luar tubuh ikan seperti perhitungan jumlah jari sirip, jumlah sisik, yang dipakai sebagai dasar pembandingan dalam penentuan spesies ikan dalam satu genus (Soliman et al., 2018). Karakter meristik dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk mengidentifikasi ikan. Dengan sifat-sifat meristik dapat diketahui kemantapan sifat suatu spesies tertentu, yang mungkin berubah karena seleksi habitat atau tekanan-tekanan pengelolaan sumberdaya perairan itu.

1.5.3. DNA Barcoding

DNA merupakan unsur kimia utama yang mengandung informasi genetik makhluk hidup dari satu generasi ke generasi selanjutnya. DNA terdapat pada inti sel, mitokondria pada hewan dan juga terdapat kloroplas tumbuhan (Rose, 2019). DNA mitokondria hanya mewariskan sifat-sifat yang berasal dari ibu, sedangkan DNA nukleus mewariskan sifat dari kedua orang tuanya (Munasinghe & Ågren, 2023).

DNA *barcoding* merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi organisme dengan menggunakan potongan gen tertentu. Teknik ini pertama kali diterapkan oleh Hebert et al., (2003) dan telah teruji kemampuannya untuk membedakan organisme pada tingkat spesies. DNA barcoding dapat diaplikasikan pada semua tingkatan stadia dari telur hingga dewasa (Rahayu & Jannah, 2019). Teknik DNA barcoding melibatkan pengambilan sekuens DNA pendek dari satu atau beberapa gen. Salah satu gen yang banyak digunakan dalam DNA barcoding adalah gen COI (*Cytochrome Oxidase Subunit I*). Gen ini terdapat pada mitokondria, dan memiliki panjang relatif stabil sehingga sangat cocok digunakan untuk mengidentifikasi organisme. DNA barcoding menggunakan gen COI terbukti efektif untuk mengidentifikasi spesies baik antar interspesies dan intraspesies (Hebert et al., 2003; Sachithanandam et al., 2022; Ward et al., 2005).

Sekuen barcoding yang diperoleh dari organisme yang tidak diketahui spesiesnya akan dibandingkan dengan sekuen barcoding dari spesies yang telah dikenali dalam database referensi (Genbank dan BOLD). Apabila terdapat kesamaan yang signifikan antara sekuens DNA dan basis data referensi, maka organisme tersebut dapat diidentifikasi (Wei et al., 2002). Penanda DNA yang sesuai dipilih dengan memperhatikan rendahnya variasi intraspesifik (kurang dari 2%) dan tingginya variabilitas di antara spesies. Selain itu, penanda harus berlaku universal

atau dapat digunakan di taksa yang berbeda-beda dan memiliki tingkat keberhasilan amplifikasi DNA yang tinggi (Amiteye, 2021).

1.5.4. Pohon Filogenetik

Pohon filogenetik merupakan suatu pendekatan yang digunakan untuk melihat dan memodelkan kedekatan antar spesies organisme (Makarenkov et al., 2006). Pada suatu filogenetik terdapat kelompok organisme yang memiliki kesamaan karakter atau ciri sehingga dianggap memiliki hubungan kekerabatan yang dekat (Ding et al., 2006; Koch et al., 2021).

Adanya filogenetik juga dapat menunjukkan adanya jarak evolusi antar organisme. Penyusunan filogenetik berdasarkan data urutan nukleotida untuk menyusun hubungan kekerabatan serta struktur evolusi suatu taksa. Metode untuk rekonstruksi pohon filogenetik (Lemey et al., 2009) antara lain: (a) Neighbor joining (NJ), dimana percabangan pohon filogenetik dibuat berdasarkan jarak genetik antara sepasang sekuen dan umumnya digunakan untuk untuk membandingkan sampel yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat; (b) *Maximum likelihood* (ML), dimana percabangan filogenetik dibuat berdasarkan jarak genetik dari sekuens, laju mutasi, dan model evolusi tiap-tiap nukleotida; (c) Bayesin method, dimana metode ini juga mengaplikasikan konsep ML, dan memakai distribusi dari banyak pohon untuk dibuat. Selain itu, pada metode ini dilakukan perhitungan *posterior probability*, untuk memperkirakan seberapa percaya kita terhadap percabangan sebuah pohon yang sekaligus menunjukkan *evolutionary relationship* dari sampel.

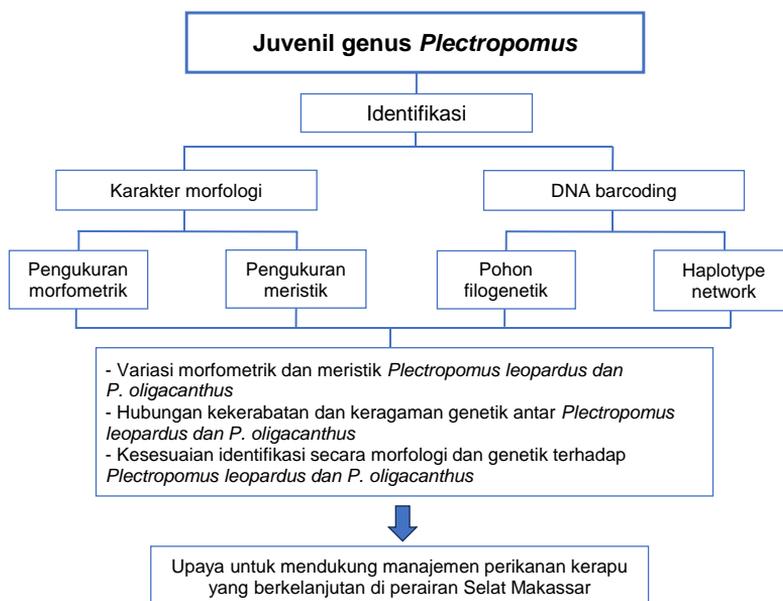
1.5.5. Jaringan Haplotipe

Jaringan haplotipe merupakan suatu pendekatan untuk menggambarkan hubungan evolusioner antara berbagai varian genetik (haplotipe) dalam suatu populasi. Dengan kata lain, jaringan haplotipe ini digunakan untuk memvisualisasikan hubungan kekerabatan pada tingkat spesies yang sama (*intraspesifik*) (Leigh & Bryant, 2015). Pendekatan ini lebih efektif dibandingkan dengan pohon filogenetik dalam memperjelas hubungan antara spesimen yang dan memvisualisasikan perbedaan dalam data spesimen DNA dan faktor lain, seperti asal wilayah (Posada & Crandall, 2001; Teacher & Griffiths, 2011).

Beberapa software yang dapat digunakan untuk membuat jaringan haplotipe antara lain: (a) software arlequin (Schneider et al., 2000) untuk mengidentifikasi haplotipe dan menghasilkan jarak koneksi antar haplotipe; (b) software TCS (Clement et al., 2000) yang dapat menghasilkan koneksi jaringan dari data sekuens dan menampilkan jaringan dalam jendela tampilan. Namun, jaringan yang dihasilkan tidak selalu mudah dipahami karena tidak adanya fungsi tata letak otomatis sehingga pengguna perlu memindahkannya secara manual untuk mencapai tata letak yang diinginkan; (c) software network (Teacher & Griffiths, 2011) untuk mengembangkan jaringan, tetapi juga tidak memiliki fungsi tata letak otomatis dan sangat rumit untuk digunakan; (d) Software minspnet (Excoffier & Smouse, 1994) yang dapat menghitung jaringan rentang minimum dari matriks jarak.

1.6. Kerangka Pikir

Fase juvenil ikan kerapu merupakan tahap peralihan dari larva menuju bentuk dewasa. Data inventarisasi Sulawesi Selatan menunjukkan bahwa sebagian besar ikan yang diperdagangkan berada pada fase juvenil. Beberapa spesies kerapu yang memiliki kemiripan secara morfologi saat berada pada fase ini, sehingga sulit untuk diidentifikasi secara akurat. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menggabungkan analisis morfologi dan DNA barcoding agar diperoleh hasil identifikasi yang akurat. Pada analisis morfologi terdiri dari dua pengukuran yaitu morfometrik dan meristik, sedangkan DNA barcoding terdiri dari beberapa tahapan. Hasil dari DNA barcoding selanjutnya dapat dijelaskan dalam bentuk pohon filogenetik dan *haplotype network*. Dari kedua pendekatan morfologi dan DNA barcoding diharapkan dapat diperoleh tujuan dari penelitian ini seperti variasi morfometrik, kekerabatan, keragaman genetik, dan kesesuaian identifikasi morfologi dan DNA barcoding. Selanjutnya, hasil dari penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi dalam upaya untuk mendukung perikanan kerapu yang berkelanjutan di Kabupaten Pangkep khususnya perairan Selat Makassar. Secara sistematis kerangka pikir ini dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 2. Kerangka pikir penelitian.

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni hingga Oktober 2024. Pengambilan spesimen ikan dilakukan di TPI Maccini Baji Kabupaten Pangkep, Sulawesi Selatan. Pengukuran morfologi dilakukan di Laboratorium Biologi Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. X-ray tulang ikan dilakukan di Makassar Pet Clinic (MPC). Ekstraksi DNA dan PCR dilakukan di UC Davis, Berkeley melalui Yayasan Biodiversitas Indonesia (Bionesia), Denpasar, Bali. Proses sekuensing dilakukan di PT. Genetika Science, Jakarta.

2.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *caliper*/jangka sorong (ketelitian 1 mm) untuk mengukur morfometrik spesimen, *coolbox* untuk menyimpan spesimen ikan agar terjaga kesegarannya, *gloves* (sarung tangan), gunting untuk memotong jaringan spesimen, kamera HP untuk dokumentasi, label untuk memberikan ID pada tube, plastik sampel (*ziplock*) untuk menyimpan spesimen ikan, penggaris untuk mengukur panjang spesimen, parafilm untuk menyegel tube, spidol 15 cm, *tissue*, dan tube 1,5 ml untuk menyimpan jaringan sirip dada. Alat untuk proses molekuler yaitu heating block untuk inkubasi, mesin PCR (*thermocycler*), sentrifuge untuk memisahkan cairan, vortex menghomogenkan spesimen dan alat elektroforesis.

Adapun bahan yang digunakan yaitu ikan kerapu genus *Plectropomus* sebagai spesimen penelitian. Kemudian chelex 10%, ethanol 96% untuk mengawetkan jaringan sirip, gel agarose 1%, primer forward FISH F1 dan reverse FISH R1, 9 μ L ddH₂O, dan 12.5 μ L *Ready mix* (DnTp, MgCl₂, larutan buffer, dan enzim taq polimerase).

2.3. Prosedur Kerja

Prosedur kerja dari penelitian ini yakni:

2.3.1. Pengumpulan spesimen

Spesimen genus *Plectropomus* dikumpulkan dari hasil tangkapan nelayan yang ditemukan di lokasi penelitian (Lampiran 1). Sampel diobservasi dan diidentifikasi dalam keadaan segar dengan pola warna jelas untuk didokumentasikan beserta penggaris 30 cm dan spidol sebagai alat pembanding berukuran 15 cm. Identifikasi dilakukan dengan merujuk pada Allen et al. (2003) dan Heemstra & Randall (1993).

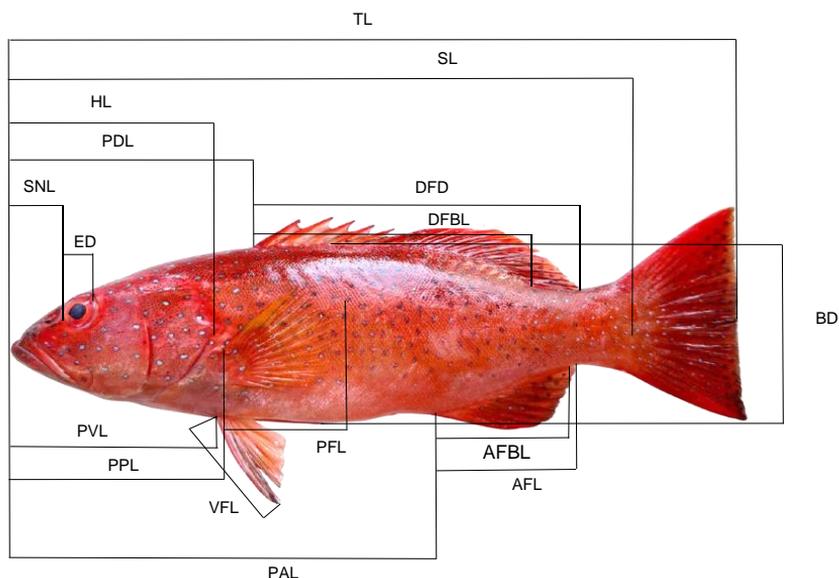
2.3.2. Preparasi spesimen

Spesimen dipreparasi dengan memotong jaringan sirip dada ikan menggunakan gunting (Lampiran 1). Kemudian spesimen dimasukkan ke dalam tube yang berisi ethanol 96% untuk dianalisis secara molekuler. Sebelumnya, botol tube tersebut diberikan nomor ID label pada masing-masing tube dan ditutup menggunakan

parafilm. Selanjutnya spesimen yang telah diambil siripnya disimpan dalam plastik sampel (*ziplock*) dan diletakkan di kotak pendingin (*coolbox*) untuk pengukuran morfologi.

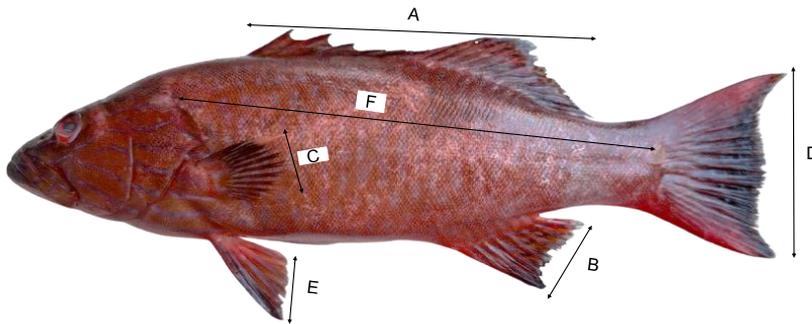
2.3.3. Pengukuran Morfometrik dan Meristik

Pengukuran morfometrik merujuk pada Darwin et al. (2020) dan Fadli et al. (2023). Pengukuran ini dilakukan menggunakan *caliper/jangka* sorong dengan ketelitian 1 mm yang meliputi panjang total (TL), panjang standar (SL), panjang kepala (HL), panjang moncong (SNL), tinggi sirip dorsal (DFD), panjang dasar sirip dorsal (DFBL), diameter mata (ED), tinggi badan (BD), panjang sirip dada (PFL), panjang sirip perut (VFL), panjang sebelum sirip punggung (PDL), panjang sebelum sirip dada (PPL), panjang sebelum sirip perut (PVL), panjang sebelum sirip anal (PAL), panjang dasar sirip anal (AFBL), panjang sirip anal (AFL) (Gambar 3) dan berat (g).



Gambar 3. Karakteristik morfometrik genus *Plectropomus* yang diukur pada spesimen ikan kerapu dari Kabupaten Pangkep.

Pengukuran meristik merujuk pada Darwin et al. (2020) dengan menghitung jumlah jari-jari sirip dorsal, jumlah jari-jari sirip dubur, jumlah jari-jari sirip dada, jumlah jari-jari sirip ekor, jumlah jari-jari sirip perut, *linea lateralis* (Gambar 4) dan jumlah tulang belakang. Perhitungan tulang belakang (*vertebrata*) dilakukan dengan melihat gambar hasil X-ray.



Gambar 4. Karakteristik meristik genus *Plectropomus* yang dihitung pada penelitian. Duri dan sirip: (A) sirip punggung, (B) sirip dubur, (C) sirip dada, (D) sirip ekor, (E) sirip perut. Jumlah sisik: (F) *linea lateralis*.

2.3.4. Ekstraksi DNA, Amplifikasi PCR, dan Sekuensing

DNA genom diekstraksi menggunakan metode chelex (chelex 10%). Jaringan yang telah dipreparasi diambil sebanyak 30 μg dan dimasukkan ke dalam alat vortex untuk pengadukkan jaringan spesimen dan bahan lainnya agar tercampur atau homogen. Selanjutnya dimasukkan ke dalam sentrifuge untuk proses pengendapan dimana DNA akan berada di permukaan tube, sedangkan organel sel lainnya akan berada di dasar tube. Terakhir dimasukkan ke heating block untuk inkubasi. Hasil dari proses ekstraksi yaitu DNA murni (*whole genome*).

Setelah proses ekstraksi, dilakukan amplifikasi PCR menggunakan mesin *Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler machine* dengan gen target yaitu *Cytochrome-c oxidase I (COI)*. Pasangan primer yang digunakan yaitu *forward FISH F1* (5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3') dan *reverse FISH R1* (5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3') (Darwin et al., 2020; Dwifajri et al., 2022; Ward et al., 2005). Total reaksi PCR adalah 26 μL yang terdiri dari campuran: 2 μL *template* DNA dari hasil ekstraksi, 1,25 μL setiap primer dalam konsentrasi 10 mM, 9 μL ddH₂O, dan 12,5 μL *Ready mix* (DnTp, MgCl₂, larutan buffer, dan enzim taq polimerase). Proses PCR meliputi denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit kemudian denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan pasangan basa (*annealing*) pada suhu 50°C selama 30 detik, pemanjangan untai (*extension*) pada suhu 72°C selama 45 detik dan kemudian pemanjangan tahap akhir pada suhu 72°C selama 5 menit (Andriyono & Suciyono, 2020). Proses ini diulang sebanyak 38 siklus untuk mendapat copyan DNA target yang lebih banyak. Hasil PCR kemudian divisualisasikan menggunakan alat elektroforesis yang telah diisi gel agarose 1% dan pewarnaan *Nucleic Acid Gel Stain* (GelRed®). Sampel yang menghasilkan warna terang dan bersih menunjukkan adanya DNA pada sampel tersebut (Lampiran 1).

Selanjutnya dilakukan proses sekuensing menggunakan metode sanger dideoksi. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Frederick Sanger (Walker, 2014). Pada proses ini terdapat tambahan alat *terminator base* dan *capillary tube*. Proses ini dilakukan untuk mengurutkan DNA target dari yang terpendek hingga terpanjang dan menghasilkan warna untuk proses pembacaan urutan nukleotida.

2.4. Analisis Data

Data morfometrik dan meristik ditabulasikan dan dianalisis menggunakan Microsoft Excel 2021 (Lampiran 2). Rasio karakter morfometrik dihitung berdasarkan panjang standar atau panjang kepala (Tabel 1), serta dianalisis secara deskriptif.

Hasil sequencing berupa data sequence (Ab1 file) diedit dan disejajarkan (*alignment*) menggunakan metode ClustalW pada program MEGA XI (Lampiran 2) (Tamura et al., 2021). Setiap susunan basa kemudian dicek secara manual dan dipastikan semua data yang dipakai memiliki kualitas yang baik. Selanjutnya, data yang telah dibersihkan dicocokkan dengan database yang ada di Genbank NCBI melalui metode *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) yang ada pada website NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Setiap data kemudian dicatat tingkat kemiripan (*persentase identity* dan *query cover*). Data kemudian dianalisis dalam bentuk pohon filogenetik untuk melihat hubungan kekerabatan antar spesimen dan mengkonfirmasi hasil BLAST dalam mengidentifikasi hingga level spesies. Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan Kimura 2 parameter routine (Kimura, 1980) dengan replikasi bootstrap 1000 kali pada software MEGA XI. Pohon filogenetik yang telah dibuat, diedit menggunakan *online Interactive Tree of Life* (IToL) (Letunic & Bork, 2021). Untuk jaringan haplotipe (*haplotype networks*) dikonstruksi menggunakan DNASP v6 (Librado & Rozas, 2009) dan Network 5.0.1.1 (Lampiran 2).