

**KERAGAMAN GENETIK IKAN TAWES (*Barbonymus spp.*)
DI DAERAH ALIRAN SUNGAI PROVINSI JAWA TIMUR
(STUDI: DAERAH ALIRAN SUNGAI BENGAWAN
SOLO, BRANTAS, DAN BARU-BAJULMATI)**

**TESIS
PROGRAM STUDI MAGISTER
BIOTEKNOLOGI PERIKANAN DAN KELAUTAN**



Oleh:

**MUTIARA RAHMAWATI
SURABAYA - JAWA TIMUR**

**FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

HALAMAN JUDUL

**KERAGAMAN GENETIK IKAN TAWES (*Barbonymus spp.*)
DI DAERAH ALIRAN SUNGAI PROVINSI JAWA TIMUR
(STUDI: DAERAH ALIRAN SUNGAI BENGAWAN
SOLO, BRANTAS, DAN BARU-BAJULMATI)**

**MUTIARA RAHMAWATI
141914153001**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
BIOTEKNOLOGI PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

**KERAGAMAN GENETIK IKAN TAWES (*Barbonymus spp.*)
DI DAERAH ALIRAN SUNGAI PROVINSI JAWA TIMUR
(STUDI: DAERAH ALIRAN SUNGAI BENGAWAN
SOLO, BRANTAS, DAN BARU-BAJULMATI)**

Tesis

Tesis sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains
Pada Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan
Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga

Oleh:

**MUTIARA RAHMAWATI
141914153001**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
BIOTEKNOLOGI PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

Surat Pernyataan Keaslian Karya Tulis Tesis

Yang bertanda tangan di bawah ini :

N a m a : Mutiara Rahmawati
N I M : 141914153001
Prodi : Bioteknologi Kelautan dan Perikanan
Tempat, tanggal lahir : Surabaya, 29 Desember 1995
Alamat : Karanganyar 5 No 23 RT 12 RW 03, 60227 Surabaya
Telp./HP : 082132147051
Judul Tesis : Keragaman Genetik Ikan Tawes (*Barbonymus spp.*) di Daerah Aliran Sungai Provinsi Jawa Timur (Studi: Daerah Aliran Sungai Bengawan Solo, Brantas, dan Baru-Bajulmati)
Pembimbing : 1. Dr. Eng. Sapto Andriyono, S.Pi., MT
2. Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si.

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa hasil tulisan laporan Tesis yang saya buat adalah murni hasil karya saya sendiri (bukan plagiat) yang berasal dari Dana Penelitian : Mandiri ~~/Proyek-Dosen/Hibah/PKM~~ (coret yang tidak perlu).

Di dalam Tesis / karya tulis ini tidak terdapat keseluruhan atau sebagian tulisan atau gagasan orang lain yang saya ambil dengan cara menyalin atau meniru dalam bentuk rangkaian kalimat atau simbol yang saya olah sebagai tulisan saya sendiri tanpa memberikan pengakuan pada penulis aslinya, serta kami bersedia :

1. Dipublikasikan dalam Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga;
2. Memberikan izin untuk mengganti susunan penulis pada hasil tulisan tesis / karya tulis saya ini sesuai dengan peranan pembimbing tesis;
3. Diberikan sanksi akademik yang berlaku di Universitas Airlangga, termasuk pencabutan gelar magister sains yang telah saya peroleh apabila dikemudian hari terbukti bahwa saya ternyata melakukan tindakan menyalin atau meniru tulisan orang lain yang seolah-olah hasil pemikiran saya sendiri

Demikian surat pernyataan yang saya buat ini tanpa ada unsur paksaan dari siapapun dan dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 18 Agustus 2022

Yang membuat pernyataan,



Mutiara Rahmawati
NIM. 141914153001

Tesis

**KERAGAMAN GENETIK IKAN TAWES (*Barbonymus* spp.)
DI DAERAH ALIRAN SUNGAI PROVINSI JAWA TIMUR
(STUDI: DAERAH ALIRAN SUNGAI BENGAWAN
SOLO, BRANTAS, DAN BARU-BAJULMATI)**

Tesis sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains
Pada Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan
Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga

Mutiara Rahmawati
141914153001

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Ketua

Pembimbing Serta


Dr. Eng. Sapto Andriyono, S.Pi., MT
NIP. 19790925 200812 1 002


Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si.
NIP. 19740308 200112 1 001

Mengetahui,
Koordinator Program Studi


Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno Lastuti MS., drh
NIP. 19530418 197803 2 001

Tesis

**KERAGAMAN GENETIK IKAN TAWES (*Barbonymus spp.*)
DI DAERAH ALIRAN SUNGAI PROVINSI JAWA TIMUR
(STUDI: DAERAH ALIRAN SUNGAI BENGAWAN
SOLO, BRANTAS, DAN BARU-BAJULMATI)**

Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal : 15 Agustus 2022

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Win Darmanto M.Si., Med Sci. Ph.D

Anggota : 1. Dr. Mufasirin, drh., M.Si.
2. Muhammad Amin S.Pi., M.Sc., Ph.D.
3. Dr. Eng. Sapto Andriyono, S.Pi, M.T
4. Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si.

Surabaya, 18 Agustus 2022

Fakultas Perikanan dan Kelautan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Mochammad Amin Alamsjah, Ir., M.Si., Ph.D.
NIP. 19700116 199503 1 002

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, taufiq dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tesis dengan judul **“Keragaman Genetik Ikan Tawes (*Barbonymus spp.*) di Daerah Aliran Sungai Provinsi Jawa Timur (Studi: Daerah Aliran Sungai Bengawan Solo, Brantas, Dan Baru-Bajulmati)”**. Tujuan penulisan Tesis ini sebagai syarat untuk memperoleh gelar Magister Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga.

Penulis menyadari bahwa Tesis ini masih belum sempurna, baik dari segi materi maupun penyajiannya, sehingga adanya saran dan kritik sangat diharapkan dalam penyempurnaan Tesis ini. Penulis berharap semoga Tesis ini dapat disetujui dan nantinya bermanfaat dan dapat memberikan informasi kepada semua pihak, khususnya bagi mahasiswa program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga Surabaya, untuk kemajuan serta perkembangan ilmu dan teknologi dalam bidang perikanan, terutama bioteknologi perikanan.

Surabaya, 05 Maret 2022

Penulis

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyadari dalam penyelesaian Tesis ini tidak terlepas dari dukungan moril dan materil dari semua pihak. Melalui kesempatan ini, penulis mengucapkan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya atas semua bantuan yang telah diberikan baik secara langsung maupun tidak langsung selama penyusunan penelitian ini hingga selesai. Secara khusus penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Moch. Amin Alamsjah, Ir., M.Si., Ph.D selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga, Dr. Eng. Sapto Andriyono, S.Pi., MT., dan Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan pengarahan selama proses penyusunan laporan, Prof. Win Darmanto M.Si., Med Sci. Ph.D, Dr. Mufasirin, M.Si., drh, Dr. Muhamad Amin S.Pi., M.Sc., Ph.D selaku Dosen Penguji yang telah banyak memberikan masukan selama proses penyusunan laporan, Bu Heni Puspitasari selaku Laboran yang telah membantu proses identifikasi molekuler dan Dr. Endang Dewi Mashitah., Ir., MP selaku Dosen Wali yang telah memberikan pengarahan dan nasehat selama masa perkuliahan di Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga. Bapak dan Ibu dosen Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga

Terimakasih penulis sampaikan kepada Kedua orang tua dan kedua kakak penulis yang telah memberi motivasi kepada penulis, rekan-rekan program Studi

Bioteknologi Perikanan dan Kelautan atas masukan dan saran selama penelitian, keluarga besar penulis atas semua motivasi dan nasehat yang berharga, serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah dengan tulus ikhlas memberikan doa dan dukungan pada penelitian ini.

Akhirnya penulis berharap semoga Tesis ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi kepada semua pihak, khususnya bagi mahasiswa di Fakultas Perikanan dan Kelautan dan masyarakat sekitar guna kemajuan serta perkembangan ilmu dan teknologi dalam bidang perikanan terutama bioteknologi perikanan.

RINGKASAN

MUTIARA RAHMAWATI. Keragaman Genetik Ikan Tawes (*Barbonymus spp.*) di Daerah Aliran Sungai Provinsi Jawa Timur (Studi: Daerah Aliran Sungai Bengawan Solo, Brantas, dan Baru-Bajulmati). Dosen Pembimbing: Dr. Eng. Sapto Andriyono, S.Pi., MT., dan Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si.

Ikan tawes (*Barbonymus spp.*) merupakan salah satu ikan endemik lokal di Jawa Timur. Ikan tawes termasuk golongan ikan ekonomis bagi masyarakat Indonesia, khususnya wilayah Jawa Timur. Ikan tawes berpotensi dijadikan sumber pangan bernutrisi, khususnya sebagai sumber protein. Keberadaan ikan tawes di habitat asli saat ini terancam oleh penangkapan yang berlebihan dan juga kerusakan lingkungan. Untuk mencegah punahnya sumberdaya ikan perlu dilakukan dengan suatu pendekatan konservatif, salah satu melalui program konservasi genetik.

Langkah awal dalam menentukan keragaman suatu populasi dilakukan melalui penanda morfologis. Penanda morfologi dalam mengidentifikasi ikan meliputi pengukuran morfometrik. Selanjutnya, *DNA barcoding* merupakan suatu penanda molekuler yang dapat dijadikan sebagai identifikasi keragaman suatu populasi ikan. Analisis *DNA barcoding* ikan sering dilakukan dengan menggunakan sekuen *DNA* mitokondria. Penggunaan sekuen *DNA* mitokondria memperjelas hubungan spesies secara evolusi yang kabur akibat variasi morfologi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sekuen *DNA*, keragaman genetik, dan hubungan kekerabatan dari ikan tawes (*Barbonymus spp.*) menggunakan gen mtDNA *COI* dan *Cyt-b*. Sampel dikumpulkan dari berbagai daerah di Provinsi Jawa Timur meliputi Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, dan Banyuwangi. Identifikasi ikan tawes dilakukan secara morfologi dan molekuler. Identifikasi morfologi dilakukan dengan pengukuran 14 karakter morfometrik. Bagian pangkal ekor dari ikan tawes digunakan untuk identifikasi molekuler. Isolasi dan pemurnian genom *DNA* menggunakan gSYNC™ *DNA Extraction kit*. Penulis menggunakan mesin *polymerase chain reaction* untuk amplifikasi *DNA* template dengan primer *COI* meliputi FishF1 dan FishR1, sedangkan primer *Cyt-b* meliputi GluDG-L dan CB2-H.

Hasil pengukuran morfometrik menggunakan uji ANOVA satu arah menunjukkan $F \text{ hitung} > F \text{ tabel}$ ($P < 0,05$) artinya karakter morfometrik antar sampel dari keenam lokasi berbeda secara signifikan. Hasil analisis keragaman morfometrik interspesies *Barbonymus gonionotus* menggunakan *neighbour joining* pada *software PAST 4.07b* menunjukkan *Barbonymus gonionotus* dari kelima lokasi terpisah menjadi lima clade. Keterpisahan tersebut menunjukkan bahwa secara morfometrik dari lima lokasi, *Barbonymus gonionotus* memiliki perbedaan atau keunikan dari masing-masing lokasi.

Hasil identifikasi molekuler menunjukkan seluruh sekuen ikan tawes berhasil teramplifikasi dengan gen *COI* sebesar 648 bp dan gen *Cyt-b* sebesar 408bp. Hasil analisis *BLASTN* menunjukkan terdapat dua spesies ikan tawes yang telah ditemukan yaitu *Barbonymus gonionotus* dan *Barbonymus schwanenfeldii* dengan *percentase identity* berkisar 99-100%. Spesies *Barbonymus gonionotus* didapatkan di kelima daerah (Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, dan Banyuwangi), sedangkan *Barbonymus schwanenfeldii* hanya ditemukan di Malang. Nilai jarak genetik berdasarkan gen *COI* berkisar 0,00000-0,10694, sedangkan nilai jarak genetik berdasarkan gen *Cyt-b* berkisar 0,00000-1,15662. Status konservasi berdasarkan data *IUCN* Red List, spesies *Barbonymus gonionotus* dan *Barbonymus schwanenfeldii* masuk dalam kategori *least concern* (*LC*), serta kedua spesies ini menurut data *CITES* belum dievaluasi atau *Not Evaluated*.

SUMMARY

MUTIARA RAHMAWATI. Study of Genetic Diversity of Cyprinid fish (*Barbonymus* spp.) in the Watershed of East Java Province (Studi: Bengawan Solo, Brantas, and Baru-Bajulmati Watershed). Academic Advisor: Dr. Eng. Sapto Andriyono, S.Pi., MT., dan Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si.

Cyprinid fish (*Barbonymus* spp.) is one of the local endemic fish in East Java. Cyprinid fish is an economical fish for the people of Indonesia, especially in the East Java region. Cyprinid fish has the potential to be used as a source of nutritious food, especially as a source of protein. The existence of Cyprinid fish in its natural habitat is currently threatened by overfishing and also environmental damage. To prevent the extinction of fish resources, it is necessary to use a conservative approach, one of which is through a genetic conservation program.

The first step in determining the diversity of a population is done through morphological markers. Morphological markers in identifying fish include morphometric measurements. Furthermore, DNA barcode is a molecular marker that can be used as an identification of the diversity of a fish population. Fish DNA barcoding analysis is often carried out using mitochondrial DNA sequences. The use of mitochondrial DNA sequences clarifies the evolutionary blurring of species relationships due to morphological variations.

This study aims to determine the base sequence, genetic diversity, and kinship of Cyprinid fish (*Barbonymus* spp.) using the mtDNA COI and Cyt-b genes. Samples were collected from various regions in East Java Province including Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, and Banyuwangi. Cyprinid fish identification was done morphologically and molecularly. Morphological identification was carried out by measuring 14 morphometric characters. The base of the tail of Cyprinid fish is used for molecular identification. Isolation and purification of its genomic DNA using the gSYNCTM DNA Extraction kit. The author used a polymerase chain reaction machine for DNA template amplification with COI primers including FishF1 and FishR1, while Cyt-b primers included GluDG-L and CB2-H.

The results of morphometric measurements using one-way ANOVA test showed $F_{count} > F_{table}$ ($P < 0.05$) meaning that the morphometric characters between samples from the six location were significantly different. The result of interspecies morphometric diversity of *Barbonymus gonionotus* using neighbour joining on PAST 4.07b software showed *Barbonymus gonionotus* from five separate locations into five clade. the separation shows that morphometrically from the five locations, *Barbonymus gonionotus* has differences or uniqueness from each location.

The results of molecular identification showed that all Cyprinid fish sequences were successfully amplified with the COI gene of 648 bp and the Cyt-b gene of 408 bp. The results of the BLASTN analysis show that there are two species of Tawes fish that have been found, namely *Barbonymus gonionotus* and

Barbonymus schwanefeldii with identity percentages ranging from 99-100%. The species *Barbonymus gonionotus* was found in five regions (Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, and Banyuwangi), while *Barbonymus schwanefeldii* was only found in Malang. The genetic distance value based on the COI gene ranged from 0.00000-0.10694, while the genetic distance value based on the Cyt-b gene ranged from 0.00000-1.15662. Conservation status based on IUCN Red List data, the species *Barbonymus gonionotus* and *Barbonymus schwanefeldii* are included in the least concern (LC) category, and these two species according to CITES data have not been evaluated or Not Evaluated.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sekuen *DNA*, keragaman genetik, dan hubungan kekerabatan dari ikan tawes (*Barbonymus spp.*) menggunakan gen mtDNA *COI* dan *Cyt-b*. Sampel dikumpulkan dari berbagai daerah di Provinsi Jawa Timur meliputi Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, dan Banyuwangi. Identifikasi ikan tawes dilakukan secara morfologi dan molekuler. Identifikasi morfologi dilakukan dengan pengukuran 14 karakter morfometrik. Hasil pengukuran morfometrik menunjukkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ ($P < 0,05$). Bagian pangkal ekor dari ikan tawes digunakan untuk identifikasi molekuler. Isolasi dan pemurnian genom *DNA* menggunakan gSYNC™ *DNA Extraction kit*. Penulis menggunakan mesin *polymerase chain reaction* untuk amplifikasi *DNA* template dengan primer *COI* meliputi FishF1 dan FishR1, sedangkan primer *Cyt-b* meliputi GluDG-L dan CB2-H. Hasil penelitian menunjukkan seluruh sekuen ikan tawes berhasil teramplifikasi dengan gen *COI* sebesar 648 bp dan gen *Cyt-b* sebesar 408bp. Hasil analisis *BLASTN* menunjukkan terdapat dua spesies ikan tawes yang telah ditemukan yaitu *Barbonymus gonionotus* dan *Barbonymus schwanefeldii* dengan *percentase identity* berkisar 99-100%. Spesies *Barbonymus gonionotus* didapatkan di kelima daerah (Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, dan Banyuwangi), sedangkan *Barbonymus schwanefeldii* hanya ditemukan di Malang. Nilai jarak genetik berdasarkan gen *COI* berkisar 0,00000-0,10694, sedangkan nilai jarak genetik berdasarkan gen *Cyt-b* berkisar 0,00000-1,15662.

Kata Kunci: Konservasi, *Cytochrome*, mtDNA, *Barbonymus*

ABSTRACT

The study aims to determine of DNA base, genetic diversity and genetic distance of cyprinid fish (*Barbonymus* spp.) using the mtDNA COI and Cyt-b gene. Sample were collected from various regions in East Java Province including Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, and Banyuwangi. Identification was done morphologically and molecularly. Morphological identification was carried out by measuring 14 morphometric characters. The results of morphometric measurements showed F count > F table ($P < 0.05$). The base of the caudal fin of cyprinid fish is used for molecular identification. Isolation and purification of its genomic DNA using the gSYNCTM DNA Extraction kit. The author used a polymerase chain reaction machine for DNA template amplification with COI primers including FishF1 and FishR1, while Cyt-b primers included GluDG-L and CB2-H. The results showed that all cyprinid fish sequences were successfully amplified with the COI gene of 648 bp and the Cyt-b gene of 408 bp. The results of BLASTN analysis show that there are two species of cyprinid fish that have been found, namely *Barbonymus gonionotus* and *Barbonymus schwanenfeldii* with identity percentages ranging from 99-100%. The species *Barbonymus gonionotus* was found in five regions (Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, and Banyuwangi), while *Barbonymus schwanenfeldii* was only found in Malang. The genetic distance value based on the COI gene ranged from 0.00000-0.10694, while the genetic distance value based on the Cyt-b gene ranged from 0.00000-1.15662.

Keywords: *Conservation, Cytochrome, mtDNA, Barbonymus*

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
KATA PENGANTAR	vii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
DAFTAR ISI	xvi
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx
DAFTAR ISTILAH	xxi
I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
II TINJAUAN PUSTAKA	5
2. 1. Ikan Tawes	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Tawes.....	5
2.1.2 Habitat Ikan Tawes	6
2. 2. Keragaman Genetik.....	6
2. 3. Mitokondria <i>DNA</i> (mtDNA)	7
2. 4. Cytochrome Oxidase Sub Unit I (COI).....	9
2. 5. <i>Cytochrome b</i> (<i>Cyt-b</i>).....	10
2. 6. Polymerase Chain Reaction (PCR)	11
2. 7. Sekuensing <i>DNA</i>	12
2. 8. Filogenetik.....	14
III KERANGKA PENELITIAN	16
3.1. Kerangka Penelitian	16
IV. METODOLOGI	22
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian	22
4.2. Materi Penelitian	22
4.2.1. Peralatan Penelitian	22
4.2.2. Bahan Penelitian.....	22
4.3. Jenis dan Rancangan Penelitian	23
4.4. Prosedur Penelitian.....	23
4.4.1. Pengambilan Sampel Ikan.....	23
4.4.2. Identifikasi Morfologi	24
4.4.3. Analisis <i>DNA</i> Mitokondria.....	24
4.5. Analisis Data	29
V HASIL DAN PEMBAHASAN	31
5.1 Hasil	31

5.1.1 Identifikasi Morfologi Ikan Tawes.....	31
5.1.2 Keragaman Morfometrik Ikan Tawes	33
5.1.3 Identifikasi Molekuler Ikan Tawes	35
5.1.4 Pohon Filogenetik	37
5.1.5 Jarak Genetik.....	39
5.1.6 Komposisi Nukleotida.....	40
5.1.7 Status Konservasi	41
5.2 Pembahasan.....	41
5.2.1 Analisis Keragaman Morfologi dan Morfometri <i>Barbonymus</i> spp.....	41
5.2.2 Analisis Identifikasi Molekuler	43
5.2.3 Analisis Pohon Filogenetik dan Jarak Genetik	45
5.2.4 Analisis Komposisi Nukleotida.....	48
5.2.5 Status Konservasi	49
5.2.6 Analisis Hubungan Morfologi, Morfometrik dan Genetik.....	49
VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	52
6.1 Kesimpulan.....	52
6.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	53

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Tabel pengukuran bagian morfometrik tubuh ikan	25
Tabel 5.1 Perbandingan morfologi antara <i>B. gonionotus</i> dan <i>B. schwanenfeldii</i> . ..	32
Tabel 5.2 Hasil pengukuran karakter morfometrik ikan tawes	33
Tabel 5.3 Hasil analisis BLASTN	37
Tabel 5.4 Jarak genetik <i>Barbonymus</i> spp. di Jawa Timur	40
Tabel 5.5 Komposisi nukleotida <i>Barbonymus</i> spp. di Jawa Timur	40
Tabel 5.6 Status konservasi <i>Barbonymus</i> spp. berdasarkan IUCN dan CITES ...	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Ikan tawes	6
Gambar 2.2 Mitokondria <i>DNA</i> pada ikan.....	8
Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian	21
Gambar 4.1 Peta sampling Provinsi Jawa Timur	24
Gambar 4.2 Pengukuran morfometrik tubuh ikan tawes.....	25
Gambar 4.3 Diagram alir penelitian	30
Gambar 5.1 Hasil pengamatan identifikasi morfologi.....	32
Gambar 5.2 Keragaman morfometrik intraspecies <i>Barbonymus gonionotus</i>	35
Gambar 5.3 Hasil elektroforesis PCR berdasarkan COI	36
Gambar 5.4 Hasil elektroforesis PCR berdasarkan <i>Cyt-b</i>	36
Gambar 5.5 Pohon filogenetik berdasarkan COI.....	38
Gambar 5.6 Pohon filogenetik berdasarkan <i>Cyt-b</i>	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil uji <i>ANOVA</i> karakter morfometrik	60
Lampiran 2. Hasil <i>chromatogram</i> ikan tawes berdasarkan gen <i>COI</i>	64
Lampiran 3. Hasil <i>chromatogram</i> ikan tawes berdasarkan gen <i>Cyt-b</i>	66
Lampiran 4. Sekuen DNA gen <i>COI</i> ikan tawes	68
Lampiran 5. Sekuen DNA gen <i>Cyt-b</i> ikan tawes	70
Lampiran 6. Hasil <i>alignment</i> sekuen DNA gen <i>COI</i>	71
Lampiran 7. Hasil <i>alignment</i> sekuen DNA gen <i>Cyt-b</i>	72
Lampiran 8. Jarak genetik ikan tawes berdasarkan gen <i>COI</i>	73
Lampiran 9. Jarak genetik ikan tawes berdasarkan gen <i>Cyt-b</i>	74

DAFTAR ISTILAH

<i>DNA</i>	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
<i>COI</i>	: <i>Cytochrome Oxydase Sub Unit I</i>
<i>Cyt-b</i>	: <i>Cytochrome b</i>
<i>mtDNA</i>	: <i>DNA mitokondria</i>
<i>PCR</i>	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>BLAST</i>	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>NJ</i>	: <i>Neighbor Joining</i>
<i>K2P</i>	: <i>Kimura 2 Parameter</i>
<i>MEGA X</i>	: <i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis X</i>
<i>SPSS</i>	: <i>Statistical Product and Service Solutions</i>
<i>ANOVA</i>	: <i>Analysis of Variance</i>
<i>IUCN</i>	: <i>International Union for Conservation of Nature's</i>
<i>CITES</i>	: <i>Convention on International Trades on Endangered Species of Wild Flora and Fauna</i>

I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Ikan tawes (*Barbonymus* spp.) merupakan ikan endemik lokal asli perairan tawar Indonesia yang terdapat di beberapa daerah seperti Sumatera, Jawa, dan Kalimantan (Radona dkk., 2016). Ikan tawes (*Barbonymus* spp.) merupakan salah satu ikan endemik lokal di Jawa Timur (Suryaningsih *et al.*, 2020). Distribusi ikan tawes diperkirakan dapat ditemukan di perairan sungai Provinsi Jawa Timur. Beberapa peneliti telah melakukan identifikasi morfologi ikan tawes di daerah aliran sungai Bengawan Solo (Ayyubi dkk., 2018) dan Brantas (Suryaningsih *et al.*, 2020), sehingga hal tersebut dapat mengindikasikan ikan tawes dapat ditemukan di daerah aliran sungai lain. Ikan tawes (*Barbonymus* spp.) bernilai ekonomis tinggi sebagai ikan konsumsi dan berpotensi sebagai sumber protein. Pada penelitian Hadisusanto dan Suryaningsih (2011) kadar protein ikan tawes mencapai 60,25%.

Ikan tawes (*Barbonymus* spp.) termasuk dalam familia Cyprinidae. Nelson (2006) menyatakan bahwa familia Cyprinidae adalah familia ikan air tawar terbesar, mencakup sekitar 367 genus dan 3006 spesies. Banyaknya spesies dari familia Cyprinidae menunjukkan kemampuan familia tersebut mampu beradaptasi dan berkembang biak secara cepat (Batubara *et al.*, 2018). Kekayaan spesies dari familia Cyprinidae yang tinggi juga menunjukkan adanya kemiripan secara morfologi (Putri dkk., 2014). *Barbonymus* terdiri dari sepuluh spesies yaitu: *B. belinka*, *B. altus*, *B. balleroides*, *B. collingwoodii*, *B. gonionotus*, *B. mahak-*

kamensis, *B. platysoma*, *B. trigatus*, *B. sunieri*, dan *B. schwanenfeldii* (Batubara *et al.*, 2021).

Produksi ikan tawes hingga saat ini sebagian besar masih berasal dari tangkapan alam (Radona dkk., 2016). Kegiatan penangkapan secara berlebihan di khawatirkan akan mempengaruhi populasi ikan tawes (Rumondang, 2016). Tidak hanya kegiatan penangkapan yang berlebihan saja tetapi penurunan populasi ikan juga dapat disebabkan akibat degradasi lingkungan perairan. Ahmad *et al.* (2019) mengatakan bahwa degradasi lingkungan perairan sebagian besar terjadi akibat adanya pencemaran domestik dan limbah industri. Kegiatan konservasi perlu dilakukan untuk mencegah kepunahan dan dapat diterapkan dalam kajian keragaman suatu populasi, sehingga mampu menjelaskan status populasi ikan saat ini (Akbar dan Labenua, 2018).

Studi populasi perlu dilakukan dengan proses identifikasi. Umumnya langkah awal dalam menentukan keragaman suatu populasi dilakukan melalui penanda morfologi (Ayyubi dkk., 2018). Penanda morfologi dalam mengidentifikasi ikan meliputi morfometrik (Baur & Leuenberger, 2011). Saat ini, identifikasi pada tingkat spesies berdasarkan ciri morfologi saja tidak cukup. Hal ini disebabkan kemungkinan terjadi kesalahan identifikasi jika hanya berdasarkan morfologi dan morfometrik (Ayyubi dkk., 2018). Pendekatan lain untuk identifikasi pada tingkat spesies dapat dilakukan secara molekuler.

Pendekatan molekuler saat ini telah banyak diterapkan untuk mengidentifikasi semua taksa. Pendekatan molekuler merupakan salah satu bagian terpenting dalam mengetahui kekerabatan dan varian genetik suatu populasi ikan

di suatu daerah (Hutama *et al.*, 2017). *DNA barcoding* merupakan suatu penanda molekuler yang dapat dijadikan sebagai identifikasi keragaman suatu populasi ikan. Analisis *DNA barcoding* ikan sering dilakukan dengan menggunakan sekuen *DNA* mitokondria. Penggunaan sekuen *DNA* mitokondria memperjelas hubungan spesies secara evolusi yang kabur akibat variasi morfologi (Kartika dkk., 2017).

Penelitian *DNA Barcoding* pada ikan sering menggunakan *DNA* mitokondria berdasarkan region *Cytochrome Oxydase Sub Unit I (COI)*. Penggunaan gen *COI* telah diakui secara global dalam identifikasi spesies (Dawnay *et al.*, 2007). Selain *COI*, *Cytochrome b (Cyt-b)* juga telah banyak digunakan dalam teknik penanda molekuler dalam keragaman genetik intra atau antar spesies, variasi genetik filogeografi, indentifikasi spesies dan hibrida, filogeni pada berbagai spesies dan marga, struktur genetik populasi, konservasi dan sejarah demografi (Rahim *et al.*, 2012).

Penelitian mengenai keragaman genetik ikan tawes di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur masih tergolong kurang. Penelitian keragaman genetik perlu dilakukan untuk mengetahui status populasi ikan tawes di daerah aliran sungai Jawa Timur. Berdasarkan latar belakang di atas, penentuan keragaman genetik ikan tawes (*Barbonymus* spp.) dapat dilakukan dengan penanda morfologi dan molekuler. Penanda morfologi dilakukan dengan pengukuran morfometrik, sedangkan penanda molekuler menggunakan gen *COI* dan *Cyt-b*. Penelitian ini diharapkan untuk mengetahui urutan sekuen *DNA*, keragaman genetik, hubungan kekerabatan dan pengukuran morfometrik ikan tawes (*Barbonymus* spp.) di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut.

- 1) Bagaimanakah perhitungan morfometrik ikan tawes (*Barbonymus spp.*) di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur?
- 2) Bagaimanakah urutan sekuen *DNA* ikan tawes (*Barbonymus spp.*) di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur?
- 3) Bagaimanakah keragaman genetik dan hubungan kekerabatan ikan tawes (*Barbonymus spp.*) di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur?

1.3. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut maka tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1) Mengetahui pengukuran morfometrik ikan tawes (*Barbonymus spp.*) di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur.
- 2) Mengetahui urutan sekuen *DNA* ikan tawes (*Barbonymus spp.*) di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur.
- 3) Mengetahui keragaman genetik dan hubungan kekerabatan ikan tawes (*Barbonymus spp.*) di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah mengenai keragaman genetik ikan tawes (*Barbonymus spp.*) di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur yang dapat dijadikan sebagai acuan kegiatan konservasi.

II TINJAUAN PUSTAKA

2. 1. Ikan Tawes

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Tawes

Kottelat *et al.* (1993) menyatakan bahwa; klasifikasi ikan tawes adalah sebagai berikut:

Phylum	: Chordata
Classis	: Pisces
Ordo	: Ostariophysi
Familia	: Cyprinidae
Genus	: <i>Barbonymus</i>
Species	: <i>Barbonymus gonionotus</i> .

Morfologi ikan tawes menurut Kottelat *et al.* (1993) meliputi ikan tawes memiliki bentuk tubuh panjang dan pipih dengan punggung meninggi. Ikan tawes memiliki mulut berbentuk runcing dan letaknya di tengah (terminal), selain itu mulut ikan tawes memiliki dua pasang sungut yang kecil disebut rudimeter. Warna tubuh ikan tawes berwarna keperak-perakan, warna sisik di bagian punggung lebih gelap, sedangkan warna sisik di bagian perut putih. Garis rusuk ikan tawes sempurna berjumlah 29-31 buah.

Rudiansyah *et al.* (2020) menyatakan bahwa ikan tawes memiliki bentuk tubuh panjang dan pipih dengan bagian punggung meninggi. Warna tubuh ikan tawes berwarna perak dengan area punggung lebih gelap. Posisi mulutnya terletak di tengah (terminal). Ikan tawes memiliki bentuk sirip dorsal jari-jari sirip lemah mengeras, sedangkan bentuk sirip *caudal homocercal*. Morfologi ikan tawes dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Ikan tawes (Rudiansyah *et al.*, 2020)

2.1.2 Habitat Ikan Tawes

Ikan tawes dalam habitat asli berkembang biak di sungai, danau dan rawa – rawa (Phen *et al.*, 2005). Habitat yang disukai oleh ikan tawes adalah perairan dengan air yang jernih dan terdapat aliran air. Bain *et al.* (2012) mengatakan bahwa untuk famili ikan tawes (*cyprinidae*) suhu optimal 23-33 C, kadar oksigen terlarut $\geq 1,5 \text{ mg L}^{-1}$, dan tingkat keasaman pH rentang 6,6-8,6.

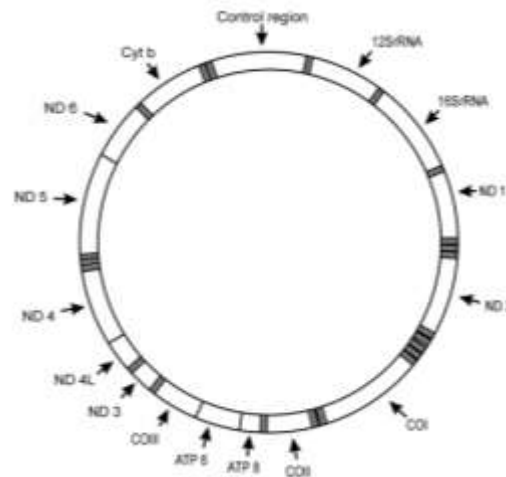
2. 2. Keragaman Genetik

Yusron (2005) menyatakan bahwa keragaman genetik merupakan tingkatan (*hierarchi*) yang paling rendah dalam tingkatan keragaman hayati. Keragaman hayati mencakup segala aspek yang meliputi keragaman habitat, komunitas, populasi dan jenis. Syafei (2017) berpendapat keragaman spesies ikan menggambarkan seluruh cakupan adaptasi ekologi, serta menggambarkan evolusi spesies terhadap lingkungan tertentu. Keanekaragaman ikan dapat berbeda dari satu lokasi ke lokasi lain. Perbedaan spesies ikan di suatu populasi dapat disebabkan oleh adanya perbedaan komposisi makanan dan perbedaan faktor

kimia, fisika, dan karakteristik habitat di hulu maupun hilir (Taylor *et al.* 2006). Penggunaan molekul *DNA* dalam keragaman genetik dapat menanggulangi keterbatasan penggunaan penanda morfologi karena penanda molekuler bebas dari pengaruh-pengaruh epistasis, lingkungan, dan fenotipe, sehingga dapat menyediakan informasi yang lebih akurat (Wibowo, 2012).

2. 3. Mitokondria *DNA* (mtDNA)

Mitokondria adalah organela yang terletak di dalam sitoplasma sel eukariotik (Susmiarsih, 2010). Fungsi mitokondria dalam sel adalah menghasilkan energi dalam bentuk *adenosine triphosphate* (*ATP*). Sebagian besar *ATP* dihasilkan melalui proses fosforilasi oksidatif (Wandia, 2001). Mitokondria *DNA* merupakan molekul *DNA* rantai ganda yang berbentuk sirkuler yang ditransmisikan secara maternal (Utami, 2009). Sekuen *DNA* yang sering digunakan sebagai alat identifikasi molekuler adalah mitokondria *DNA* (Soewardi, 2007). Mitokondria *DNA* mengandung 13 gen pengkode protein, dua gen pengkode rRNA (12S dan 16S rRNA), 22 gen yang mengkode molekul tRNA dan satu bagian non kode *DNA* yang bertindak sebagai situs inisiasi untuk replikasi mtDNA dan transkripsi RNA (Gambar 2.2) (Beaumont *et al.*, 2010).



Gambar 2.2 Mitokondria *DNA* pada ikan (Beaumont *Et al.*, 2010).

Mitokondria *DNA* ditemukan di sel telur betina, sehingga genetik murni merupakan warisan dari sifat gen induk betina dan tidak ada rekombinan dari gen induk jantan (Rahayu dkk., 2019). Mitokondria *DNA* pada ikan lebih sering digunakan pada studi filogenetik daripada *DNA* inti (Muthiadin dkk., 2018). Kocher *et al.* (1989) mengatakan bahwa *DNA* mitokondria vertebrata dapat berevolusi lebih cepat daripada *DNA* inti, oleh karena itu *DNA* mitokondria lebih bersifat polimorfik dan sangat berguna untuk identifikasi spesies.

Beberapa kelebihan penggunaan mitokondria *DNA* menurut Solihin (1994) di antaranya ukuran mitokondria *DNA* relatif kecil (14-39 kb) sehingga dapat dipelajari sebagai satu kesatuan yang utuh, mitokondria *DNA* tidak diselengi intron dan ekson sehingga mudah dilakukan amplifikasi, jumlah kopi mitokondria *DNA* terdapat dalam jumlah yang tinggi sehingga mudah untuk keperluan analisis genom, dan genom mitokondria berevolusi dengan kecepatan yang berbeda, karena gen yang terkonservasi dengan baik dapat dijadikan sebagai dasar penelusuran kesamaan asal muasal (*acient taxa*) sedangkan bagian yang berubah

cepat digunakan untuk mengetahui seberapa cepat divergensi dalam spesies tersebut terjadi.

2. 4. *Cytochrome Oxidase Sub Unit I (COI)*

Region *cytochrome oxidase subunit I (COI)* adalah salah satu penyandi protein yang terdapat pada DNA mitokondria (Dawnay *et al.*, 2007). Gen *COI* merupakan gen mitokondria yang mengkode protein sitokrom oksidasi dan termasuk kategori kompleks IV dari proses fosforilasi oksidatif (Watson *et al.*, 2020). Richter & Ludwig (2003) menjelaskan bahwa gen *COI* juga berperan pada reaksi terakhir pada rantai elektron dan mentransfer elektron ke oksigen ketika memompa proton melewati membran. Gen *COI* dapat digunakan untuk identifikasi spesies, mempelajari keragaman jenis, dan hubungan kekerabatan diantara intraspecies maupun interspecies (Wibowo, 2012).

Kelebihan gen *COI* dalam identifikasi spesies adalah panjang sekuen gen *COI* relatif pendek (sekitar 600 bp) yang mampu membedakan variasi intraspecies maupun interspecies, gen *COI* relatif stabil sehingga tidak mudah mengalami perubahan, dan gen *COI* memiliki jumlah kopi yang banyak, sehingga mudah di amplifikasi (Rahayu dkk., 2019). Kelebihan lain dari penggunaan sekuen barcode gen *COI* adalah adanya database yang disebut *The Barcode of Life Data System*, database ini menyimpan dan memberikan informasi data berupa hasil sekuen barcode gen *COI*, data spesimen, tingkatan taksonomi spesies, primer yang digunakan, dan penelusuran kekerabatan (Ratnasingham *et al.*, 2007).

Gen *COI* telah banyak digunakan untuk identifikasi ikan. Batubara *et al.* (2021) telah melakukan *DNA barcoding* menggunakan sekuen DNA mitokondria

berdasarkan region *COI*. Tujuan penelitian tersebut adalah untuk identifikasi spesies *Barbonymus* di perairan Aceh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Lampam a dan Lampam b lebih dekat hubungannya dengan Naleh, serta Lampam a dan Lampam b menunjukkan identitas yang dekat dengan sekuens GenkBank *B. schwanenfeldii* (99-100%).

2. 5. *Cytochrome b* (*Cyt-b*)

Cytochrome b (*Cyt-b*) merupakan salah satu gen yang disandi oleh mitokondria *DNA* dan berperan penting dalam transfer elektron pada rantai pernapasan (Megarani *et al.*, 2020). Megarani *et al.* (2020) juga menyatakan bahwa gen *Cyt-b* termasuk kategori kompleks III dalam mitokondria yang berperan dalam proses fosforilasi oksidatif. Castresana (2001) mengemukakan bahwa kompleks III berperan dalam proses fosforilasi oksidatif untuk menghasilkan *ATP* sebagai sumber energi yang berfungsi untuk berbagai aktivitas dalam sel.

Esposti *et al.* (1993) mengemukakan bahwa struktural *Cyt-b* memiliki beberapa daerah yang sangat konservatif (misalnya, permukaan luar protein), dan daerah lain menunjukkan variabilitas yang cukup besar (misalnya transmembran wilayah dalam). Prusak *et al.* (2005) berpendapat bahwa gen *Cyt-b* dari mitokondria merupakan indikator yang kuat untuk identifikasi spesies dalam teknik analisis *DNA*. Gen *Cyt-b* cukup stabil, tidak mudah mengalami perubahan sehingga cocok untuk studi evolusi filogenetik pada tingkat intraspesifik dan interspesifik (Li *et al.*, 2018). Lee *et al.* (2008) mengungkapkan bahwa *Cyt-b* memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi cocok digunakan identifikasi spesies.

2. 6. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik ilmu pengetahuan dalam bidang biologi molekuler untuk mengamplifikasi satu atau beberapa kopian pada bagian *DNA* menjadi beberapa kali lipat menghasilkan seribu sampai jutaan *copy* pada bagian sekuen *DNA* (Shehnam, 2012). Feranisa (2016) menyatakan bahwa *PCR* adalah suatu metode enzimatik dalam bidang biologi molekuler yang bertujuan untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan jumlah kelipatan ribuan hingga jutaan salinan secara *in vitro*. Ketika awal perkembangannya, metode *PCR* hanya digunakan sebagai metode untuk melipatgandakan *DNA*. Kemudian, dikembangkan untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA.

Komponen utama dalam proses *PCR* (Irianto, 2017) terdiri dari : (1) *DNA* cetakan/*DNA* template, yaitu fragmen *DNA* yang akan dilipatgandakan; (2) Oligonukleotida primer, yaitu suatu urutan nukleotida pendek (15–25 basa nukleotida), digunakan untuk mengawali sintesis rantai *DNA*; (3) Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), yaitu suatu campuran yang terdiri atas dATP, dTTP, dGTP, dan dCTP. Dalam proses *PCR*, dNTP bertindak sebagai *building block DNA* yang digunakan dalam proses elongasi *DNA*; (4) Enzim *DNA* polimerase, yaitu enzim yang stabil bekerja pada suhu tinggi, berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi *DNA*.

Proses *PCR* melibatkan beberapa tahap yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi (Erber, 2010). Denaturasi adalah pemisahan untai ganda *DNA*. Selama proses denaturasi, *DNA* untai ganda akan membuka menjadi dua untai

tunggal. Suatu fragmen *DNA* rantai ganda (*double strand*) dipanaskan pada suhu 95°C selama 1-2 menit sehingga akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single strand*) (Yuwono, 2006). Denaturasi awal dilakukan selama 1-3 menit diperlukan untuk meyakinkan bahwa *DNA* telah terdenaturasi menjadi untaian tunggal. Denaturasi yang tidak berlangsung secara sempurna dapat menyebabkan *DNA* terputus. Tahap denaturasi yang terlalu lama dapat mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim polimerase (Triwibowo, 2010).

Annealing adalah penempelan primer pada templat. Oligonukleotida primer menempel pada *DNA* cetakan yang komplementer dengan sekuen primer (Yuwono, 2006). Tahap *annealing* primer merupakan tahap terpenting dalam PCR, jika terjadi kesalahan pada tahap ini maka akan mempengaruhi kemurnian dan hasil akhir produk *DNA* yang diinginkan. Triwibowo (2010) menyatakan bahwa faktor yang mempengaruhi tahap *annealing* antara lain suhu dan primer. Suhu *annealing* yang tepat dilakukan pada suhu 55 °C selama 1-2 menit. Ekstensi merupakan proses pemanjangan primer. Enzim *DNA polymerase* akan melakukan proses polimerasi, yakni rantai *DNA* yang baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan *DNA* cetakan. Ekstensi dilakukan pada suhu 72°C selama 1-2 menit (Yuwono 2006).

2. 7. Sekuensing *DNA*

Sekuensing *DNA* merupakan proses penting untuk memvalidasi hasil *PCR* dan uji *DNA* yang berbasis hibridisasi. Sekuensing *DNA* merupakan metode umum analisis setelah amplifikasi produk *PCR*. Melalui analisa konservasi dan

variabilitas region *DNA*, sekuensing *DNA* menjadi tahap yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan diferensiasi pada organisme (Wang *et al.*, 2012).

Van Pelt-Verkuil *et al.* (2008) berpendapat bahwa terdapat dua metode yang sering digunakan dalam sequencing *DNA* yaitu metode Sanger dan metode Maxam-Gilbert. Lilian *et al.* (2002) mengungkapkan bahwa metode Maxam and Gilbert didasari pada degradasi basa secara kimiawi. Pada metode ini *DNA* yang akan disekuensing ditandai dengan zat radioaktif fragmen *DNA* yang sudah dilabeli, merupakan subjek untuk pemecahan secara acak pada posisi basa adenine, sitosin, guanin, dan timin menggunakan kimia spesifik. Degradasi senyawa kimia ini didasarkan pada tiga tahap yaitu : perubahan basa nukleotida, penggantian dari basa yang telah mengalami perubahan pada molekul gulanya dan rantai *DNA* yang dipecah pada molekul gulanya. Hal ini akan menghasilkan sekumpulan fragmen bertanda radioaktif yang panjang sekuen tergantung pada jarak antara letak basa yang dihilangkan dengan ujung molekul radioaktif sekuen *DNA* yang dapat dibaca dari hasil pemisahan fragmen-fragmen yang terbentuk pada gel poliakrilamida.

Fatchiyah (2015) mengatakan bahwa metode Sanger pada ekstensi untai *DNA* tergantung *polymerase DNA* yang diterminasi oleh penggabungan pada dideoxynucleotide spesifik yang tidak memiliki gugus 3'- *hydroxyl* yang diperlukan untuk elongasi *DNA*. Metode Sanger ekstensi rantai *DNA* dimulai dari situs spesifik pada *DNA* cetakan dengan menggunakan oligonukleotida pendek yang disebut primer. Primer tersebut diperpanjang menggunakan *DNA* polimerase, enzim yang mereplikasi *DNA* bersama dengan primer dan *DNA*

polimerase. Empat jenis basa nukleotida (dNTP) dan nukleotid pemutus atau dalam konsentrasi rendah (ddNTP). Metode ini didasari pada penghambatan sintesis nukleotida akibat adanya persaingan antara dNTP dengan ddNTP. Penempelan ddNTP pada cetakan mengakibatkan berhentinya sintesis utas yang komplementer dengan DNA cetakan oleh dNTP. Pada reaksi ini dihasilkan berbagai fragmen yang berbeda-beda panjangnya dengan label radioaktif. Fragmen-fragmen DNA tersebut lalu dipisahkan menurut ukurannya dengan elektroforesis gel poliakrilamida (Lilian *et al.*, 2002).

Penggunaan sekuensing DNA dalam mengidentifikasi dan diferensiasi pada organisme memiliki beberapa keuntungan antara lain, beberapa spesies memiliki karakteristik morfologi luar yang sangat mirip, oleh karena itu sulit untuk membedakannya satu sama lain hanya berdasarkan karakteristik morfologis. Teknologi sekuensing DNA dapat membantu membedakan secara akurat. Perbedaan morfologi dapat sangat bervariasi selama berbagai tahap perkembangan, tetapi individu pada tahap perkembangan yang berbeda dapat diidentifikasi dengan teknologi sekuensing DNA. Sekuensing DNA memungkinkan penemuan spesies samar. Spesies samar merupakan dua atau lebih spesies yang secara morfologis serupa namun secara genetic berbeda (Bingpeng *et al.*, 2018).

2. 8. Filogenetik

Filogenetik merupakan penerapan dari kombinasi teknik statistika dan molekuler dalam menjelaskan hubungan evolusioner antar organisme atau gen. Kesamaan fungsi biologis dan mekanisme molekuler dalam organisme hidup

dapat menunjukkan bahwa suatu spesies berasal dari suatu keturunan nenek moyang yang sama (Dowell, 2005). Patwardhan *et al.* (2014) menyatakan bahwa filogenetik, hubungan evolusioner antar organisme atau gen dipelajari dengan membandingkan homolog dari sekuen (urutan) *DNA* atau protein. Ketidaksamaan dalam urutan mengindikasikan terdapat perbedaan genetik yang menghasilkan adanya evolusi molekuler dalam waktu tertentu.

Filogenetik digambarkan sebagai suatu klasifikasi secara taksonomi pada suatu organisme berdasarkan dari sejarah evolusi filogeni (Dharmayanti, 2011). Filogeni adalah deskripsi hubungan biologis, biasanya diekspresikan melalui pohon. Pernyataan filogeni antar objek mengasumsikan homologi dan bergantung pada klasifikasi. Filogeni menyatakan topologi dari hubungan berdasarkan klasifikasi menurut kemiripan karakter satu atau lebih, atau pada model proses evolusi (Lesk, 2014).

III KERANGKA PENELITIAN

3.1. Kerangka Penelitian

Daerah aliran sungai (DAS) dapat diartikan sebagai kesatuan ruang yang terdiri atas unsur abiotik (tanah, air, udara), biotik (vegetasi, binatang, organisme hidup lainnya) dan kegiatan manusia yang saling berinteraksi dan saling ketergantungan satu sama lain, sehingga membentuk satu kesatuan ekosistem (Sudaryono, 2002). Pada dasarnya DAS merupakan penampungan air, mendistribusikan air yang tertampung lewat suatu sistem saluran dari hulu ke hilir, dan berakhir di suatu tubuh air berupa danau (Fuady dkk., 2008).

Mahrudin dkk. (2021) mengatakan bahwa sungai merupakan suatu ekosistem bagi hewan di perairan yang berperan dalam penyedia sumber daya makanan dan sebagai tempat hidup hewan akuatik terutama ikan. Keputusan Presiden nomor 12 tahun 2012 tentang penetapan wilayah sungai di Jawa Timur, Provinsi Jawa Timur memiliki tujuh wilayah sungai meliputi wilayah Sungai Bengawan Solo, wilayah Sungai Brantas, wilayah Sungai Madura-Bawean, wilayah Sungai Welang-Rejoso, wilayah Sungai Bondoyudo-Bedadung, wilayah Sungai Pekalen-Sampean, dan wilayah Sungai Baru-Bajulmati. Ikan air tawar yang mendominasi di sungai Provinsi Jawa Timur terdiri dari ikan mas, ikan nila, ikan tawes, lele, dan belut (Radona dkk., 2016).

Peranan dan manfaat ikan meliputi sebagai penyeimbang ekosistem dan sumber protein (Mahrudin dkk., 2021). Keberadaan ikan yang beragam di perairan menjadi kekayaan bagi suatu daerah, karena dapat meningkatkan nilai

perekonomian masyarakat (Pratami dkk., 2018). Ikan tawes (*Barbonymus* spp.) termasuk dalam familia Cyprinidae. Nelson (2006) menyatakan bahwa familia Cyprinidae adalah familia ikan air tawar terbesar, mencakup sekitar 367 genus dan 3006 spesies. Banyaknya spesies dari familia Cyprinidae menunjukkan kemampuan familia tersebut mampu beradaptasi dan berkembang biak secara cepat (Batubara *et al.*, 2018). Kekayaan spesies dari familia Cyprinidae yang tinggi juga menunjukkan adanya kemiripan secara morfologi (Putri dkk., 2014).

Barbonymus terdiri dari sepuluh spesies yaitu: *B. belinka*, *B. altus*, *B. balleroides*, *B. collingwoodii*, *B. gonionotus*, *B. mahak-kamensis*, *B. platysoma*, *B. trigatus*, *B. sunieri*, dan *B. schwanenfeldii* (Batubara *et al.*, 2021). Ikan tawes (*Barbonymus* spp.) bernilai ekonomis tinggi sebagai ikan konsumsi dan berpotensi sebagai sumber protein (Hadisusanto dan Suryaningsih, 2011). Produksi ikan tawes hingga saat ini sebagian besar masih berasal dari tangkapan alam (Radona dkk., 2016). Upaya budidaya belum banyak dilakukan sehingga perlu dikhawatirkan terjadinya eksploitasi yang berlebihan sehingga dapat menurunkan jumlah populasi ikan tawes (Gustiano *et al.*, 2015).

Berbagai aktivitas manusia dalam memenuhi kehidupannya secara alami telah merusak ekosistem terutama di wilayah aliran sungai (Mahrudin dkk., 2021). Beberapa faktor penyebab kerusakan ekosistem di wilayah sungai meliputi pencemaran limbah domestik maupun limbah industri (Ahmad *et al.*, 2019), kegiatan eksploitasi ikan (Romundang, 2016), dan alat penangkapan ikan yang merusak (Iriansyah dkk., 2021). Kerusakan ekosistem tersebut akan berdampak pada penurunan jumlah spesies ikan. Kegiatan konservasi perlu dilakukan untuk

mencegah kepunahan dan dapat diterapkan dalam kajian keragaman suatu populasi, sehingga mampu menjelaskan status populasi ikan saat ini (Akbar dan Labenua, 2018).

Langkah awal dalam menentukan keragaman suatu populasi dilakukan melalui penanda morfologi (Ayyubi dkk., 2018). Penanda karakter morfologi yang dapat digunakan untuk mengetahui keragaman adalah morfometrik (Akbar dan Labenua, 2018). Morfometrik digunakan untuk mengukur ciri-ciri khusus, hubungan variasi dalam taksonomi populasi ikan dan sangat berguna untuk menilai variasi bentuk karena perbedaan geografis (Baur & Leuenberger, 2011).

Elvyra *et al.* (2020) menyatakan bahwa penanda morfologis memiliki beberapa keterbatasan. Salah satunya adalah bagian tubuh dari objek yang akan diidentifikasi harus lengkap, selain itu kunci identifikasi seringkali hanya cocok untuk tahap kehidupan atau jenis kelamin tertentu sehingga dibutuhkan keahlian yang tinggi dalam taksonomi. Metode lain untuk menentukan keragaman suatu populasi saat ini menggunakan penanda molekuler atau disebut *DNA barcoding* (Hajibabaei *et al.*, 2007).

Pengkajian keragaman genetik melalui penanda molekuler dapat menggunakan inti sel atau mitokondria (Solihin, 1994). Beberapa tahun terakhir sekuen *DNA* yang sering digunakan dalam penelusuran hubungan kekerabatan, penelusuran evolusi suatu spesies, dan sistematika molekuler adalah *DNA* mitokondria (Hutama *et al.*, 2017). Hal ini dikarenakan *DNA* mitokondria memiliki beberapa kelebihan di antaranya yaitu *DNA* mitokondria terdapat jumlah kopi yang tinggi sehingga menjadikannya mudah diisolasi dan dipurifikasi

(Kamarudin *et al.*, 2011), ukuran *DNA* mitokondria relatif kecil (14-39 kb) sehingga dapat dipelajari sebagai satu kesatuan yang utuh (Hebert *et al.*, 2003), dan *DNA* mitokondria bersifat khusus yaitu diturunkan melalui induk betina tanpa mengalami rekombinasi. Adanya sifat tersebut sangat berguna untuk mempelajari dan mengamati asal muasal dan biologi populasi (Susmiarsih, 2010).

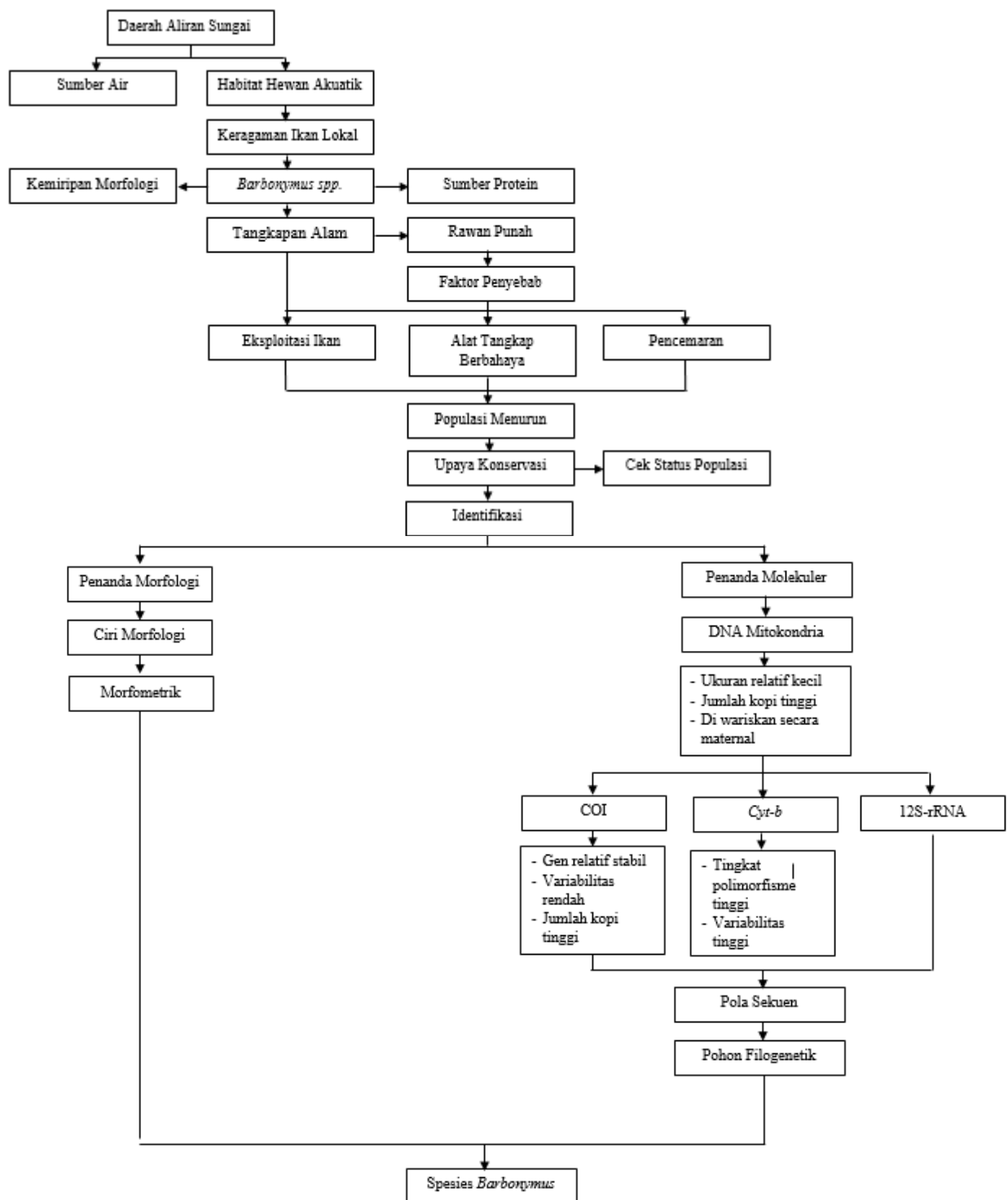
Sekuen *DNA* mitokondria yang dapat digunakan sebagai penanda molekuler adalah *COI*, *Cyt-b*, 12S-rRNA, 16S-rRNA (Hajibabaei *et al.*, 2007). Penggunaan gen *COI* memberikan peluang yang sangat cepat dan akurat sebagai marker untuk identifikasi di tingkat spesies (Dawnay *et al.*, 2007). Gen *COI* relatif stabil, tidak mudah mengalami perubahan bila dibandingkan dengan gen yang lain (Hajibabaei *et al.*, 2007). Gen *COI* juga mempunyai tingkat variabilitas yang rendah (1-2%) (Ward *et al.*, 2008), dan memiliki jumlah kopi yang banyak sehingga mudah di amplikasi dibandingkan gen yang berasal dari inti (Dawnay *et al.*, 2007).

Teknik penanda molekuler dalam sekuen *DNA* mitokondria selain gen *COI* adalah *Cytochrome b* (*Cyt-b*). Gen *Cyt-b* dapat digunakan untuk studi populasi ikan. Gen *Cyt-b* cukup stabil, tidak mudah mengalami perubahan sehingga cocok untuk studi evolusi filogenetik pada tingkat intraspesifik dan interspesifik (Li *et al.*, 2018). Lee *et al.* (2002) mengungkapkan bahwa *Cyt-b* juga memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi sehingga cocok digunakan identifikasi spesies. Struktural *Cyt-b* memiliki daerah yang sangat konservatif serta daerah yang menunjukkan variabilitas yang cukup tinggi (Espoti *et al.*, 1993)

Penggunaan gen *COI* maupun *Cyt-b* dalam analisis molekuler akan menghasilkan pola sekuen atau urutan *DNA*. Hebert *et al.* (2003) mengatakan

bahwa urutan *DNA* memberikan pengukuran terbaik dan telah terstandarisasi untuk identifikasi spesies hewan secara tepat dan akurat. Pola sekuen yang dihasilkan juga berguna untuk filogenetik. Patwardhan *et al.* (2014) menyatakan bahwa filogenetik, hubungan evolusioner antar organisme atau gen dipelajari dengan membandingkan homolog dari sekuen (urutan) *DNA* atau protein.

Berdasarkan uraian di atas, penentuan keragaman populasi ikan tawes di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur dapat dilakukan dengan penanda morfologis dan molekuler, dengan harapan untuk mengetahui keragaman genetik ikan tawes dan hubungan kekerabatan ikan tawes di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur. Kerangka konseptual disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian

IV METODOLOGI

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret - Juni 2021 di Laboratorium Toxoplasma *Institut Tropical Diseases (ITD)* Universitas Airlangga Surabaya.

4.2. Materi Penelitian

4.2.1. Peralatan penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seser, dan ember plastik untuk pengambilan sampel ikan. Peralatan yang digunakan untuk pemeriksaan molekuler ikan tawes adalah penggaris, pisau, neraca analitik (Ohaus Scout-Pro SP602), botol sample, *tube*, inkubator, tabung reaksi, *sentrifuge* (Boeco SC-8), gelas ukur, *micropipette* (Socorex Acura 825), *freezer* (Gea AB-750TX), *sectio set*, *beaker glass*, erlenmeyer, spatula, *water bath Shaker* (Sibata WS-120), *autoclave* (Hirayama HVA-85), pipet volume, kapas, cawan petri, lumpang dan alu, vortex (BR-2000 Bio-Rad), tabung reaksi, rak tabung reaksi, nampan dan PCR themal cycler (MJ Mini *Thermal Cyclers* Bio-Rad).

4.2.2. Bahan penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan tawes yang diambil di beberapa sungai di Jawa Timur. Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan molekuler ikan tawes adalah tris EDTA (Vivantis), alkohol, kit

ekstraksi gSYNC™ DNA (Geneaid), DNA kit (PROMEGA), Taq DNA Polymerase (BIOLINE), gel agarosa (Vivantis), TBE (Vivantis), EtBr (Vivantis) dan aquades, primer *Cyt-b* menggunakan 5'- TGA CTT GAA RAA CAA YCG TTG- 3' dikenal sebagai GluDG-L dan 5'- CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA- 3' dikenal sebagai CB2-H, dan primer *COI* menggunakan *fish* F1 5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3' dan R1 5'TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3'.

4.3. Jenis dan rancangan penelitian

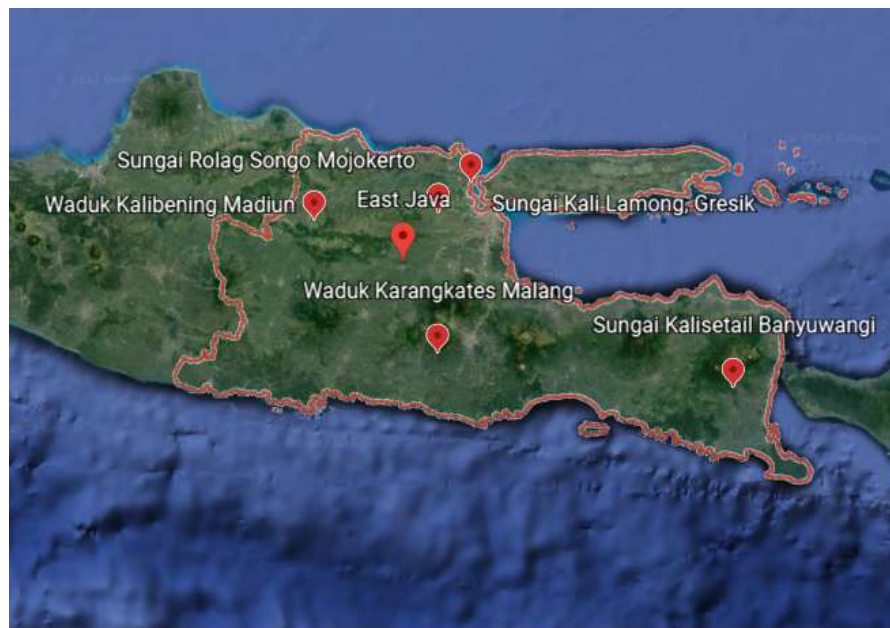
Penelitian ini menggunakan jenis eksploratif dengan pengambilan sampel pada lokasi secara langsung. Pengambilan sampel ikan didapatkan di daerah aliran sungai Provinsi Jawa Timur meliputi sungai Kali Lamong Gresik, sungai Rolag Songo Mojokerto, waduk Kali Bening Madiun, waduk Karangates Malang, dan sungai Kalisetail Banyuwangi. Rancangan penelitian ini adalah *cross sectional study* yaitu pengukuran variabel sampel pada waktu yang sama dalam kurun waktu yang ditentukan.

4.4. Prosedur Penelitian

4.4.1. Pengambilan Sampel Ikan

Pengambilan sampel ikan tawes dilakukan pada lima titik di lokasi yang berbeda. Ikan tawes yang didapatkan merupakan tangkapan dari alam yakni berasal dari beberapa sungai dan waduk di Jawa Timur. Sampel yang diperoleh berasal dari sungai kali lamong Gresik (7°12'02"S 112°40'09"E) yang merupakan daerah aliran sungai Bengawan Solo, sungai Rolag Songo Mojokerto (7°26'44"S

112°28'01"E) yang merupakan daerah aliran sungai Brantas, Waduk Kali Bening Madiun (7°32'42"S 111°47'44"E) yang merupakan daerah aliran sungai Brantas, waduk Karangates Malang (8°09'38"S 112°26'55"E) yang merupakan dari daerah aliran sungai Brantas, dan aliran sungai kalisetail yang berasal dari Banyuwangi (8°17'32"S 114°14'28"E) merupakan daerah aliran sungai Baru-Bajulmati. Jumlah masing-masing sampel dari setiap lokasi berjumlah 5 ekor dengan ukuran panjang tubuh ikan berkisar 16-18 cm dan berat tubuh ikan berkisar 25-28 gram.

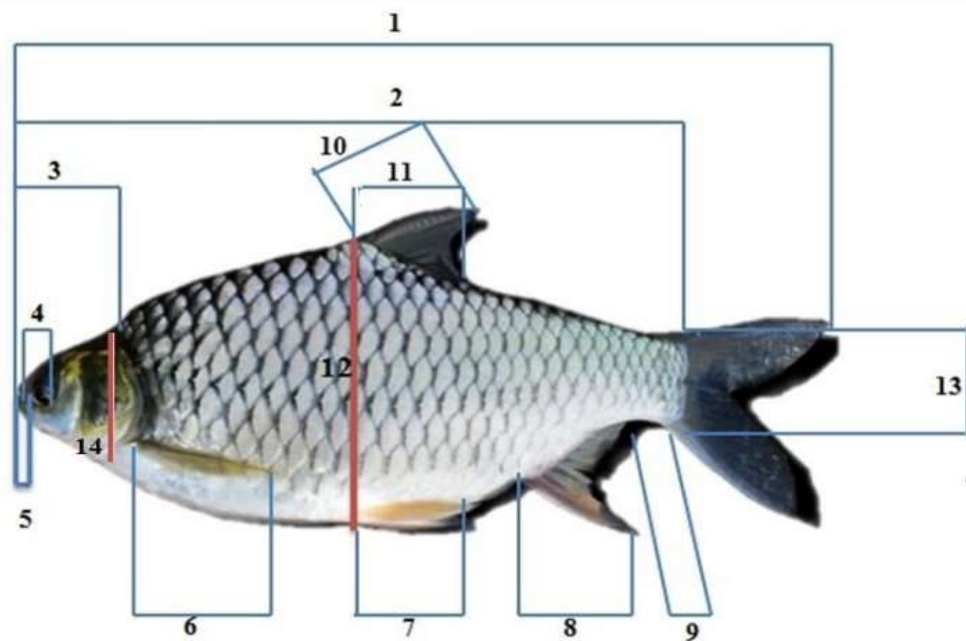


Gambar 4.1 Peta sampling Provinsi Jawa Timur

4.4.2. Identifikasi Morfologi

Semua sampel diidentifikasi karakter morfologi yakni warna tubuh, bentuk tubuh, posisi mulut, bentuk mata, bentuk sirip dan warna sirip (Ayyubi *et al.*, 2018). Identifikasi morfologi ikan tawes mengacu pada www.fishbase.se untuk mengetahui jenis ikan tawes berdasarkan ciri-ciri morfologi. Identifikasi

morfologi juga mengacu pada beberapa jurnal untuk melihat ciri-ciri khusus yang dimiliki spesies ikan tawes. Sampel ikan tawes diukur panjang tubuh, bobot tubuh dan dilakukan pengukuran morfometrik. Pengukuran morfometrik merupakan salah satu kajian penting dalam bidang perikanan yang perlu dipublikasikan secara meluas. Hal ini dipandang penting karena variasi morfometrik suatu populasi pada kondisi geografi berbeda dapat disebabkan oleh perbedaan struktur genetik dan kondisi lingkungan (Tzeng *et al.*, 2000). Parameter morfometrik yang diukur meliputi beberapa karakter yang disajikan pada Gambar 4.2 dan keterangan disajikan pada Tabel 4.1.



Gambar 4.2 Pengukuran karakter morfometrik

Tabel 4.1 Pengukuran morfometrik tubuh ikan tawes

No	Karakter Morfometrik	Keterangan
1.	Panjang Total (TL)	Jarak antara ujung bagian kepala (anterior) hingga posterior sirip ekor
2	Panjang Standar (SL)	Jarak antara anterior mulut hingga pangkal kaudal

No	Karakter Morfometrik	Keterangan
3	Panjang Kepala (HL)	Jarak antara anterior mulut hingga posterior kepala
4	Diameter Mata (ED)	Panjang garis tengah rongga mata yang diukur dari sisi anterior ke sisi posterior bola mata
5	Panjang Moncong (SnL)	Jarak awal mulut hingga ujung mulut
6	Panjang Sirip Dada (PFL)	Jarak antara pangkal sirip hingga ujung terpanjang dari sirip pectoral
7	Panjang Sirip Perut (VFL)	Jarak antara pangkal sirip hingga ujung terpanjang dari sirip ventral
8	Panjang Sirip Anal (AFL)	Jarak antara pangkal sirip hingga ujung terpanjang sirip anal
9	Panjang Batang Ekor (CPL)	Jarak yang diukur dari posterior sirip dorsal sampai batang ekor
10	Tinggi Sirip Dorsal (DD)	Jarak dasar dari jari-jari sampai ujung jari-jari terpanjang sirip dorsal
11.	Panjang Dasar Sirip Dorsal (DBL)	Jarak yang diukur garis lurus pada anterior dasar sirip dorsal sampai posterior dasar sirip dorsal
12.	Tinggi Badan (BD)	Diukur pada bagian ventral tertinggi antara bagian dorsal dengan ventral
13.	Tinggi Batang Ekor (CPD)	Diukur pada bagian batang ekor pada tempat yang terendah
14.	Tinggi Kepala (HD)	Diukur dari bagian kepala atas sampai kepala bawah

Sumber : (Ayyubi dkk, 2018)

4.4.3. Analisis DNA mitokondria

1) Ekstraksi DNA

Sampel diambil dari bagian pangkal ekor ikan tawes sebanyak 25 mg. Kemudian sampel dicuci menggunakan Tris EDTA untuk menghilangkan alkohol dan dilakukan pencacahan menggunakan pisau. Selanjutnya DNA diekstraksi menggunakan kit ekstraksi gSYNCTM *DNA Extraction* (Nuryanto *et al.*, 2020).

Prosedur pengerjaan ekstraksi DNA modifikasi dari protokol kit ekstraksi. Pertama, sampel diberi 200 μ L GST *Buffer*, kemudian sampel dicacah menggunakan silet dan diberi 20 μ L Proteinase K dan dilarutkan menggunakan vortex. Inkubasi dilakukan pada suhu 60°C selama 24 jam. Setelah sel terlisis

ditambahkan 200 μ L AE (*Elution Buffer*), lalu divortex, dan inkubasi dengan suhu 60°C. Kemudian ditambahkan 200 μ L GSB *buffer* dan dilarutkan menggunakan vortex selama 10 detik. Selanjutnya ditambahkan 200 μ L etanol absolut dan dilarutkan menggunakan vortex selama 10 detik. Supernatan dipindahkan ke GS kolom, disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, larutan penampung yang di bawah dibuang. Kemudian ditambahkan 400 μ L W1 (*Wash Buffer*), disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik, dan larutan penampung dibuang. Selanjutnya ditambahkan 600 μ L W2 (*Wash Buffer*), disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 30 detik, larutan penampung dibuang, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit. Selanjutnya kolom dipindahkan ke tube baru 1.5 ml, dan ditambahkan 60 μ L AE (*Elution Buffer*) ke dalam spin kolom berisi pellet DNA. Inkubasi dengan suhu ruang selama 15 menit, sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. DNA disimpan dalam freezer suhu - 20°C hingga akan digunakan (Setiaputri dkk., 2020).

2) Amplifikasi mtDNA dengan PCR

DNA Mitokondria yang diamplifikasikan menggunakan primer *COI fish* F1 5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT OGC AC 3' dan R1 5'TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3' (Panprommin *et al.*, 2019; Batubara *et al.*, 2021). Target gen untuk *Barbonymus gonionotus* adalah 648 bp (Panprommin *et al.*, 2019) dan *Barbonymus schwanenfeldii* adalah 655 bp (Batubara *et al.*, 2021). Reaksi PCR dilakukan dalam volume akhir yang mengandung 25 μ l, 18,75 μ l air suling, 2,25 μ l buffer 10x Taq, 0,8 μ l MgCl₂ (50mM) masing-masing primer

(0,01mM), 0,25 µl dNTPs (nukleotida trifosfat) (25 mM), 1U dari TaqDNA polymerase dan 1 µl DNA hasil ekstraksi. Kondisi optimal *PCR* terdiri dari denaturasi awal pada suhu 95 ° C selama 2 menit, 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 54°C selama 30 detik, pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit dan perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit (Panprommin *et al.*, 2019).

DNA Mitokondria diamplifikasikan menggunakan primer *Cytochrome b* (gen *Cyt-b*); 5'- TGA CTT GAA RAA CAA YCG TTG- 3' dikenal sebagai GluDG-L dan 5'- CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA- 3' dikenal sebagai CB2-H (Esa *et al.*, 2012; Esa and Kamarudin, 2009). Target gen untuk dan *Barbonymus schwanenfeldii* adalah 408 bp (Esa *et al.*, 2012).

Reaksi *PCR* menggunakan sekitar 50-100 ng template DNA diamplifikasi dalam 25 ml campuran reaksi yang mengandung 50 mM 10x buffer, 22 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,1 mM primer, dan 0,5 unit Taq DNA Polymerase. *PCR* dilakukan sebanyak 35 siklus. Pradenaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 59°C selama 30 detik, pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit, perpanjangan akhir dengan suhu 72°C selama 5 menit, serta *cooling* 15°C selama 20 menit. Produk *PCR* selanjutnya dimurnikan lebih lanjut menggunakan pemurnian DNA kit (PROMEGA) sesuai dengan instruksi manufaktur. Produk *PCR* yang dimurnikan langsung diurutkan menggunakan Kit BigDye® Terminator v3.0 pada ABI 377 termasuk sekuenser otomatis (*PE Applied Biosystem*) yang hanya menggunakan forward primer (GluDG-L) (Esa *et al.*, 2012; Esa and Kamarudin, 2009).

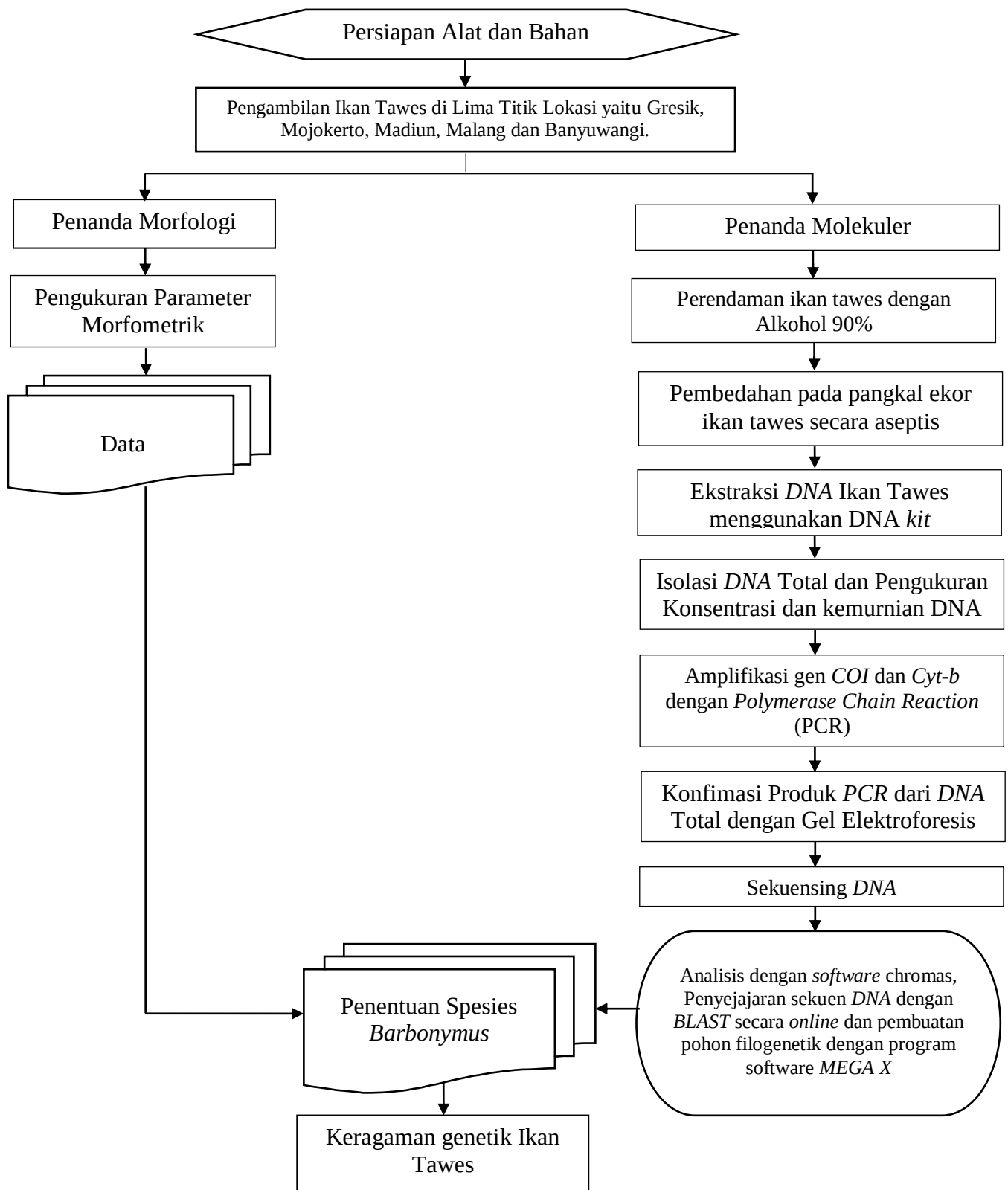
Pengecekan hasil amplifikasi *PCR* dilakukan dengan elektroforesis dan dimigrasikan menggunakan gel agarosa 1,2% terdiri atas gel agarosa 0,6 mg, TBE 1x 50mL, dan EtBr 2,5 µL pada alat *electrophoretic chamber* dengan voltase 85 selama 60 menit. Program *PCR* disesuaikan suhu lebur primer yang digunakan pada proses *annealing* dan lama waktu ekstensi (Esa *et al.*, 2012).

3) Sekuensing DNA

Produk *PCR* yang didapatkan kemudian disekuen untuk melihat runutan susunan basa nukleotida. Sekuensing dilakukan oleh PT Genetika Science dan akan dikirim ke perusahaan *integrated DNA technology (IDT)* Singapura. Runutan nukleotida yang diperoleh diedit berdasarkan hasil kromatogram menggunakan software Chromas dan *Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA)* version X (Kumar *et al.*, 2018; Panprommin *et al.*, 2021).

4.5. Analisis Data

Runutan nukleotida hasil sekuensing dijadikan input dalam *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* yang terdapat dalam GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk mengecek kemiripan dengan data yang ada di GeneBank. Selanjutnya semua sekuens dilakukan *alignment* (pensejajaran) untuk dianalisa jarak genetik dan pohon filogenetiknya dengan metode *Neighbor Joining (NJ)* model Kimura 2-parameter (Panprommin *et al.*, 2019). Diagram alir penelitian disajikan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Diagram alir penelitian

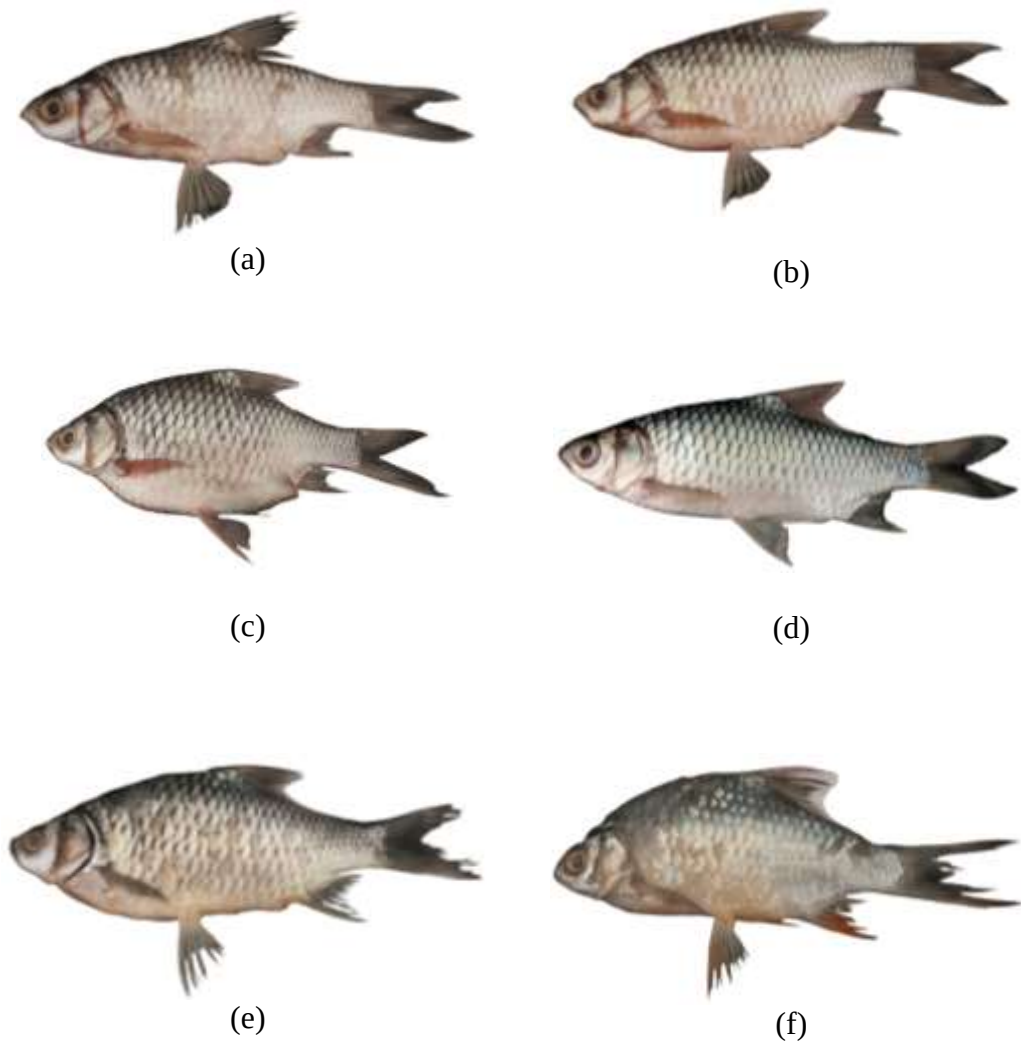
V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil

5.1.1 Identifikasi Morfologi Ikan Tawes

Identifikasi morfologi dilakukan dengan menganalisis karakter morfologi secara deskriptif. Sebanyak 5 sampel ikan tawes dari masing-masing lokasi telah dilakukan identifikasi morfologi. Pengambilan sampel ikan dilakukan secara acak berdasarkan hasil tangkapan nelayan, sehingga tidak dapat dipastikan umur dari kelompok ikan yang diambil. Karakter morfologi pada ikan tawes yang diamati di antaranya warna tubuh, bentuk tubuh, posisi mulut, bentuk sirip, dan warna sirip.

Hasil pengamatan identifikasi morfologi dari lima lokasi yang diambil didapatkan dua jenis spesies ikan. Ikan yang didapatkan dari daerah Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, dan Banyuwangi teridentifikasi sebagai *B. gonionotus* dengan bentuk punggung badan meninggi, sirip bewarna perak, bentuk sirip ekor homocercal. Adapun ikan yang berasal dari daerah Malang juga ditemukan spesies lain yaitu *B. schwanenfeldii* dengan bentuk punggung badan meninggi, sirip bewarna perak kemerahan khususnya sirip anal, dan bentuk sirip ekor homocercal. Hasil pengamatan identifikasi morfologi dapat dilihat pada Gambar 5.1 dan Perbandingan morfologi antara *B. gonionotus* dan *B. schwanenfeldii* disajikan pada Tabel 5.1.



Gambar 5.1 Hasil pengamatan identifikasi morfologi, keterangan: *Barbonymus gonionotus* berasal dari Gresik (a), Mojokerto (b), Madiun (c), Banyuwangi (d), Malang (e). *Barbonymus schwanenfeldii* berasal dari Malang (f).

Tabel 5.1 Perbandingan morfologi antara *B. gonionotus* dan *B. schwanenfeldii*

No.	Karakteristik Morfologi	<i>B. gonionotus</i>	<i>B. schwanenfeldii</i>
1.	Warna Tubuh	Keperakan dengan bagian punggung (dorsal) lebih gelap	Keperakan dengan bagian punggung (dorsal) lebih gelap
2.	Bentuk Tubuh	Pipih dengan bagian punggung (dorsal) meninggi	Pipih dengan bagian punggung (dorsal) meninggi
3.	Bentuk Mata	Bulat	Bulat
4.	Letak Mulut	Terminal	Terminal

No.	Karakteristik Morfologi	<i>B. gonionotus</i>	<i>B. schwanenfeldii</i>
5.	Warna Sirip	Warna sirip perak	Warna sirip perak kemerahan
6.	Bentuk Sirip Ekor	Homocercal	Homocercal

5.1.2 Keragaman Morfometrik Ikan Tawes

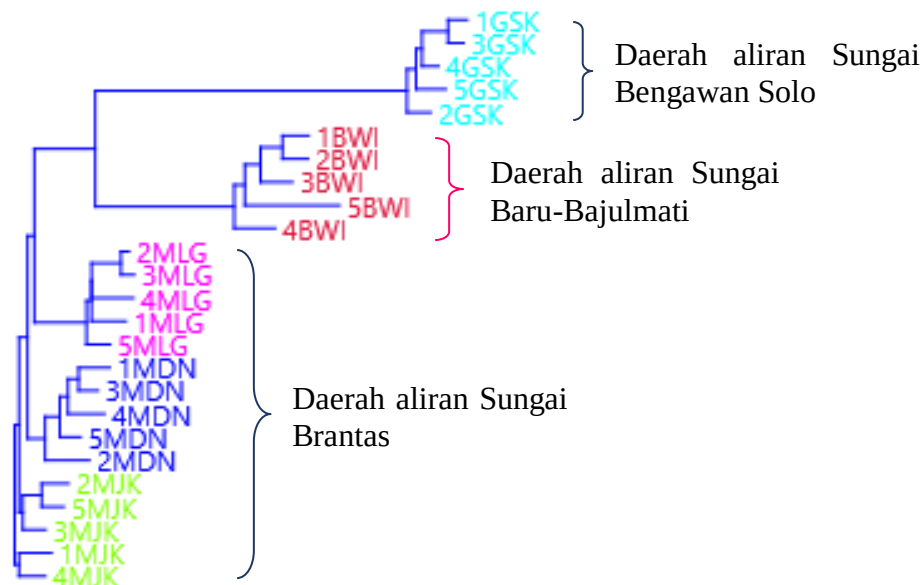
Keragaman morfometrik dianalisis *one way ANOVA* melalui *software SPSS* 25 dan dianalisis keragaman morfometrik filogenetik dengan menggunakan *neighbour joining software PAST* 4.07b. Jumlah karakter morfometrik yang dihitung sebanyak 14 karakter morfometrik. Hasil pengukuran karakter morfometrik ikan tawes disajikan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil pengukuran karakter morfometrik ikan tawes

No	Karakteristik	<i>B. gonionotus</i> Gresik (N=5)	<i>B. gonionotus</i> Madiun (N=5)	<i>B. gonionotus</i> Mojokerto (N=5)	<i>B. gonionotus</i> Malang (N=5)	<i>B. gonionotus</i> Banyuwangi (N=5)	<i>B. schwanenfeldii</i> Malang 2 (N=5)	F value
1	TL	15,10-16,40	20,10-22,30	16,50-21,70	15,10-19,70	17,70-22,10	14,00-15,30	15,653
		15,66±0,53	21,34±0,86	18,10±2,09	17,16±1,75	19,76±1,72	14,78±0,51	
2	SL	11,00-12,50	15,60-17,20	12,80-15,80	11,40-15,30	13,70-17,10	10,50-11,40	21,472
		11,38±0,63	16,4±0,61	13,80±1,24	13,06±1,45	15,24±1,32	11,02±0,33	
3	HL	1,80-2,80	3,30-4,00	2,50-3,50	2,60-3,70	3,20-3,80	2,30-2,90	14,303
		2,20±0,39	3,78±0,29	3,02±0,43	2,96±0,43	3,44±0,25	2,30±0,37	
4	ED	0,70-1,00	1,00-1,20	0,90-1,20	0,80-1,00	1,00-1,20	0,70-0,80	13,006
		0,80±0,12	1,16±0,11	1,06±0,13	0,94±0,08	1,08±0,84	0,74±0,05	
5	SnL	0,40-0,70	0,80-1,00	0,70-1,00	0,50-1,00	0,80-1,00	0,30-0,50	14,338
		0,50±0,12	0,90±0,10	0,84±0,15	0,66±0,21	0,94±0,08	0,40±0,07	
6	PFL	2,40-2,70	3,50-4,00	2,60-3,20	2,50-3,20	3,50-4,00	2,40-2,70	31,067
		2,50±0,12	3,70±0,23	2,88±0,26	2,78±0,30	3,68±0,19	2,58±0,11	
7	VFL	2,30-2,70	3,20-3,80	2,50-3,10	2,30-3,10	3,30-3,60	1,50-3,80	22,608
		2,42±0,16	3,52±0,23	2,72±0,30	2,56±0,32	3,48±0,11	2,36±0,27	
8	AFL	2,00-2,40	3,00-3,30	2,30-3,00	1,80-2,70	2,90-3,30	2,10-2,40	20,544
		2,22±0,16	3,16±0,11	2,64±0,27	2,18±0,36	3,06±0,15	2,26±0,11	
9	CPL	0,30-0,50	0,60-0,80	0,40-0,70	0,40-0,50	0,50-0,70	0,30-0,40	13,262
		0,38±0,08	0,70±0,07	0,54±0,11	0,44±0,05	0,54±0,09	0,34±0,05	
10	DD	3,00-3,20	3,70-4,50	3,20-3,90	3,00-4,00	3,30-4,50	2,50-4,80	10,186
		3,1±0,10	4,14±0,30	3,56±0,30	3,32±0,43	4,1±0,30	2,94±0,33	
11	DBL	3,00-3,50	3,90-4,60	3,00-3,60	3,10-3,90	4,00-4,40	3,00-3,70	15,066
		3,14±0,21	4,30±0,33	3,36±0,25	3,52±0,33	4,08±0,18	3,28±0,28	
12	BD	4,40-5,00	7,10-8,80	5,60-7,40	5,10-6,50	5,70-6,30	4,70-5,50	24,331
		4,74±0,28	8,00±0,67	6,42±0,736	5,70±0,60	5,90±0,25	5,14±0,38	
13	CPD	1,10-1,60	2,40-2,80	1,60-2,40	1,30-2,50	1,70-2,50	1,10-1,30	16,247
		1,30±0,21	2,64±0,15	1,98±0,30	1,68±0,48	2,06±0,38	1,18±0,08	
14	HD	1,80-2,70	3,00-3,40	2,30-3,00	2,10-3,00	2,50-3,20	1,70-2,50	8,881
		2,26±0,32	3,24±0,18	2,58±0,31	2,50±0,34	2,86±0,30	2,12±0,36	

Berat ikan tawes yang berasal dari Gresik berkisar 68,8-81,3 gram dengan panjang standar 11-12,5 cm, Mojokerto 98,4-121,8 gram dengan panjang standar 12,80-15,80 cm, Madiun 98,4-129,6 gram dengan panjang standar 15,6-17,2 cm, Banyuwangi 70,8-98,2 gram dengan panjang standar 13-17,1 cm. Ikan tawes yang berasal dari Malang terdapat 2 spesies yang didapatkan spesies *Barbonymus gonionotus* memiliki berat berkisar 100,3-116,1 gram dengan panjang standar 11,4-15,3 cm, sedangkan spesies *Barbonymus schwanenfeldii* memiliki berat berkisar 54,8-67,3 gram dengan panjang standar 10,5-11,4 cm. Hasil uji Anova one-way menunjukkan sign dari semua karakter morfometrik adalah 0,000. Berdasarkan nilai F hitung yang diujikan menggunakan uji ANOVA, nilai F hitung menunjukkan hasil lebih besar dibandingkan F tabel ($P < 0,05$). Nilai F hitung terbesar adalah pada karakter morfometrik PFL = 31,067, BD = 24,331, VFL = 22,608, dan SL = 21,472.

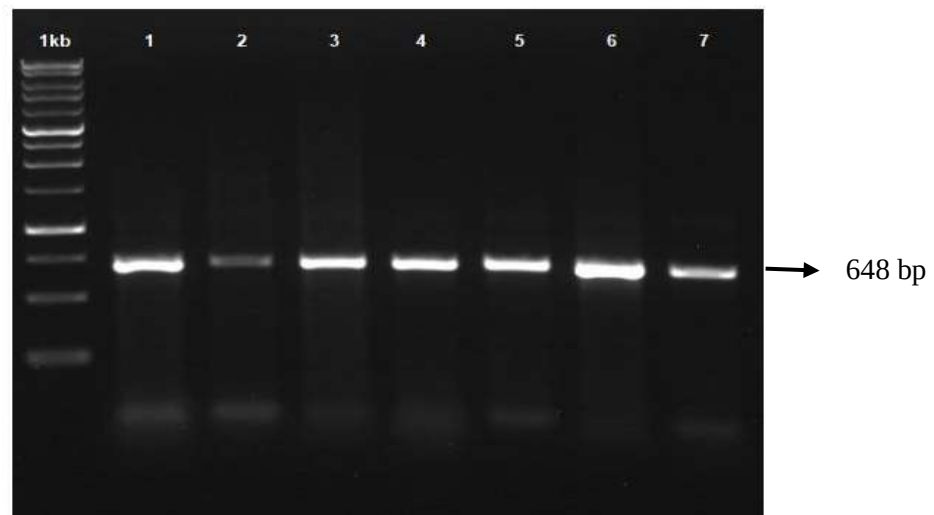
Hasil penelitian menunjukkan dari lima lokasi telah ditemukan spesies ikan tawes *Barbonymus gonionotus*. Analisis keragaman morfometrik filogenetik interspesies *Barbonymus gonionotus* dengan menggunakan *neighbour joining* pada *software PAST 4.07b*. Analisis keragaman morfometrik filogenetik interspesies *Barbonymus gonionotus* dilakukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*) di lima lokasi penelitian yang disajikan pada Gambar 5.2.



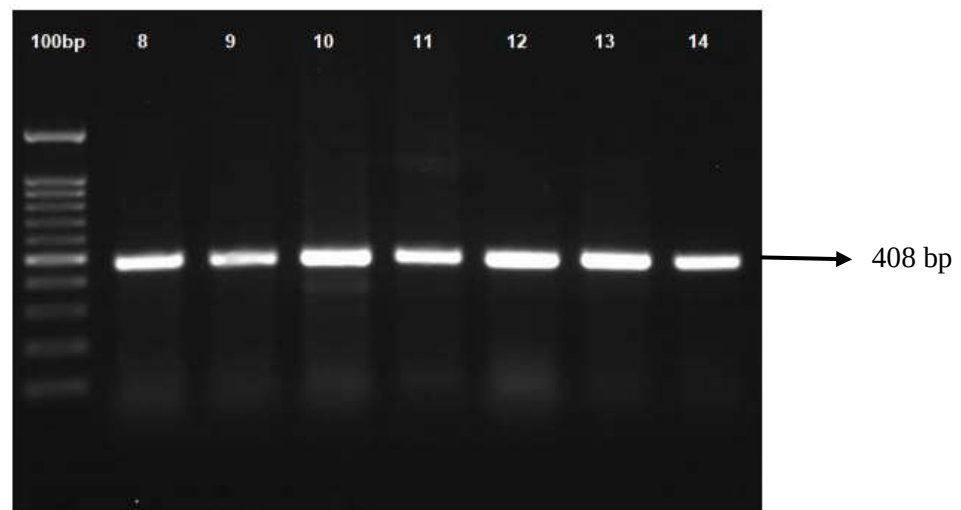
Gambar 5.2 Keragaman morfometrik dengan menggunakan *Neighbour Joining* intraspesies *Barbonymus gonionotus*. Keterangan: (GSK) : Berasal dari Gresik, (BWI): Berasal dari Banyuwangi, (MLG): Berasal dari Malang, (MJK) : Berasal dari Mojokerto, dan (MDN) : Berasal dari Madiun.

5.1.3 Identifikasi Molekuler Ikan Tawes

Identifikasi molekuler ikan tawes dilakukan dengan beberapa tahap yaitu ekstraksi DNA, PCR, elektroforesis hingga proses sekuensing yang telah dilakukan di PT Genetika Science Indonesia. Penelitian ini menggunakan 14 sampel ikan tawes untuk amplifikasi DNA dengan menggunakan 2 primer yaitu *COI* dan *Cyt-b*. Panjang target sekuens DNA berdasarkan gen *COI* adalah 648 bp (Panprommin *et al.*, 2019) (Gambar 5.3), sedangkan berdasarkan gen *Cyt-b* adalah 408 bp (Esa *et al.*, 2012) (Gambar 5.4).



Gambar 5.3 Hasil elektroforesis *PCR* berdasarkan *COI*; 1= Berasal dari Gresik, 2= Berasal dari Madura, 3= Berasal dari Madiun, 4= Berasal dari Mojokerto, 5= Berasal dari Malang, 6= Berasal dari Malang 2, 7= Berasal dari Banyuwangi.



Gambar 5.4 Hasil elektroforesis *PCR* berdasarkan *Cyt-b*; 8= Berasal dari Gresik, 9= Berasal dari Madura, 10= Berasal dari Madiun, 11= Berasal dari Mojokerto, 12= Berasal dari Malang, 13= Berasal dari Malang 2, 14= Berasal dari Banyuwangi

Proses selanjutnya dilanjutkan ke tahap sekuensing. Tujuan dari proses sekuensing yaitu untuk mendapatkan hasil sekuen berupa urutan basa nukleotida. Hasil sekuensing kemudian dilanjutkan dengan pembacaan kromatogram

menggunakan *software* Chromas 2.6. Hasil kualitas kromatogram pada sampel Madura bernilai (<20) sehingga identifikasi molekuler tidak dapat dilanjutkan karena akan mempengaruhi validasi identifikasi molekuler. Urutan nukleotida yang diperoleh dalam penelitian ini dibandingkan dengan urutan nukleotida yang terdapat pada data *GenBank*, tujuannya untuk mengetahui kesamaan sampel yang diuji. Hasil analisis *BLASTN* berdasarkan dengan kecocokan homologi data *GenBank* dapat dilihat pada Tabel 5.3.

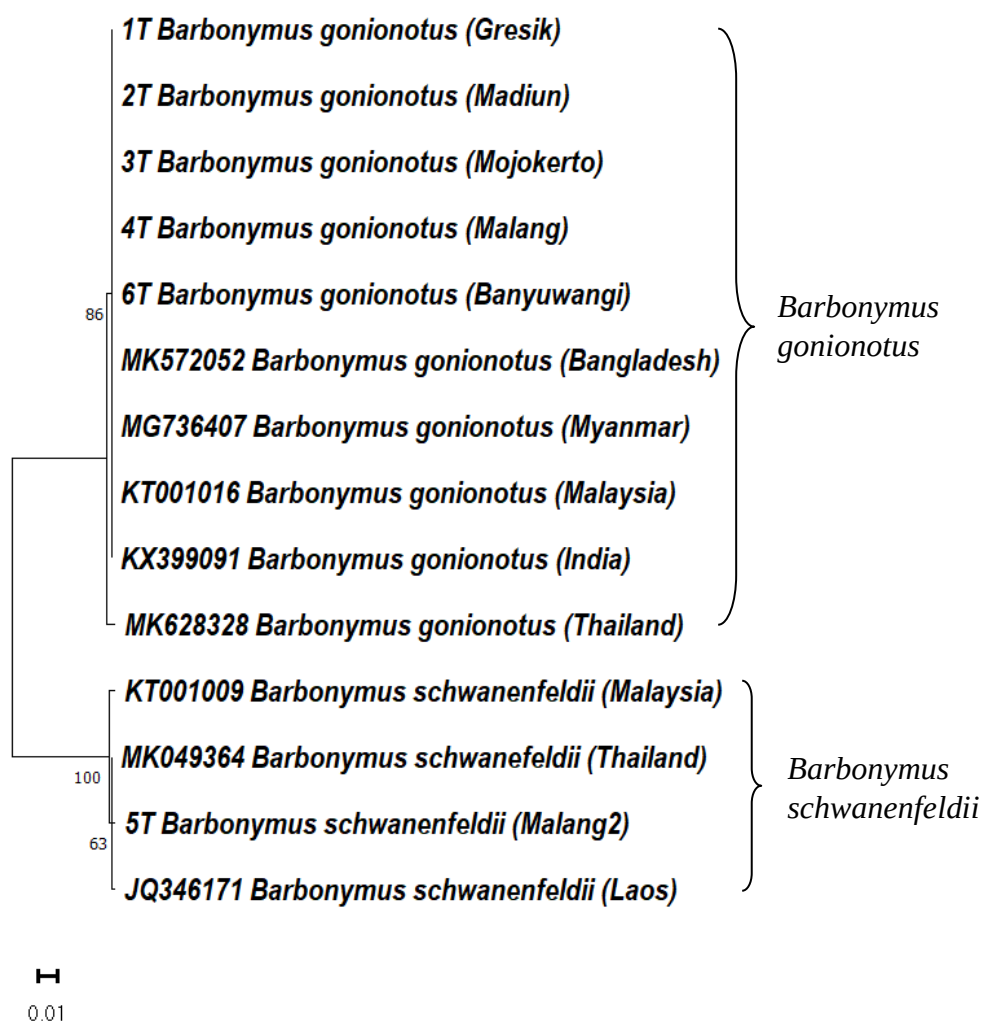
Tabel 5.3 Hasil analisis *BLASTN* berdasarkan dengan kecocokan homologi data *GenBank*

No	Kode Sampel	Asal Sampel	Spesies	COI		<i>Cyt-b</i>	
				% Identity	GenBank Accession No.	% Identity	GenBank Accession No.
1.	1T	Gresik	<i>B. gonionotus</i>	100%	KJ936769	100%	DQ366152
2.	2T	Madiun	<i>B. gonionotus</i>	100%	KJ936769	99,72%	DQ366152
3.	3T	Mojokerto	<i>B. gonionotus</i>	100%	KJ936769	99,73%	DQ366152
4.	4T	Malang	<i>B. gonionotus</i>	99,85%	KJ936769	100%	DQ366152
5.	5T	Malang 2	<i>B. schwanenfeldii</i>	99,69%	JQ34617	99%	KJ573467
6.	6T	Banyuwangi	<i>B. gonionotus</i>	100%	KJ936769	100%	DQ366152

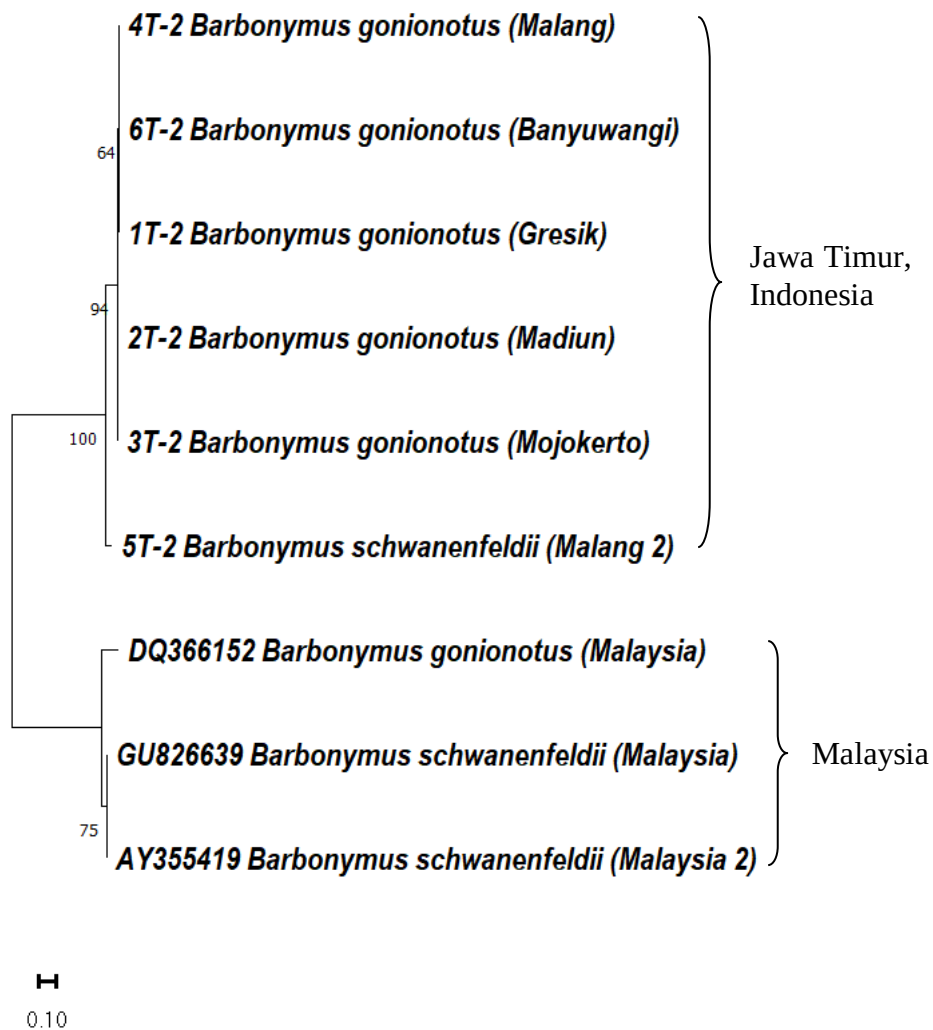
5.1.4 Pohon Filogenetik

Data hasil *BLASTN* yang didapatkan kemudian dilakukan penjajaran untuk pembuatan pohon filogenetik dengan menggunakan *Software MEGAX*. Penyuntingan menggunakan *tools alignment*, kemudian disejajarkan dengan metode *ClustalW* untuk melihat keragaman basa nukleotida. Hasil penjajaran sekuen *DNA* dengan data sekunder yang diperoleh dari *GenBank* dapat dilihat pada Lampiran 11. Hasil penjajaran kemudian digunakan pembuatan pohon

filogenetik untuk melihat tingkat kekerabatan antar spesies dan mengetahui jarak genetik dari masing-masing spesies. Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan metode *Neighbor Joining Tree*, model evolusi *Kimura 2-parameter* dan replikasi bootstraps 1000x ditunjukkan pada Gambar 5.5 dan Gambar 5.6.



Gambar 5.5 Pohon filogenetik berdasarkan Gen *COI*



Gambar 5.6 Pohon filogenetik berdasarkan *Cyt-b*

5.1.5 Jarak Genetik

Jarak genetik adalah tingkat perbedaan gen (basa nukleotida) dalam suatu spesies atau populasi diukur dengan jumlah numerik. Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar individu suatu spesies dengan individu dan spesies lainnya. Pengukuran jarak genetik menggunakan metode *pairwise Distances* dalam program *MEGA X*. Hasil pengukuran jarak genetik

Barbonymus spp. dari beberapa spesies di Jawa Timur dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Jarak genetik *Barbonymus* spp. dari beberapa spesies di Jawa Timur

Jarak Genetik	COI			Cyt-b		
	Min	Max	Average	Min	Max	Average
Intraspecies <i>Barbonymus gonionotus</i>	0,00000	0,00714	0,00357	0,00000	1,22244	0,61122
Intraspecies <i>Barbonymus schwanefeldii</i>	0,00178	0,10694	0,05436	0,09981	1,15662	0,62821
Interspecies <i>Barbonymus gonionotus</i> vs <i>Barbonymus schwanefeldii</i>	0,10478	0,10694	0,10586	0,10317	1,15662	0,62989

5.1.6 Komposisi Nukleotida

Komposisi nukleotida DNA mitokondria berdasarkan gen *COI* dan *Cyt-b* pada ikan tawes dapat dilihat pada Tabel 5.5

Tabel 5.5 Komposisi nukleotida *Barbonymus* spp. dari beberapa spesies di Jawa Timur

No	Sampel	COI					Cyt-b				
		T (U)	C	A	G	Total	T (U)	C	A	G	Total
1.	1T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Gresik)	28,2	28,7	27,7	15,4	564	32,1	14,7	26,0	27,1	361
2.	2T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Madiun)	28,2	28,7	27,7	15,4	564	32,1	14,7	25,8	27,4	361
3.	3T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Mojokerto)	28,2	28,7	27,7	15,4	564	32,1	14,7	25,8	27,4	361
4.	4T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Malang)	28,2	28,7	27,7	15,4	564	32,1	14,7	26,0	27,1	361
5.	5T <i>Barbonymus schwanefeldii</i> (Malang 2)	27,1	29,1	27,1	16,7	564	32,4	26,0	26,0	28,3	361
6.	6T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Banyuwangi)	28,2	28,7	27,7	15,4	564	32,1	14,7	26,0	27,1	361

5.1.7 Status Konservasi

Status konservasi ikan tawes (*Barbonymus* spp.) mengacu kepada *IUCN Red List of Threatened Species*. Status konservasi menjadi salah satu aspek yang perlu diperhitungkan dalam domestikasi suatu jenis spesies. Hasil status konservasi ikan tawes menunjukkan bahwa status IUCN beresiko rendah, CITES tidak dievaluasi, dan ikan tawes tidak berbahaya jika dikonsumsi oleh manusia. Status konservasi ikan *Barbonymus* spp. berdasarkan *IUCN* dan *CITES* dapat dilihat pada Tabel 5.6

Tabel 5.6 Status konservasi ikan *Barbonymus* spp. berdasarkan *IUCN* dan *CITES*

No	Kode Spesimen	Nama Spesies	Status IUCN	CITES	Ancaman Bagi Manusia
1	1T	<i>B. gonionotus</i>	LC	tidak dievaluasi	tidak berbahaya
2	2T	<i>B. gonionotus</i>	LC	tidak dievaluasi	tidak berbahaya
3	3T	<i>B. gonionotus</i>	LC	tidak dievaluasi	tidak berbahaya
4	4T	<i>B. gonionotus</i>	LC	tidak dievaluasi	tidak berbahaya
5	5T	<i>B. schwanenfeldii</i>	LC	tidak dievaluasi	tidak berbahaya
6	6T	<i>B. gonionotus</i>	LC	tidak dievaluasi	tidak berbahaya

Keterangan : Status IUCN; (LC) *Least Concern* atau Resiko Rendah.
Status CITES; *Not Evaluated* atau Belum Dievaluasi

5.2 Pembahasan

5.2.1 Analisis Keragaman Morfologi dan Morfometrik *Barbonymus* spp.

Berdasarkan hasil pengamatan identifikasi morfologi di keenam lokasi, didapatkan tiga jenis spesies yang teridentifikasi. Sampel ikan yang berasal dari Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, dan Banyuwangi teridentifikasi spesies

Barbonymus gonionotus. Analisis identifikasi morfologi dari spesies *Barbonymus gonionotus* terlihat serupa yakni posisi mulut terminal, bentuk sirip dorsal jari-jari sirip lemah mengeras, bentuk sirip caudal homocercal, bentuk tubuh panjang dan pipih dengan bagian punggung meninggi, warna tubuh perak dengan area punggung lebih gelap. Hasil identifikasi morfologi tersebut sesuai dengan penelitian Suryaningsih *et al.*, (2020).

Analisis identifikasi morfologi ikan sampel yang berasal dari Malang juga ditemukan spesies lain yaitu *Barbonymus scwhanefeldii*. Analisis identifikasi morfologinya meliputi posisi mulut terminal, bentuk sirip dorsal jari-jari sirip lemah mengeras, bentuk sirip caudal homocercal, bentuk tubuh panjang dan pipih dengan bagian punggung meninggi, warna tubuh perak, warna sirip perut, sirip anal dan sirip caudal terdapat warna kemerahan. Hasil identifikasi morfologi tersebut sesuai dengan penelitian Desrita *et al.*, (2021).

Analisis morfometrik dilakukan dengan menggunakan uji ANOVA satu arah. Hasil uji ANOVA dari 14 karakter morfometri memperlihatkan nilai F hitung lebih besar dibandingkan dengan F tabel ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data dari kelima lokasi berbeda secara signifikan. Hasil analisis keragaman morfometrik interspesies *Barbonymus gonionotus* juga dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan *Barbonymus gonionotus* dari lima lokasi yang telah ditemukan menggunakan *neighbour joining* pada *software PAST 4.07b*.

Hasil analisis keragaman morfometrik filogenetik interspesies *Barbonymus gonionotus* menunjukkan *Barbonymus gonionotus* dari kelima lokasi terpisah menjadi lima clade. Keterpisahan tersebut menunjukkan bahwa secara

morfometrik dari lima lokasi, *Barbonymus gonionotus* memiliki perbedaan atau keunikan dari masing-masing lokasi. Faktor yang memungkinkan terjadinya keunikan tersebut dipastikan akibat adanya perbedaan daerah aliran sungai. Gambar 5.3 menunjukkan sampel GSK lebih berkerabat dekat dengan BWI hal ini berkaitan dengan lokasi pengambilan GSK berada di daerah aliran sungai Bengawan Solo yang berdekatan langsung dengan laut, hal tersebut juga berlaku dengan lokasi pengambilan BWI yang berada di daerah aliran sungai Baru-Bajulmati yang juga dekat dengan laut. Hasil MLG, MDN, dan MJK memperlihatkan hubungan berkerabat dekat hal ini disebabkan daerah aliran sungai yang sama yaitu berasal dari daerah aliran sungai brantas.

5.2.2 Analisis Identifikasi Molekuler

Hasil produk *PCR* yang diperlihatkan pada Gambar 5.4 menunjukkan sebagian besar ketebalan *band* (pita) terlihat terang dan jelas, hanya hasil sampel dengan kode nomor urut 2 (Madura) yang menunjukkan ketebalan band terlihat tipis. Perbedaan ketebalan pita *DNA* yang dihasilkan dikarenakan konsentrasi *DNA* hasil ekstraksi yang dihasilkan berbeda. Mulyani dkk. (2011) mengemukakan bahwa perbedaan konsentrasi *DNA* hasil isolasi ditentukan perlakuan fisik pada proses ekstraksi dan kemampuan buffer ekstraksi dalam memecah sel. Panjang rata-rata sekuen *DNA* berdasarkan gen *COI* adalah 564 bp, sedangkan panjang rata-rata sekuen berdasarkan gen *Cyt-b* adalah 361 bp. Panjang rata-rata sekuen *DNA* tersebut merupakan hasil *trimming* diperoleh dari hasil sekuensing yang telah dilakukan pemotongan dibagian ujung kanan dan kiri pada hasil *chromatogram* menggunakan *software* Chromas 2.6.6.

Hasil sekuen kemudian dianalisis atau dilakukan pensejajaran pada *BLASTN* di NCBI dengan tujuan membandingkan sekuen *DNA* yang diperoleh dengan sekuen *DNA* yang telah terdaftar pada *GenBank*. Hasil analisis *BLASTN* berdasarkan gen *COI* menunjukkan sampel ikan yang berasal dari Gresik, Madiun, Mojokerto, dan Banyuwangi teridentifikasi jenis *Barbonymus gonionotus* dengan *accession number* KJ936769 memiliki tingkat kemiripan sekuen sebesar 100%. Sampel ikan yang berasal dari Malang teridentifikasi dua jenis spesies yakni *Barbonymus gonionotus* dengan *accession number* KJ936769 memiliki tingkat kemiripan sekuen sebesar 99,85% dan *Barbonymus schwanenfeldii* dengan *accession number* JQ34617 memiliki tingkat kemiripan sekuen sebesar 99,69%.

Hasil analisis *BLASTN* berdasarkan gen *Cyt-b* menunjukkan sampel ikan yang berasal dari Gresik dan Banyuwangi teridentifikasi jenis *Barbonymus gonionotus* dengan *accession number* DQ366152 memiliki tingkat kemiripan sekuen sebesar 100%. Sampel ikan yang berasal dari Madiun dan Mojokerto juga teridentifikasi *Barbonymus gonionotus* memiliki tingkat kemiripan sekuen masing-masing sebesar 99,72% dan 99,73%. Hasil analisis *BLASTN* berdasarkan gen *Cyt-b* pada sampel ikan yang berasal dari Malang juga teridentifikasi dua jenis spesies yakni *Barbonymus gonionotus* dengan *accession number* DQ366152 memiliki tingkat kemiripan sekuen sebesar 99,85% dan *Barbonymus schwanenfeldii* dengan *accession number* KJ573467 memiliki tingkat kemiripan sekuen sebesar 99,69%.

Berdasarkan hasil analisis *BLASTN* berdasarkan gen *COI* dan *Cyt-b* menunjukkan tingkat kemiripan sekuen sebesar $\geq 99\%$ sehingga menunjukkan

bahwa spesies yang dibandingkan merupakan spesies yang sama. Hal ini sesuai penjelasan dari Bhattacharjee *et al.* (2012) yang mengemukakan bahwa tingkat persentase kemiripan pada rentang 98-100% menjelaskan tentang homologi sekuen pada tingkat spesies yang sama. Hasil analisis *BLASTN* berdasarkan gen *COI* dan *Cyt-b* selain menunjukkan tingkat kemiripan di antara 99-100% juga memiliki nilai *e-value* 0,0. Menurut Maulid dkk. (2016) menjelaskan bahwa nilai *e-value* 0 menunjukkan hasil perbandingan yang diberikan identik dan dapat dipercaya. Nilai *e-value* semakin mendekati satu maka nilai *e-value* tidak bisa dipercaya.

5.2.3 Analisis Pohon Filogenetik dan Jarak Genetik

Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan metode *Neighbor Joining Tree*, model evolusi *Kimura 2-parameter*, dan replikasi *bootstraps* 1000x ditunjukkan pada Gambar 5.5 dan Gambar 5.6. Hasil dari analisis filogenetik berdasarkan gen *COI* dan *Cyt-b* menunjukkan terpisah menjadi dua *Clade* berdasarkan jenis spesies. *Clade* 1 pada gen *COI* merupakan kelompok spesies *Barbonymus gonionotus*. Hasil pohon filogenetik menunjukkan bahwa kelima sampel penelitian (Gresik, Madiun, Mojokerto, Malang, Banyuwangi) memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan KT001016 (Malaysia), KX399091 (India), MG736407 (Myanmar), dan MK572052 (Bangladesh), serta terlihat berkerabat jauh dengan MK628328 (Thailand). *Clade* 2 pada gen *COI* merupakan kelompok spesies *Barbonymus schwanenfeldii*. Hasil pohon filogenetik menunjukkan bahwa *Barbonymus schwanenfeldii* yang berasal

dari Malang berkerabat dekat dengan MK049364 (Malaysia) dan KT001009 (Thailand), serta terlihat berkerabat jauh dengan JQ346171 (Laos).

Penggunaan *COI* telah terbukti sebagai penanda untuk identifikasi spesies. Pohon filogenetik berdasarkan gen *COI* menunjukkan keterpisahan jenis spesies antara *B. gonionotus* dan *B. schwanenfeldii*. Hasil pohon filogenetik menunjukkan adanya kedekatan sampel penelitian dengan sampel yang berasal dari beberapa negara lain. Ikan tawes menurut Radona dkk. (2016) merupakan salah satu ikan endemik lokal perairan tawar Indonesia. Keberadaan ikan tawes di beberapa negara diakibatkan sejarah topografi ketika kepulauan negara Indonesia masih tergabung menjadi satu kontinen besar yakni lempeng Sunda. Pada masa tersebut dataran rendah tenggelam akibat naiknya permukaan air laut dengan peningkatan ketinggian permukaan air laut yang disebabkan oleh mencairnya es di kutub bumi (Kotaki *et al.*, 2010).

Penggunaan gen *Cyt-b* menunjukkan hasil ikan sampel penelitian dengan *database* GenBank memiliki populasi yang berbeda sehingga pohon filogenetik terpisah menjadi dua clade berdasarkan letak geografis. *Clade* 1 pada gen *Cyt-b* merupakan kelompok spesies ikan yang diteliti yakni dari provinsi Jawa Timur, Indonesia. *Clade* 1 terdiri dari dua kelompok yakni kelompok spesies *Barbonymus gonionotus* dan kelompok spesies *Barbonymus schwanenfeldii*. *Clade* 2 merupakan kelompok pembandingan dari *GenBank* yang berasal dari Malaysia. *Clade* 2 juga terdiri dari dua kelompok yakni kelompok spesies *Barbonymus gonionotus* dan kelompok spesies *Barbonymus schwanenfeldii*. Pohon filogenetik yang dibangun memiliki nilai *bootstrap* di antara 64-100%.

Penggunaan *Cyt-b* telah terbukti dapat dijadikan sebagai studi populasi dengan menunjukkan hasil keterpisahan populasi ikan tawes Jawa Timur, Indonesia dengan ikan tawes asal Malaysia. Hasil pohon filogenetik berdasarkan gen *Cyt-b* menunjukkan bahwa ikan tawes yang berasal dari Jawa Timur, Indonesia berbeda dengan ikan tawes asal Malaysia. Perbedaan tersebut terjadi karena pengaruh kondisi habitat, adanya perbedaan komposisi makanan dan perbedaan faktor fisika, kimia dan karakteristik habitat.

Penghitungan jarak genetik dilakukan menggunakan model Kimura 2 Parameter (Tabel 5.4). Nilai jarak genetik minimum intraspecies *Barbonymus gonionotus* pada gen *COI* adalah 0,00000, maksimum 0,00714 dan rata-rata 0,00357. Nilai jarak genetik minimum intraspecies *Barbonymus gonionotus* pada gen *COI* adalah 0,00178, maksimum 0,10694 dan rata-rata 0,05436. Sedangkan jarak minimum interspecies *Barbonymus gonionotus* versus *Barbonymus schwanenfeldii* adalah 0,10478, maksimum 0,10694, dan rata-rata 0,10586.

Nilai jarak genetik minimum intraspecies *Barbonymus gonionotus* pada gen *Cyt-b* adalah 0,00000, maksimum 1,22244 dan rata-rata 0,61122. Nilai jarak genetik minimum intraspecies *Barbonymus gonionotus* pada gen *Cyt-b* adalah 0,09981, maksimum 1,15662, dan rata-rata 0,62821. Sedangkan jarak minimum interspecies *Barbonymus gonionotus* versus *Barbonymus schwanenfeldii* adalah 0,10317, maksimum 1,15662, dan rata-rata 0,62989.

Nilai *bootstrap* pada pohon filogenetik diperoleh sebesar 63-100%. Dharmayanti (2011) menyatakan bahwa nilai *bootstrap* adalah nilai yang digunakan untuk menguji seberapa baik set model yang telah digunakan, jika nilai

bootstrap rendah maka sekuen dari analisis untuk mendapatkan sebuah pohon filogenetik menjadi tidak dapat dipercaya. Nilai *bootstrap* dikategorikan kuat (>85%), sedang (70-85%), lemah (50-69%) atau buruk (<50%) (Kress *et al.*, 2002). Nilai *bootstrap* yang ditampilkan pada pohon filogenetik sebesar >60%.

5.2.4 Analisis Komposisi Nukleotida

Komposisi nukleotida dan rata-rata basa *DNA* yang ditemukan pada sampel penelitian spesies *Barbonymus gonionotus* berdasarkan gen *COI* didapatkan *Thymine* (T) (28,2%), *Cytosine* (C) (28,7%), *Adenine* (A) (27,7%), dan *Guanine* (G) (15,4%). Sampel penelitian spesies *Barbonymus gonionotus* tidak terjadi mutasi genetik, hal ini dikarenakan spesies tersebut memiliki sekuen yang identik. Sedangkan Komposisi nukleotida dan rata-rata basa *DNA* yang ditemukan pada *Barbonymus schwanefeldii* berdasarkan gen *COI* didapatkan *Thymine* (T) (27,1%), *Cytosine* (C) (29,1%), *Adenine* (A) (27,1%), dan *Guanine* (G) (16,7%).

Komposisi nukleotida dan rata-rata basa *DNA* yang ditemukan pada sampel penelitian spesies *Barbonymus gonionotus* berdasarkan gen *Cyt-b* terlihat sampel yang berasal dari Gresik, Malang, dan Banyuwangi memiliki sekuen yang identik yakni didapatkan *Thymine* (T) (32,1%), *Cytosine* (C) (14,7%), *Adenine* (A) (26,0%), dan *Guanine* (G) (27,1%), sedangkan sampel Madiun dan Mojokerto memiliki sekuen yang identik yakni didapatkan *Thymine* (T) (32,1%), *Cytosine* (C) (14,7%), *Adenine* (A) (25,8%), dan *Guanine* (G) (27,4%). Komposisi nukleotida dan rata-rata basa *DNA* yang ditemukan pada *Barbonymus schwanefeldii* berdasarkan gen *Cyt-b* didapatkan *Thymine* (T) (32,4%), *Cytosine* (C) (26,0%), *Adenine* (A) (26,0%), dan *Guanine* (G) (28,3%).

5.2.5 Status Konservasi

Berdasarkan status konservasinya, menurut data *IUCN* Red List, spesies *Barbonymus gonionotus* dan *Barbonymus schwanenfeldii* masuk dalam kategori *least concern (LC)* atau resiko rendah. Kedua spesies ini menurut data *CITES* belum dievaluasi atau *Not Evaluated*. Kedua spesies tersebut tergolong ikan yang aman dikonsumsi oleh manusia. Keberadaan ikan tawes cukup banyak di alam bebas, selain itu kedua spesies ini merupakan kelompok ikan yang hidupnya didalam kawanan dan selalu bersama didalam jumlah yang banyak sehingga perkembangannya dan reproduksinya terbilang cepat. Akan tetapi hal-hal tersebut tidak bisa diacuhkan dan disepelekan karena jika tidak dilakukan pengawasan atau pengendalian terhadap kegiatan perikanan dan penangkapan maka berpotensi menjadi *overfishing* serta eksploitasi besar-besaran yang dapat menurunkan jumlah populasi spesies ini di alam bebas dan untuk waktu jangka lama dapat mengalami kepunahan.

5.2.6 Analisis Hubungan Morfologi, Morfometrik dan Genetik

Hasil analisis identifikasi morfologi dan genetik menunjukkan telah ditemukan dua spesies ikan yakni spesies *Barbonymus gonionotus* dan *Barbonymus schwanenfeldii*. Analisis identifikasi morfologi dilakukan sebagai langkah awal dalam menentukan keragaman suatu populasi ikan. Hasil dari analisis identifikasi morfologi secara umum *Barbonymus gonionotus* memiliki ciri-ciri meliputi posisi mulut terminal, bentuk sirip dorsal jari-jari sirip lemah mengeras, bentuk sirip caudal homocercal, bentuk tubuh panjang dan pipih dengan bagian punggung meninggi, warna tubuh perak dengan area punggung

lebih gelap. Sampel yang teridentifikasi *Barbonymus gonionotus* berasal dari Gresik, Mojokerto, Madiun, Malang, dan Banyuwangi. Secara umum sampel dari kelima lokasi tersebut memiliki ciri-ciri morfologi yang sama.

Baur & Leuenberger (2011) berpendapat bahwa keragaman morfologi dan morfometrik disebabkan beberapa faktor seperti perbedaan kondisi lingkungan, topografi dan habitat yang berbeda. Hasil identifikasi morfologi dilihat dari aspek lingkungan menunjukkan ikan tawes yang berasal dari sungai cenderung memiliki tubuh yang lebih ramping dibandingkan ikan yang diperoleh dari waduk. Hal tersebut berkaitan dengan penyesuaian terhadap lingkungan. Santos *et al.* (2010) mengemukakan ikan tawes sungai cenderung melawan arus dan bergerak lebih aktif dibandingkan ikan perairan lentik yang tidak berarus.

Spesies lain yang teridentifikasi adalah *Barbonymus schwanenfeldii* ciri-cirinya meliputi posisi mulut terminal, bentuk sirip dorsal jari-jari sirip lemah mengeras, bentuk sirip caudal homocercal, bentuk tubuh panjang dan pipih dengan bagian punggung meninggi, warna tubuh perak, warna sirip perut, sirip anal dan sirip caudal terdapat warna kemerahan.

Baur & Leuenberger (2011) mengemukakan identifikasi morfologi dilakukan dengan mengukur karakter morfometri. Morfometrik digunakan untuk mengukur ciri-ciri khusus, dan sangat berguna untuk menilai variasi bentuk karena perbedaan geografis. Hasil analisis keragaman morfometrik interspesies *Barbonymus gonionotus* menggunakan *neighbour joining* pada *software PAST* 4.07b menunjukkan sampel ikan yang berasal dari Gresik dan Banyuwangi terlihat memiliki kekerabatan yang dekat, hal tersebut akibat pengambilan sampel

sama-sama dekat dengan laut, sedangkan sampel ikan yang berasal dari Mojokerto, Madiun dan Malang terlihat memiliki kekerabatan yang dekat, hal tersebut diduga akibat aliran sungai yang sama yaitu aliran sungai berantas.

Untuk mempertegas hasil identifikasi morfologi yang telah dilakukan langkah selanjutnya dilakukan analisis genetik. Analisis genetik dilakukan menggunakan *DNA* mitokondria berdasarkan gen *COI* dan *Cyt-b*. Penggunaan gen *COI* digunakan untuk identifikasi spesies *Barbonymus* sedangkan gen *Cyt-b* digunakan untuk melihat populasi ikan. Hasil analisis genetik berdasarkan gen *COI* menunjukkan sampel ikan yang diteliti dibandingkan *database* GenBank teridentifikasi spesies *Barbonymus gonionotus* dan *Barbonymus schwanenfeldii*. Hasil analisis genetik berdasarkan gen *Cyt-b* menunjukkan sampel ikan yang diteliti dibandingkan *database* GenBank memiliki populasi yang berbeda dengan ditunjukkan pada pohon filogenetik (Gambar 5.6).

VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Hasil pengukuran 14 karakter morfometrik menunjukkan karakter morfometrik antar sampel dari kelima lokasi berbeda secara signifikan. Hasil urutan sekuen *DNA* ikan tawes di lima lokasi dibandingkan dengan GenBank berdasarkan region mitokondria *COI* dan *Cyt-b* memiliki persentase kemiripan sekuen berkisar 99-100%. Hasil identifikasi molekuler telah berhasil mengidentifikasi dua spesies ikan tawes yaitu *Barbonymus gonionotus* dan *Barbonymus schwanenfeldii*. Hubungan kekerabatan antar sampel dapat ditunjukkan melalui pohon filogenetik, serta nilai jarak genetik berdasarkan gen *COI* berkisar 0,00000-0,10694, sedangkan nilai jarak genetik berdasarkan gen *Cyt-b* berkisar 0,00000-1,15662.

6.2 Saran

Dalam penelitian berikutnya dapat dikembangkan wilayah studi dengan membandingkan jenis *B. gonionotus* dan *B. schwanenfeldii* dari sejumlah wilayah di Indonesia. Hal ini sangat penting dalam pengembangan *breeding* ikan tawes di Indonesia untuk mendapatkan variasi genetik yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, N., B. Yanuwadi, C. Retnaningdyah, L. Hakim. 2019. Diversity and conservation status of fish in the water of Rolag Songo Dam, Mojokerto district East Java Indonesia. IOP Conf. Series Earth and Environmental Science 391:1-6.
- Akbar, N., dan R. Labenua. 2018. Keragaman genetik ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*) di Perairan Laut Maluku Utara. Depik Jurnal, 7(2): 164-176.
- Ayyubi, H., A. Budiharjo, dan Sugiyarto. 2018. Studi keragaman populasi ikan tawes (*Puntius javanicus*) di Sungai Bengawan Solo, Sungai Dengkeng dan Sungai Opak berdasarkan morfometri. Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Saintek III, 05/05/2018. hal. 222-228.
- Bain, M. B., and H. Jia. 2012. Habitat model for fish communities in large streams and small rivers. International Journal of Ecology, 2012: 1-8.
- Batubara, Agung S., D. Efizon, R. Elvyra, S. Rizal, and Z. A. Muchlisin. 2018. Population dynamics of the Naleh Fish *Barbonymus* sp. (Pisces: Cyprinidae) in Nagan River Waters, Aceh Province, Indonesia. Jordan Journal of Biological Sciences, 12 (3): 361-366.
- Batubara, A. S., Z. A. Muchlisin, D. Efizon, R. Elvyra, N. Fadli, S. Rizal, M. N. S. Azizah, and M. Wilkes. 2021. DNA barcoding (COI genetic marker) revealed hidden diversity of cyprinid fish (*Barbonymus spp.*) from Aceh Water, Indonesia. Biharean Biologist, 15 (1): 39-47.
- Baur H, Leuenberger C. 2011. Analysis of ratios in multivariate morphometry. Systematic Biology, 60(6): 813-825.
- Bhattacharjee M. J., B. A. Laskar, B. Dhar, S. K. Ghosh. 2012. Identification and re-evaluation of freshwater catfishes through DNA barcoding. Plos One, 7:1-7.
- Bingpeng, X., L. Heshan, Z. Zhilan, W. Chunguang, W. Yanguo, W. Jianjun. 2018. DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan strait. PLoS ONE, 13 (6): 1-13, e0198109.
- Castresana, J. 2001. Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of Great Apes and mammals. Molecular Biology and Evaluation, 18(4): 465-471.

- Dawnay, N. R. Ogden, R. McEwing, G. R. Carvalho, R. S. Thorpe. 2007. Validation of the barcoding COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International*, 173: 1-6
- Desrita, F. K. Hasugian, E. Yusni, V. R. Manurung, R. Rambey. 2021. Feeding habits of Tinfoil barb, *Barbonymus schwenenfeldii* in the Tasik River, South Labuhanbatu, North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*, 22(4): 2131-2135.
- Dharmayanti, N. I. 2011. Molecular phylogenetic: Organism taxonomy method based on evolution history. *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, 21 (1): 1-10.
- Dowell, Karen. 2005. Molecular phylogenetics an introduction to computational methods and tools for analyzing evolutionary relationships. *Math*, 500: 1-19
- Elvyra, Roza, D. D. Solihin, R. Affandi, M. Z. Junior, and M. Suhendra. 2020. Short Communication: Molecular characteristics and phylogenetic relationships of silurid catfishes (*Kryptopterus*, *Ompok* and *Phalacronotus*) from the Kampar River, Indonesia, based on the cytochrome b gene. *Biodiversitas*, 21 (8), 3539-3546.
- Erber, W. N. 2010. Diagnostic techniques in hematological malignancies. New York. Cambridge University Press. p. 51-70.
- Esa, Y. B., J. R. R. Japning, K. A. A. Rahim, S. S. Siraj, S. K. Daud, S. G. Tan, and S. Sungan. 2012. Phylogenetic realitionsips among several freshwater fishes (Family: Cyprinidae) in Malaysia inferred from partial sequencing of the cytochrome b mitochondrial DNA (mtDNA) gene. *Pertanika Journal Tropical Agricultural Science*, 35(2): 307-318.
- Espoti, M. D., S. D. Vries, M. Crimi, A. Ghelli, T. Patarnello, and A. Meyer. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143:243-271.
- Fatchiyah. 2015. Prinsip dasar bioinformatika. Universitas Brawijaya Press. Malang. 126 hal.
- Feranisa, A. 2016. Komparasi antara Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) dalam diagnosis molekuler. *ONDOTO Dental Journal*, 3(2): 145-151.
- Fuady, Z., C. Azizah. 2008. Tinjauan daerah aliran sungai sebagai sistem ekologi dan manajemen daerah aliran sungai. *Lentera*, 6(1) :1-10.
- Hadisusanto, S. dan S. Suryaningsih. 2011. *Puntius orphoides* Valenciennes, 1842: Kajian ekologi dan potensi untuk domestikasi. *Biota*, 16 (2): 214-220.

- Hajibabei, M., G. A. C. Singer, P. D. N. Hebert, A. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4): 167-172.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.
- Hutama, A., H. Dahruddin, F. Busson, S. Sauri, P. Keith, R. K. Hadiaty, R. Hanner, B. Suryobroto, N. Hubert. 2017. Identifying spatially concordant evolutionary significant units across multiple species through DNA barcode: Application to the conservation genetics of the freshwater fishes of Java and Bali. *Global Ecology and Conservation* 12: 170-187.
- Iriansyah, E. Rosadi, S. Aminah, W. Sari. 2021. Penyuluhan terhadap nelayan dalam upaya pencegahan ilegal fishing di Perairan Rawa Danau Bangkai Kecamatan Kandangan Kabupaten Hulu Sungai Selatan. *Aquana*, 2(2): 125-128.
- Irianto, K. 2017. *Biologi Molekuler*. Bandung. Alfabeta. Hal.375-531.
- Kamarudin, K.R., and Y. Esa. 2009. Phylogeny and phylogeography of *Barbonymus schwanenfeldii* (Cyprinidae) from Malaysia inferred using partial cytochrome b mtDNA gene. *Journal of Tropical Biology and Conservation*, 5(1): 1-13.
- Kamarudin, K.H., A.M. Rehan, R. Hashim, G. Usup, H.F. Ahmad, M.H. Anua, and M.Y. Idris. 2011. Molecular phylogeny of holothuria (*Mertensiothuria*) *leucospilota* (Brandt 1835) as inferred from cytochrome C oxidase I mitochondrial DNA gene sequences. *Sains Malaysiana*, 40 (2): 125-133.
- Karlina, W., D. I. Roesma, and D. H. Tjong. Phylogenetic study of *Puntius* cf. *binotatus* fish from Gunung Tujuh Lake in Sumatera Based on cytochrome b gene. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(2): 538-540.
- Kartika, G. R. A, A. Sartimbul, dan N. Widod. 2016. Varian genetik *Sardinella lemuru* di Perairan Selat Bali berdasarkan gen cytochrome oksidase sub unit I (COI). *Seminar Nasional Kelautan*, 27/07/2016. Hal 10-22.
- Kottelat, M., A.J. Whitten, S.N. Kartikasari and S. Wirjoatmodjo. 1993. *Freshwater fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. Periplus Editions, Hong Kong. 221 p.

- Kottelat, M. and E. Widjanarti. 2005. The fishes of Danau Sentarum National Park and the Kapuas lakes area, Kalimantan Barat, Indonesia. The Raffles Bulletin of Zoology Supplement, 13: 139-173.
- Kress, W. J., L. M. Prince, and K. J. Williams. 2002. The Phylogeny and A New Classification of The Gingers (Zingiberaceae): Evidence From Molecular Data. American Journal of Botany, 89(11): 1682-1696.
- Kure, S., B. Winarta, Y. Takeda, K. Udo, M. Umeda, A. Mano, H. Tanaka. 2014. Effects of Mud Flows from the LUSI mud volcano on the Porong River estuary, Indonesia. In: Green, A.N. and Cooper, J.A.G. (eds.). Journal of Coastal Research, Special Issue No. 70, pp. 568-573.
- Lee, S. D., Y. S. Lee, J. B. Lee. 2002. Polymorphism in the mitochondrial cytochrome b gene in Koreans an additional marker for individual identification. International Journal Legal Medicine 116: 74-78.
- Lesk, A.M. 2014. Introduction to bioinformatics. Fourth Edition. Oxford Pres. 440p.
- Li, X., X. Shen, X. Chen, D. Xiang, R. W. Murphy, Y. Shen. 2018. Detection of potential problematic Cyt b gene sequences of fishes in GenBank. Frontiers in Genetics, 9: 1-5.
- Lilian, F. C., E. Carrilho, and T. B. L. Kist. 2002. A review of DNA sequencing techniques. Quarterly Reviews of Biophysics, 35 (2): 169–200.
- Mahrudin, R. Irianti, S. Z. Zalfa, N. A. Rahma, N. Puteri, N. A. Fajerati. 2021. Keanekaragaman jenis ikan familia cyprinidae di Sungai Nagara Kecamatan Daha Utara Kabupaten Hulu Sungai Selatan. Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah, 2/02/2021, 6(2):1-7.
- Maulid, Y. M., M. Nurimala, Nurjanah dan H. Madduppa. 2016. Karakteristik molekuler cytochrome untuk DNA barcoding ikan tenggiri. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia, 19(1): 9-16.
- Megarani, D. V., H. A. Nugroho, Z. P. Andriani, Y. D. Risa, R. Subakti and R. Widayanti. 2020. Genetic characterization and pylogenetic study of Indonesian indigenous catfish based on mitochondrial cytochrome b gene. Veterinary World, 13(14): 97-103.
- Mulyani Y, Purwanto A, Nurruhwati I. 2011. Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). Jurnal Akuatika, 2 (1): 1 – 16.

- Muthiadin, C., I. R. Aziz, A. Z. Darojat. 2018. DNA mitokondria untuk identifikasi ikan yang kaya spesies. Prosiding Seminar Nasional Megabiodiversitas Indonesia, 9/04/2018: 51-53.
- Nelson, J. S. 2006. Fishes of the world. 4th ed. Hoboken (USA): John Wiley & Sons. 601p.
- Panprommin, D. K. Soontornprasit, S. Tuncharoen, S. Pithakpol, J. Keereelang. 2019. DNA barcodes for the identification of species diversity in fish from Kwan Phayao, Thailand. Journal of Asia Pacific Biodiversity, 12: 382-389.
- Patwardhan, A., S. Ray, R. Roy. 2014. Molecular markers in phylogenetic studies-a review. Journal of Phylogenetics Evolutionary Biology, 2 (2): 1-9.
- Phen, C., B. T. Touch, B. Eric, and S. V. Leng. 2005. Biological reviews of important Cambodian fish species, based on fishbased 2004. Fisheries Research and Development Institute, Phnom Penh. Cambodia. p. 51-60.
- Pratami, V. A., Y. Setyono, P. Sunarto. 2018. Zonasi, keanekaragaman dan pola migrasi ikan di Sungai Keyang, Kabupaten Ponorogo, Jawa Timur. Jurnal Ilmu Lingkungan, 16(1): 78-85.
- Prusak, B., T. Grzybowski, and J. Bednarek. 2005. Cytochrome b gene (*Cyt-b*) in analysis of anonymous biological traces and its application in veterinary diagnostics and animal conservation. Animal Science Papers and Reports, 23(4): 229-236.
- Putri, D. S., M. N. Abulias, D. Bhagawati. 2014. Studi kekerabatan ikan familia cyprinidae yang tertangkap di Sungai Serayu Kabupaten Banyumas. Scripta Biologica, 1(2): 129-135.
- Radona, D., D. T. Soelistyowati, O. Carman, R. Gustiano. 2016. Keragaman genotype dan morfometrik ikan tengadak *Barbonymus schwanenfeldii* (Bleeker 1854) asal Sumatera, Jawa dan Kalimantan. Jurnal Ikhtiologi Indonesia, 16 (3): 259-268.
- Rahayu, D. A., M. Jannah. 2019. DNA barcode hewan dan tumbuhan Indonesia. Yayasan Inspirasi Ide Berdaya. Jakarta. 165 hal.
- Rahim, M. H. A., P. Ismail, R. Alias, N. Muhammad, and A. M. M. Jais. 2012. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA cytochrome b gene among Haruan (*Channa striatus*) in Malaysia. Gene, 494 (1): 1-10.
- Ratnasingham, S., and P. D. N. Hebert. 2007. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes, 7:355–364.

- Richter, H., and B. Ludwig. 2003. Cytochromecoxidase – structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Reviews of Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 147:47–74.
- Risjani, Y., G. Loppion, J. Couteau, Y. Yuniarta, I. Widowati, A. Hermawati, C. Minier. 2020. Genotoxicity in the rivers from the Brantas catchment (East Java, Indonesia): occurrence in sediments and effects in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). *Environmental Science and Population Research*, 27(4):1-9.
- Rudiansyah, M., L. Lubis, R. Bandiara, R. Supriyadi, Afiatin, R. S. Gondodiputra, R. M. A. Roesli, and D. Rachmadi. 2020. Java barb fish gallbladder-induced acute kidney injury and ischemic acute hepatic failure. *Kidney International Reports*, 1-3.
- Rumondang. 2016. Mortalitas dan tingkat eksploitasi ikan Brek (*Barbonymus balleroides* Val. 1842) di Sungai Serayu Kabupaten Banjarnegara, Jawa Tengah. *Agricola*, 6: 1–12.
- Santos, A. B., and F.G. Araujo. 2010. Influence of the river flow on the structure of fish assemblage along longitudinal gradient from river to reservoir. *Zoologia*, 27 (5): 732-740.
- Setiaputri, A. A., G. R. Barokah, M. A. B. Sahaba, R. D. Arbajayanti, N. Fabella, R. M. Pertiwi, M. Nurimala, R. Nugraha, A. Abdulla. 2020. Perbandingan metode isolasi DNA pada produk perikanan segar dan olahan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3): 447-458.
- Shehnam, S. 2012. Polymerase chain reaction. Lap Lambert Academic Publishing GmbH KG. Germany. 96p.
- Soewardi, K. 2007. Pengelolaan keragaman genetik sumberdaya perikanan dan kelautan. Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bogor. 90 hal.
- Solihin, D. D. 1994. Peran DNA mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. *Hayati*, 1(1):1-4.
- Sudaryono. 2002. Pengelolaan daerah aliran sungai (DAS) terpadu, konsep pembangunan berkelanjutan. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 3(2): 153-158.
- Suryaningsih, S., D. Bhagawati, S. Sukmaningrum, Sugiharto, and I. A. R. Puspitasari. 2020. The morphometrical character of silver barb fish *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1849). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 593. 6 hal.

- Susmiarsih, T. 2010. Peran genetik DNA mitokondria (mtDNA) pada motilitas spermatozoa. *Majalah Kesehatan Pharmamedika*, 2(2): 178-184.
- Syafei, Lenny S. 2017. Keanekaragaman hayati dan konservasi ikan air tawar. *Jurnal Penyuluhan Kelautan dan Perikanan Indonesia*, 11 (1): 48-62.
- Taylor, C. M., L.H. Thomas, A.F. Riccardo, R.W. Lance, R.B. Thomas, and L.W. Melvin. 2006. Distribution, abundance, and diversity of stream fishes under variable environmental conditions. *Journal Fish Aquatic*, 63 (1) : 43-54.
- Triwibowo. 2010. Teori dan aplikasi PCR. Yogyakarta: Penerbit ANDI. 240 hal.
- Utami, S. 2009. Etiologi infertilitas pada pria akibat dari mutasi DNA mitokondria (mtDNA). *JKM*, 9(1): 85-94.
- Van Pelt-Verkuil, E., A. V. Belkum, and J. P. Hays. 2008. Principles and technical aspect of PCR amplification. USA. Springer science & Business Media. 325p.
- Wandia, I. N. 2001. Genom mitokondria. *Jurnal Veterinary*, 2(4): 131-137.
- Wang, C., B. Kaltenboeck, and M. D. Freeman. 2012. Verinary PCR diagnostic. USA. Bentham Science Publishers. 136p.
- Ward, R. B., B. H. Holmes, W. T. White, and P. R. Last. 2008. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater research*, 59(1):57-71.
- Watson, S. A., and G. P. McStay. 2020. Functions of cytochrome c oxidase assembly. *International Jornal of Molecular Science*, 21: 1-17.
- Weber, M., and L.F. de Beaufort. 1916. The fishes of the Indo-Australian archipelago III. Ostariophysi: II. Cyprinoidea, Apodes. Synbranchii. Brill, Leiden. 455p.
- Wibowo, A. 2012. Keragaman genetik ikan semah (*Tor tambroides* Bleker 1854) di Sungai Manna, Bengkulu dan Sungai Semangka, Lampung. *Jurnal Bawal*, 4(2): 105-112.
- Yusron, E. 2005. Pemanfaatan keragaman genetik dalam pengelolaan sumberdaya hayati laut. *Oseana*, xxx (2): 29-34.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan aplikasi *Polymerase Chain Reaction*. Andi Offset. Yogyakarta. 237 p.

LAMPIRAN**Lampiran 1.** Hasil Uji ANOVA Karakter Morfometrik

1. Panjang total (TL)

ANOVA

Panjang Total

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	152,864	5	30,573	15,653	,000
Within Groups	46,876	24	1,953		
Total	199,740	29			

2. Panjang standart (SL)

ANOVA

Panjang Standar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	112,407	5	22,481	21,472	,000
Within Groups	25,128	24	1,047		
Total	137,535	29			

3. Panjang Kepala (HL)

ANOVA

Panjang Kepala

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9,595	5	1,919	14,303	,000
Within Groups	3,220	24	,134		
Total	12,815	29			

4. Diameter Mata (ED)

ANOVA

Diameter Mata

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,694	5	,139	13,006	,000

Within Groups	,256	24	,011		
Total	,950	29			

5. Panjang Moncong (SnL)

ANOVA

Panjang Moncong

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,243	5	,249	14,338	,000
Within Groups	,416	24	,017		
Total	1,659	29			

6. Panjang Sirip Dada (PFL)

ANOVA

Panjang Sirip Dada

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,196	5	1,439	31,062	,000
Within Groups	1,112	24	,046		
Total	8,308	29			

7. Panjang Sirip Perut (VFL)

ANOVA

Panjang Sirip Perut

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,858	5	1,372	22,608	,000
Within Groups	1,456	24	,061		
Total	8,314	29			

8. Panjang Sirip Anal (AFL)

ANOVA

Panjang Sirip Anal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,811	5	,962	20,544	,000
Within Groups	1,124	24	,047		

Total	5,935	29			
-------	-------	----	--	--	--

9. Panjang Batang Ekor (CPL)

ANOVA

Panjang Batang Ekor

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,431	5	,086	13,262	,000
Within Groups	,156	24	,006		
Total	,587	29			

10. Tinggi Sirip Dorsal (DD)

ANOVA

Tinggi Sirip Dorsal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,375	5	1,275	10,186	,000
Within Groups	3,004	24	,125		
Total	9,379	29			

11. Panjang Dasar Sirip Dorsal (DBL)

ANOVA

Panjang Dasar Sirip Dorsal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,487	5	1,097	15,066	,000
Within Groups	1,748	24	,073		
Total	7,235	29			

12. Tinggi Badan (BD)

ANOVA

Tinggi Badan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33,010	5	6,602	24,331	,000
Within Groups	6,512	24	,271		
Total	39,522	29			

13. Tinggi Batang Ekor (CPD)

ANOVA

Tinggi Batang Ekor

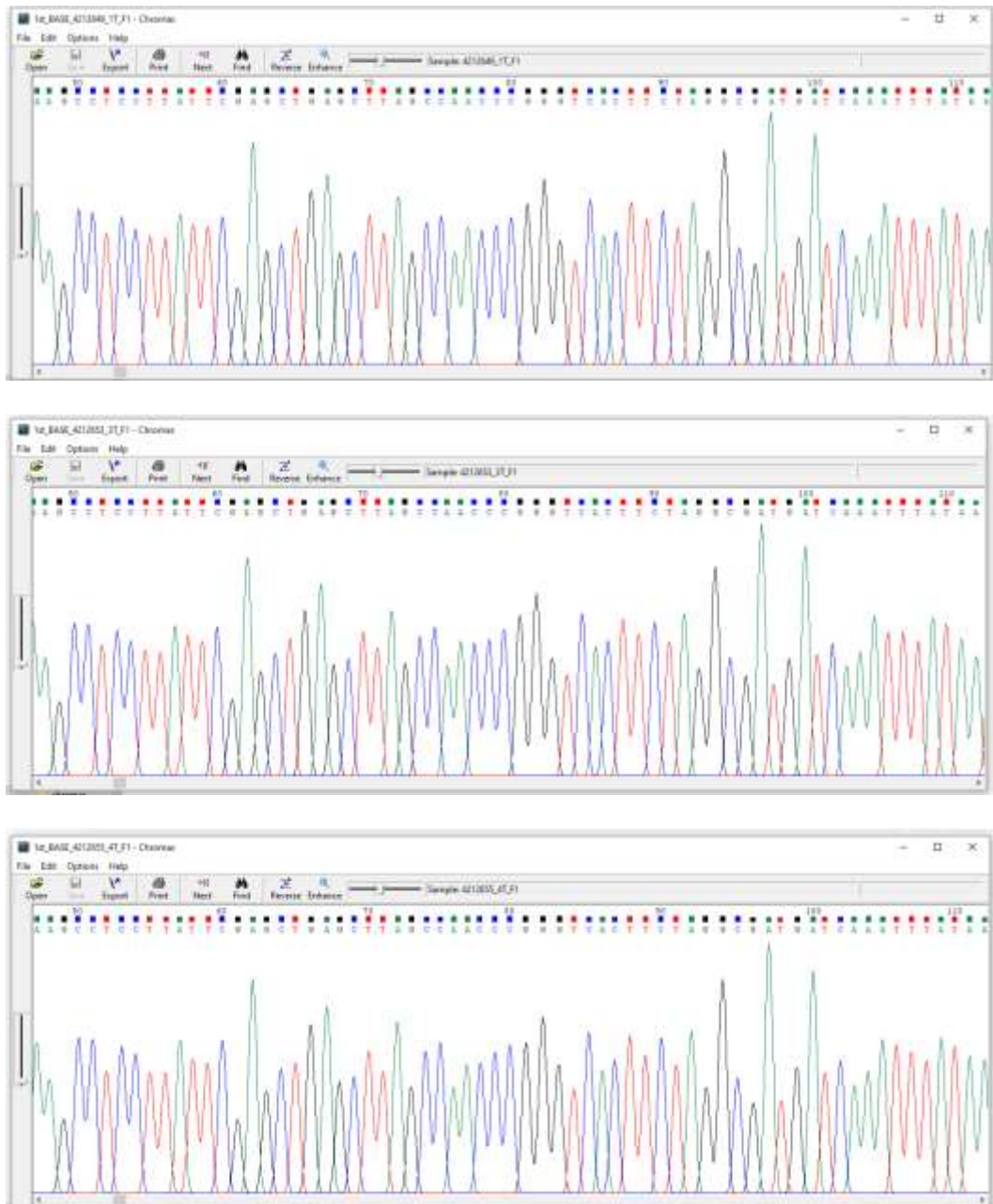
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,271	5	1,454	16,247	,000
Within Groups	2,148	24	,089		
Total	9,419	29			

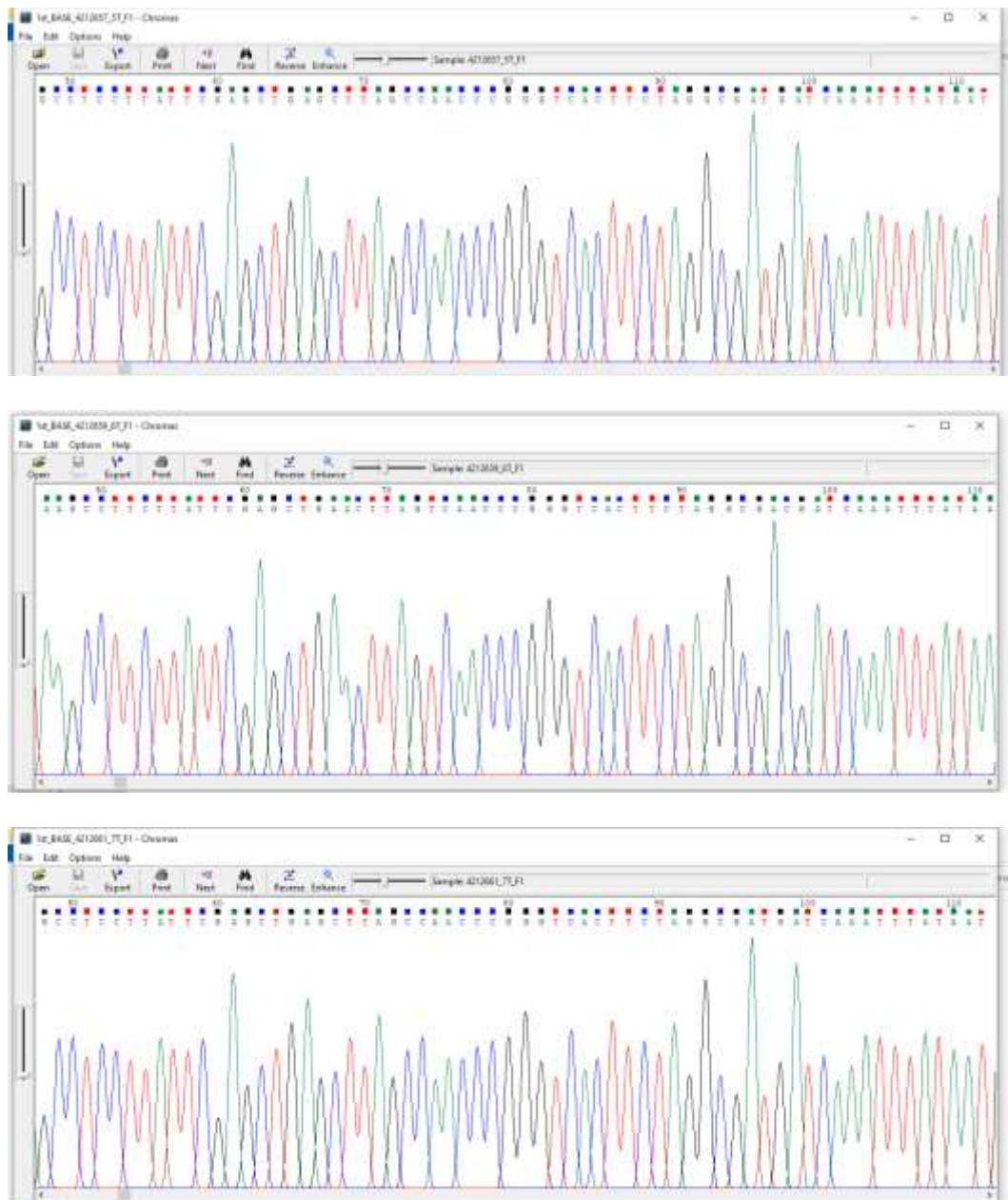
14. Tinggi Kepala (HD)

ANOVA

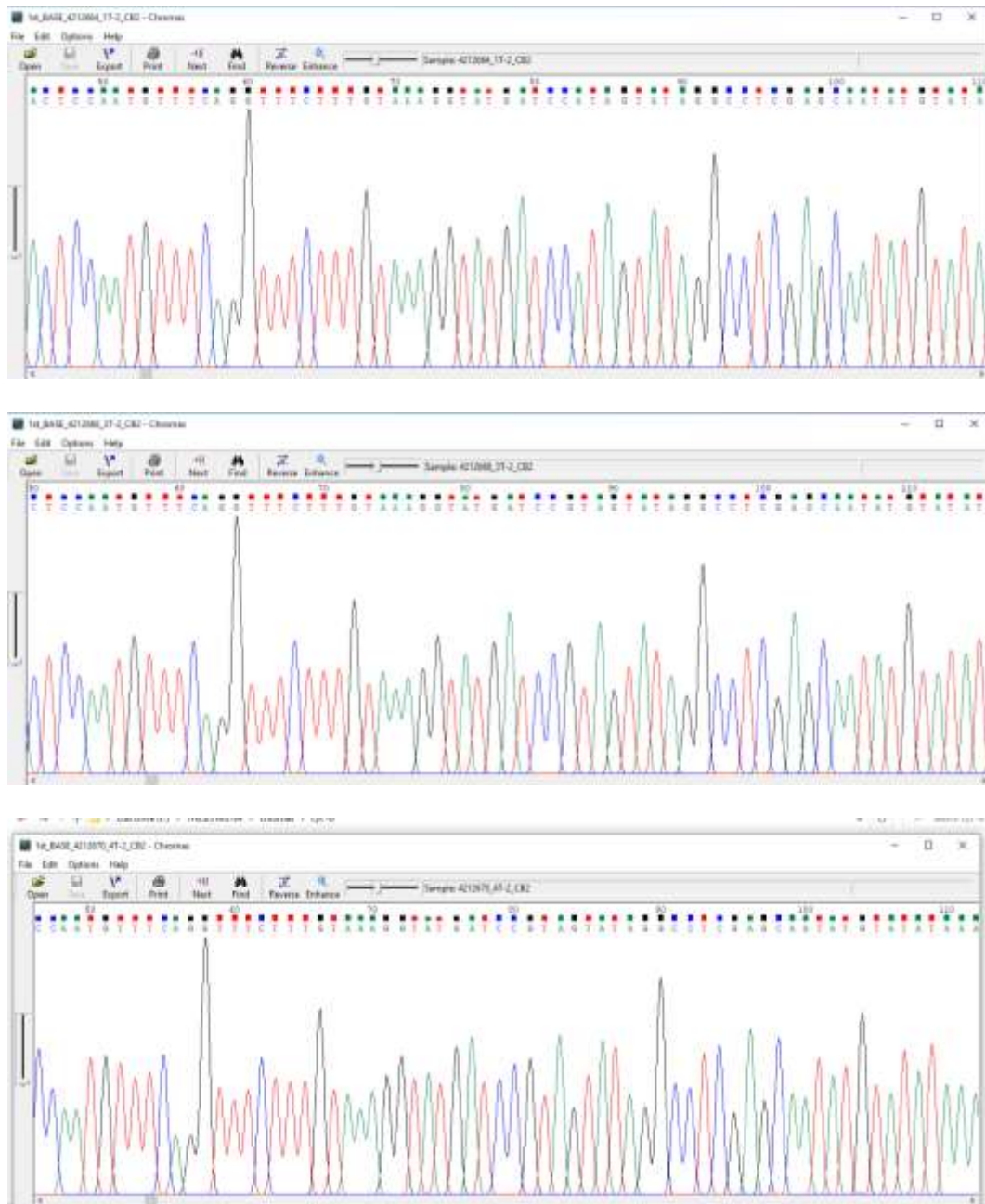
Tinggi Kepala

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,167	5	,833	8,881	,000
Within Groups	2,252	24	,094		
Total	6,419	29			

Lampiran 2. Hasil chromatogram ikan tawes berdasarkan gen COI



Lampiran 3. Hasil chromatogram ikan tawes berdasarkan gen *Cyt-b*





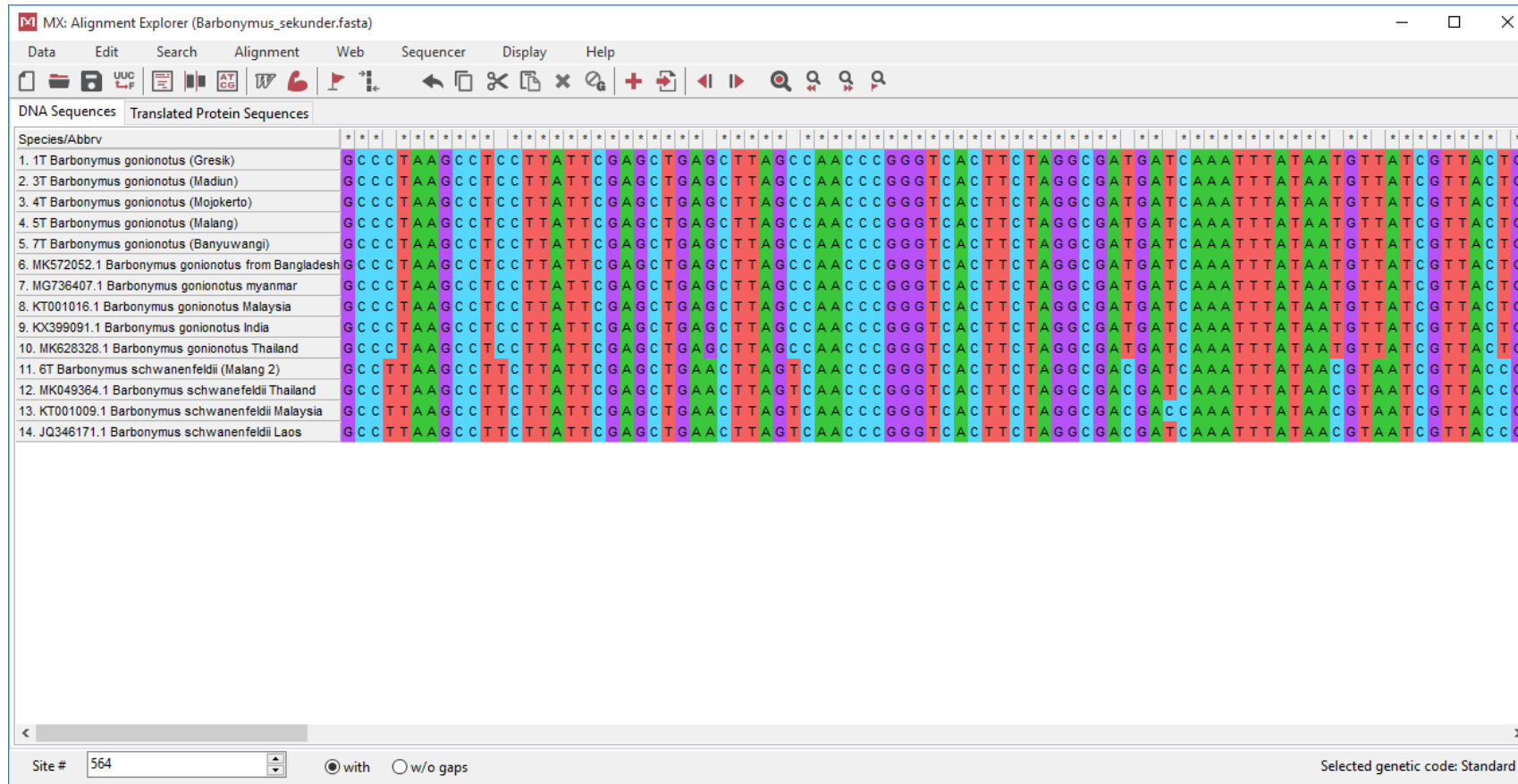
Lampiran 4. Sekuen DNA COI ikan tawes

Sampel	Asal Sampel	Sekuen COI
1T	Gresik	GCC TGA GCC GGA ATA GTG GGA ACC GCC CTA AGC CTC CTT ATT CGA GCT GAG CTT AGC CAA CCC GGG TCA CTT CTA GGC GAT GAT CAA ATT TAT AAT GTT ATC GTT ACT GCC CAT GCC TTC GTA ATA ATC TTC TTT ATA GTA ATG CCC ATC CTC ATC GGA GGA TTC GGA AAC TGA CTT GTG CCT CTA ATA ATT GGA GCC CCC GAC ATA GCA TTC CCA CGA ATA AAC AAC ATA AGC TTC TGA TTA CTA CCC CCA TCA TTC CTG CTA TTA TTA GCC TCC TCT GGT GTT GAA GCC GGA GCT GGG ACA GGA TGA ACA GTA TAT CCC CCT CTT GCA GGA AAC CTA GCT CAC GCA GGA GCA TCA GTA GAC CTA ACA ATT TTC TCA CTC CAC TTA GCA GGT GTA TCC TCA ATT CTA GGT GCA ATT AAT TTT ATC ACC ACA ACT ATT AAC ATA AAA CCC CCA GCC ATC TCC CAA TAT CAA ACA CCA CTA TTC GTT TGA TCT GTG CTC GTA ACC GCC CTA CTC CTC CTA TCA CTA CCT GTT TTA GCC GCC GGA ATT ACA ATA CTA CTA ACA GAT CGA AAC CTT AAT ACT ACA TTC TTT GAC CCA GCA GGC GGA GGA GAC CCA ATT CTC TAC CAA CAC CTG TTC TGA TTC TTT GGC CAC C
3T	Madiun	TTG GTG CCT GAG CCG GAA TAG TGG GAA CCG CCC TAA GCC TCC TTA TTC GAG CTG AGC TTA GCC AAC CCG GGT CAC TTC TAG GCG ATG ATC AAA TTT ATA ATG TTA TCG TTA CTG CCC ATG CCT TCG TAA TAA TCT TCT TTA TAG TAA TGC CCA TCC TCA TCG GAG GAT TCG GAA ACT GAC TTG TGC CTC TAA TAA TTG GAG CCC CCG ACA TAG CAT TCC CAC GAA TAA ACA ACA TAA GCT TCT GAT TAC TAC CCC CAT CAT TCC TGC TAT TAT TAG CCT CCT CTG GTG TTG AAG CCG GAG CTG GGA CAG GAT GAA CAG TAT ATC CCC CTC TTG CAG GAA ACC TAG CTC ACG CAG GAG CAT CAG TAG ACC TAA CAA TTT TCT CAC TCC ACT TAG CAG GTG TAT CCT CAA TTC TAG GTG CAA TTA ATT TTA TCA CCA CAA CTA TTA ACA TAA AAC CCC CAG CCA TCT CCC AAT ATC AAA CAC CAC TAT TCG TTT GAT CTG TGC TCG TAA CCG CCG TAC TAC TCC TCC TAT CAC TAC CTG TTT TAG CCG CCG GAA TTA CAA TAC TAC TAA CAG ATC GAA ACC TTA ATA CTA CAT TCT TTG ACC CAG CAG GCG GAG GAG ACC CAA TTC TCT ACC AAC ACC TGT TCT GAT TCT TTG GCC ACC
4T	Mojokerto	TTG GTG CCT GAG CCG GAA TAG TGG GAA CCG CCC TAA GCC TCC TTA TTC GAG CTG AGC TTA GCC AAC CCG GGT CAC TTC TAG GCG ATG ATC AAA TTT ATA ATG TTA TCG TTA CTG CCC ATG CCT TCG TAA TAA TCT TCT TTA TAG TAA TGC CCA TCC TCA TCG GAG GAT TCG GAA ACT GAC TTG TGC CTC TAA TAA TTG GAG CCC CCG ACA TAG CAT TCC CAC GAA TAA ACA ACA TAA GCT TCT GAT TAC TAC CCC CAT CAT TCC TGC TAT TAT TAG CCT CCT CTG GTG TTG AAG CCG GAG CTG GGA CAG GAT GAA CAG TAT ATC CCC CTC TTG CAG GAA ACC TAG CTC ACG CAG GAG CAT CAG TAG ACC TAA CAA TTT TCT CAC TCC ACT TAG CAG GTG TAT CCT CAA TTC TAG GTG CAA TTA ATT TTA TCA CCA CAA CTA TTA ACA TAA AAC CCC CAG CCA TCT CCC AAT ATC AAA CAC CAC TAT TCG TTT GAT CTG TGC TCG TAA CCG CCG TAC TAC TCC TCC TAT CAC TAC CTG TTT TAG CCG CCG GAA TTA CAA TAC TAC TAA CAG ATC GAA ACC TTA ATA CTA CAT TCT TTG ACC CAG CAG GCG GAG GAG ACC CAA TTC TCT ACC AAC ACC TGT TCT GAT TCT TTG GCC ACC
5T	Malang	TGT TTT GGT GCC TGA GCC GGA ATA GTG GGA ACC GCC CTA AGC CTC CTT ATT CGA GCT GAG CTT AGC CAA CCC GGG TCA CTT CTA GGC GAT GAT CAA ATT TAT AAT GTT ATC GTT ACT GCC CAT GCC TTC GTA ATA ATC TTC TTT ATA GTA ATG CCC ATC CTC ATC GGA GGA TTC GGA AAC TGA CTT GTG CCT CTA ATA ATT GGA GCC CCC GAC ATA GCA TTC CCA CGA ATA AAC AAC ATA AGC TTC TGA TTA CTA CCC CCA TCA TTC CTG CTA TTA TTA GCC TCC TCT GGT GTT GAA GCC GGA GCT GGG ACA GGA TGA ACA GTA TAT CCC CCT CTT GCA GGA AAC CTA GCT CAC GCA GGA GCA TCA GTA GAC CTA ACA ATT TTC TCA CTC CAC TTA GCA GGT GTA TCC TCA ATT CTA GGT GCA ATT AAT TTT ATC ACC ACA ACT ATT AAC ATA AAA CCC CCA GCC ATC TCC CAA TAT CAA ACA CCA CTA TTC GTT TGA TCT GTG CTC GTA ACC GCC GTA CTA CTC CTC CTA TCA CTA CCT GTT TTA GCC GCC GGA ATT ACA ATA CTA CTA ACA GAT CGA AAC CTT AAT ACT ACA TTC TTT GAC CCA GCA GGC GGA GGA GAC CCA ATT CTC TAC CAA CAC CTG TTC TGA TTC TTT GGC CAC C
6T	Malang 2	TAG TGG GAA CCG CCT TAA GCC TTC TTA TTC GAG CTG AAC TTA GTC AAC CCG GGT CAC TTC TAG GCG ACG ATC AAA TTT ATA ACG TAA TCG TTA CCG CCC ACG CCT TTG TAA TAA TTT TCT TTA TAG TAA TGC CAA TTC TCA TTG GAG GAT TCG GAA ACT GAC TTG TAC CCC TAA TAA TCG GAG CCC CAG ATA TGG CAT TCC CAC GAA TAA ACA ACA TAA GCT TCT GAT TAC TGC CCC CAT CAT TCC TAC TAC TGC TAG CTT CTT CCG GTG TTG AAG CCG GTG CCG GGA CAG GGT GAA CAG TAT ATC CAC CCC TTG CAG GAA ACC TCG CCC ACG CAG GAG CAT CAG TAG ACC TAA CAA TTT TCT CAC TCC ATT TAG CAG GTG TGT

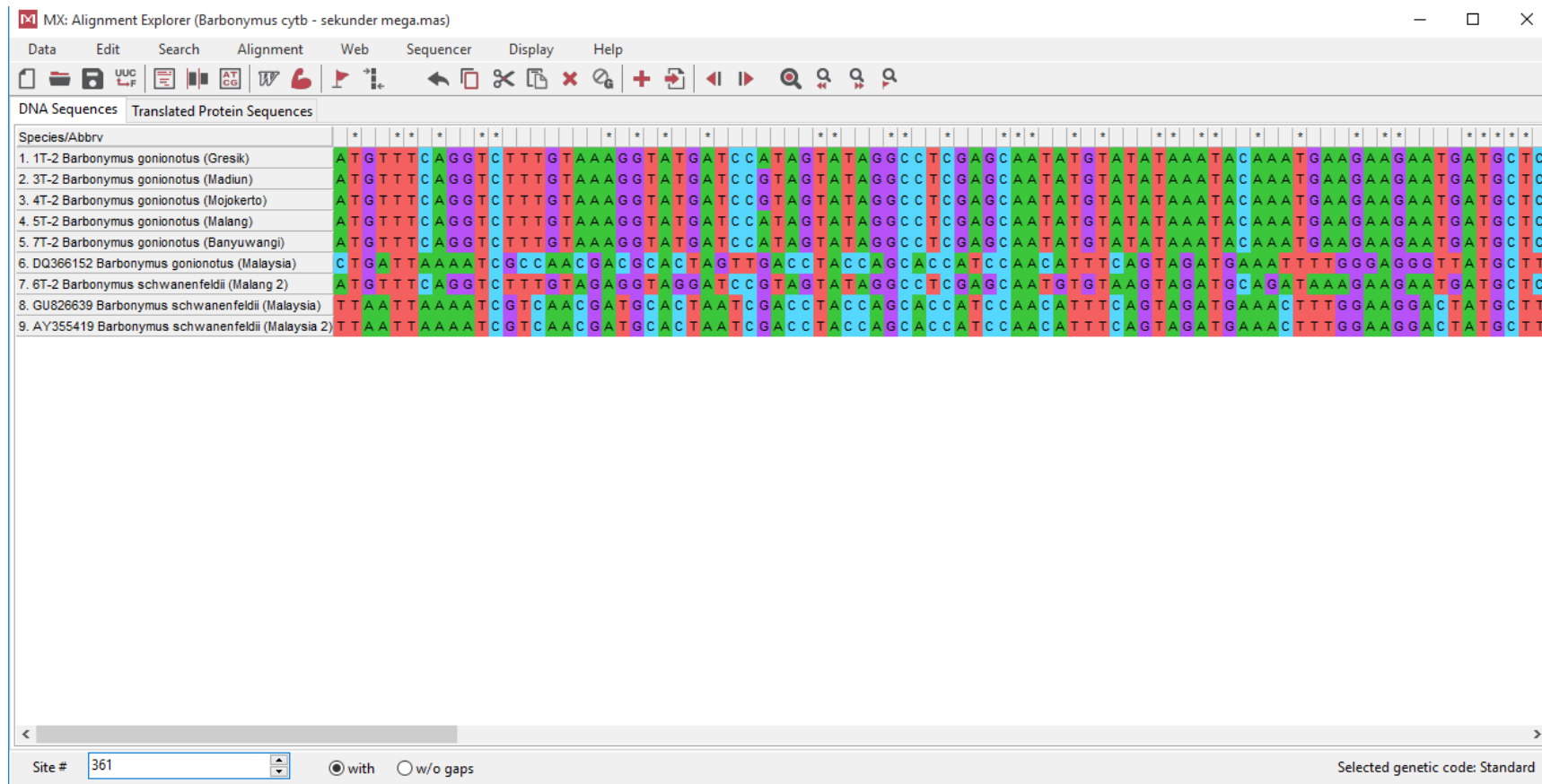
		CAT CAA TTC TAG GGG CAA TTA ATT TTA TCA CCA CAA CCA TTA ACA TGA AAC CCC CAG CCA TCT CCC AAT ATC AAA CAC CAT TAT TTG TTT GAT CCG TAC TTG TAA CCG CCG TAC TAC TCC TCC TGT CAC TAC CTG TCC TGG CCG CCG GAA TTA CAA TGC TCC TAA CAG ATC GAA ACC TCA ACA CCA CAT TCT TTG ATC CGG CAG GTG GAG GAG ACC CAA TCC TTT ACC AAC ATC TAT TCT GAT TCT TTG GCC ACC A
7T	Banyuwangi	TTG GTG CCT GAG CCG GAA TAG TGG GAA CCG CCC TAA GCC TCC TTA TTC GAG CTG AGC TTA GCC AAC CCG GGT CAC TTC TAG GCG ATG ATC AAA TTT ATA ATG TTA TCG TTA CTG CCC ATG CCT TCG TAA TAA TCT TCT TTA TAG TAA TGC CCA TCC TCA TCG GAG GAT TCG GAA ACT GAC TTG TGC CTC TAA TAA TTG GAG CCC CCG ACA TAG CAT TCC CAC GAA TAA ACA ACA TAA GCT TCT GAT TAC TAC CCC CAT CAT TCC TGC TAT TAT TAG CCT CCT CTG GTG TTG AAG CCG GAG CTG GGA CAG GAT GAA CAG TAT ATC CCC CTC TTG CAG GAA ACC TAG CTC ACG CAG GAG CAT CAG TAG ACC TAA CAA TTT TCT CAC TCC ACT TAG CAG GTG TAT CCT CAA TTC TAG GTG CAA TTA ATT TTA TCA CCA CAA CTA TTA ACA TAA AAC CCC CAG CCA TCT CCC AAT ATC AAA CAC CAC TAT TCG TTT GAT CTG TGC TCG TAA CCG CCG TAC TAC TCC TCC TAT CAC TAC CTG TTT TAG CCG CCG GAA TTA CAA TAC TAC TAA CAG ATC GAA ACC TTA ATA CTA CAT TCT TTG ACC CAG CAG GCG GAG GAG ACC CAA TTC TCT ACC AAC ACC TGT TCT GAT TCT TTG GCC ACC A

Lampiran 5. Sekuen DNA *Cyt-b* ikan tawes

Sampel	Asal Sampel	Sekuen <i>Cyt-b</i>
1T	Gresik	TAC TCC AAT GTT TCA GGT TTC TTT GTA AAG GTA TGA TCC ATA GTA TAG GCC TCG AGC AAT ATG TAT ATA AAT ACA AAT GAA GAA GAA TGA TGC TCC GTT GGC GTG TAT GTT GCG GAT CAG TCA TCC GTA GTT CAC GTC TCG GCA AAT GTG TGT TAC TGA TGA GAA TGC GGT TGA GAT GTC TGA GGT GTA GTG TAT GGC TAG GAA TAG GCC GGT TAA AAT TTG GGT AAT TAA GCA TAA CCC TAG CAG AGA CCC AAA ATT TCA TCA TAC TGA AAT GTT GGA TGG TGC TGG TAG GTC AAC TAG TGC GTC GTT GGC GAT TTT AAT CAG GGG GTG TGT TTT TCG TAG GCT TGC CAT TAA TGG TTC TTG TAG TTG AAT AAC AAC GAT GGT TCT TCA AGT CAA
3T	Madiun	TAC TCC AAT GTT TCA GGT TTC TTT GTA AAG GTA TGA TCC GTA GTA TAG GCC TCG AGC AAT ATG TAT ATA AAT ACA AAT GAA GAA GAA TGA TGC TCC GTT GGC GTG TAT GTT GCG GAT CAG TCA TCC GTA GTT CAC GTC TCG GCA AAT GTG TGT TAC TGA TGA GAA TGC GGT TGA GAT GTC TGA GGT GTA GTG TAT GGC TAG GAA TAG GCC GGT TAA AAT TTG GGT AAT TAA GCA TAA CCC TAG CAG AGA CCC AAA ATT TCA TCA TAC TGA AAT GTT GGA TGG TGC TGG TAG GTC AAC TAG TGC GTC GTT GGC GAT TTT AAT CAG GGG GTG TGT TTT TCG TAG GCT TGC CAT TAA TGG TTC TTG TAG TTG AAT AAC AAC G
4T	Mojokerto	TAA CTA GTA ATA GAA GGA TTA CTC CAA TGT TTC AGG TTT CTT TGT AAA GGT ATG ATC CGT AGT ATA GGC CTC GAG CAA TAT GTA TAT AAA TAC AAA TGA AGA AGA ATG ATG CTC CGT TGG CGT GTA TGT TGC GGA TCA GTC ATC CGT AGT TCA CGT CTC GGC AAA TGT GTG TTA CTG ATG AGA ATG CGG TTG AGA TGT CTG AGG TGT AGT GTA TGG CTA GGA ATA GGC CGG TTA AAA TTT GGG TAA TTA AGC ATA ACC CTA GCA GAG ACC CAA AAT TTC ATC ATA CTG AAA TGT TGG ATG GTG CTG GTA GGT CAA CTA GTG CGT CGT TGG CGA TTT TAA TCA GGG GGT GTG TTT TTC GTA GGC TTG CCA TTA ATG GTT CTT GTA GTT GAA TAA CAA CG
5T	Malang	TAC TCC AAT GTT TCA GGT TTC TTT GTA AAG GTA TGA TCC ATA GTA TAG GCC TCG AGC AAT ATG TAT ATA AAT ACA AAT GAA GAA GAA TGA TGC TCC GTT GGC GTG TAT GTT GCG GAT CAG TCA TCC GTA GTT CAC GTC TCG GCA AAT GTG TGT TAC TGA TGA GAA TGC GGT TGA GAT GTC TGA GGT GTA GTG TAT GGC TAG GAA TAG GCC GGT TAA AAT TTG GGT AAT TAA GCA TAA CCC TAG CAG AGA CCC AAA ATT TCA TCA TAC TGA AAT GTT GGA TGG TGC TGG TAG GTC AAC TAG TGC GTC GTT GGC GAT TTT AAT CAG GGG GTG TGT TTT TCG TAG GCT TGC CAT TAA TGG TTC TTG TAG TTG AAT AAC AAC GAT GGT TCT TCA AGT CAA G
6T	Malang 2	TAT AAC TAG TAA TAG TAG GAC TAC TCC GAT GTT TCA GGT TTC TTT GTA GAG GTA GGA TCC GTA GTA TAG GCC TCG AGC AAT GTG TAA GTA GAT GCA GAT AAA GAA GAA TGA TGC TCC GTT AGC GTG TAT ATT GCG GAT TAG TCA GCC GTA GTT TAC GTC TCG GCA GAT GTG GGT TAC TGA TGA GAA TGC AGT TGA AAT ATC TGA GGT GTA GTG TAT GGC TAG GAA TAG GCC AGT TAA GAT TTG AGT AAT TAA GCA TAG TCC TAA GAG GGA TCC AAA GTT TCA TCA TAC TGA AAT GTT GGA TGG TGC TGG TAG GTC AAT TAG TGC ATC GTT GAC GAT TTT AAT TAA GGG GTG TGT TTT TCG TAG GCT TGC CAT TAG CGG TTC TTG TAG TTG AAT AAC AAC G
7T	Banyuwangi	TAC TCC AAT GTT TCA GGT TTC TTT GTA AAG GTA TGA TCC ATA GTA TAG GCC TCG AGC AAT ATG TAT ATA AAT ACA AAT GAA GAA GAA TGA TGC TCC GTT GGC GTG TAT GTT GCG GAT CAG TCA TCC GTA GTT CAC GTC TCG GCA AAT GTG TGT TAC TGA TGA GAA TGC GGT TGA GAT GTC TGA GGT GTA GTG TAT GGC TAG GAA TAG GCC GGT TAA AAT TTG GGT AAT TAA GCA TAA CCC TAG CAG AGA CCC AAA ATT TCA TCA TAC TGA AAT GTT GGA TGG TGC TGG TAG GTC AAC TAG TGC GTC GTT GGC GAT TTT AAT CAG GGG GTG TGT TTT TCG TAG GCT TGC CAT TAA TGG TTC TTG TAG TTG AAT AAC AAC GAT GGT TCT TCA AGT CAA G

Lampiran 6. Hasil *alignment* sekuen DNA gen COI

Lampiran 7. Hasil *alignment* sekuen DNA gen *Cyt-b*



Lampiran 8. Jarak genetik ikan tawes berdasarkan gen COI

No.	Nama Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	1T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Gresik)														
2	2T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Madiun)	0.00000													
3	3T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Mojokerto)	0.00000	0.00000												
4	4T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Malang)	0.00000	0.00000	0.00000											
5	5T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Banyuwangi)	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000										
6	MK572052 <i>Barbonymus gonionotus</i> (Bangladesh)	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000									
7	MG736407 <i>Barbonymus gonionotus</i> (Myanmar)	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000								
8	KT001016 <i>Barbonymus gonionotus</i> (Malaysia)	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000							
9	KX399091 <i>Barbonymus gonionotus</i> (India)	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000						
10	MK628328 <i>Barbonymus gonionotus</i> (Thailand)	0.00714	0.00714	0.00714	0.00714	0.00714	0.00714	0.00714	0.00714	0.00714					
11	6T <i>Barbonymus schwanefeldii</i> (Malang 2)	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10911				
12	MK049364 <i>Barbonymus schwanefeldii</i> (Thailand)	0.10478	0.10478	0.10478	0.10478	0.10478	0.10478	0.10478	0.10478	0.10478	0.10694	0.00178			
13	KT001009 <i>Barbonymus schwanefeldii</i> (Malaysia)	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10911	0.00714	0.00535		
14	JQ346171 <i>Barbonymus schwanefeldii</i> (Laos)	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10694	0.10911	0.00356	0.00178	0.00714	

Lampiran 9. Jarak genetik ikan tawes berdasarkan gen *Cyt-b*

No.	Nama Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Gresik)									
2	2T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Madiun)	0.00278								
3	3T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Mojokerto)	0.00278	0.00000							
4	4T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Malang)	0.00000	0.00278	0.00278						
5	5T <i>Barbonymus gonionotus</i> (Banyuwangi)	0.00000	0.00278	0.00278	0.00000					
6	DQ366152 <i>Barbonymus gonionotus</i> (Malaysia)	1.22245	1.20459	1.20459	1.22245	1.22245				
7	6T <i>Barbonymus schwanefeldii</i> (Malang 2)	0.10317	0.09982	0.09982	0.10317	0.10317	1.17937			
8	Gu826639 <i>Barbonymus schwanefeldii</i> (Malaysia)	1.15663	1.14147	1.14147	1.15663	1.15663	0.12665	1.12183		
9	AY355419 <i>Barbonymus schwanefeldii</i> (Malaysia 2)	1.15663	1.14147	1.14147	1.15663	1.15663	0.12665	1.12183	0.00000	

