

SKRIPSI

VARIASI GENETIK LINTAH LAUT (*Pterobdella arugamensis*) PADA IKAN
KERAPU CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*)
DI INDONESIA DAN MALAYSIA DENGAN MENGGUNAKAN GEN
CYTOCHROME C OXYDASE SUBUNIT I (COI)

GENETIC VARIATION OF MARINE LEECH (*Pterobdella arugamensis*)
ON GROUPER FISH (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*)
IN INDONESIA AND MALAYSIA BY USING CHYTOCHROME C
OXYDASE SUBUNIT I (COI) GENE

PROGRAM STUDI S-1 AKUAKULTUR



KC
KK
S FPK A 84-25
Nur
V

Oleh:
NURHALIZA
SURABAYA – JAWA TIMUR



FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2025

Surat Pernyataan Keaslian Karya Tulis Skripsi

Yang bertanda tangan dibawah ini, saya:

Nama : Nurhaliza

NIM : 14111133014

Tempat, tanggal lahir : Surabaya, 2 April 2003

Alamat : Jl. Nyamplungan, Ampel Menara No. 12,
Surabaya.

Telp./HP : 082142548355

Judul Skripsi : VARIASI GENETIK LINTAH
LAUT (*Pterobdella arugamensis*) PADA IKAN KERAPU CANTANG
(*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) DI INDONESIA DAN
MALAYSIA DENGAN MENGGUNAKAN GEN *CYTOCHROME C OXYDASE*
SUBUNIT I (COI)

Pembimbing : 1. Putri Desi Wulan Sari, S.Pi., M.Si
2. Prof. Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil tulisan Karya Ilmiah Skripsi yang saya buat adalah murni hasil karya saya sendiri melalui keikutsertaan pada proyek penelitian Fakultas Biosumber dan Industri Makanan, Universitas Sultan Zainal Abidin dengan dosen pembimbing lapang Prof. Madya. Dr. Ahmad Syazni Bin Kamarudin. Di dalam Skripsi/karya tulis ini tidak terdapat keseluruhan atau sebagian tulisan atau gagasan orang lain yang saya ambil dengan cara menyalin atau meniru dalam bentuk rangkaian.

Seluruh data yang ditampilkan pada Karya Ilmiah Skripsi yang saya susun adalah milik Fakultas Biosumber dan Industri Makanan, Universitas Sultan Zainal Abidin sebagai pihak pengelola proyek penelitian dan menjadi kewenangan Fakultas Biosumber dan Industri Makanan, Universitas Sultan Zainal Abidin dalam pelaksanaan publikasi karya ilmiah ini.

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



Surabaya, 1 Juni 2025

Yang membuat pernyataan,

Nurhaliza

NIM. 142111133014



Fakulti Biosumber dan Industri Makanan | Faculty of Bioresources and Food Industry

Rujukan Kami : UniSZA.700-9/2/1 (75)

Bertarikh : 23 Februari 2025

Bersamaan : 24 Syaaban 1446H

Nurhaliza (E00576)

Faculty of Fisheries and Marine

Universitas Airlangga

Kampus C Mulyorejo

Surabaya 60115

INDONESIA

LETTER OF UNDERTAKING NON-PUBLICATION OF ACADEMIC WORK

In reference to the above matter, the Faculty of Bioresources and Food Industry, Universiti Sultan Zainal Abidin (UniSZA), is pleased to inform that Research and Internship Program at Faculty of Bioresources and Food Industry (FBIM) Malaysia, solemnly certify the following:

- i. The study entitled "Genetic Variation of Marine Leech (*Pterobdella arugamensis*) on Grouper Fish (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) in Indonesia and Malaysia By Using Cytochrome C Oxydase Subunit I (COI) Gene" is an original work, conducted under student responsibility and supervisor **Prof. Madya Dr. Ahmad Syazni Kamarudin**, starting from period **10th October 2024**
- ii. This study is a requisite for the internship program, and that all research results produced during tenure are the sole OWNERSHIP of Faculty of Bioresources and Food Industry (FBIM);
- iii. The intellectual property generated during the study period belongs to FBIM UniSZA, and FBIM has the exclusive right to use, manage, and control all Intellectual Property related to this research.;
- iv. The student shall not publish, share, or distribute any data, findings, or results from this study in any journal, article, conference proceeding, or other forms of publication without obtaining prior written permission from FBIM UniSZA;
- v. The student is permitted to use the data exclusively for their undergraduate thesis; however, FBIM UniSZA and the research supervisor must be properly acknowledged and explicitly mentioned in the thesis;

Kampus Besut, 22200 Besut, Terengganu, Malaysia.
Tel: 609.699.3100 E-mel: fbim@unisza.edu.my



SKRIPSI

VARIASI GENETIK LINTAH LAUT...

NURHALIZA



- vi. The student affirms that there are no personal interests or external influences affecting the integrity of the research;
- vii. Will not claim any revenue, commissions, or profits on the result of innovations conducted through the result of the research;
- viii. Truly understand that if student do not comply with any of the above, then legal action can be taken by FBIM against student and the associated institution (Universitas Airlangga - UNAIR, if applicable).

Thank you.

Yours sincerely,

PROF. DR. HAFIZAN JUAHIR

Dean



- c.c. - Prof. Ir. Mochammad Amin Alamsjah, M.Si., Ph.D
Dean
Faculty of Fisheries and Marine
Universitas Airlangga
- Prof. Madya Dr. Ahmad Syazni Kamarudin

**VARIASI GENETIK LINTAH LAUT (*Pterobdella arugamensis*) PADA IKAN
KERAPU CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*)
DI INDONESIA DAN MALAYSIA DENGAN MENGGUNAKAN GEN
CYTOCHROME C OXYDASE SUBUNIT I (COI)**

**GENETIC VARIATION OF MARINE LEECH (*Pterobdella arugamensis*)
ON GROUPER FISH (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*)
IN INDONESIA AND MALAYSIA BY USING CHYTOCHROME C
OXYDASE SUBUNIT I (COI) GENE**

**Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana
Perikanan Pada Program Studi S-1 Akuakultur Fakultas Perikanan dan
Kelautan Universitas Airlangga**

Oleh:
NURHALIZA
NIM. 142111133014



Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

Putri Desi Wulan Sari, S.Pi., M.Si.
NIP. 198612082014042001

Pembimbing Kedua

Prof. Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si.
NIP. 197403082001121001

SKRIPSI

VARIASI GENETIK LINTAH LAUT (*Pterobdella arugamensis*) PADA IKAN
KERAPU CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*)
DI INDONESIA DAN MALAYSIA DENGAN MENGGUNAKAN GEN
CYTOCHROME C OXYDASE SUBUNIT I (COI)

GENETIC VARIATION OF MARINE LEECH (*Pterobdella arugamensis*)
ON GROUPE FISH (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*)
IN INDONESIA AND MALAYSIA BY USING CHYTOCHROME C
OXYDASE SUBUNIT I (COI) GENE

NURHALIZA
142111133014

Telah diujikan pada Tanggal : 23 Juni 2025

KOMISI PENGUJI

Ketua : Rozi, S.Pi., M. Biotech.
Sekretaris : Syifania Hanifah Samara, S.Pi., M.Sc.
Anggota : 1. Dr. A. Shofy Mubarak, S.Pi., M.Si.
2. Putri Desi Wulan Sari, S.Pi., M.Si.
3. Prof. Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si.



Surabaya, 26 Juni 2025
Dekan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga



Prof. Mochammad Amin Alamsjah, Ir., M.Si., Ph.D.
NIP. 197001161995031002

RINGKASAN

NURHALIZA. Variasi Genetik Lintah Laut (*Pterobdella arugamensis*) Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) di Indonesia dan Malaysia dengan Menggunakan Gen *Cytochrome C Oxydase Subunit I* (COI). Dosen Pembimbing Putri Desi Wulan Sari, S.Pi., M.Si. dan Prof. Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si.

Salah satu kendala yang sering dialami oleh pembudidaya khususnya pada budidaya ikan kerapu yaitu adanya serangan penyakit parasiter yang prevalensinya masih tinggi. *P. arugamensis* adalah ektoparasit yang kerap menginfestasi ikan kerapu dan mengakibatkan kerugian besar dalam budidaya perikanan di wilayah Asia Tenggara. *P. arugamensis* menginfeksi ikan dengan cara menghisap darah inangnya dan menyebabkan luka hingga anemia kronis. Cara efektif untuk menangani infestasi ektoparasit *P. arugamensis* yaitu dengan melihat profil molekuler dengan bantuan kunci identifikasi. Sampel diambil dari dua lokasi yaitu Situbondo dan Terengganu, kemudian dilakukan ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, dan analisis sekuens gen COI. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis variasi genetik dan hubungan kekerabatan *P. arugamensis* yang terdapat di Indonesia dan Malaysia dengan memanfaatkan penanda molekuler gen COI.

Hasil penelitian menunjukkan adanya variasi genetik internal dengan jarak genetik sekitar 5% yang tercantum dalam struktur percabangan pohon filogenetik. Beberapa sampel dari lokasi yang sama cenderung mengelompok bersama, namun tidak sepenuhnya menunjukkan pola pengelompokan geografis yang konsisten. Meskipun terdapat variasi genetik, semua sampel tetap menunjukkan tingkat kedekatan molekuler yang signifikan, yang berarti kemungkinan terjadi aliran gen antara populasi atau sejarah evolusi yang baru dari *P. arugamensis* di wilayah tersebut. Karakteristik genetik *P. arugamensis* berdasarkan gen COI menunjukkan tingkat kesamaan yang tinggi (>98%) dibandingkan dengan isolat dari kawasan Asia Tenggara lain yang mengindikasikan variasi genetik intraspesifik yang rendah. Morfologi *P. arugamensis* memiliki tubuh silindris panjang dan ukuran penghisap yang bervariasi, serta menghasilkan fragmen DNA 650 bp.

SUMMARY

NURHALIZA. Genetic Variation of Marine Leech (*Pterobdella arugamensis*) on Grouper Fish (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) in Indonesia and Malaysia by Using Cytochrome C Oxydase Subunit I (COI) Gene. Supervisor Putri Desi Wulan Sari, S.Pi., M.Si. and Prof. Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M. Si.

One of the obstacles often experienced by farmers, especially in grouper aquaculture, is the attack of parasitic diseases whose prevalence is still high. *P. arugamensis* is an ectoparasite that often infests grouper fish and causes huge losses in aquaculture in the Southeast Asia region. *P. arugamensis* infects fish by sucking the blood of its host and causing injury and chronic anemia. An effective way to deal with *P. arugamensis* ectoparasite infestation is by looking at molecular profiles with the help of identification keys. Samples were taken from two locations, Situbondo and Terengganu, then DNA extraction, PCR amplification, and COI gene sequence analysis were conducted. This study aims to analyze the genetic variation and relationship of *P. arugamensis* found in Indonesia and Malaysia by utilizing molecular markers of the COI gene.

The research results show internal genetic variation with a genetic distance of around 5% listed in the phylogenetic tree branching structure. Some samples from the same location tend to cluster together but did not show a completely consistent geographical grouping pattern. Despite the genetic variation, all samples still showed a significant level of molecular proximity, which means that there is likely to be gene flow between populations or a recent evolutionary history of *P. arugamensis* in the region. The genetic characteristics of *P. arugamensis* based on the COI gene show a high degree of similarity (>98%) compared to isolates from other Southeast Asian regions, indicating low intraspecific genetic variation. The morphology of *P. arugamensis* has a long cylindrical body and varying sucker sizes and produces 650 bp DNA fragments.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur peneliti panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga Skripsi dengan judul “Variasi Genetik Lintah Laut (*Pterobdella arugamensis*) Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) di Indonesia dan Malaysia dengan Menggunakan Gen *Cytochrome C Oxydase Subunit I (COI)*” ini dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun berdasarkan hasil kegiatan penelitian Skripsi yang telah dilaksanakan di Laboratorium Molekuler Fakultas Biosumber dan Industri Makanan, Universitas Sultan Zainal Abidin, Terengganu, Malaysia pada bulan Oktober hingga Januari.

Pada kesempatan ini penulis dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak atas ilmu, bimbingan dan saran yang sangat membantu demi terselesaikannya Skripsi ini. Penulis menyadari banyak kekurangan dalam penyusunan Skripsi ini, sehingga memerlukan perbaikan dan penyempurnaan. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan naskah Skripsi ini. Semoga naskah Skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, 1 Juni 2025

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT karena hanya dengan rahmat dan kasih sayang dan lindungan-Nya, penulis dapat menyelesaikan serangkaian penelitian hingga penyusunan Skripsi ini. Dalam penyusunan naskah Skripsi ini, penulis menyampaikan terimakasih yang tulus kepada:

1. Prof. Ir. Moch. Amin Alamsjah, M.St., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga yang telah memberikan bimbingan kepada penulis.
2. Putri Desi Wulan Sari, S.Pi., M.Si. selaku Kepala Program Studi Akuakultur dan Dosen Pembimbing Utama, serta Prof. Dr. Akhmad Taufiq Mukti, S.Pi., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Serta yang telah memberikan arahan, masukan, serta bimbingan sejak awal penyusunan hingga akhir penyelesaian Skripsi ini.
3. Rozi, S.Pi., M. Biotech. serta Syifania Hanifah Samara, S.Pi., M.Sc. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan dan membangun kepenulisan Skripsi ini
4. Dr. A. Shofy Mubarak, S.Pi., M.Si. selaku dosen wali yang telah memberikan arahan, masukan, serta bimbingan sejak awal masuk kuliah hingga akhir penyelesaian Skripsi ini.
5. Prof. Madya Dr. Ahmad Syazni Kamarudin selaku dosen pembimbing lapangan dan tim penelitian Drask Lab seperti Dr. Zafirah, kak Athirah dan kak Ain yang telah berkenan untuk memberikan arahan dan kerja samanya selama proyek penelitian berlangsung.
6. Kedua orang tua tercinta, Ibunda Fernanda Maulina dan Ayahanda Ir. Ahmad Solhan, S.T., M.T. yang telah mendidik penulis dari kecil hingga saat ini dengan penuh kesabaran, selalu mengusahakan segala kebutuhan penulis, selalu memberikan motivasi, semangat dan kasih sayangnya kepada penulis, serta doa yang tiada henti tcurahkan untuk penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini dengan baik. Semoga Allah SWT membalas

kebaikan kalian dengan pahala yang berlipat ganda dan selalu dilancarkan rezekinya.

7. Teruntuk kedua adik penulis Farhannur dan M. Fakhri, terima kasih telah menjadi adik yang baik bagi penulis, selalu menghibur penulis selama proses penulisan Skripsi ini. Tetap tumbuh menjadi lebih baik yang dapat melampaui kakakmu, meskipun penulis masih jauh dari kata ‘seorang kakak yang baik’ namun penulis akan selalu mendoakan kalian dan mendukung kalian dimanapun kalian berada.
8. Terima kasih kepada rekan program MBKM Extend di Malaysia yang telah bekerjasama dan senantiasa membantu dalam pelaksanaan projek penelitian.
9. Terima kasih kepada sahabat penulis Salma, Desicha, dan Tari serta teman seperjuangan Fakultas Perikanan dan Kelautan yang telah membantu penulis dalam proses pengerjaan Skripsi ini, serta menjadi *support system* yang baik untuk penulis.
10. Kepada sahabat sekaligus keluarga kedua penulis ‘Rumahopah Gurls’ Syalwa, Saskia, Alisia, Mega, Farah, dan Shafa terima kasih telah kebersamai penulis dalam lika-liku kehidupan yang telah dilalui, terima kasih untuk setiap tawa, air mata, motivasi, dukungan, dan setiap kebersamaan. Terima kasih telah membuat hidup penulis lebih bermakna dan lebih indah. Semoga persahabatan kita tetap langgeng dan tak lekang oleh waktu.
11. Kepada sepupu terdekat penulis Nur Hasanah, terima kasih telah kebersamai penulis dari awal perkuliahan hingga sekarang, dan selalu membantu penulis dalam setiap kesulitan. Semoga Allah SWT membalas kebaikan mu dengan pahala yang berlipat ganda.
12. Terakhir kepada diri saya sendiri, Nurhaliza. Terima kasih telah bertahan sejauh ini. Walau sering kali merasa putus asa dan tidak percaya diri, namun terima kasih karena memutuskan untuk tidak menyerah sesulit apapun proses penyusunan Skripsi ini dan telah menyelesaikannya sebaik dan semaksimal mungkin, serta selalu berusaha dan senantiasa menikmati prosesnya yang terbilang tidak mudah.



DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	v
SUMMARY	vi
KATA PENGANTAR	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Ikan Kerapu Cantang (<i>E. fuscoguttatus</i> x <i>E. lanceolatus</i>)	7
2.1.1 Klasifikasi Kerapu Cantang (<i>E. fuscoguttatus</i> x <i>E. lanceolatus</i>)....	7
2.1.2 Morfologi Ikan Kerapu Cantang (<i>E. fuscoguttatus</i> x <i>E. lanceo-</i>	
<i>latus</i>).....	8
2.1.3 Habitat Ikan Kerapu Cantang (<i>E. fuscoguttatus</i> x <i>E. lanceolatus</i>)...8	
2.2 <i>Pterobdella arugamensis</i>	9
2.2.1 Klasifikasi <i>P. arugamensis</i>	9
2.2.2 Morfologi <i>P. arugamensis</i>	10
2.2.3 Inang dan Predileksi.....	11
2.2.4 Identifikasi <i>P. arugamensis</i>	11
2.2.5 Gejala Klinis	12
2.2.6 Siklus Hidup <i>P. arugamensis</i>	13
2.3 Keragaman Genetik	14
2.4 Filogenetika.....	15
2.5 DNA Barcoding	17
2.6 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	18

x

2.7	Sekuensing DNA	19
2.8	Gen <i>Cytochrome C Oxydase Subunit I (COI)</i>	19
III	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	21
3.1	Hipotesis	25
IV	MATERI DAN METODE.....	26
4.1	Waktu dan Tempat.....	26
4.2	Materi Penelitian.....	27
4.2.1	Peralatan Penelitian.....	27
4.2.2	Bahan Penelitian	27
4.3	Metode Penelitian	28
4.4	Prosedur Penelitian	28
4.4.1	Preparasi Sampel.....	28
4.4.3	Isolasi DNA (Ekstraksi) Sampel dengan CTAB.....	29
4.4.4	Amplifikasi <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	30
4.4.5	Elektroforesis	31
4.4.6	Sekuensing DNA	32
4.5	Parameter Penelitian	32
4.6	Analisis Data Molekuler	32
4.6.1	Analisis Homologi Berdasarkan GenBank NCBI	32
4.6.2	Analisis DNA Polimorfisme	33
4.6.3	Analisis Filogenetik	33
4.6.4	Identifikasi Morfologi dan Morfometrik	34
4.7	Diagram Alir Penelitian	36
V	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
5.1	Hasil Penelitian	37
5.1.1	Hasil Homologi Sekuens Gen <i>COI</i> Menggunakan BLAST NCBI	37
5.1.2	Identifikasi Molekuler Berdasarkan Gen <i>COI</i>	38
5.1.3	Hasil DNA Polimorfisme <i>P. arugamensis</i>	39
5.1.4	Hasil Filogenetik <i>P. arugamensis</i>	41
5.1.5	Morfologi <i>P. arugamensis</i>	43
5.1.6	Morfometrik <i>P. arugamensis</i>	44
5.2	Pembahasan.....	46

VI PENUTUP	58
6.1 Kesimpulan	58
6.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN.....	69

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil BLAST gen <i>COI</i> yang dibandingkan dengan NCBI	38
2. Hasil analisis DNA polimorfisme dengan menggunakan <i>software</i> DnaSP ...	40
3. Hasil pengukuran morfometrik <i>P. arugamensis</i> Malaysia dan Indonesia	45
4. Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk	45
5. Hasil uji hipotesis menggunakan uji Mann-Whitney	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Kerapu Cantang (<i>E. fuscoguttatus</i> x <i>E. lanceolatus</i>).....	7
2. <i>P. arugamensis</i>	9
3. Morfologi <i>P. arugamensis</i>	11
4. Gejala klinis ikan yang terinfeksi <i>P. arugamensis</i>	13
5. Siklus hidup <i>P. arugamensis</i>	14
6. Struktur pohon evolusi	17
7. Kerangka konsep penelitian.....	24
8. Peta lokasi sampling	26
9. Diagram alir penelitian	36
10. Visualisasi pita DNA <i>P. arugamensis</i>	39
11. Hasil analisis pohon Filogenetik <i>P. arugamensis</i>	42
12. <i>P. arugamensis</i> Indonesia dan Malaysia	44

I PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Ikan kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) merupakan ikan yang populer di Indonesia, sehingga banyak dibudidayakan dan memiliki harga jual yang tinggi. Kegiatan ekspor kerapu di Indonesia tercatat sebagai yang terbesar kedua di seluruh dunia setelah Filipina. Budidaya ikan kerapu dimulai pada tahun 1970-an di Hong Kong, Malaysia, Singapura, Taiwan, dan Thailand, sebelum menyebar ke seluruh kawasan Asia Tenggara (Koepper *et al.* 2020). Volume ekspor kerapu mencapai 97,37% dengan rata-rata pertumbuhan 3,50% setiap tahun. Estimasi peminat untuk kerapu diperkirakan mencapai 35.000 ton setiap tahun, dengan negara-negara pengimpor utama antara lain Hongkong, Taiwan, China, Jepang, Korea Selatan, Vietnam, Thailand, Filipina, Amerika Serikat, Australia, Singapura, Malaysia, dan Prancis (Ochtavia dkk., 2024).

Salah satu kendala utama dalam budidaya ikan kerapu adalah tingkat kematian yang tinggi akibat penyakit (Liu *et al.*, 2017), yang berdampak langsung pada produksi ikan kerapu dan keberlanjutan ekonomi sektor budidaya ikan suatu negara (Rimmer *et al.*, 2019). Virus, bakteri, jamur, dan parasit telah menjadi penyebab utama penyakit menular pada ikan kerapu budidaya (Harikrishnan *et al.*, 2010). Serangan infeksi parasit menjadi salah satu tantangan paling serius dalam akuakultur (Ochtavia dkk., 2024). Budidaya ikan juga bergantung pada kesehatan dan manajemen kualitas air yang tepat. Tanpa adanya manajemen kualitas air yang

tepat, ikan akan mengalami stres secara terus-menerus karena akibat infeksi parasit yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan ikan hingga terjadi kematian pada ikan. Penyakit parasiter yang sering menginfestasi ikan kerapu salah satunya parasit lintah laut dari spesies *Zeylanicobdella arugamensis*.

Z. arugamensis merupakan ektoparasit lintah laut dari famili Piscicolidae yang pertama kali ditemukan di Sri Lanka. Akan tetapi baru-baru ini, nama *Z. arugamensis* telah diganti menjadi *P. arugamensis* (Azmeiy *et al.*, 2022). Spesies ini adalah parasit obligat yang melekat pada insang, mulut, atau kulit ikan dengan cara menghisap darah dan bisa mengakibatkan anemia, luka terbuka, infeksi sekunder, hingga kematian pada inangnya. Selain itu, *P. arugamensis* dapat menyebabkan *trypanosoma* dan *haemogregarine* ke inangnya, menyebabkan inangnya mati dan mengalami anemia kronis (Azmeiy *et al.*, 2022). Ektoparasit ini semakin mendapat perhatian dalam beberapa tahun terakhir karena memiliki dampak cukup serius terhadap akuakultur, khususnya dalam budidaya ikan. Infestasi *P. arugamensis* dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang signifikan melalui terhambatnya pertumbuhan ikan, meningkatnya kerentanan terhadap infeksi sekunder, dan menurunnya nilai pasar ikan yang terkena dampak (Govedich *et al.*, 2005).

P. arugamensis di perairan Malaysia pertama kali dilaporkan pada kuda laut (*Hippocampus* sp.) dan spesies belut yang tidak teridentifikasi (Ravi and Yahaya, 2017). *P. arugamensis* telah dilaporkan sebagai ektoparasit paling berbahaya yang menyerang berbagai spesies ikan, karena kematian inang biasanya terjadi dalam kurun waktu 3 hari setelah infestasi karena infeksi sekunder dengan bakteri patogen

seperti *Vibrio alginolyticus* (Azmeiy *et al.*, 2022). Ochtavia dkk. (2024) menyebutkan bahwa kendala utama dalam budidaya ikan adalah prevalensi serangan penyakit parasiter yang disebabkan oleh *P. arugamensis* masih tinggi. Disebutkan juga bahwa hasil observasi yang telah dilakukan di beberapa lokasi pertambakan dan keramba jaring apung (KJA) dihasilkan rata-rata nilai prevalensi sebanyak 6 kali pengambilan mencapai 11-90% dari total sampel yang diperiksa (50-225 ekor) dengan intensitas yang ditemukan pada tiap ekor ikan kerapu sebesar 4 -17 individu/ekor ikan.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *P. arugamensis* dapat menginfeksi hingga 100% pada ikan kerapu hibrida di beberapa lokasi Asia Tenggara (Mahardika dkk., 2023), hal ini menandakan bahwa persebaran lintah laut (*P. arugamensis*) menjadi ancaman yang serius bagi industri perikanan. Tingginya infestasi ini menunjukkan bahwa *P. arugamensis* memiliki kemampuan adaptasi yang baik dan kemungkinan telah mengalami diferensiasi genetik untuk beradaptasi dengan inang serta lingkungan setempat. Namun, sampai saat ini masih sedikit penelitian yang mengeksplorasi aspek genetik spesies lintah laut ini secara menyeluruh, terutama di daerah Indonesia dan Malaysia. Data mengenai variasi genetik di antara populasi *P. arugamensis* sangat penting untuk memahami struktur populasi, asal infestasi, serta kemungkinan adanya strain yang lebih virulen atau tahan terhadap upaya pengendalian (Kua *et al.*, 2024).

Wang *et al.* (2016) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa berbagai metode penanganan telah dicoba, termasuk merendamnya dalam air tawar maupun memberikan zat kimia seperti imunostimulan guna mempercepat pertumbuhan dan

tingkat keberlangsungan hidup ikan, namun hasil yang diperoleh belum dapat mencapai target dikarenakan prevalensi dan intensitas masih menunjukkan angka yang tinggi di berbagai lokasi. Metode yang dianggap efektif untuk mengetahui infestasi ektoparasit salah satunya adalah melihat profil molekuler dengan bantuan kunci identifikasi (Wang *et al.*, 2016).

Berdasarkan rekonstruksi pohon filogenetik, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melihat molekuler *deoxyribonucleic acid* (DNA) parasit dalam menentukan validitas spesies dan hubungan satu sama lain dengan menggunakan data molekuler, sehingga spesies parasit yang memiliki tingkat kesamaan morfologis yang tinggi dapat dibedakan. Selain itu, urutan DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi kekerabatan antar spesies parasit (Wang *et al.*, 2016). Pendekatan molekuler sangat penting untuk memahami sejarah evolusi karena dapat digunakan sebagai sumber informasi tentang perkembangan biologi, fisiologi, biokimia, dan biologi molekuler. Oleh karena itu, dalam kasus mutasi genetik atau pergeseran DNA yang terjadi melalui sekuensing DNA pendekatan molekuler dapat menambah, mengkonfirmasi, dan mengurangi berdasarkan fitur morfologis organisme.

Mempelajari variasi genetik ini dapat membantu memprediksi respon parasit terhadap berbagai pengendalian dan memberikan informasi untuk membangun strategi pengendalian (Criscione *et al.*, 2005). Penggunaan gen *marker Cytochrome C Oxydase Subunit I (COI)* sebagai penanda molekuler dalam penelitian ini sangat penting, mengingat gen *COI* sering digunakan dalam studi DNA barcoding dan analisis variasi genetik karena sifatnya yang cukup konservatif

namun informatif dalam mengidentifikasi perbedaan antar populasi (Deagle *et al.*, 2014). Penelitian terhadap gen ini memungkinkan peneliti untuk menemukan hubungan kekerabatan lintah laut di berbagai wilayah, mendeteksi kemungkinan perbedaan genetik antar populasi Indonesia dan Malaysia, serta memahami pola distribusi dan evolusi spesies ini dengan lebih mendetail. Penelitian ini ditujukan untuk mengidentifikasi karakteristik genetik *P. arugamensis* di Indonesia dan Malaysia berdasarkan sekuens gen *cytochrome C oxydase subunit I* (COI) dan menganalisis tingkat variasi genetik pada *P. arugamensis* di Indonesia dan Malaysia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat diketahui rumusan masalah penelitian ini yaitu:

- a. Bagaimana karakteristik genetik antara *P. arugamensis* di Indonesia dan Malaysia berdasarkan gen COI?
- b. Bagaimana tingkat variasi genetik antara *P. arugamensis* di Indonesia dan Malaysia berdasarkan gen COI ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian Variasi Genetik Lintah Laut *P. arugamensis* di Indonesia dan Malaysia :

- a. Untuk mengidentifikasi karakteristik genetik antara *P. arugamensis* di Indonesia dan Malaysia berdasarkan gen COI.

- b. Untuk menganalisis tingkat variasi genetik antara *P. arugamensis* di Indonesia dan Malaysia berdasarkan gen *COI*.

1.4 Manfaat Penelitian

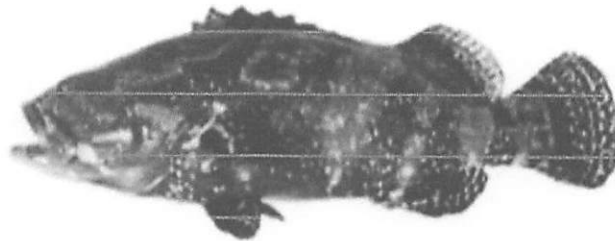
Penelitian ini memiliki manfaat untuk memberikan informasi kepada para pembaca mengenai karakteristik genetik *P. arugamensis* di Indonesia dan Malaysia berdasarkan gen *COI* serta untuk mengetahui tingkat variasi genetik antara *P. arugamensis* di Indonesia dan Malaysia agar dapat mengimplikasikan dari variasi genetik yang ditemukan untuk pencegahan dan pengendalian serangan penyakit dari lintah laut di kedua negara tersebut. Selain itu, penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi dalam penelitian selanjutnya mengenai variasi genetik parasit lintah laut *P. arugamensis*.

II TINJAUAN PUSTAKA



2.1 Ikan Kerapu Cantang (*E. fuscoguttatus* x *E. lanceolatus*)

Ikan kerapu cantang (*E. fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*) merupakan ikan hasil persilangan antara ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) betina dan ikan kerapu kertang (*E. lanceolatus*) jantan yang dikembangkan untuk menciptakan jenis baru ikan kerapu yang unggul dan dapat dibudidayakan di keramba jaring apung (KJA) (Rochmad dan Mukti, 2020). Keunggulan ikan kerapu hibrida cantang terletak pada pertumbuhannya yang pesat, dengan laju pertumbuhan dua kali lebih cepat dibandingkan ikan kerapu macan yang umum dibudidayakan oleh masyarakat (Rochmad dan Mukti, 2020). Ikan kerapu cantang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Ikan kerapu cantang (*E. fuscoguttatus* x *E. lanceolatus*) (Rochmad dan Mukti, 2020)

2.1.1 Klasifikasi Kerapu Cantang (*E. fuscoguttatus* x *E. lanceolatus*)

Klasifikasi ikan kerapu cantang (*E. fuscoguttatus* x *E. lanceolatus*) menurut Febrianto dkk. (2023) sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Chondrichthyes
Subkelas	: Elasmobranchii
Ordo	: Percomorphi
Subordo	: Percoidea
Famili	: Serranidae
Genus	: <i>Epinephelus</i>

Spesies : *E. fuscoguttatus* x *E. lanceolatus*

2.1.2 Morfologi Ikan Kerapu Cantang (*E. fuscoguttatus* x *E. lanceolatus*)

Ikan kerapu cantang memiliki bentuk tubuh yang kompres dan cenderung membulat. Ukuran kepalanya sedikit atau hampir sama dengan lebar badannya, dan kulitnya berwarna coklat kehitaman dengan lima garis hitam melintang di tubuhnya. Siripnya bercorak seperti ikan kerapu kertang dengan dasar kuning dan bintik-bintik hitam yang banyak tersebar di kepala dan di dekat sirip pectoral dengan jumlah bintik-bintik hitam yang berbeda untuk setiap spesies (Rochmad dan Mukti, 2020). Sirip punggung melebar ke belakang, menyatu dengan 11 jari-jari keras dan 15 jari-jari lunak, sirip pectoral memiliki 17 jari-jari lunak, sirip ventral terdiri dari 1 jari-jari keras dan 5 jari-jari lunak, sirip anal terdiri atas 2 jari-jari keras dan 8 jari-jari lunak, dan sirip *caudal* terdiri dari 13 jari-jari lunak, ekor berbentuk *rounded*, mulut lebar *superior* (bibir bawah lebih panjang dari bibir atas), jenis sisik *ctenoid* (bergerigi), serta bentuk gigi runcing (*canine*) (Rochmad dan Mukti, 2020).

2.1.3 Habitat Ikan Kerapu Cantang (*E. fuscoguttatus* x *E. lanceolatus*)

Ikan kerapu sering ditemukan di perairan karang, atau di daerah berlumpur, hidup pada kedalaman antara 40 meter hingga 60 meter. Sepanjang tahap hidupnya, ikan kerapu muda tinggal di perairan terumbu karang pada kedalaman 0,5-3 meter, kemudian saat dewasa berpindah ke tempat yang lebih dalam, dan biasanya pergerakan ini terjadi pada siang dan sore hari. Berdasarkan Mulyani dkk. (2021) kerapu dari muda hingga dewasa memiliki sifat demersal. Habitat kerapu macan

adalah lingkungan terumbu karang. Pantai berpasir dan berbatu karang lepas merupakan habitat yang disukai oleh kerapu macan dengan ukuran 50-200 gram. Karang lepas berfungsi sebagai tempat perlindungan bagi benih ikan kerapu dari pemangsa dan juga sebagai lokasi persembunyian untuk menyerang mangsa (Mulyani dkk., 2021).

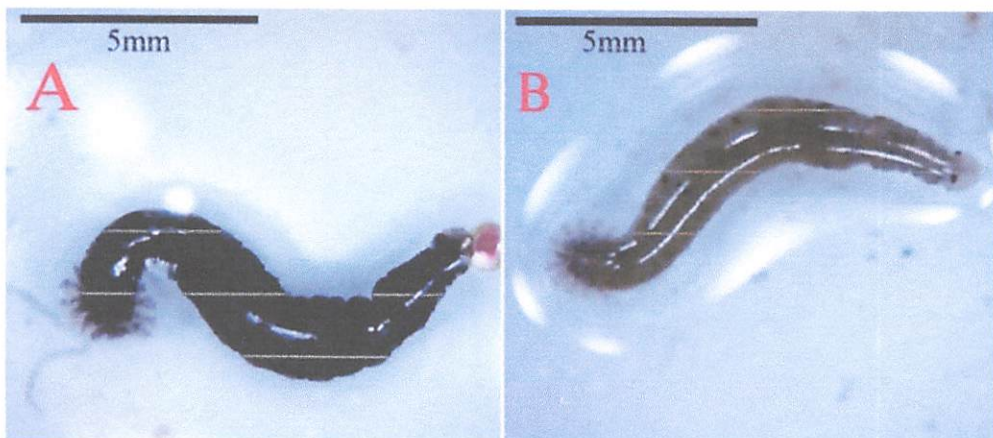
2.2 *Pterobdella arugamensis*

2.2.1 Klasifikasi *P. arugamensis*

De Silva (1963) melakukan klasifikasi dan menyatakan bahwa klasifikasi *P. arugamensis* adalah sebagai berikut:

Filum : Annelida
Kelas : Clitellata
Subkelas : Hirudinea
Ordo : Rhynchobdellida
Famili : Piscicolidae
Genus : *Pterobdella*
Spesies : *Pterobdella arugamensis*

P. arugamensis dapat dilihat pada Gambar 2.

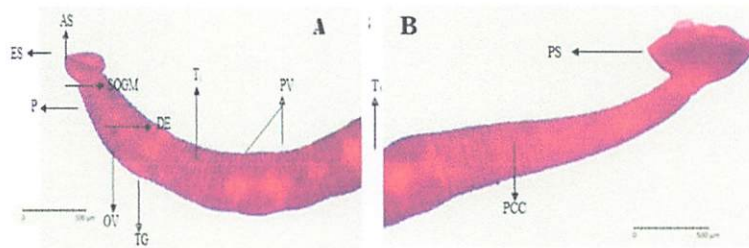


Gambar 2. *P. arugamensis* (Murwantoko *et al.*, 2018) keterangan: (A) *P. arugamensis* dengan pigmentasi tubuh coklat kehitaman, (B) *P. arugamensis* dengan pigmentasi tubuh coklat muda.

2.2.2 Morfologi *P. arugamensis*

P. arugamensis termasuk dalam filum Annelida karena tubuhnya berbentuk silindris yang tersusun memanjang seperti tumpukan cincin (Chandra, 1982). *P. arugamensis* termasuk dalam kelas Clitellata karena pada bagian *anterior* cacing ektoparasit ini terdapat oral sucker berbentuk cupuliform dan pada bagian *posterior* berukuran lebih besar daripada bagian *anterior* (Agustiya dkk., 2023). *P. arugamensis* biasanya disebut dengan lintah laut yang termasuk dalam sub class Hirudinea karena memiliki dua sucker yang terdiri dari oral sucker pada bagian *anterior* dan *caudal sucker* pada bagian *posterior*. *P. arugamensis* termasuk dalam ordo Rhynchobdellida dan famili Piscicolidae dikarenakan spesies ini tidak memiliki rahang tetapi memiliki alat penghisap untuk mengambil nutrisi pada inang yang disebut dengan *proboscis*.

Lintah laut ini termasuk dalam genus *Pterobdella* karena memiliki annuli berjumlah empat belas atau lebih serta memiliki bentuk tubuh silindris dan sepasang *eye spot* pada sepertiga bagian bawah *anterior sucker* sehingga spesies cacing ektoparasit ini termasuk spesies *P. arugamensis* (Agustiya dkk., 2023). Morfologi eksternal menunjukkan spesimen lunak dan elastis dengan anatomi silinder yang seragam, dengan individu dewasa berwarna hitam atau coklat muda, dan pada penghisap *anterior* spesimen juga terlihat dua bintik mata. Ukuran penghisap *anterior* dan *posterior* berbeda. Lintah laut dewasa memiliki panjang total 3–16 mm. Morfologi internal: Ada dua misetoma, ovisak, dan lima testis. (Azmeiy *et al.*, 2022). Morfologi *P. arugamensis* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Morfologi *P. arugamensis* (Agustiya dkk., 2023) keterangan: (A) Bagian anterior, AS: anterior sucker, ES: eye spot, SOGM: suboesophageal ganglionic mass, P: proboscis, DE: ductus ejaculatorious, OV: ovary, TG: testicular ganglion, T: testis, PV: pulsative vesicle. (B) Bagian posterior, PS: posterior sucker, PCC: posterior crop caecum.

2.2.3 Inang dan Predileksi

Spesies lintah laut ini menempel pada seluruh permukaan tubuh, termasuk mata, operculum, dan sirip (dorsal, ventral, pectoral, dan caudal) pada ikan kerapu cantang (Agustiya dkk., 2023). *P. arugamensis* selalu menginfestasi ikan kerapu sepanjang tahun, terutama pada ikan kerapu yang ditenakkan di hatchery dan tambak yang menggunakan air laut secara langsung, serta ikan kerapu yang ditenakkan di Keramba Jaring Apung (KJA) (Zafran dkk., 2020).

2.2.4 Identifikasi *P. arugamensis*

Pengamatan pada spesimen identifikasi merupakan hal yang sangat penting dalam penentuan jenis dan morfologi spesies, salah satunya adalah identifikasi morfometrik. Identifikasi morfometrik adalah suatu metode pengukuran bentuk tubuh yang dijadikan sebagai dasar untuk membandingkan ukuran tubuh seperti panjang tubuh ikan, lebar tubuh ikan dan tinggi badan ikan (Maya dkk., 2024). Identifikasi morfometrik pada ektoparasit dapat membantu mengidentifikasi struktur dan morfologi parasit, termasuk dalam karakteristik morfometrik seperti

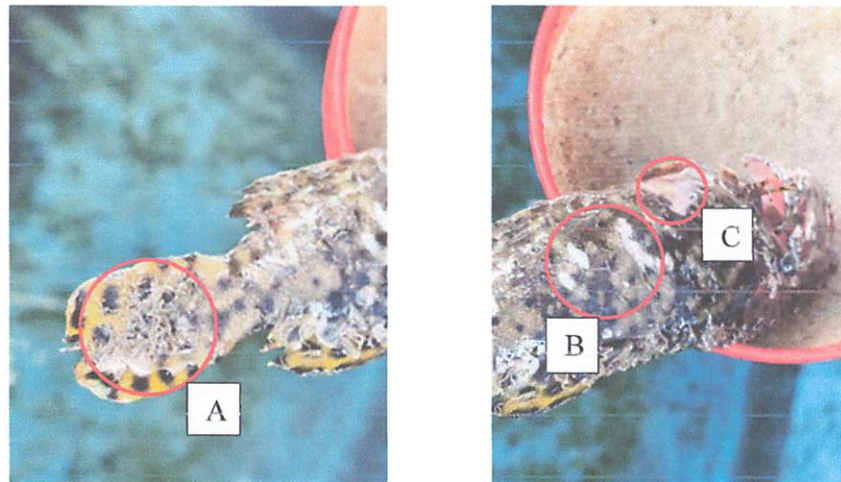
panjang, lebar, dan diameter organ, hal ini dapat digunakan untuk penentuan spesies atau genus parasit. Nagasawa *and* Uyeno (2009) menyebutkan bahwa identifikasi morfometrik lintah laut *Zeylanicobdella* dilakukan dengan mengukur panjang total lintah termasuk sucker, lebar, diameter oral, dan diameter caudal. Hasil dari pengukuran bagian-bagian tubuh tersebut dapat digunakan untuk membedakan antar spesies lintah laut *Zeylanicobdella* secara morfometrik.

2.2.5 Gejala Klinis

Ikan yang terserang oleh *P. arugamensis* menunjukkan gejala klinis seperti lemas. Infestasi pada skala berat, ikan akan menunjukkan gejala klinis cenderung berada di dasar kolam dengan kondisi yang sangat lemah. Akibat serangan parasit ini, sirip ikan menjadi tipis, kemerahan, dan kulit membengkak (Nisa *et al.*, 2021). Serangan *P. arugamensis* dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan kulit, parasit seringkali menyebabkan kerusakan pada jaringan atau organ pada ikan karena perlekatan, keberadaan, dan makanannya (Rach *et al.*, 2000).

Selain itu, parasit juga dapat menyebabkan peningkatan kerentanan ikan terhadap infeksi jamur, bakteri sekunder, dan erosi pada tempat perlekatan yang dapat menjadi tempat jalurnya patogen sekunder untuk masuk ke dalam tubuh ikan akibat rusaknya jaringan atau organ ikan. Semakin besar berat dan ukuran inang, maka semakin besar pula infestasi parasit terhadap inang. Riko dkk. (2012) mengatakan bahwa hal tersebut dikarenakan lama pemeliharaan inang dalam suatu perairan, yang mengakibatkan semakin lamanya waktu yang dimiliki inang untuk

kontak dengan parasit. Gejala klinis pada ikan kerapu yang terinfeksi *P. arugamensis* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Gejala klinis ikan yang terinfeksi *P. arugamensis*. keterangan: (A) *P. arugamensis*, (B) borok putih, (C) luka pada permukaan kulit. sumber : dokumentasi pribadi.

2.2.6 Siklus Hidup *P. arugamensis*

Parasit *P. arugamensis* merupakan cacing yang termasuk dalam kelas hirudinea yang dapat menimbulkan kerugian bagi pembudidaya karena dapat menghambat pertumbuhan ikan. Siklus hidup telur *P. arugamensis* sampai menetas dan menjadi *P. arugamensis* dewasa membutuhkan waktu 17-22 hari (Mahardika dkk., 2018). Siklus hidup *Pterobdella* membutuhkan waktu 7 hari mulai dari telur menetas dan 9 hari untuk perkembangan dari larva lintah sampai dewasa dan mampu menghasilkan telur kembali. Waktu yang dibutuhkan sekitar 16 hari dengan waktu mulai telur menetas hingga dewasa dengan salinitas air 28 ppt dan 27°C suhu air.

Tahapan perkembangan telur lintah laut dimulai dari kepompong lalu blastula awal membutuhkan waktu kurang lebih 5 jam, gastrula awal membutuhkan waktu 27 jam, gastrula akhir yang membutuhkan waktu 104 jam, dan embrio hingga juvenil dalam waktu setelah 168 jam. Ravi *and* Yahaya (2017) mengatakan perkembangan telur *P. arugamensis* dipengaruhi oleh suhu selama waktu penetasan. Kua *et al.* (2010) juga menyebutkan bahwa siklus hidup *P. arugamensis* dimulai dari lintah dewasa yang menginvestasi inang untuk bersiap menetas dalam waktu 9-10 hari, setelah menetas terbentuk kepompong, lalu blastula awal, gastrula awal, gastrula akhir, embrio, juvenil dan pada akhirnya menjadi cacing dewasa dalam waktu kurang lebih 7 hari. Mahardika dkk. (2020) menjelaskan bahwa lintah laut dan *cocoon*-nya dapat hidup dan menetas pada media pemeliharaan air laut hingga payau (5-30 ppt). Siklus hidup *P. arugamensis* dapat dilihat pada Gambar 5.

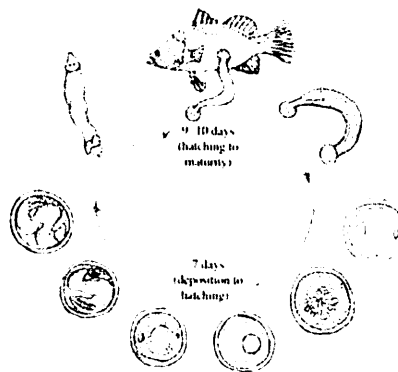


Fig. 4. The life cycle of *P. arugamensis* (Kua *et al.*, 2010).

Gambar 5. Siklus hidup *P. arugamensis* (Kua *et al.*, 2010)

2.3 Keragaman Genetik

Keberadaan semua perbedaan dalam suatu spesies termasuk aspek biokimia, struktur dan sifat yang secara fisik diwariskan dari induk yang terbentuk dari DNA

disebut keanekaragaman genetik. Keanekaragaman populasi menunjukkan proses evolusi tingkat mikro yang terjadi pada tingkat genetik. Tingkat keanekaragaman hayati yang paling rendah adalah habitat, komunitas, populasi dan spesies, karena keanekaragaman genetik mempengaruhi respon suatu populasi terhadap seleksi alam dan seleksi buatan. Keanekaragaman genetik sangat penting untuk kelangsungan hidup generasi berikutnya (Mukhopadhyay *and* Bhattacharjee, 2016). Gen-gen yang memiliki potensi yang tinggi disimpan dalam populasi yang memiliki keragaman genetik yang tinggi.

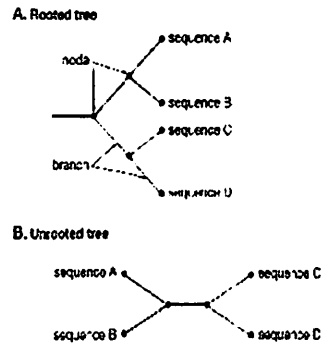
Mutasi, rekombinasi, migrasi gen antara gen membentuk keanekaragaman genetik, dan perkawinan antara jantan dan betina juga mempengaruhi keanekaragaman genetik. Kemampuan untuk bertahan dari penyakit dan perubahan iklim juga didukung oleh keanekaragaman genetik yang tinggi, hal tersebut menjadi faktor penting dalam keberhasilan pemuliaan dan konservasi. Keberhasilan sistem reproduksi merupakan faktor lain yang mempengaruhi tingkat keanekaragaman genetik dalam suatu populasi, dalam situasi dimana tidak terjadinya perkawinan sedarah maka keragaman genetik dapat dipertahankan (Tani *et al.*, 2009).

2.4 Filogenetika

Filogenetika adalah analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi hubungan kekerabatan selama proses evolusi, hal tersebut dapat digambarkan dengan menempatkan sekuen sebagai cabang luar dari sebuah pohon. Hubungan evolusi sekuen menunjukkan tingkat sekuen yang berbeda dapat saling berhubungan, dan kemiripan dua sekuen dapat saling berhubungan. Metode yang

dapat digunakan untuk membuat pohon filogenetika dengan menggunakan data molekuler, yaitu urutan nukleotida atau asam amino (Saitou *and* Imanishi, 1989). Dua sekuen dapat saling berhubungan dan diletakkan sebagai *neighboring outside* cabang dengan karakteristik yang sangat mirip dalam cabang umum (Mount, 2001). Filogenetika adalah metode klasifikasi organisme secara taksonomi berdasarkan sejarah evolusi, dan filogeni organisme adalah bagian penting dari ilmu pengetahuan yang sistematis berdasarkan karakteristik organisme (Mount, 2001).

Filogenetika juga dapat berperan sebagai pusat evolusi biologi, menciptakan paradigma lengkap tentang kehidupan dan perkembangan organisme di alam. Analisis filogenetika dapat digunakan untuk melihat perubahan yang terjadi dalam evolusi organisme yang berbeda, hal ini dapat mengidentifikasi sekuen yang dekat dengan penempatan pada cabang pohon yang berdekatan. Analisis filogenetika juga dapat digunakan untuk mengikuti perubahan yang terjadi secara cepat yang mampu mengubah spesies seperti virus (Nielsen *and* Yang, 1998). Pohon evolusi merupakan sebuah grafik dua dimensi yang menunjukkan adanya hubungan di antara organisme atau sekuen gen dari organisme, cara tersebut adalah cara yang paling umum untuk menggambarkan filogeni (Lesk, 2014). Sebuah konstruksi pada pohon filogenetik, pemisahan sekuen yang didefinisikan sebagai jarak filogenetika disebut *taxa* atau *taxon* (jika tunggal). Pohon ini terdiri dari cabang-cabang luar atau daun-daun yang mewakili *taxa*, dan titik-titik dan cabang menunjukkan hubungan di antara *taxa* sebagai A-D seperti pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur pohon evolusi (Dharmayanti, 2011)

2.5 DNA Barcoding

DNA *Barcoding* merupakan teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi spesies berdasarkan urutan DNA tertentu dan biasanya menggunakan gen mitokondrial *cytochrome C oxydase subunit I (COI)*. Konsep ini telah diperkenalkan oleh Hebert *et al.* (2003) dan telah menjadi alat yang penting dalam taksonomi modern yang memungkinkan mengidentifikasi spesies dengan cepat dan akurat, bahkan untuk spesies yang sulit dibedakan secara morfologis. Konsep ini menggunakan potongan pendek dari urutan DNA, keuntungan dari konsep DNA *barcoding* yaitu dapat membantu dalam pengenalan spesies baru, pemantauan keanekaragaman hayati, dan pengelolaan sumber daya alam.

Penerapan DNA *barcoding* telah digunakan untuk mengidentifikasi spesies ikan dan invertebrata laut yang sering kali sulit dibedakan berdasarkan ciri morfologis saja. Penelitian Robert *et al.* (2005) menunjukkan bahwa DNA *barcoding* dapat mengungkapkan keanekaragaman spesies yang lebih tinggi daripada yang terdeteksi melalui metode tradisional. Selain itu, teknik ini telah digunakan untuk mendeteksi spesies invasif dan dapat memantau perubahan dalam

komunitas biota akibat perubahan lingkungan. Adapun kekurangan dari teknik ini adalah terdapat variasi genetik dalam spesies yang sama, hal tersebut dapat menyebabkan kesulitan dalam mengidentifikasi suatu spesies, selain itu referensi database yang kurang lengkap dapat membatasi keefektifan teknik ini. Tujuan dari DNA *barcoding* adalah untuk mengetahui klasifikasi taksonomi konvensional dengan data organisme yang *barcode*-nya sudah terdata dalam genbank (Battacharya *et al.*, 2016).

2.6 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

PCR juga dikenal sebagai reaksi rantai *polymerase*, adalah teknik biologi molekuler yang dapat menghasilkan salinan DNA khusus dari sekuens oligodeoksinukleotida atau primer melalui reaksi termal berulang yang terjadi jutaan kali dalam waktu yang sangat singkat. Karena dinilai dapat menghasilkan hasil yang lebih akurat, metode PCR telah banyak digunakan. Selain itu, metode PCR memiliki keunggulan seperti sensitivitas dan spesifitas yang cepat; jika dibandingkan dengan uji biokimia, metode ini sangat efektif untuk mengidentifikasi, mengukur, dan mendeteksi organisme (Wulandari dkk., 2019).

Pra-denaturasi DNA templat, denaturasi DNA templat, annealing (penempelan primer pada templat), *extension* (pemanjangan primer), dan post-extension adalah tahapan PCR. Tahap kedua hingga keempat, terjadi tahapan berulang, atau siklus, di mana jumlah DNA akan diulang. Beberapa komponen pasti diperlukan untuk proses PCR seperti templat DNA, buffer PCR, enzim polimerase DNA, *dNTPs* (*deoxynucleotide triphosphates*), dan sepasang primer yang disebut "balik" dan "pergi". Oleh karena itu, primer digunakan untuk membatasi fragmen

DNA target yang akan diamplifikasi dan juga karena proses ekstensi DNA menyiapkan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3', sensititas dan spesifitas hasil PCR sangat dipengaruhi olehnya (Putra *et al.*, 2020).

2.7 Sekuensing DNA

Bacaan urutan basa nukleotida DNA disebut sekuensing. Dua pendekatan sekuensing yang saat ini digunakan adalah metode sintesis molekul DNA dan pemberhentian sintesis tersebut pada basa tertentu. Metode *Maxam-Gilbert* disebut sebagai pendekatan degradasi fragmen DNA secara kimiawi, dan metode *Sanger* disebut sebagai pendekatan sintesis molekul DNA dan pemberhentian sintesis tersebut pada basa tertentu. Proses sekuensing menggunakan teknik gel *elektrophoresis polyacrylamide* untuk membedakan fragmen DNA berukuran berbeda. Metode Sanger umumnya lebih banyak digunakan karena lebih mudah, praktis, dan efektif. Metode ini dimaksudkan untuk mengidentifikasi urutan basa nukleotida dalam fragmen DNA, yang biasanya kurang dari 1.000 bp panjangnya. "Standard Emas" adalah pengurutan Sanger yang memiliki akurasi dasar 99,99% (Totomoch-serra *et al.*, 2017).

2.8 Gen *Cytochrome C Oxydase Subunit I (COI)*

Pada studi karakteristik genetik dan filogeni, Gen *cytochrome C oxydase subunit I (COI)* termasuk gen mitokondria yang sering digunakan (Wibowo *et al.*, 2013). Sekuennya yang pendek digunakan sebagai gen standar untuk identifikasi spesies hewan berbasis *barcode* DNA. Gen *COI* memiliki beberapa kelebihan, salah satunya adalah bahwa ia tidak mengalami delesi atau insersi pada sekuennya

dan ada beberapa bagian yang bersifat lestari (*converse*) sehingga gen ini dapat digunakan sebagai DNA *barcode*.

Adapun kelemahan dari gen *COI* yaitu panjang gennya relatif pendek berkisar 648 bp (Sutrisno, 2018). Gen *COI* dapat membedakan spesies yang dekat dan semua filum, sehingga gen ini merupakan marka genetik umum dalam DNA *barcoding* (Mustikasari dan Agustiani, 2021). Fragmen yang dimiliki oleh gen ini berupa spektrum filogenetik yang luas dan menunjukkan divergensi sekuens intraspesies.



III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

Masalah pada budidaya ikan yang paling umum adalah masalah lingkungan, seperti pencemaran air atau kualitas air yang buruk. Faktor-faktor ini dapat menyebabkan stres bagi ikan, menurunkan daya tahan tubuhnya, dan membuatnya rentan terhadap penyakit yang disebabkan oleh parasit lintah (Irianto, 2017). Budidaya ikan juga bergantung pada kesehatan dan manajemen kualitas air yang baik, tanpa manajemen kualitas air yang baik, ikan akan terpapar patogen dan stres terus-menerus, yang dapat menyebabkan kematian. Adanya serangan penyakit parasiter yang disebabkan oleh lintah *P. arugamensis* adalah salah satu kendala utama dalam budidaya yang masih sangat umum. *P. arugamensis* merupakan spesies lintah laut yang dapat menginfeksi ikan budidaya dan keberadaannya semakin menjadi perhatian dalam beberapa tahun terakhir, karena parasit ini memberikan dampak yang cukup serius terhadap akuakultur khususnya dalam budidaya ikan. Infestasi *P. arugamensis* dapat menyebabkan ikan mengalami luka pada permukaan kulit dan ulserasi yang berpotensi sebagai penyebab infeksi sekunder. Selain itu, *P. arugamensis* dapat menyebarkan *trypanosoma* dan *haemoragi* yang dapat menyebabkan kematian dan inang mengalami anemia kronis (Azmeiy *et al.*, 2022).

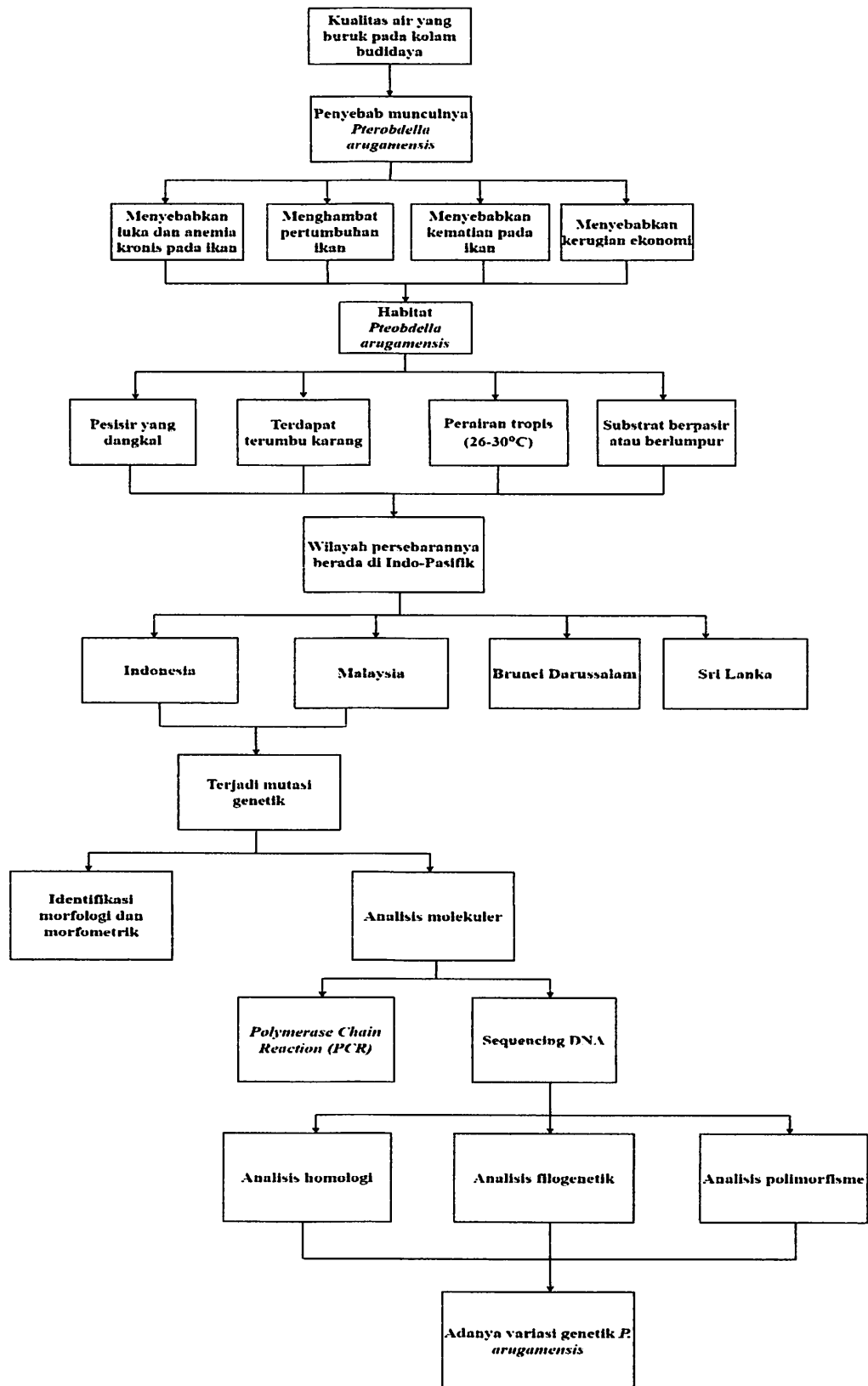
Infestasi *P. arugamensis* juga dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang cukup signifikan, seperti terhambatnya pertumbuhan ikan, meningkatnya kerentanan terhadap infeksi sekunder dapat menurunkan nilai pasar ikan yang terkena dampaknya (Govedich *et al.*, 2005). Kendala utama pada budidaya ikan adalah prevalensi serangan parasit *P. arugamensis* masih tinggi, biasanya kematian

inang yang terinfeksi *P. arugamensis* terjadi dalam kurun waktu 3 hari, hal tersebut disebabkan oleh infeksi sekunder dengan bakteri patogen.

Secara umum, distribusi lintah laut *P. arugamensis* cukup luas di kawasan Indo-Pasifik, namun sebagian besar lebih sering berada di kawasan perairan tropis Indonesia dan Malaysia. Murwantoko *et al.* (2018) menyebutkan prevalensi spesies ini berkisar 30-40% pada ikan budidaya di daerah Bali dan Sulawesi. Cruz *et al.* (2000) juga melaporkan bahwa ditemukannya spesies ini di perairan karang Filipina, dan di Malaysia, lintah laut paling banyak ditemukan di perairan laut dangkal di Sabah dan Sarawak, yang didominasi oleh ekosistem terumbu karang, serta daerah perikanan, serta ditemukan pada beberapa spesies ikan kerapu yang tersebar di daerah tersebut. Pernyataan tersebut menunjukkan lintah laut *P. arugamensis* mampu menyesuaikan terhadap lingkungan, karena terdapat keterikatan dengan suhu air (*water temperature*), salinitas (*salinity*), serta keberadaan terumbu karang.

Kasus pada *P. arugamensis*, keragaman genetik dapat mempengaruhi kapasitasnya untuk menginfeksi spesies ikan yang berbeda, atau beradaptasi dengan berbagai kondisi lingkungan di berbagai lokasi budidaya. Dengan mempelajari variasi genetik ini dapat membantu memprediksi respon parasit terhadap berbagai pengelolaan dan menginformasikan pengembangan strategi pengendalian (Criscione *et al.*, 2005). Variasi genetik dalam populasi parasit secara signifikan mempengaruhi kemampuan mereka untuk menghindari respon imun inang, dan mengembangkan resistensi terhadap tindakan pengendalian (Tan *et al.*, 2019). Oleh karena itu, variasi genetik populasi pada parasit dalam akuakultur dapat

memberikan wawasan mengenai pola penyebaran, potensi adaptasi parasit, asal-usul parasit, persebaran parasit dan interaksi antara inang dengan parasit. Wang *et al.* (2016) mengatakan bahwa salah satu cara yang dianggap efektif untuk mengetahui infestasi ektoparasit yaitu dengan cara melihat profil morfologis dengan bantuan kunci identifikasi. Pendekatan molekuler sangat penting untuk memahami sejarah evolusi karena dapat digunakan sebagai sumber informasi tentang perkembangan biologi, fisiologi, biokimia, dan biologi molekuler. Dengan demikian, pendekatan molekuler dapat menambah, mengkonfirmasi, dan mengurangi berdasarkan fitur morfologis suatu organisme dalam kasus mutasi genetik atau pergeseran *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang terjadi melalui sekuensing DNA, serta urutan DNA dapat digunakan untuk menentukan kekerabatan antar spesies parasit dan mengamati molekuler DNA parasit dalam menentukan validitas dan hubungan spesies berdasarkan rekonstruksi pohon filogenetik. Kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kerangka konsep penelitian

3.1 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, hipotesis berikut diberikan:

Hipotesis Pertama

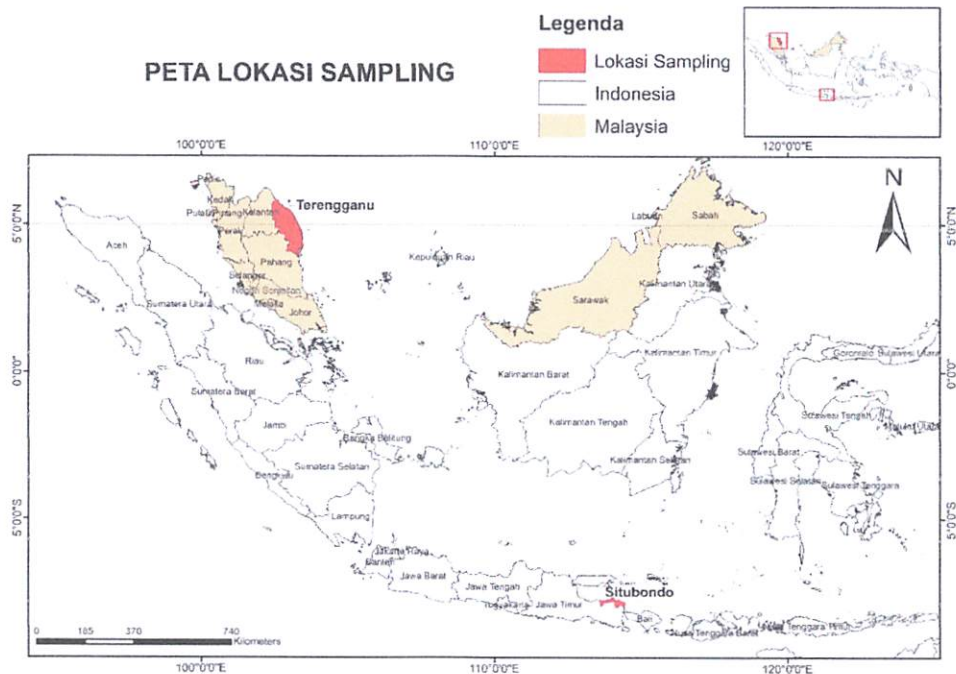
H₀: Tidak ada variasi genetik antara *P. arugamensis* Indonesia dengan Malaysia

H₁: Terdapat variasi genetik antara *P. arugamensis* Indonesia dengan Malaysia

IV MATERI DAN METODE

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2024 – Januari 2025 di Laboratorium Molekuler Fakultas Biosumber dan Industri Makanan, Universitas Sultan Zainal Abidin, Terengganu, Malaysia. Pengambilan sampel dilakukan di dua wilayah perairan yaitu Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, Jawa Timur serta Pusat Pembenuhan dan Asuhan Ikan Marin, Terengganu, Malaysia. Pengujian PCR dilakukan di Laboratorium Molekuler Fakultas Biosumber dan Industri Makanan, Universitas Sultan Zainal Abidin, Terengganu, Malaysia. Peta lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Peta lokasi sampling

4.2 Materi Penelitian

Materi penelitian meliputi peralatan penelitian dan bahan yang digunakan dalam penelitian.

4.2.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian kali ini berupa *software* GenBank NCBI, *software* LAS X, *software* MEGA 12, *software* DnaSP, *software* ImageJ, sentrifuge (@Eppendorf, Europe), vortex (@MS1, USA), Spinner Cubee (@GeneReach, Taiwan), Thermo Mixer C (@Eppendorf, Europe), *UV transilluminator* (@Maestrogen, Taiwan), *Gel Documentation System* (@Fujifilm LAS-4000, Japan), *microwave* (@Sharp, Japan), *Analitic Balance* (@Radwag, Poland), 100 ml $\pm$ 1 ml *Glass Beacker* (@HMBG Ex20, Malaysia), PCR Thermal *Cycler* (@ Applied Biosystems, USA), 100 ml *Glass Beacker* (@HMBG Boro 3.3, Malaysia), Mikropipet (@Joanlab, China), Microtip, Cetakan Elektroforesis, Laminar Flow (@TNEI, India), *Autoclave* (@Hirayama HVE50, Japan), *Power Supply Electrophoresis* (@CBS Scientific EPS- 300 II, USA), *submarine electrophoresis system* (@Advance Mupid-Exu, Japan), *microtube* PCR 0,2 ml, *microtube* 1,5 ml, pinset, gunting, bunsen (@Campingaz CT-200, France), *microscope compound* (@LEICA ICC50 E, German).

4.2.2 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan bahan-bahan yaitu berupa media 1x TBE Buffer, agarose 100g (@1st Base, Singapore), *Gel stain* 10000x (@Trans, China), 2x PCRBIO Taq Mix Red (@PCRBio, United Kingdom), *Nuclease-free water* 1,25 mL (@Norgen, Canada), 2x CTAB Buffer, 3m NaCl, ethanol absolute 70%, ethanol

absolute 100%, DNA ladder 100bp (@Trans, China), proteinase K solution (@Thermo Scientific, USA), alkohol 70%, ethanol 95%, dan 6 sampel lintah laut (*P. arugamensis*) Indonesia yang berlokasi di BPBAP Situbondo dan 6 sampel dari Malaysia yang berlokasi di Pusat Pembenihan dan Asuhan Ikan Marin, Terengganu.

4.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode observasional deskriptif dengan rancangan eksploratif. Metode observasional deskriptif merupakan metode yang menggambarkan fenomena yang ditemukan baik berupa faktor risiko maupun suatu efek atau hasil pada penelitian yang bersifat deskriptif tidak perlu ada hipotesis (Sugiono, 2013). Penelitian eksploratif merupakan penelitian yang bertujuan melakukan eksplorasi untuk memperdalam pengetahuan dan mencari ide baru.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Preparasi Sampel

Sampel diambil dari ikan yang terinfeksi *P. arugamensis*. Pengambilan sampel dilakukan dengan pelabelan kode berdasarkan nama ikan, asal spesimen, dan tanggal pengambilan sampel. Sampel dipindahkan ke dalam tube dan diberi ethanol 95% untuk sampel lintah laut Malaysia dan alkohol 70% untuk sampel lintah laut Indonesia dan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan. Setelah dimasukkan ke dalam tube, lintah dipotong menjadi empat bagian dan sampel disimpan dalam suhu ruang.

4.4.2 Pengamatan Morfologi dan Morfometrik

Sampel *P. arugamensis* yang digunakan berjumlah 6 ekor dari BPBAP Situbondo dan 6 ekor dari Pusat Pembenihan dan Asuhan Ikan Marin, Terengganu, Malaysia. Pengamatan morfologi menggunakan *microscope compound* LEICA ICC50 E yang tersambung dengan *software* LAS X dan dilakukan di Laboratorium Sains Akuatik, Universitas Sultan Zainal Abidin. Sedangkan pengukuran morfometrik dilakukan dengan menggunakan *software* ImageJ, karakter morfometrik yang diukur adalah total panjang tubuh, panjang tubuh, lebar tubuh, diameter *anterior sucker* dan diameter *posterial sucker*.

4.4.3 Isolasi DNA (Ekstraksi) Sampel dengan CTAB

Isolasi DNA *P. arugamensis* dilakukan menggunakan metode *cetyl trimethylammonium bromide* (CTAB) *extraction* yang dilakukan sesuai petunjuk dengan beberapa langkah. Adapun prosedur isolasi DNA yang dilakukan yaitu persiapan alat dan bahan antara lain *microtube* 1,5 ml, bunsen, pinset, gunting, 2x CTAB buffer, *chloroform-isoamyl alcohol* (CIA 24:1), proteinase K solution, 100% ethanol absolute, 70% ethanol absolute, 3m NaCl, *free water* (ddH₂O) dan sampel *P. arugamensis* masing-masing sebanyak enam ekor. Sampel *P. arugamensis* dipindahkan ke dalam *microtube* dan sampel dihancurkan menggunakan gunting di dalam *microtube*. Kemudian 2x CTAB buffer ditambahkan sebanyak 600 µL, setelah itu tambahkan proteinase K sebanyak 10 µL. Kemudian sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 3 jam atau hingga sampel menjadi larut.

Sampel ditambahkan *Chloroform-Isoamyl alcohol* (CIA 24:1) sebanyak 600 µL, lalu sampel dihomogenkan selama 15 detik. Kemudian sampel di sentrifuge

dengan kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit. Setelah disentrifuge, sampel dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru sebanyak 500 μ L dan ditambahkan 100% ethanol absolute sebanyak 500 μ L. Kemudian *microtube* dibolak-balikkan selama beberapa detik, lalu sampel diinkubasi selama semalaman. Setelah diinkubasi semalaman, sampel disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang berada dalam *microtube* dibuang dan DNA yang berada dalam *microtube* dibiarkan, lalu tambahkan 70% ethanol absolute sebanyak 600 μ L dan 3M NaCl sebanyak 25 μ L. *Microtube* dibolak-balikkan selama beberapa detik, dan sentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Ethanol absolute dalam *microtube* dibuang dan keringkan DNA yang menempel pada *microtube*. DNA dilarutkan menggunakan ddH₂O sebanyak 20-100 μ L. Sampel disimpan ke dalam *freezer* pada suhu -20°C.

4.4.4 Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode replikasi DNA (perbanyak DNA) secara enzimatik yang dapat menghasilkan DNA dalam jumlah besar dengan waktu yang relatif lebih singkat (Kurniawati dkk., 2019). Adapun prinsip metode PCR yaitu melakukan amplifikasi segmen DNA spesifik dengan pelekatan dua primer komplementer dengan sekuen khusus gen target. Pasangan primer yang digunakan adalah primer *forward* LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') dan primer *reverse* HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.* 1994). Metode PCR terdapat tiga tahapan yaitu denaturasi, *annealing* (penempelan), dan *extension* (pemanjangan) (Aminah dkk., 2019). Pra-denaturasi dilakukan pada suhu 94°C

selama 4 menit, denaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* dengan suhu 47,9°C selama 50 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit. Pada tahap denaturasi hingga *extension* terjadi 39 siklus. Proses terakhir yaitu *final extension* di suhu 72°C selama 7 menit.

Pembuatan master mix diperlukan primer *forward* LCO 1490 dan primer *reverse* HCO 2198, primer ditambahkan sebanyak 9.5 µl, ddH₂O 38 µl, 2x PCRBIO Taq Mix Red sebanyak 247 µl, dan ekstraksi DNA sebanyak 4 µl. Selanjutnya, hasil PCR dilakukan proses elektroforesis untuk mengidentifikasi fragmen DNA yang akan dilihat pada *UV transilluminator* atau dengan *gel document system* (Muhammad-Rasul *et al.*, 2018).

4.4.5 Elektroforesis

Hasil PCR dielektroforesis pada gel agarose. Agarose 2% (0,6 g ditambahkan ke dalam buffer TBE 30 mL) dididihkan di *microwave*. Setelah agarose hangat, *gel stain* ditambahkan sebanyak 1,5 µl. Setelah itu, agarose dimasukkan ke dalam cetakan elektroforesis yang telah dipasang *comb*. Setelah agarose mengeras, 4 µl produk PCR dimasukkan ke sumur pertama yang diisi dengan 1 µl penanda molekuler (*marker*). Selama empat puluh menit, elektroforesis dilakukan dengan voltase 100 volt. Gel yang diangkat kemudian diamati di atas *transilluminator ultraviolet* atau *gel documentation system* dan didokumentasikan. Besar pasangan base yang dihasilkan untuk mendeteksi gen *COI* sebesar 650 bp. Setelah pembacaan besar pasangan base yang terlihat, tahap PCR berakhir dengan hasil amplifikasi gen *COI P. arugamensis* yang positif.

4.4.6 Sekuensing DNA

Hasil PCR yang telah di amplifikasi dan telah dilihat pada *UV transilluminator* atau *gel document system* akan dilakukan sekuensing DNA dengan pihak ketiga yaitu Perusahaan Sanger Sekuensing berlokasi di Seri Kembangan, Selangor, Malaysia yang bertujuan untuk mendapatkan susunan basa dan kemudian hasilnya akan dicocokkan dengan data pada NCBI yang digunakan untuk mencari kesamaan sekuens nukleotida dengan sekuens di GenBank (Harun dkk., 2018).

4.5 Parameter Penelitian

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini meliputi parameter utama dan parameter pendukung. Parameter utama dalam penelitian ini yaitu konfirmasi sekuens DNA *barcoding* sampel *P. arugamensis* dari Indonesia dan Malaysia, variasi genetik dari *P. arugamensis*, pohon filogenetik, dan DNA polimorfisme. Parameter pendukung yaitu identifikasi morfologi dan morfometrik *P. arugamensis*.

4.6 Analisis Data Molekuler

4.6.1 Analisis Homologi Berdasarkan GenBank NCBI

Hasil sekuensing *deoxyribonucleic acid* (DNA) disejajarkan (*alignment*) dan diedit menggunakan *software* MEGA 12 dan dibandingkan dengan data pada *Gene Bank* (GenBank) *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan metode *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Sekuens yang dipilih dari *GenBank* akan disimpan dalam format *Fast-All* (FASTA) (Hariyanto dkk., 2015).

4.6.2 Analisis DNA Polimorfisme

Hasil dari pensejajaran sekuens dianalisis menggunakan *software* DnaSP ver. 6 untuk mengetahui jumlah polimorfisme. Polimorfisme yang dimaksud yaitu seperti jenis, letak, dan jumlah mutasi pada sekuen sehingga dapat diketahui keanekaragaman nukleotida (gen) (Yuliani dkk., 2017). Berikut beberapa rumus yang digunakan dalam analisis DNA polimorfisme :

a. Keragaman nukleotida (π) menurut Nei *and* Li (1979):

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij}$$

Keterangan :

n = jumlah sekuens dalam sampel

x_i dan x_j = frekuensi sekuens ke- i dan ke- j

π_{ij} = jumlah perbedaan nukleotida persitus antara sekuens i dan j

b. Keragaman haplotipe (H_d) menurut Zein (2007) :

$$1 - \sum p_i^2$$

Keterangan :

p = frekuensi dari haplotipe ke i

4.6.3 Analisis Filogenetik

Tujuan analisis filogenetik adalah untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara sampel *P. arugamensis* yang digunakan dan sampel yang ditemukan di GenBank. Analisis filogenetik dilakukan menggunakan metode *maximum*

likelihood dengan model parameter Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G) dan nilai *bootstrap* 1000x yang ditemukan di *software* MEGA 12 (Triswiyana, 2021).

4.6.4 Identifikasi Morfologi dan Morfometrik

Data pengamatan morfologi dan pengukuran morfometrik disusun ke dalam Microsoft Excel 2013 dan disajikan dalam bentuk tabel pada Microsoft Word. Selanjutnya dilakukan perhitungan standar deviasi (SD) pada setiap karakter morfometrik semua sampel *P. arugamensis*, kemudian dilakukan uji normalitas dengan *software* SPSS ver. 27 dan apabila hasilnya terdistribusi normal maka dilanjut dengan uji T-Independent, apabila hasil data tidak terdistribusi normal maka alternatifnya dilanjut dengan uji Mann-Whitney.

a. Standar Deviasi

Standar deviasi (SD) merupakan pencerminan penyimpangan yang sangat tinggi, sehingga penyebaran data menunjukkan hasil yang normal (Riadi dan Ulum, 2021). Rumus Standar Deviasi sebagai berikut :

$$\text{Standar Deviasi} = \frac{\sqrt{\sum (X_i - \mu)^2}}{N}$$

Keterangan :

X_i = Nilai Tengah

μ = Nilai rata-rata

N = Jumlah data

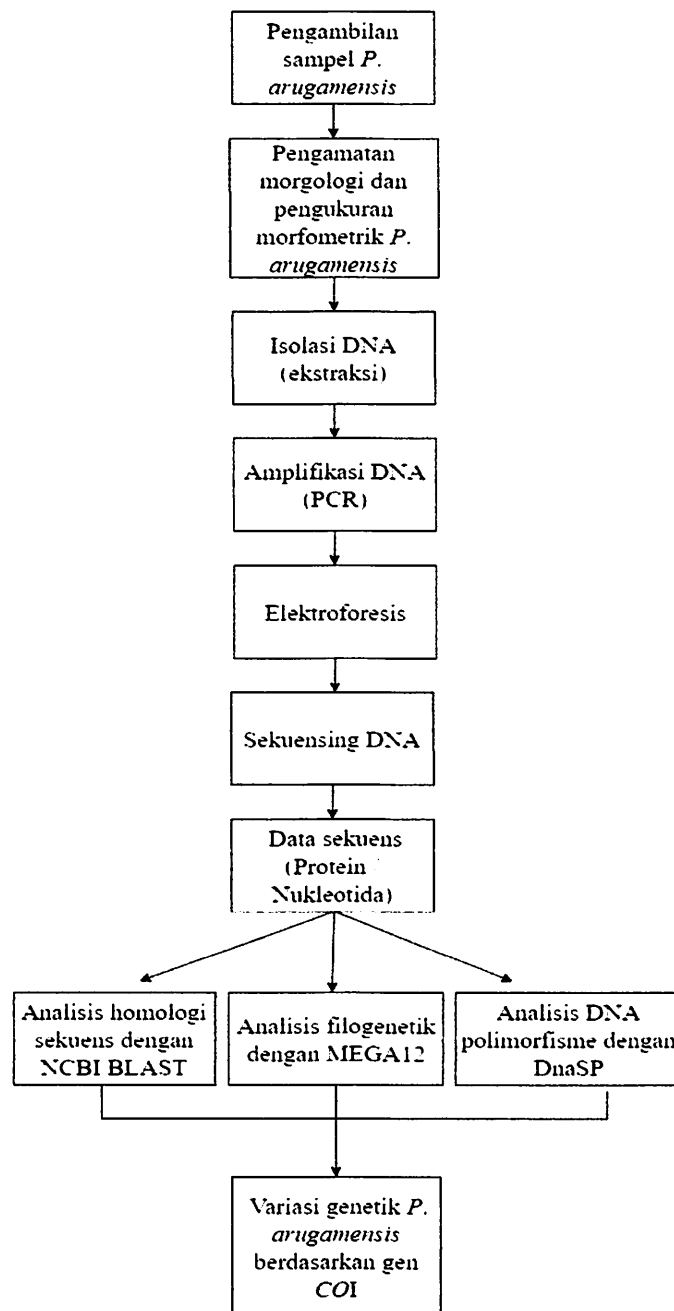
b. Uji Normalitas

Uji normalitas yang digunakan pada perhitungan morfometrik adalah uji normalitas Shapiro-Wilk karena data yang digunakan dalam penelitian ini < 50 sampel. Agustin dan Permatasari (2020) menyebutkan bahwa uji normalitas Shapiro-Wilk merupakan uji yang bertujuan untuk mengetahui sebaran data acak suatu sampel yang digunakan dalam simulasi data serta sampelnya tidak mencapai 50. Dasar pengambilan keputusan menurut Santoso (2016) bisa dilakukan berdasarkan probabilitas yaitu jika probabilitas $> 0,05$ maka distribusi dari populasi normal. Apabila probabilitas $< 0,05$ maka populasi tidak terdistribusi secara normal.

c. Uji Mann-Whitney

Uji Mann-Whitney termasuk dalam uji statistik non-parametrik dan merupakan metode statistik yang tidak memerlukan asumsi tentang distribusi data, seperti normalitas atau keseragaman varians serta kemampuannya dalam membandingkan dua kelompok independen (Cantica dkk., 2023). Hasil hipotesis dari uji Mann-Whitney akan memberikan gambaran tentang ada tidaknya perbedaan signifikan antara morfometrik Malaysia dan Indonesia, meskipun data tidak memenuhi asumsi klasik statistik parametrik (Nurmaizura dkk., 2024). Dasar pengambilan keputusan dari uji tersebut ialah jika Asymp. Sig. (2-tailed) $< 0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan, apabila Asymp. Sig. (2-tailed) $> 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan (Nurmaizura dkk., 2024).

4.7 Diagram Alir Penelitian



Gambar 9. Diagram alir penelitian



V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Homologi Sekuens Gen *COI* Menggunakan BLAST NCBI

Hasil identifikasi sekuens dengan BLAST dapat dilihat pada Tabel 1. Data sekuens hasil BLAST merupakan data yang menunjukkan spesies terdekat dan juga merupakan *type strains* dari suatu spesies. Tabel 1 menunjukkan hasil dari sampel *P. arugamensis* Indonesia dan Malaysia bahwa terdapat kemiripan dengan spesies Penang (kode akses KY441719, KY441720, KY441721), spesies Terengganu dengan kode akses MW590479, spesies Lombok dengan kode akses MW590422, dan spesies Bali dengan kode akses MH299847. Nilai yang diperoleh yaitu 86.04% - 99.53% dengan *query cover* 71% - 100% dan nilai *E-value* pada semua sampel yaitu 0.0.

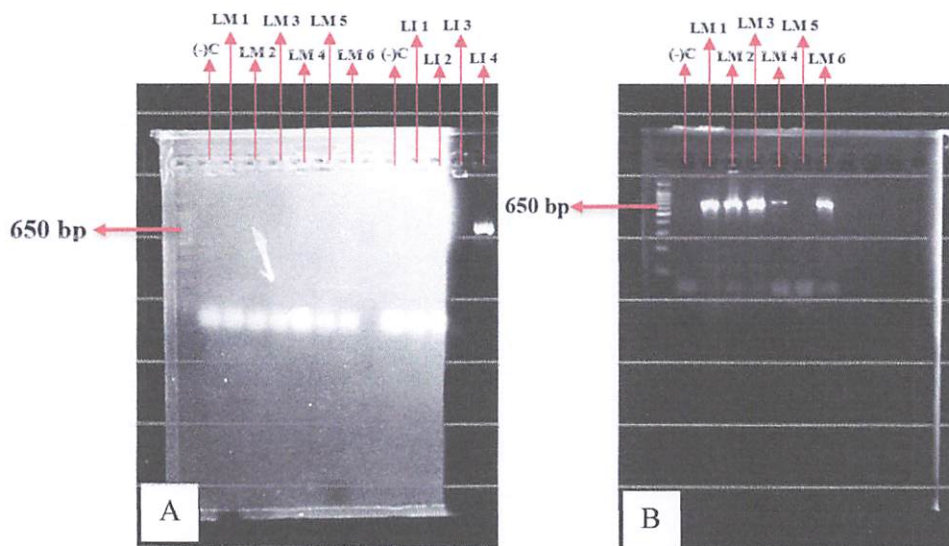
Tabel 1. Hasil BLAST gen COI *P. arugamensis* yang dibandingkan dengan NCBI

Spesies	BLAST				
	Lokasi	Access Code of NCBI	Query Cover	E-value	Identity
<i>P. arugamensis</i>	Bali	MH299847	100%	0.0	99,38% 99,39%
<i>P. arugamensis</i>	Terengganu	MW590479	95%	0.0	99,35%
<i>P. arugamensis</i>	Penang	KY441720	97% 98%	0.0	99,53% 99,37%
<i>P. arugamensis</i>	Penang	KY441721	97% 98%	0.0	99,53% 99,37%
<i>P. arugamensis</i>	Penang	KY441719	97% 98%	0.0	99,53% 99,37%
<i>P. arugamensis</i>	Lombok	MW590422	95%	0.0	99,52% 99,51%
<i>P. arugamensis</i>	Brunei	MW590444	95%	0.0	99,35%
<i>P. arugamensis</i>	Brunei	MW590454	95%	0.0	99,19%
<i>P. arugamensis</i>	Iran	FM208110	71% 72%	0.0	93,95%
<i>P. arugamensis</i>	Borneo	DQ414344	99%	0.0	96,59%
<i>P. arugamensis</i>	Hainan	NC035308	100%	0.0	99,23% 99,38%
<i>Pterobdella amara</i>	Australia	DQ414334	99%	0.0	89,44% 89,36%
<i>Aestabdella abditovesiculata</i>	USA	DQ414300	99%	0.0	90,22% 90,14%
<i>Myzobdella lugubris</i>	USA	DQ414324	93% 94%	0.0	86,63% 86,49%
<i>Piscicolaria reducta</i>	USA	DQ414339	93% 94%	0.0	86,04% 85,90%

5.1.2 Identifikasi Molekuler Berdasarkan Gen COI

Hasil dari elektroforesis *P. arugamensis* yang teramplifikasi menunjukkan band tunggal pada 650 bp untuk *P. arugamensis* dari Malaysia dan Indonesia. Pita (band) yang berada pada 650 bp menunjukkan bahwa fragmen DNA yang dihasilkan memiliki panjang 650 pasangan basa. Pita terlihat secara jelas dan tebal

menandakan bahwa konsentrasi DNA yang teramplifikasi cukup tinggi, serta mengindikasikan spesifisitas karena tidak ada kemunculan band lain pada daerah tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa struktur genetik *P. arugamensis* relatif stabil di kedua negara, karena gen *mtDNA* memiliki ukuran yang konsisten disemua sampel. Beberapa pita nampak lebih terang dari yang lain dikarenakan jumlah DNA yang didapatkan dari sampel tersebut berbeda-beda, sampel dengan pita yang lebih terang artinya mengandung lebih banyak DNA. Hasil elektroforesis *P. arugamensis* dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Visualisasi Pita DNA *P. arugamensis* berdasarkan Gen *COI*. keterangan: [A] Indonesia (LI), [B] Malaysia (LM).

5.1.3 Hasil DNA Polimorfisme *P. arugamensis*

Hasil pada Tabel 2 menunjukkan bahwa data tersebut merupakan hasil dari analisis DNA polimorfisme dengan *software* DnaSP yang bertujuan untuk mengukur tingkat keragaman genetik dalam suatu populasi. Data ini menunjukkan populasi dengan keragaman genetik moderat hingga tinggi dengan nilai keragaman haplotipe 0,853 dan keragaman nukleotida 0,058 pada 17 sekuens dari 107 situs

yang dianalisis menunjukkan tingkat variasi yang signifikan dalam sampel tersebut.

Berikut hasil analisis DNA polimorfisme dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisis DNA polimorfisme dengan menggunakan *software* DnaSP

Parameter	Nilai
Jumlah urutan	17
Jumlah situs polimorfik	107
Jumlah haplotipe (h)	9
Keragaman haplotipe (Hd)	0,853
Jumlah rata-rata perbedaan nukleotida (k)	27.103
Keragaman nukleotida (π)	0,058

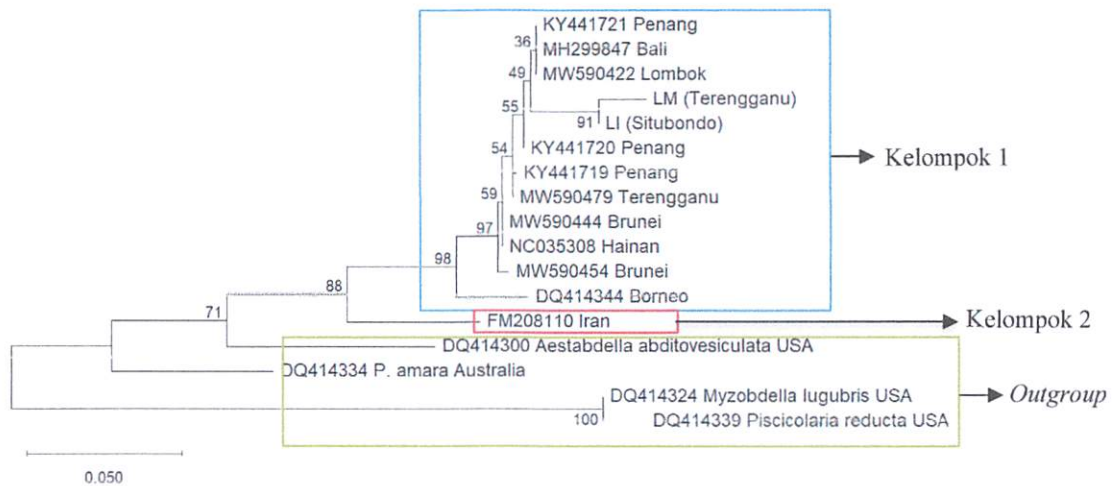
Nilai 17 menunjukkan bahwa terdapat 17 sekuens yang telah digunakan dalam penelitian. Nilai 107 menunjukkan bahwa terdapat 107 posisi yang berbeda dari keseluruhan panjang sekuens DNA yang diteliti, dan nilai 107 situs polimorfik dapat dianggap cukup tinggi berdasarkan panjang total sekuens yang dianalisis. Nilai 9 pada jumlah haplotipe dari 17 sekuens menunjukkan bahwa populasi memiliki tingkat keunikan genetik moderat.

Hasil keragaman haplotipe (Hd) berkisar 0,853 dan nilai ini dianggap cukup tinggi (hampir satu) karena terdapat banyak haplotipe yang berbeda dalam populasi yang diteliti. Nilai 27.103 menunjukkan jumlah variasi yang signifikan, yang berarti bahwa terdapat sekitar 27 perbedaan nukleotida antara dua sekuens yang dipilih secara acak dari populasi. Nilai π mengindikasikan persentase variasi nukleotida antara dua sekuens yang sama per-situs. Nilai 0,058 menunjukkan perbedaan lokasi nukleotida sekitar 5,8% antara dua sekuens yang dipilih secara acak. Nilai tersebut berarti terdapat tingkat variasi genetik yang tinggi pada tingkat nukleotida.

5.1.4 Hasil Filogenetik *P. arugamensis*

Hasil *multiple sequence alignment* (MSA) dari sampel lintah laut dengan menggunakan gen *COI* dapat dilihat pada Lampiran 13. Setiap baris menunjukkan urutan DNA dari spesimen yang berbeda, dan setiap kolom mencerminkan satu posisi nukleotida yang sejajar di sepanjang gen *COI*. Penanda titik (“.”) menunjukkan nukleotida yang sama dengan baris referensi (terdapat pada baris pertama), sementara huruf A, T, G, atau C menunjukkan variasi basa nukleotida yang terjadi pada sampel tersebut. Warna kuning menandakan situs polimorfik, yaitu tempat di mana terjadi penggantian basa antara spesimen. Situs polimorfik ini merupakan elemen penting dalam analisis genetik karena dapat digunakan untuk mengidentifikasi variasi genetik dalam populasi, membedakan populasi dari daerah geografis yang berlainan, serta sebagai landasan dalam penyusunan pohon filogenetik.

Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan metode *Maximum-Likelihood* dari sekuen nukleotida *P. arugamensis* dengan data dari berbagai spesies *P. arugamensis* pembandingan di Genbank. Hasil analisis filogenetik *P. arugamensis* terdiri dari 4 kelompok yaitu kelompok utama (seluruh sampel *P. arugamensis*), kelompok 1 masih satu spesies namun terdapat variasi genetik dari kelompok 2 dan 2 *outgroup*. Skala 0.050 menunjukkan jarak genetik yang berarti terdapat perbedaan 5% pada setiap situs dalam sekuens nukleotida. Nilai *bootstrap* muncul di setiap node dan mencerminkan tingkat kepercayaan pada cabang yang terbentuk. Konstruksi pohon filogenetik yang diperoleh dengan data Genbank dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Hasil analisis pohon filogenetik *P. arugamensis* berdasarkan susunan nukleotida gen COI *P. arugamensis* Malaysia dan Indonesia dipadankan dengan susunan nukleotida data dari GenBank sebagai pembandingan. keterangan: warna biru (LM dan LI) sebagai isolat yang berkerabat dekat dengan isolat referensi dari GenBank, merah sebagai kekerabatan yang terdapat variasi genetik dari kelompok 1, dan hijau sebagai data pembandingan (*outgroup*).

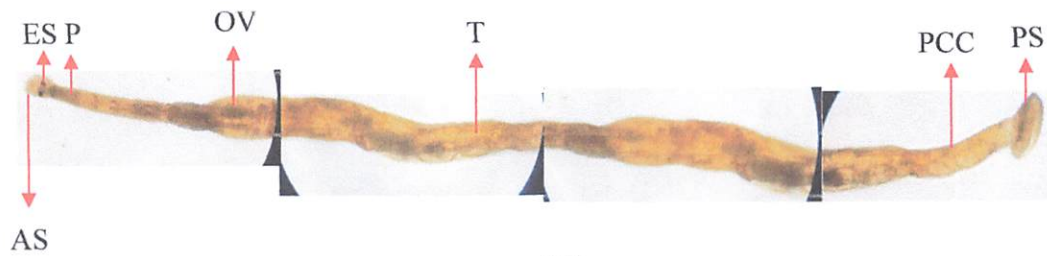
P. arugamensis memiliki satu klad (kelompok) berdasarkan struktur pohon filogenetik menunjukkan bahwa kelompok tersebut adalah monofiletik atau memiliki nenek moyang yang sama, yang berarti semua sampel *P. arugamensis* termasuk dalam spesies yang sama. Spesimen dari Iran (FM208110) dan Australia (DQ414334 – *P. amara*) menciptakan percabangan yang terpisah dari kelompok utama Asia Tenggara, hal ini menunjukkan adanya variasi genetik yang signifikan yang memang diprediksi secara geografis dan evolusi. *Outgroup* tambahan seperti *Aestabdelta abditovesiculata* (DQ414300), *Myzobdella lugubris* (DQ414324), dan *Piscicolaria reducta* (DQ414339) dengan jelas ditempatkan di luar klade utama. *Outgroup* digunakan untuk membangun pohon filogenetik dan menegaskan bahwa kelompok utama (*P. arugamensis*) secara nyata membentuk satu klade monofiletik, terpisah dari spesies lainnya. Sampel LI (Situbondo) dari Indonesia menunjukkan cabang yang sedikit berbeda, tetapi tetap berada dalam klade yang sama dengan

Penang dan Lombok, sedangkan sampel LM (Terengganu) berada dalam satu cabang dengan spesimen KY441721 Penang, MH299847 Bali, MW590422 dan Lombok.

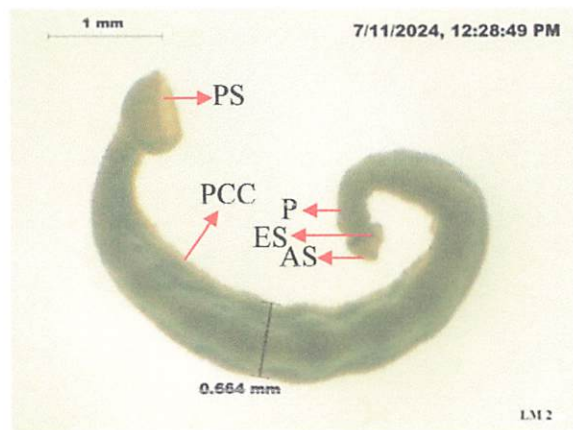
5.1.5 Morfologi *P. arugamensis*

Hasil dari pengamatan morfologi pada penelitian ini menunjukkan bahwa *P. arugamensis* memiliki tubuh silindris dan elastis. Bagian mulut terdiri dari dua jenis *sucker* yaitu *anterior sucker* dan *posterior sucker*. *Anterior sucker* berbentuk oval, sedangkan *posterior sucker* berbentuk cakram. Ukuran *posterior sucker* lebih besar dibandingkan dengan *anterior sucker*, hal ini menunjukkan adaptasi parasit secara efektif untuk menempel pada inang.

Morfologi eksternal menunjukkan tubuh *P. arugamensis* bersifat lunak, individu dewasa berwarna hitam atau coklat muda, dan terdapat dua bintik mata dibagian *anterior sucker*. Perbedaan pigmentasi antara *P. arugamensis* dari Malaysia dan Indonesia dapat dilihat pada Gambar 12. *P. arugamensis* dari Indonesia memiliki pigmentasi berwarna coklat muda, sedangkan yang dari Malaysia memiliki pigmentasi berwarna coklat kehitaman.



(A)



(B)

Gambar 12. *P. arugamensis* Indonesia dan Malaysia. keterangan: (A) LI ; AS: anterior sucker, PCC: posterior crop caecum, ES: eye spot, P: proboscis, OV: ovari, T: testis, PS: posterior sucker. (B) LM ; PS: posterior sucker, PCC: posterior crop caecum, AS: anterior sucker, ES: eye spot, P: proboscis

5.1.6 Morfometrik *P. arugamensis*

Pengukuran morfometrik meliputi panjang tubuh total, panjang tubuh, lebar tubuh, diameter *anterior sucker*, dan diameter *posterior sucker*. Hasil dari pemeriksaan morfometrik pada penelitian ini menunjukkan bahwa panjang tubuh total *P. arugamensis* Indonesia memiliki rata-rata $\pm$ SD yaitu $7,44 \pm 1,12$ mm dan *P. arugamensis* Malaysia berkisar $7,63 \pm 0,98$ mm. *Anterior sucker* *P. arugamensis* Malaysia dan Indonesia berbentuk oval dengan diameter *anterior sucker* berkisar $0,30 \pm 0,08$ mm dan $0,26 \pm 0,11$ mm. Diameter *posterior sucker* *P. arugamensis* Indonesia berkisar $0,32 \pm 0,20$ mm , sedangkan *P. arugamensis* Malaysia

diameternya berkisar $0,26 \pm 0,10$ mm. Data hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengukuran morfometrik *P. arugamensis* Malaysia dan Indonesia

Perhitungan morfometrik	Rata-rata $\pm$ Standar deviasi (SD) (mm)	
	Malaysia	Indonesia
Panjang tubuh total	$7,63 \pm 0,98$	$7,44 \pm 1,12$
Panjang tubuh	$6,67 \pm 0,77$	$6,66 \pm 0,92$
Lebar tubuh	$0,68 \pm 0,08$	$0,42 \pm 0,08$
Diameter <i>anterior sucker</i>	$0,30 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,11$
Diameter <i>posterior sucker</i>	$0,26 \pm 0,10$	$0,32 \pm 0,20$

Tabel 3 menunjukkan bahwa nilai rata-rata $>$ standar deviasi yang berarti sebaran data sampel relatif rendah, dengan kata lain data cenderung konsisten atau tidak tersebar luas. Selanjutnya, dilakukan uji normalitas bertujuan untuk mengetahui apakah data pada Tabel 3 tersebut terdistribusi normal atau sebaliknya, hasil uji normalitas dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	L	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Perhitungan	Malaysia	.344	5	.054	.753	5	.032
Morfometrik	Indonesia	.359	5	.033	.729	5	.019

a. Lilliefors Significance Correction

Pengujian ini menggunakan uji normalitas Shapiro-Wilk karena nilai sampel kurang dari 50. Berdasarkan hasil uji normalitas pada Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai signifikansi Malaysia yaitu 0,032 dan Indonesia 0,019. Kedua nilai tersebut menunjukkan nilai signifikansi $< 0,05$ maka dinyatakan data tidak berdistribusi normal. Sehingga uji lanjutan yang digunakan yaitu uji non-paramterik yaitu uji Mann-Whitney, hasil uji Mann-Whitney dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji hipotesis menggunakan uji Mann-Whitney

Test Statistics ^a	
	Perhitungan Morfometrik
Mann-Whitney U	11.500
Wilcoxon W	26.500
Z	-.210
Asymp. Sig. (2-tailed)	.834
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.841 ^b

a. Grouping Variable: L

b. Not corrected for ties.

Berdasarkan hasil uji hipotesis, terlihat bahwa nilai Asymp. Sig. (2-tailed) yaitu $0,834 > 0,05$. Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara perhitungan morfometrik Malaysia dengan Indonesia.

5.2 Pembahasan

Hasil visualisasi pita DNA *P. arugamensis* berdasarkan gen COI yang dibuat melalui elektroforesis gel agarosa pada gel A dan B mengandung fragmen DNA (pasangan basa) 650 bp. Gen ini memiliki keunggulan dan juga memiliki

variasi yang cukup untuk membedakan spesies dalam tingkat konservasi sekuens yang tinggi pada spesies yang sama. Sebagaimana dinyatakan oleh Hebert *et al.* (2003), gen *COI* telah terbukti efektif untuk mengidentifikasi taksonomi berbagai kelompok hewan, termasuk lintah dan hewan akuatik lainnya. Pita DNA tunggal yang ditemukan pada sampel menunjukkan spesifisitas primer yang baik dalam mengamplifikasi gen target *COI*. Tidak adanya produk amplifikasi non-spesifik, seperti pita tambahan berukuran berbeda, menunjukkan bahwa primer yang digunakan memiliki spesifisitas yang tinggi untuk daerah target pada genom *P. arugamensis*. Folmer *et al.* (1994) telah mengembangkan primer *COI universal* yang digunakan dalam studi filogenetik invertebrata, dan spesifisitas ini penting untuk analisis sekuensing yang akurat.

Primer dengan spesifisitas tinggi mengindikasikan bahwa sekuens yang dihasilkan benar-benar menunjukkan variasi genetik spesies target tanpa merusak DNA organisme lain atau memperluas regio genom organisme *non-target*. Gel A dan gel B memiliki perbedaan hasil, berbagai permasalahan teknis dapat menyebabkan perbedaan ini. Faktor-faktor seperti konsentrasi primer, jumlah siklus PCR, suhu penempelan primer, dan konsentrasi templat DNA sangat mempengaruhi amplifikasi DNA (Schrader *et al.*, 2012). Tidak adanya pita pada beberapa sampel (khususnya pada gel A) dapat disebabkan oleh penghambat PCR atau jumlah DNA yang tidak mencukupi. Selain itu, sampel yang disimpan pada suhu yang tidak tepat atau sering mengalami pembekuan dan pencairan dapat mengalami degradasi DNA yang menyebabkan kegagalan amplifikasi PCR (Schander and Halanych, 2003).

Hasil BLAST gen *COI* dari situs NCBI menunjukkan bahwa isolat LM dan LI memiliki hubungan kekerabatan sebesar 95%-100% dengan isolat MH299847, MW590479, KY441719, KY441720, KY441721, dan MW590422 yang berasal dari Bali, Terengganu, Penang, dan Lombok. Identitas *P. arugamensis*, yaitu senilai 99% pada Tabel 1 menunjukkan tingkat kemiripan genetik yang sangat tinggi, tetapi tidak identik sempurna karena beberapa faktor genetik dan ekologi. Pengurutan sekuens DNA *P. arugamensis* dari beberapa lokasi menunjukkan tingkat konservasi genetik yang tinggi dalam spesies ini. Lambatnya perkembangan gen yang dikonservasi, termasuk *COI* yang sering digunakan untuk mengidentifikasi spesies, merupakan penyebab kesamaan genetik yang signifikan (Hebert *et al.*, 2003).

Beberapa kelompok taksonomi gen penanda molekuler seperti *COI* menunjukkan tingkat keragaman yang rendah karena adanya tekanan seleksi pemurnian untuk menjaga kestabilan fungsi protein (Pentinsaari *et al.*, 2016). Selain itu, transfer gen yang intensif antara populasi yang berbeda secara geografis, terutama melalui distribusi inang, dapat mengeliminasi perubahan genetik yang signifikan (Siddall and Burreson, 1998). Tan *et al.* (2012) juga mengatakan bahwa penyebaran parasit pada inang yang bermigrasi seperti ikan menyebabkan homogenitas genetik di berbagai lokasi geografis dan menyebabkan aliran gen yang intens antar populasi. Kemampuan *P. arugamensis* untuk menempel pada sejumlah spesies ikan teleost, termasuk kerapu, meningkatkan peluangnya untuk menyebar ke seluruh wilayah Indo-Pasifik Barat. Studi Azmey *et al.* (2022) menemukan bukti kuat bahwa kegiatan akuakultur menjadi salah satu penyebab penyebaran lintah ini.

Kemungkinan besar, migrasi induk atau benih yang terinfeksi parasit di antara lokasi akuakultur telah membuat *P. arugamensis* menyebar ke berbagai lokasi geografis tanpa memberikan waktu yang cukup untuk terjadinya perbedaan genetik yang besar.

Penyebaran populasi baru dari lokasi yang sama dapat menyebabkan populasi yang berbeda tetap memiliki kemiripan genetik yang tinggi karena waktu mutasi yang singkat (Avice, 2000). Selain itu, sangat memungkinkan bagi populasi *P. arugamensis* memiliki hambatan genetik yang cukup besar atau efek pendiri dalam sejarahnya, sehingga menghasilkan basis genetik yang relatif seragam (Govedich *et al.*, 2005). Efek pendiri, yang juga disebut sebagai hambatan genetik (*bottleneck genetic*), kemungkinan disebabkan oleh kolonisasi awal yang menyebabkan populasi baru memiliki keragaman genetik yang rendah (Blakeslee *et al.*, 2019). Tekanan seleksi yang seragam di wilayah laut dengan kondisi ekologi yang sama di Asia Tenggara berkontribusi pada sedikitnya perbedaan genetik (Williams and Burreson, 2006).

Sifat parasitisme lintah ini dapat menghambat aliran gen pada jalur migrasi inang tertentu, sehingga mengurangi munculnya variasi genetik (Siddall and Burreson, 1998). Stabilitas ekologi jangka panjang di habitat *P. arugamensis* juga membantu melestarikan urutan genetik, karena seleksi alam cenderung mempertahankan genotipe yang sesuai atau yang telah beradaptasi (Near *et al.*, 2012). Perubahan terkecil pada sekuens DNA mitokondria, terutama substitusi nukleotida yang mempertahankan fungsi gen sekaligus menyebabkan sedikit keragaman (Lavrov, 2007).

Analisis DNA polimorfisme pada Tabel 2 menunjukkan jumlah situs polimorfik senilai 107 dari 17 sekuens, hal tersebut mengindikasikan adanya variasi genetik yang cukup besar dalam populasi. Jumlah situs polimorfik yang sangat tinggi ini dapat diartikan bahwa populasi tersebut mengalami perbedaan genetik yang cukup besar atau beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang berbeda (Frankham *et al.*, 2010). Roesti *et al.* (2014) juga mengemukakan bahwa variasi genetik dalam populasi dapat mendukung adaptasi melalui proses genetik yang rumit, di mana perpaduan variasi ini meningkatkan kemampuan populasi untuk beradaptasi dengan lingkungan yang beragam. Hughes *et al.* (2008) berpendapat bahwa kemampuan suatu populasi untuk menyesuaikan diri terhadap perubahan lingkungan dapat diukur dengan melihat jumlah haplotipe populasi, tingkat keragaman haplotipe yang lebih tinggi berkorelasi dengan potensi adaptasi yang lebih baik.

Nilai keragaman haplotipe (H_d) sebesar 0,853 mengindikasikan populasi dengan keragaman genetik yang stabil dan struktur populasi yang kompleks (Grant and Bowen, 1998). Nilai H_d yang tinggi pada penelitian ini menunjukkan bahwa meskipun jumlah sekuens relatif kecil (17 individu), distribusi haplotipe cukup merata dan tidak didominasi oleh satu atau beberapa haplotipe saja, sehingga menurut Freeland *et al.* (2011) hal ini menjadi indikator populasi yang tidak mengalami hambatan genetik yang signifikan dalam sejarah evolusinya. Jumlah rata-rata perbedaan nukleotida ($k = 27.103$) merupakan indikator penting keragaman genetik di antara individu-individu dalam suatu populasi. Nilai k yang sangat tinggi mengindikasikan akumulasi variasi genetik yang cukup besar,

sebagaimana dikemukakan oleh Tajima (1983), yang kemungkinan disebabkan oleh jangka waktu divergensi yang panjang atau tingkat mutasi yang tinggi pada gen yang diteliti. Slatkin *and* Hudson (1991) menyatakan bahwa nilai k yang tinggi dapat menggambarkan sebuah populasi dengan ukuran besar yang relatif stabil dalam jangka waktu evolusi yang panjang, hal ini memungkinkan pembentukan variasi genetik melalui mutasi.

Nilai keragaman nukleotida (π) merupakan parameter utama untuk mengukur keragaman genetik suatu populasi. Berdasarkan Nei *and* Kumar (2000), nilai π lebih dari 0,01 pada DNA inti mengimplikasikan sebuah populasi dengan ukuran efektif yang besar yang tetap stabil selama evolusi. Frankham *et al.* (2010) dan Bielecki *et al.* (2012) berpendapat bahwa nilai π di atas 0,01 pada DNA inti menunjukkan variasi genetik yang sedang hingga tinggi, yang sangat penting untuk adaptasi populasi dan kemampuan bertahan terhadap perubahan lingkungan. Nilai π sebesar 0,058 yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan tingkat keragaman genetik yang signifikan, yang mendukung kemungkinan adaptasi jangka panjang dari populasi. Berdasarkan keragaman haplotipe yang tinggi ($H_d = 0,853$) dan keragaman nukleotida sedang hingga tinggi ($\pi = 0,058$), populasi yang telah diteliti kemungkinan memiliki sejarah demografi yang stabil dengan ukuran populasi relatif besar selama periode evolusi yang signifikan.

Pohon filogenetik menunjukkan hubungan evolusi antara populasi yang didasarkan pada variasi nukleotida, di mana panjang cabang menggambarkan jumlah substitusi genetik. Nilai *bootstrap* muncul di setiap node dan mencerminkan tingkat kepercayaan pada cabang yang terbentuk. Nilai *bootstrap* 91 pada klade LI

(Situbondo) menandakan bahwa 91% dari 1000 uji *bootstrap* mendukung cabang tersebut, skala 0,050 menunjukkan jarak genetik sebesar 5% dalam perubahan persitus. Pohon ini menunjukkan bahwa spesimen KY441721 dari Penang, MH299847 dari Bali, MW590422 dari Lombok, dan LM (Terengganu) termasuk dalam satu klade besar. Hasil tersebut mengindikasikan adanya tingkat kekerabatan genetik yang tinggi antara spesimen dari Malaysia bagian barat dan Indonesia (Kvist et al., 2023) .

Dukungan *bootstrap* 36 dan 49 bisa dianggap rendah, tetapi tetap menunjukkan hubungan genetik yang tidak terlalu jauh, hal ini menegaskan dugaan bahwa populasi di daerah ini memiliki asal evolusi yang serupa atau mungkin telah terjadi transmigrasi individu antar perairan di kawasan tersebut, seperti melalui arus laut atau perdagangan ikan (Azmeiy et al., 2020). Kategori nilai *bootstrap* menurut Dharmayanti (2011) terdiri dari tinggi (>85%), sedang (70–85%), lemah (50–69%), dan sangat lemah (<50%). Pohon filogenetik yang baik seharusnya memiliki nilai *bootstrap* lebih dari 70% pada cabang-cabang utama, karena angka ini menunjukkan bahwa hasil analisis cukup kuat dan dapat dipercaya. Nilai di bawah 70% sering dianggap tidak cukup kuat untuk mendukung hubungan kekerabatan yang ditampilkan.

Sampel LI (Situbondo) dari Indonesia menunjukkan cabang yang sedikit berbeda, tetapi tetap dalam klade yang sama dengan Penang dan Lombok. Pernyataan ini didukung oleh nilai *bootstrap* 91, yang menunjukkan dukungannya sangat kuat bahwa sampel Situbondo benar-benar berhubungan dekat dengan kelompok tersebut. Oleh karena itu, Situbondo memiliki peranan penting sebagai

penghubung antara populasi bagian barat (Lombok, Penang) dan bagian timur, hal ini menunjukkan adanya aliran genetik lintah laut di kawasan pantai Asia Tenggara, meskipun ada perbedaan geografis (Tan *et al.*, 2012). *P. arugamensis* dari Iran (FM208110) memiliki posisi yang lebih basal pada klade, mengimplikasikan adanya efek pendiri atau kolonisasi jarak jauh dari populasi Asia Barat (Kvist *et al.*, 2023). Prinsip-prinsip genetika populasi yang dijelaskan oleh Avise (2000) dan Apakupakul *et al.* (1999), nilai *bootstrap* yang tinggi (88%) pada cabang yang membedakan spesimen Iran dengan kelompok utama Asia Tenggara mendukung hipotesis bahwa isolasi geografis telah menunjukkan diferensiasi genetik yang signifikan.

Terbentuknya cabang yang terpisah dengan jarak genetik yang besar menunjukkan dugaan adanya proses spesiasi alopatrik yang sedang berlangsung. Spesiasi alopatrik merupakan proses terbentuknya spesies baru melalui isolasi geografis (Yamaguchi and Iwasa, 2013). Spesimen dari Brunei (MW590444 dan MW590454), Borneo (DQ414344), dan Hainan (NC035308) membentuk kelompok terpisah yang masih dekat secara evolusioner dengan klade utama. Kelompok ini menunjukkan nilai *bootstrap* yang tinggi (97 dan 98), yang mengindikasikan konsistensi evolusioner dalam kelompok tersebut. Meskipun kawasan geografis terletak pada bagian timur laut dibandingkan dengan Indonesia bagian barat, hubungan genetik yang kuat menunjukkan bahwa lintah laut dari daerah tersebut kemungkinan memiliki nenek moyang yang serupa, atau telah mengalami perbedaan genetik secara bertahap dalam jalur evolusi yang berdekatan (Utevsky and Trontelj, 2004).

Cabang dengan nilai *bootstrap* 100 antara spesies *Myzobdella lugubris* dan *Piscicolaria reducta* dari Amerika Serikat menunjukkan hubungan kekerabatan yang sangat kuat dan dapat dipercaya. Nilai *bootstrap* 100% menunjukkan bahwa dari 1000 kali pengulangan analisis *bootstrap*, semuanya menghasilkan topologi yang identik untuk pengelompokan kedua spesies tersebut. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa kedua spesies itu memiliki kesamaan genetik yang sangat tinggi dan kemungkinan besar berasal dari leluhur yang sama dalam periode evolusi yang cukup baru (Nei and Kumar, 2000). Williams and Burreson (2006) menemukan adanya homogenitas di antara kedua genus tersebut dalam famili *Piscicolidae*.

Namun, populasi *P. arugamensis* yang berasal dari tempat yang berbeda menunjukkan pemisahan yang jelas dan tingkat variasi genetik yang cukup tinggi, yang diduga sebagai dampak dari isolasi geografis dan adaptasi lokal (Utevsky and Trontelj, 2004). Pohon ini menunjukkan bahwa *P. arugamensis* dari Indonesia dan Malaysia adalah populasi yang tergolong dalam satu spesies dengan variasi genetik yang sedang. Namun, adanya klade-klade terpisah seperti kelompok Brunei dan Iran mengindikasikan bahwa lintah laut ini sedang mengalami proses divergensi intraspesifik. Pola sekuens yang serupa di *multiple sequence alignment* (MSA) menghasilkan cabang yang berdekatan di pohon filogenetik, seperti Situbondo dan Lombok. Perbedaan nukleotida yang signifikan di MSA mengakibatkan percabangan yang lebih jauh seperti pada Iran dan Hainan, sehingga mendukung pernyataan adanya variasi genetik antar populasi yang berbeda secara geografis (Futuyama, 2010). Konsistensi antara MSA dan filogenetik memperkuat bahwa

populasi di Indonesia dan Malaysia adalah bagian dari satu kelompok genetik, tetapi menunjukkan keberagaman lokal yang signifikan .

Ciri-ciri morfologi pada *P. arugamensis* dari dua lokasi tersebut menunjukkan adanya perbedaan. Sampel *P. arugamensis* yang berasal dari Situbondo (Indonesia) memiliki pigmentasi warna tubuh yang lebih cerah (coklat muda) dibandingkan dari sampel *P. arugamensis* (coklat kehitaman) yang berasal dari Terengganu (Malaysia), hal tersebut telah dijelaskan oleh Azmey *et al.* (2022) bahwa habitat atau kondisi lingkungan dapat mempengaruhi perbedaan pigmentasi tubuh. Intensitas cahaya, substrat habitat, salinitas dan parameter air, serta interaksi terhadap *host* menyebabkan adanya perbedaan pigmentasi tubuh pada *P. arugamensis* (Phillips *et al.*, 2020). Secara keseluruhan, morfologi *P. arugamensis* dari penelitian sebelumnya seperti Azmey *et al.* (2022), Ravi and Yahaya (2017), Agustiya dkk. (2023), Ochtavia dkk. (2024), dan Murwantoko *et al.* (2018) menunjukkan bahwa morfologi *P. arugamensis* memiliki kemiripan morfologi yang sama.

Adapun perbedaan morfologi antara *P. arugamensis* dengan genus lain namun masih berkerabat dekat dengan *P. arugamensis* yang berasal dari Amerika Utara yaitu *Myzobdella lugubris* dan *Piscicolaria reducta*. Studi Williams (2007) telah menyebutkan bahwa Genus *Myzobdella* memiliki ciri-ciri tubuh yang relatif datar dan lebar dengan banyak annuli yang memberikan tampilan bersegmen halus pada tubuh, serta pengisap caudal yang sangat besar dan memiliki kemampuan untuk menghasilkan lendir dalam jumlah yang banyak. Sementara itu, genus *Piscicola* memiliki tubuh yang ramping dan memanjang dengan annuli yang halus,

pengisap caudal dan oral yang serupa, dan permukaan tubuh yang halus tanpa papila dorsal.

Standar deviasi yang rendah menunjukkan bahwa data sampel mengelompok di sekitar rata-rata, sedangkan standar deviasi yang tinggi menandakan lebih banyak variabilitas di antara sampel (Riadi dan Ulum, 2021). Hasil morfometrik *P. arugamensis* yang berasal dari Malaysia dan Indonesia menunjukkan persamaan yang signifikan, walaupun terdapat variasi deskriptif pada beberapa parameter. Standar deviasi yang rendah pada lebar tubuh (± 0.08 mm) dalam kedua populasi menunjukkan adanya homogenitas morfologi yang kuat, sesuai dengan penelitian Mandarim-de-Lacerda and Del Sol (2017) yang menyebutkan bahwa SD yang rendah mencerminkan stabilitas populasi. Akan tetapi, standar deviasi yang lebih besar pada diameter posterior sucker di Indonesia (± 0.20 mm) mengindikasikan adanya variasi intra-populasi yang lebih signifikan, yang mungkin disebabkan oleh faktor genetik atau lingkungan. Borda and Siddall (2004) dan Borda *et al.* (2008) menyebutkan bahwa faktor-faktor geografis dan ekologis dapat memengaruhi variasi morfometrik.

Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa data morfometrik *P. arugamensis* dari Malaysia dan Indonesia tidak terdistribusi normal (p-value Malaysia = 0.032, Indonesia = 0.019). Ketiadaan normalitas ini memerlukan penerapan uji non-parametrik, dalam hal ini uji Mann-Whitney digunakan untuk membandingkan dua kelompok. Hasil uji Mann-Whitney (Asymp. Sig. = 0.834) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara morfometri *P. arugamensis* dari kedua negara. Oleh karena itu, walaupun terdapat variasi

deskriptif pada beberapa parameter, secara statistik perbedaan tersebut tidak signifikan sehingga kedua populasi dianggap memiliki karakter morfometrik yang sama.

Karakteristik genetik *P. arugamensis* yang dianalisis dengan gen *cytochrome C oxydase subunit I* (COI) menunjukkan sekuen COI dari *P. arugamensis* yang menginfeksi ikan kerapu hibrida di Malaysia memiliki tingkat kesamaan (*similarity*) yang tinggi (>98%) jika dibandingkan dengan isolat dari daerah Asia Tenggara lainnya, yang mengindikasikan variasi genetik intraspesifik yang tergolong rendah (Azmeiy *et al.*, 2022). Penelitian Ochtavia dkk. (2024) juga mendukung adanya homogenitas genetik di wilayah Asia Tenggara yang menyebutkan bahwa populasi *P. arugamensis* di daerah ini masih memiliki hubungan dekat secara molekuler meskipun terdapat variasi lokal. *P. arugamensis* yang melekat pada kerapu memiliki bentuk tubuh silindris yang memanjang, dengan penghisap *anterior* dan *posterior* yang berbeda ukuran. Amplifikasi gen COI pada *P. arugamensis* menghasilkan fragmen dengan panjang sekitar ± 650 pasang basa, menggunakan primer universal seperti LCO1490 dan HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994).

VI PENUTUP



6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat ditarik kesimpulan antara lain :

1. Hasil sekuensing dan analisis gen *COI* menunjukkan variasi genetik intraspesifik pada *P. arugamensis* dari Indonesia (Situbondo, Bali, Lombok) dan Malaysia (Penang, Terengganu), dengan adanya situs polimorfik pada nukleotida spesifik, namun tetap menunjukkan homologi yang tinggi antar populasi yang berarti bahwa spesimen dari kedua negara tersebut masih termasuk dalam satu spesies yang identik secara genetik. Pohon filogenetik menunjukkan bahwa beberapa sampel dari lokasi yang berbeda membentuk klade yang sama dengan nilai *bootstrap* tinggi (>90) seperti sampel LI (Situbondo) dari Indonesia menunjukkan cabangnya masih termasuk dalam klade yang sama dengan Penang dan Lombok dengan nilai *bootstrap* 91, yang menunjukkan dukungannya sangat kuat bahwa sampel Situbondo benar-benar berhubungan dekat dengan kelompok tersebut, sedangkan sampel LM (Terengganu) berada dalam satu cabang dengan spesimen KY441721 Penang, MH299847 Bali, MW590422 dan Lombok, mengindikasikan adanya tingkat kekerabatan genetik yang tinggi antara spesimen dari Malaysia bagian barat dan Indonesia. Nilai jarak genetik antar populasi sekitar 5% yang menunjukkan terjadinya diferensiasi populasi akibat faktor lingkungan, geografis, dan tekanan seleksi alam.

2. Karakterisasi genetik *P. arugamensis* berdasarkan gen *COI* menunjukkan adanya tingkat kesamaan (*similarity*) yang tinggi (>98%) jika dibandingkan dengan isolat dari daerah Asia Tenggara lainnya, yang mengindikasikan variasi genetik intraspesifik yang tergolong rendah, dengan morfologi *P. arugamensis* yang memiliki tubuh silindris memanjang dan ukuran penghisapnya berbeda, serta gen *COI* *P. arugamensis* menghasilkan fragmen DNA berkisar 650 bp.

6.2 Saran

Saran untuk studi selanjutnya dapat mengkaji analisis struktur populasi secara spasial dengan pendekatan *landscape genetics*, guna memahami dampak distribusi geografis terhadap variasi genetik. Studi juga perlu memperluas objek dengan membandingkan variasi genetik lintah laut yang menginfestasi spesies inang lainnya, seperti Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) atau Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*), untuk mengetahui apakah spesies inang berpengaruh pada struktur genetik parasit. Selain itu, disarankan untuk meningkatkan jumlah sampel dan memperluas cakupan lokasi pengambilan sampel, baik di Indonesia maupun Malaysia guna memperkuat representasi populasi lintah laut yang diteliti. Disarankan untuk penelitian selanjutnya agar tidak hanya menggunakan gen *cytochrome C oxydase subunit I* (*COI*), tetapi juga melibatkan penanda genetik lain seperti 16S rRNA, ITS, atau *COII* agar mendapatkan pemahaman variasi genetik yang lebih komprehensif dan akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, P dan Permatasari, R. I. 2020. Pengaruh Pendidikan dan Kompensasi Terhadap Kinerja Divisi New Product Development (NPD) Pada PT. Mayora Indah Tbk. *Jurnal Ilmiah M-Progress*, 10(2): 174-184.
- Agustiya, R., Mahasri, G dan Sri, S. 2023. Identifikasi Morfometrik dan Intensitas Lintah Laut *Zeylanicobdella* yang Menginfestasi Ikan Kerapu Cantang Asal Kecamatan Brondong, Lamongan dan Pulau Mandangin, Madura. *Journal of Marine and Coastal Science*, 12(1): 35-42.
- Aminah, A., R. Ramadini dan T. Naid. 2019. Analisis Cemarkan DNA Tikus Pada Bakso Daging Sapi yang Beredar di Makassar dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Farmasi Gelenika (Gelenika Journal of Pharmacy)(e-Journal)*, 5(1): 93-100.
- Apakupakul, K., Siddal, M. E and Burreson, E. M. 1999. Higher Level Relationships of Leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) Based on Morphology and Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(3): 350-359.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography : The History and Formation of Species*. Harvard University Press. Cambridge MA. pp. 3-36.
- Azmey, S., Taruna, M., Taha, H and Arai, T. 2020. Prevalence and Infestation Intensity of a Piscicolid Leech, *Zeylanicobdella arugamensis* on Cultured Hybrid Grouper in Brunei Darussalam. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 20(26): 100398.
- Azmey, S., Taha, H., Mahasri, G., Amin, M., Habib, A., Tan, M. P and Arai, T. 2022. Population Genetic Structure of Marine Leech, *Pterobdella arugamensis* in Indo-West Pacific Region. *Genes*, 13(6): 956.
- Azmey, S., Taha, H., Mahasri, G., Amin, M., Habib, A., Tan, M. P and Arai, T. 2024. Analysis of Mitochondrial Cytochrome B Gene Sequences of Marine Leech *Pterobdella arugamensis*. *Zoologia*, 41(15): 1-6.
- Bhattacharya, M., A.R. Sharma., B. C. Patra., G. Sharma, E.M., Seo, J. S., Nam, C., Chakraborty and S. S. Lee. 2016. DNA Barcoding to Fishes: Current Status and Future Direction. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(4): 2744-2752.
- Bielecki, A and Polok, K. 2012. Genetic Variation and Species Identification Among Selected Leeches (Hirudinea) Revealed By RAPD Markers. *Biologia*, 67(4): 721-730.

- Blakeslee, A. M. H., Haram, L. E., Altman, I., Kristn, K., Gregory, M. R and A. Whitman, M. 2019. Founder Effects and Species Introductions: A Host Versus Parasite Perspective. *Evolutionary Applications*, 13(3): 559-574.
- Borda. E and Siddall, M. E. 2004. Arhynchobdellida (Annelida: Oligochaeta: Hirudinida): Phylogenetic Relationships and Evolution. *Mol Phylogenet Evol*, 30(1): 213–225.
- Borda. E., Oceguera-Figueroa, A and Siddal, M. E. 2008. On The Classification, Evolution and Biogeography of Terrestrial Haemadipsoid Leeches (Hirudinida: Arhynchobdellida: Hirudiniformes). *Mol Phylogenet Evol*, 46(1): 142-154.
- Cantica, O., Abdillah, M. H dan Anggraini, F. 2023. Analisis Produksi Padi di Provinsi Jambi dan Riau Menggunakan Uji Mann-Whitney. *Multi Proximity: Jurnal Statistika Universitas Jambi*, 2(1): 32-38.
- Chandra, M. 1982. A Check-list of Leeches of India. *Record of The Zoological Survey of India*, 80(3-4) : 265-290.
- Criscione, C. D., Poulin, R and Blouin, M. S. 2005. Molecular Ecology of Parasites: Elucidating Ecological and Microevolutionary Processes. *Molecular Ecology*, 14(8): 2247–2257.
- Cruz-Lacierda, E. R., Toledo, J. D., Tan-Fermin, J. D., Bureson, E. M., 2000. Marine Leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) Infestation on Cultured Orange-Spotted Grouper, *Epinephelus coiodes*. *Aquaculture*, 185(3-4) : 191–196.
- Dharmayanti, N. I. 2011. Molecuular Phylogenetic: Organism Taxonomy Method Based on Evolution History. *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, 21(1): 1-10.
- Deagle, B. E., Jarman, S. N., Coissac, E., Francois, P and Pierre, T. 2014. DNA Metabarcoding and The Cytochrome C Oxidase Subunit I Marker: Not a Perfect Match. *Biology Letters*, 10(9): 1-4.
- De Silva, P. H. D. H. 1963. *Zeylanicobdella arugamensis* Gen. Nov. and Sp. Nov. from Arugam Kalapu, Eastern Province, Ceylon. *Spolia Zeylanicobdella*, 30(1) : 47-53.
- Febrianto, T., Ma'mun, A dan Apdillah, D. 2023. Target Strength Ikan Kerapu Cantang Terhadap Panjang Total Ikan Menggunakan Singlebeam Echosounder. *Jurnal Akuatiklestari*, 6(2): 200-205.
- Folmer, O. M., Black, M., Hoeh, R., Lutz, R and Vrijenhoek, R. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I from

- Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- Frankham, R., Ballou, J. D and Briscoe, D. A. 2010. *Introduction to Conservation Genetics* (2nd ed.). Cambridge University Press. Cambridge MA. pp. 644.
- Freeland, J. R., Kirk, H and Petersen, S. D. 2011. *Molecular Ecology* (2nd ed.). Wiley-Blackwell. Chichester. pp. 1-128.
- Futuyama, D. J. 2010. *Evolutionary Constraint and Ecological Consequences*. *Evolution*, 64(7): 1865-1884.
- Govedich, F. R., Bain, B. A and Davies, R. W. 2005. Hirudinea (Leeches). In K. Rohde (Ed.), *Marine Parasitology*. CSIRO Publishing. Collingwood. pp. 196-202.
- Grant, W. S and Bowen, B. W. 1998. Shallow Population Histories In Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lesson for Conservation. *The American Genetics Association*, 89(5): 415-426.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C and Heo, M.S. 2010. Molecular Studies, Disease Status and Prophylactic Measures in Grouper Aquaculture: Economic Importance, Diseases and Immunology. *Aquaculture*, 309(1–4): 1-14.
- Hariyanto, D. S. T., I. G. N . K. Mahardika dan I. N. Wandia. 2015. Keragaman Spesies Ikan Tuna di Pasar Ikan Kedonganan Bali dengan Analisis Sekuen Kontrol Daerah Mitokondria DNA. *Jurnal Veteriner*, 16(3) : 416-422.
- Harun, A., S. I. Muchlissin., A. H. Mukarromah., S. Darmawati dan S. N. Ethica. 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Staphylococcus hominis* Pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 120 Jam. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional*, 1(1): 23-30.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L and de Waard, J. R. 2003. Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. B*, 270 (1512) : 313–322.
- Hughes, R. A., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Nora, U and Mark, V. 2008. Ecological Consequences of Genetic Diversity. *Ecology Letters*, 11(6): 609-623.
- Irianto, K. 2017. *Biologi Molekuler*. CV Alfabeta. Bandung. pp. 748.
- Koepper, S., Nuryati, S., Palm, H.W., Theisen, S., Wild, C., Yulianto, I. and Kleinertz, S. 2020. Parasite Fauna of The White-Streaked Grouper (*Epinephelus ongus*) from The Thousand Islands, Java, Indonesia. *Acta Parasitol*, 66 (2): 1–10.

- Kua, B. C., Azmi, A.M and Hamid, N.K.A. 2010. Life Cycle of The Marine Leech (*Zeylanicobdella arugamensis*) Isolated From Sea Bass (*Lates calcarifer*) Under Laboratory Conditions. *Aquaculture*, 302(3-4): 154-156.
- Kua, B. C and Leaw, Y.Y. 2024. Pathogenicity Associated with An Infestation of The Marine Leech Parasite *Pterobdella arugamensis* in Farmed Fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 158(16): 179-184.
- Kurniawati, M. D., S. Sumaryam dan I. N. Hayati. 2019. Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Konvensional dan Real-Time PCR untuk Deteksi Virus VNN (*Viral Nervous Necrosis*) Pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Techno-Fish*, 3(1): 19-30.
- Kvist, S., Earl, I., Kink, E., Alejandro, O. F and Peter, T. 2023. Phylogenetic Relationships and Species Delimitation in *Haemopsis* (Annelida: Hirudinea: Haemopidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 178(15): 1-17.
- Lavrov, D. V. 2007. Key Transitions in Animal Evolution: a Mitochondrial DNA Perspective. *Integrative and Comparative Biology*, 47(5): 734-743.
- Lesk, A. M. 2014. *Introduction to Bioinformatics*. Fourth Edition. Oxford Pres. Oxford. pp. 400.
- Liu, X.H., Xu, L.W., Luo, D., Zhao, Y.L., Zhang, Q.Q., Liu, G.F., and Zhang, J.Y. 2017. Outbreak of Mass Mortality of Yearling Groupers of *Epinephelus* (Perciformes, Serranidae) Associated with The Infection of a Suspected New Enteric Sphaerospora (Myxozoa: Myxosporea) Species in South China Sea. *J. Fish Dis*, 41(4): 663–672.
- Mahardika, K., Mastutia, I dan Zafrana, Z. 2018. Respon Lintah Laut (*Zeylanicobdella arugamensis*) Terhadap Salinitas Berbeda Secara Laboratorium. *Journal of Fisheries and Marine Research*, 2(3): 208-214.
- Mahardika, K., Mastuti, I dan Zafran. 2020. Respon Lintah Laut (*Zeylanicobdella arugamensis*) Terhadap Salinitas Tinggi Secara In Vitro dan In Vivo. *Jurnal Perikanan dan Ilmu Kelautan*. 2(1): 16-22.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A and Del Sol, M. 2017. Tips for Studies with Quantitative Morphology (Morphometry and Stereology). *International Journal of Morphology*, 35(4): 1482-1494.
- Maya, A. F. U., Suryati, N. K., Wisnu, A dan Aida, A. 2024. Identifikasi Morfologi dan Morfometrik Ikan (*Anguilla* sp.) Sidat Fase Elver. *Seminar Nasional Hasil Penelitian Kelautan dan Perikanan*, 2(1): 121-126.
- Muhammad-Rasul, A. H., R. Ramli., V. L. U. N, Low., A. Ahmad., C. Grudpan., S. Koolkalya and M. Z. Khaironizam. 2018. Taxonomic Revision of The Genus

- Poropuntius* (Teleostei : Cyprinidae) in Peninsular Malaysia. *Zootaxa*, 4472(2): 327-342.
- Mount, D. W. 2001. Phylogenetic prediction. In: Bioinformatics, Sequence, and Genome Analysis. Cold Spring Harbor Laboratory. New York Press. New York. pp. 237.
- Mukhopadhyay, S and Bhattacharjee, S. 2016. Genetic Diversity and Its Importance in Conservation. *Journal of Biodiversity and Conservation*, 11(3): 474.
- Mulyani, S., Hadijah dan Hitjahubessy, B. 2021. Potensi Pengembangan Budidaya Ikan Kerapu Perairan Teluk Ambai Provinsi Papua. *Pusaka Almada*. Gowa. pp. 23-29.
- Murwantoko., Negoro, S. L. C., Alim, I and Zafran. 2018. Short Communication: Identification of Marine Leech and Assessment of Its Prevalence and Intensity on Cultured Hybrid Groupers (*Epinephelus* sp.). *Biodiversitas*, 19(5): 1798-1804.
- Mustikasari, D dan R.D. Agustiani. 2021. DNA Barcoding Ikan Kepala Timah dan Betok Berdasarkan Gen COI Sebagai Pioneer di Kolong Pascatambang Timah, Pulau Bangka. *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan*, 12(1): 86-95.
- Nagasawa, K and D. Uyeno. 2009. *Zeylanicobdella arugamensis* (Hirudinea, Piscicolidae), a Leech Infesting Brackish-water Fishes, New to Japan. *Biogeography*, 11(19): 125-130.
- Near, T. J., Eytan, R. I., Dornburg, A., K. L. Kuhn, J. A. Moore, M. P. Davis, P. C. Wainwright., M. Friedman and W. L. Smith. 2012. Resolution of Ray-Finned Fish Phylogeny and Timing of Diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(34): 13698-13703.
- Nei, M and Li, W. H. 1979. Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 76(10): 5269-5273.
- Nei, M and Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York. pp. 352.
- Nielsen, R and Z. Yang. 1998. Likelihood Models for Detecting Positively Selected Amino Acid Sites and Application to The HIV-1 Envelope Gene. *Genetics*, 148(3): 929-936.
- Nisa, M., Mahasri, G dan Sulmartiwi, L. 2021. Gill and Skin Pathology of Hybrid Grouper (sira) Infested *Zeylanicobdella arugamensis* Worms in Different Infestations Degree. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 679(1): 1-7.

- Nurmaizura, D., Munawarah, D. R., Putri, M., Leila, A. F., Hermanto, J dan Edy, H. 2024. Implementasi Model Pembelajaran Contextual Teaching and Learning Berbantuan Media Educaplay pada Mata Pelajaran PPKn. Jurnal Pendidikan, Sains, Geologi, dan Geofisika, 5(2): 173-179.
- Ochtavia, S., Mahasri, G dan Mufasirin. 2024. Kekerabatan *Zeylanicobella arugamensis* Pada Ikan Kerapu Cantang dengan Pendekatan Molekuler di Jawa Timur dan Lombok. Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi, 12(1): 1043-1056.
- Petinsaari, M., Salmela, H., Mutanen, M and Tomas, S. 2016. Molecular Evolution of a Widely Adopted Taxonomic Marker (COI) Across The Animal Tree of Life. Scientific Reports, 6(4428): 1-12.
- Putra, L. A. G., Yonathan, C. J., Niedhatrata, N. I., M. H. R. Firdaus and J. R. Yoewono. 2020. A Review of The Development of Polymerase Chain Reaction Technique and Its Uses in Scientific Field. Stannum : Jurnal Sains dan Terapan Kimia. 2(1): 17-30.
- Phillips, A. J., Govedich, F. R and Moser, W. E. 2020. Leeches in The Extreme: Morphological, Physiological, and Behavioral Adaptations to Inhospitable Habitats. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 12(44): 318-325.
- Rach, J. J., Gaikowski, M. P and Ramsay, R. T. 2000. Efficacy of Hydrogen Peroxide to Control Parasitic Infestations on Hatchery-Reared Fish. Journal of Aquatic Animal Health, 12(4): 267-273.
- Ravi, R and Yahaya, Z. S. 2017. *Zeylanicobdella arugamensis*, The Marine Leech Cultured Crimson Snapper (*Lutjanus erythropterus*), Jerejak Island, Penang, Malaysia. Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine. 7(5): 473-477.
- Riadi, S dan F. Ulum. 2021. Analisis Penerapan Algoritma *First Come First Served (FCFS)* Dalam Proses Pesanan Pada Aplikasi Gojek. Jurnal Informatika dan Rekayasa Perangkat Lunak, 2(2): 268-275.
- Riko, Y. A., Rosidah dan Herawati, T. 2012. Intensitas dan Prevalensi Ektoparasit Pada Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) dalam Keramba Jaring Apung (KJA) di Waduk Cirata Kabupaten Cianjur Jawa Barat. Jurnal Perikanan Kelautan. 3(4): 231-241.
- Rimmer, M. A., Glamuzina, B. 2019. A Review of Grouper (Family: Serranidae Subfamily : Epinephelinae) Aquaculture from a Sustainability Science Perspective. Rev. Aquac. 11(1) : 58–87.

- Robert, D. W., Zemplak, T. S., Bronwyn, H. I., Peter, R. L and Paul, D. N. H. 2005. DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philosophical Transaction of The Royal Society B*, 360(1462): 1847-1857.
- Rochmad, A. N dan Mukti, A. T. 2020. Teknik Pembesaran Ikan Kerapu Hibrida Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*) pada Karamba Jaring Apung. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 22(1): 29-36.
- Roesti, M., Gavrillets, S., Hendry, A. P., Walter, S. and Daniel, B. 2014. The Genomic Signature of Parallel Adaptation from Shared Genetic Variation. *Molecular Ecology*, 23(16): 3944-3956.
- Saitou, N and T. Imanishi. 1989. Relative Effeciencies of The Fitch-Margoliash, Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum Evolution and Neighbor-Joining Methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining The Correct Tree. *Molecular Biology Evolution*, 6(5): 514-525.
- Santoso, Singgih. 2016. Statistik Parametrik: Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. Elex Media Komputindo. Jakarta. pp. 11-229.
- Schander, C and Halanych, K. M. 2003. DNA, PCR and Formalinized Animal Tissue – a Short Review and Protocols. *Organism Diversity and Evolution*, 3(3): 195-205.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L and R. Johne. 2012. PCR inhibitors–Occurrence, Properties and Removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5): 1014-1026.
- Siddall, M. E and Burreson, E. M. 1998. Phylogeny of Leeches (Hirudinea) Based on Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9(1): 156–162.
- Slatkin, M and Hudson, R. R. 1991. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics*, 129(2): 555-562.
- Sutrisno, H. 2018. Peran Ilmu Dasar Biosistematika Pada Era Bioteknologi. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi, Teknologi dan Kependidikan*, 4(1): 1-5.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary Relationship of DNA Sequences Infinite Population. *Genetics*, 105(2): 437-460.
- Tan, M. P., Amornsakun, T., Siti Azizah, M. N., Habib, A., Sung, Y. Y and Danish-Daniel, M. 2019. Hidden Genetic Diversity in Snakeskin Gourami, *Trichopodus pectoralis* (Perciformes, Osphronemidae), Inferred from The Mitochondrial DNA *COI* Gene. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2): 2966–2969.

- Tan, M. P., Jamsari, A. F. J and Azizah, M. N. S. 2012. Phylogeographic Pattern of The Striped Snakehead, *Channa striata* in Sundaland: Ancient River Connectivity, Geographical and Anthropogenic Signatures. PLoS ONE, 8(5): 1-11.
- Tani, N., Tsumura, Y., Kado, T., Taguchi, Y., Lee, S. L., Muhammad, N., Ng, K. K. S., Numata, S., Nishimura, S., Konuma, A. and Okuda, T. 2009. Paternity Analysis based Inference of Pollen Dispersal Patterns, Male Fecundity Variation, and Influence of Flowering Tree Density and General Flowering Magnitude in Two Dipterocarp Species. Annals of Botany, 104(7): 1421-1434.
- Totomoch-Serra A., Marquez, M. F and D. E. Cervantes-Barragán. 2017. Sanger Sequencing as a First-Line Approach for Molecular Diagnosis of Andersen-Tawil Syndrome, 28(6): 1016.
- Triswiyana, I. 2021. Keragaman Genetik Hiu Barong (*Rhina ancylostoma*) dan Potensi Kepunahannya di Indonesia: Review Berdasarkan Gen COI. Jurnal Biogenerasi, 6(2): 109-115.
- Utevsky, S. Y and Trontelj, P. 2004. Phylogenetic Relationships of Fish Leeches (Hirudinea, Piscicolidae) Based on Mitochondrial DNA Sequences and Morphological Data. Zoologica Scripta, 33(4): 375–385.
- Wang, Y., Huang, M., Wang, R and Lanyu, F. 2016. Complete Mitochondrial Genome of The Fish Leech *Zeylanicobdella arugamensis*. Mitochondrial Part B, 3(2): 659-660.
- Wibowo, S. E., M. A. Djaelani dan H. P. Kusumaningrum. 2013. Pelacakan Gen Sitokrom Oksidase Sub Unit I (COI) DNA Mitokondrial Itik Tegal (*Anas domesticus*) Menggunakan Primer Universal. Bioma: Berkala Ilmiah Biologi, 15(1): 20-26.
- Williams, J. I and Burreson, E. M. 2006. Phylogeny of The Fish Leeches (Oligochaeta, Hirudinida, Piscicolidae) Based on Nuclear and Mitochondrial Genes and Morphology. Zoologica Scripta, 35(6): 627-639.
- Williams, J. I. 2007. Monograph of the North American freshwater fish leeches (Oligochaeta: Hirudinida ; Piscicolidae) and Molecular Phylogeny of The Family Piscicolidae. Dissertations, Theses, and Masters Projects. College of William and Mary. Virginia. 147 p.
- Wulandari, T., A. Indrawati dan F. Pasaribu. 2019. Isolasi dan Identifikasi *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Lele (*Clarias gariepinus*) Pertambakan Muara Jambi, Provinsi Jambi. Jurnal Medik Veteriner, 2(2): 89-95.

- Yamaguchi, R and Iwasa, Y. 2013. First Passage Time to Allopatric Speciation. *Interface Focus*, 3(6): 1-11.
- Yuliani, Y., Yuniaty, A dan Susanto, A. H. 2017. Variasi Sekuens DNA yang Diampifikasi Menggunakan Primer atpb-rbcl Pada Beberapa Kultivar Kacang Tanah. *Scripta Biologica*. 4(1):11.
- Zafran., Mahardika, K., Retri, D. P dan Martini, N. N. D. 2020. Uji Efektivitas Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale*) Terhadap Lintah Laut Hirudinea (*Zeylanicobdella arugamensis*). *Jurnal Perikanan dan Ilmu Kelautan*, 2(1): 8-15.
- Zamroni, W. 2012. Gene Flow and Its Impact on Population Genetics. *Journal of Genetics*, 91(2): 241-253.
- Zein, M. S. A. 2007. Keragaman Daerah Kontrol DNA Mitokondria Rusa Timor (*Cervus timorensis timorensis*) di Pulau Timor, Alor, dan Pantar. *Biota*, 12(3): 138-144.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data sekuens LM1 sebelum dipotong

1st_BASE_5309172_LM1_LCO1490 - Notepad

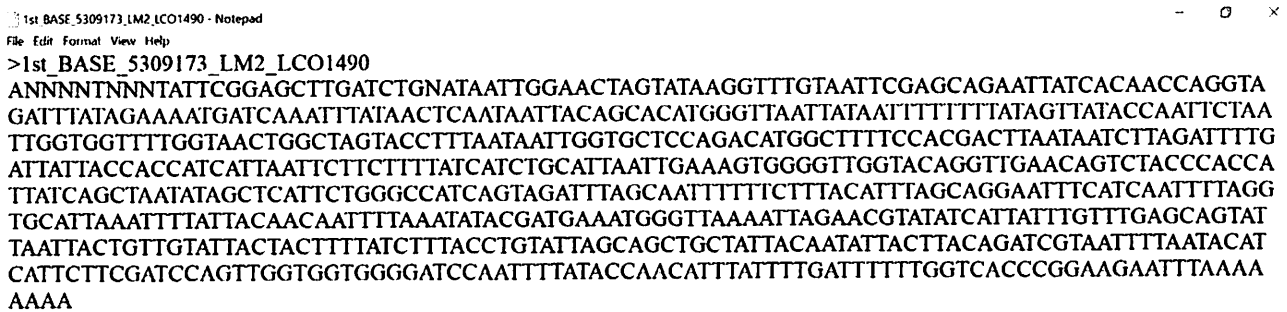
File Edit Format View Help

>1st_BASE_5309172_LM1_LCO1490

CGGAGCTTGATCTGCATAATTGGAAGTAGTATAAGGTTTGTAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAAT
GATCAAATTTATAACTCAATAATTACAGCACATGGGTTAATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTCTAATTGGTGGTTTTGGT
AACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATTACCACCAT
CATTAAITCTTCTTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTTGAACAGTCTACCCACCATTATCAGCTAATAI
AGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTCAATCAATTTTAGGTGCATTAATTTT
ATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAATTAGAACGTATATCATTATTTGTTTGAGCAGTATTAATTACTGTTGT
ATTACTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACATCATTCTTCGATCC
AGTTGGTGGTGGGGATCCAATTTTATACCAACATTTAATTTTGATTTTTTGGTC



Lampiran 2. Data sekvens LM2 sebelum dipotong



```
>1st_BASE_5309173_LM2_LCO1490
ANNNTNNNTATTTCGGAGCTTGATCTGNATAATTGGAAGTTTGTAAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGGTA
GATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCAATAATTACAGCACATGGGTTAATTATAATTTTTTTATAGTTATAACCAATCTAA
TTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTG
ATTATTACCACCATCATTAATCTTCTTTTATCATCTGCATTAATIGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTTGAACAGTCTACCCACCA
TTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTCATCAATTTAGG
TGCATTAAATTTTATTACAACAATTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAATTAGAACGTATATCATTATTTGTTTGAGCAGTAT
TAATTACTGTTGTATTACTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACAT
CATTCTTCGATCCAGTTGGTGGTGGGGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCGGAAGAATTTAAAA
AAAA
```

Lampiran 3. Data sekuens LM3 sebelum dipotong



1st_BASE_5309174_LM3_LCO1490 - Notepad
File Edit Format View Help
>1st_BASE_5309174_LM3_LCO1490
NNNNATTTTANNTTCGGAGCTTGNTCTGNATAATTGGAAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGGT
AGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCAATAATTACAGCACATGGGTAAATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTCTA
ATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTT
GATTATTACCACCATCATTAATTCCTTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTTGAACAGTCTACCCACC
ATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTCATCAATTTTAG
GTGCATTAAATTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAATTAGAACGTATATCATTATTTGTTTGAGCAGTA
TTAATTACTGTTGTIATACTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACA
TCATTCTTCGATCCAGTTGGTGGTGGGGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCTGGAAAATTTAAAA

Lampiran 4. Data sekuens LM4 sebelum dipotong

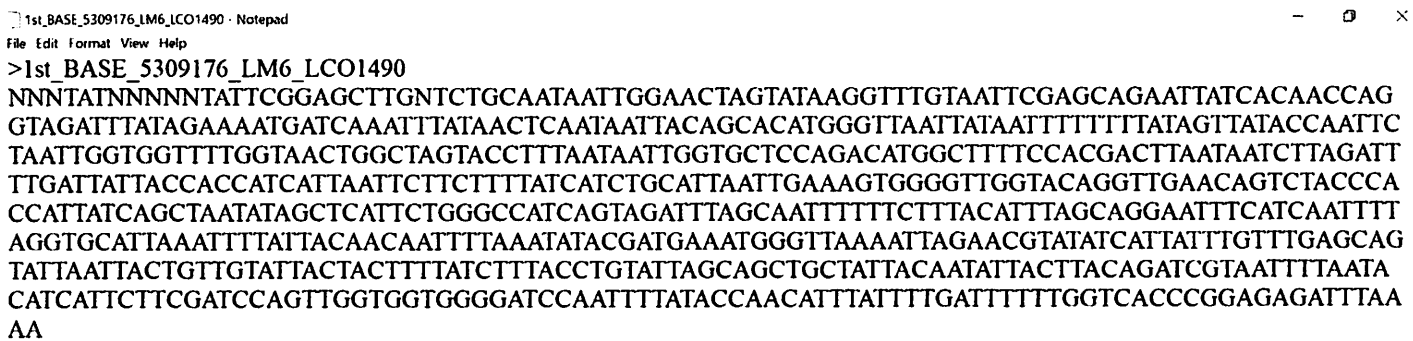
1st_BASE_5309175_LM4_LCO1490 - Notepad

File Edit Format View Help

1st_BASE_5309175_LM4_LCO1490

NNNNNTNTNNTNTTCGGAGCTTGNTCTGCAATAATTGGAAGTCTGATAAGGTTTGTAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGGT
 AGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATACTCAATAATTACAGCACATGGGTTAATTATAATTTTTTTATAGTTATACCAATTCTA
 ATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTT
 GATTATTACCACCATCATTAATTCCTCTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTTGAACAGTCTACCCACC
 ATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTACATTAGCAGGAATTCATCAATTTTAG
 GTGCATTAAATTTATTACAACAATTTAAATATACGATGAAATGGGTTAAATAGAACGTATATCATTATTTGTTTGAGCAGTA
 TTAATTACTGTTGTATTACTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACA
 TCATTCTTCGATCCAGTTGGTGGGTGGGGATCCAATTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCTGGAAATTTATAA

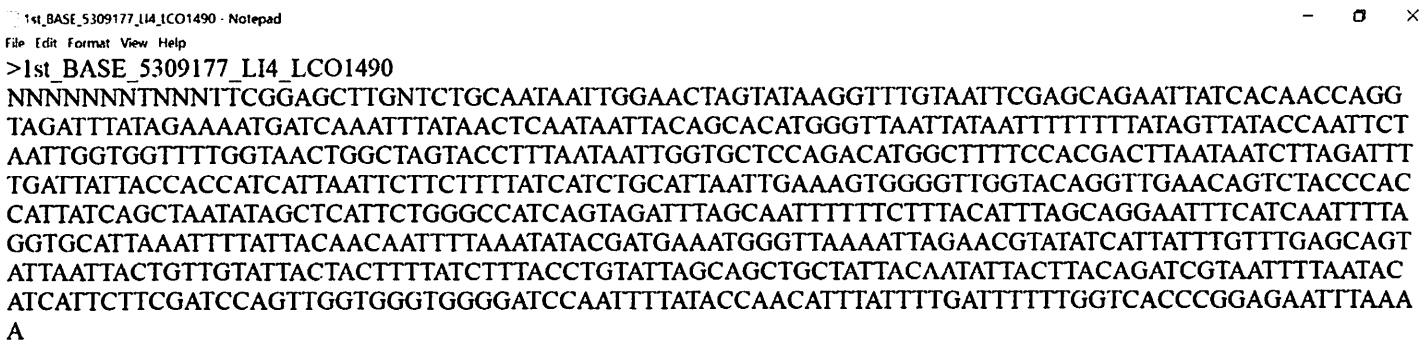
Lampiran 5. Data sekuens LM6 sebelum dipotong



A screenshot of a Notepad window titled "1st_BASE_5309176_LM6_LCO1490 - Notepad". The window contains a DNA sequence starting with ">1st_BASE_5309176_LM6_LCO1490". The sequence is as follows:

```
NNNTATNNNNNTATTCGGAGCTTGNTCTGCAATAATTGGAAGTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAG
GTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCAATAATTACAGCACATGGGTTAATTATAATTTTTTTATAGTTATACCAATTC
TAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATT
TTGATTATTACCACCATCATTAATTCCTTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTTGAACAGTCTACCCA
CCATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTT
AGGTGCATTAAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAATTAGAACGTATATCATTTTGTGTTGAGCAG
TATTAATTACTGTTGTATTACTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATA
CATCATTCTTCGATCCAGTTGGTGGTGGGGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCGGAGAGATTAA
AA
```

Lampiran 6. Data sekuens LI4 sebelum dipotong



```
>1st_BASE_5309177_LI4_LCO1490
NNNNNNNTNNNTTCGGAGCTTGNTCTGCAATAATTGGAAGCTTAGTATAAGGTTTGTAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGG
TAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCAATAATTACAGCACATGGGTAAATTATAATTTTTTTATAGTTATACCAATTCT
AATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTT
TGATTATTACCACCATCATTAAATTCCTCTTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTTGAACAGTCTACCCAC
CATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTCATCAATTTTA
GGTGCATTAAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAATTAGAACGTATATCATTATTTGTTTGAGCAGT
ATTAATTACTGTTGTATTACTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATAC
ATCATTCCTTCGATCCAGTTGGTGGGTGGGGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCGGAGAATTTAAA
A
```

Lampiran 7. Sequence LM1, LM2, dan LM3 setelah dipotong

```

new Fasta - Notepad
File Edit Format View Help

>LM1_Pterobdella_arugamensis
AGCTTGATCTGCATAATTGGAAC TAGTATAAGGTTTGAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCAAT
AATTACAGCACATGGGTTAATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTC TAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAG
ACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATTACCACCATCATTAAATCTTCTTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTACA
GGTTGAACAGTCTACCCACCATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTCAATCAAT
TTTAGGTGCATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAAATTAGAACGTATATCATTATTTGTTTGAGCAGTATTAATTACTGT
TGTATTACTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACATCATTCTTCGATCCAGTTGGTGGTGG
GGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCAC

>LM2_Pterobdella_arugamensis
CGGAGCTTGATCTGNATAATTGGAAC TAGTATAAGGTTTGAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACT
CAATAATTACAGCACATGGGTTAATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTC TAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTC
CAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATTACCACCATCATTAAATCTTCTTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGT
ACAGGTTGAACAGTCTACCCACCATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTCAATC
AATTTTAGGTGCATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAAATTAGAACGTATATCATTATTTGTTTGAGCAGTATTAATTAC
TGTGTATTACTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACATCATTCTTCGATCCAGTTGGTGG
TGGGGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCAC

>LM3_Pterobdella_arugamensis
GGAGCTTGNTCTGNATAATTGGAAC TAGTATAAGGTTTGAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTC
AATAATTACAGCACATGGGTTAATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTC TAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCC
AGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATTACCACCATCATTAAATCTTCTTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTA
CAGGTTGAACAGTCTACCCACCATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTCAATCA
ATTTTAGGTGCATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAAATTAGAACGTATATCATTATTTGTTTGAGCAGTATTAATTACT
GTTGTATTACTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACATCATTCTTCGATCCAGTTGGTGGT
GGGGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCA

```

Lampiran 8. Sequence LM4, LM6, dan LI4 setelah dipotong

```

new FASTA - Notepad
File Edit Format View Help

>LM4_Pterobdella_arugamensis
CGGAGCTTGNTCTGCAATAATTGGAAC TAGTATAAGGTTTGTAATTCGAGCAGAATTATCACAAACCAGGTAGAITTATAGAAAATGATCAAATTTATAAC
TCAATAATTACAGCACATGGGTAAATTATAATTTTTTTATAGTTATACCAATTC TAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCT
CCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATTACCACCATCATTAATTCCTCTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGG
TACAGGTTGAACAGTCTACCCACCATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTTACATTTAGCAGGAATTCAT
CAATTTTAGGTGCATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAAATTAGAACGTATATCATTTATTTGTTTGAGCAGTATTAATTA
CTGTTGTATTACTACTTTTATCTTTTACCCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACATCATTTCTTCGATCCAGTTGGTG
GGTGGGGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCA

>LM6_Pterobdella_arugamensis
GAGCTTGNTCTGCAATAATTGGAAC TAGTATAAGGTTTGTAATTCGAGCAGAATTATCACAAACCAGGTAGAITTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTC
AATAATTACAGCACATGGGTAAATTATAATTTTTTTATAGTTATACCAATTC TAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCC
AGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATTACCACCATCATTAATTCCTCTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTA
CAGGTTGAACAGTCTACCCACCATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTTACATTTAGCAGGAATTCATCA
ATTTTAGGTGCATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAAATTAGAACGTATATCATTTATTTGTTTGAGCAGTATTAATTA
GTTGTATTACTACTTTTATCTTTTACCCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACATCATTTCTTCGATCCAGTTGGTGGT
GGGGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCA

>LI4_Pterobdella_arugamensis
TCTGCAATAATTGGAAC TAGTATAAGGTTTGTAATTCGAGCAGAATTATCACAAACCAGGTAGAITTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCAATAATTAC
AGCACATGGGTAAATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTC TAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGACATGG
CTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATTACCACCATCATTAATTCCTCTTTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTTGA
ACAGTCTACCCACCATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTTACATTTAGCAGGAATTCATCAATTTTAGG
TGCATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGGTAAAAATTAGAACGTATATCATTTATTTGTTTGAGCAGTATTAATTA
CTACTTTTATCTTTTACCCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTAATACATCATTTCTTCGATCCAGTTGGTGGGTGGGGAT
CCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCA

```

Lampiran 9. Analisis dan hasil homologi sekuens dengan NCBI BLAST

NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite Home Recent Results Saved Strategies Help

Important update
Effective August 2025, the **ClusteredNR** database will become the default Protein BLAST database. [Learn more about ClusteredNR](#)

Standard Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear

Query subrange

From

To

Or, upload file No file chosen

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Feedback

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

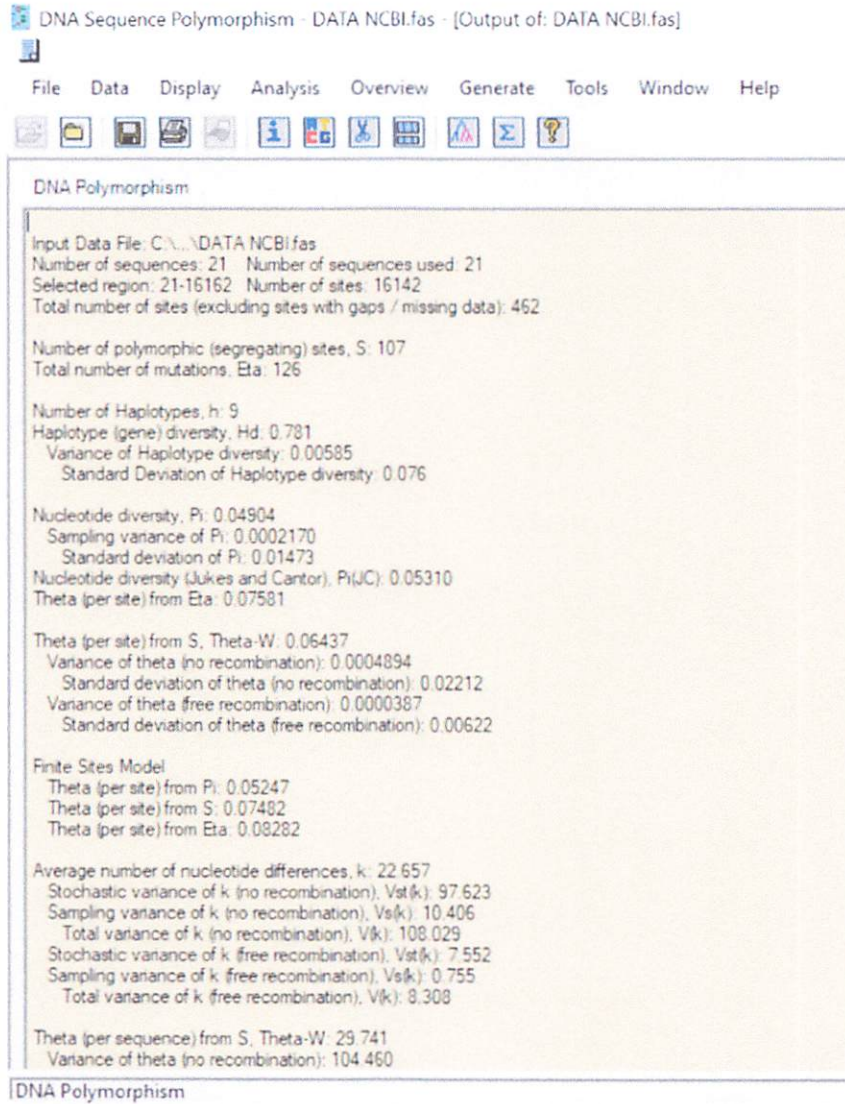
☒ select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

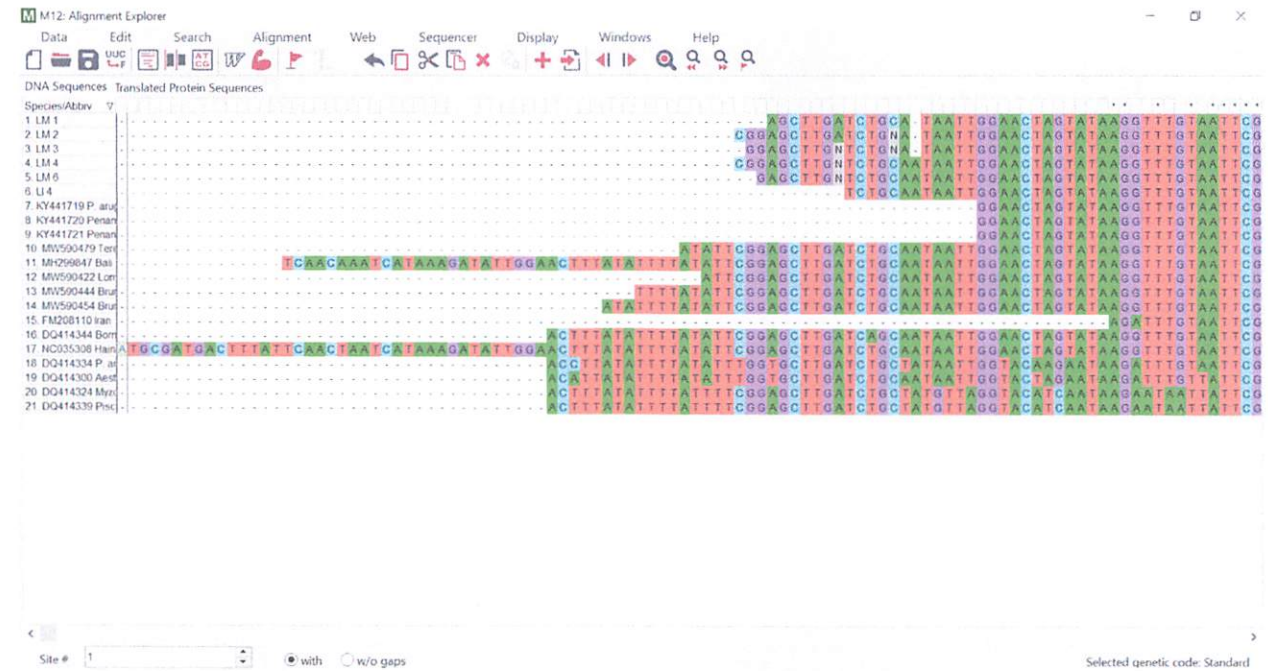
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
☒ <i>Pterobolia anupamensis</i> cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	Unknown	1181	1181	100%	0.0	99.39%	707	MH299817.1
☒ <i>Zeylanosydella anupamensis</i> mitochondrial complete genome	Unknown	1175	1175	100%	0.0	99.23%	16161	NC_035306.1
☒ <i>Pterobolia anupamensis</i> isolate Fish Leech 2 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitoch...	Unknown	1153	1153	97%	0.0	99.53%	637	KY441718.1
☒ <i>Pterobolia anupamensis</i> isolate Fish Leech 4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1153	1153	97%	0.0	99.53%	637	KY111720.1
☒ <i>Pterobolia anupamensis</i> isolate Fish Leech 5 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1153	1153	97%	0.0	99.53%	637	KY111721.1
☒ <i>Pterobolia anupamensis</i> isolate Fish Leech 3 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1153	1153	97%	0.0	99.53%	637	KY111719.1
☒ <i>Pterobolia anupamensis</i> isolate Fish Leech 1 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1147	1147	97%	0.0	99.37%	637	KY441717.1
☒ <i>Zeylanosydella anupamensis</i> isolate BL29 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1127	1127	95%	0.0	99.52%	625	MW590468.1
☒ <i>Zeylanosydella anupamensis</i> isolate L120 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1127	1127	95%	0.0	99.52%	624	MW590434.1
☒ <i>Zeylanosydella anupamensis</i> isolate L028 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1127	1127	95%	0.0	99.52%	626	MW590422.1
☒ <i>Zeylanosydella anupamensis</i> isolate L03 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1122	1122	95%	0.0	99.35%	626	MW590466.1
☒ <i>Zeylanosydella anupamensis</i> isolate L027 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1122	1122	95%	0.0	99.35%	625	MW590421.1
☒ <i>Zeylanosydella anupamensis</i> isolate PM2 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds, mitoc...	Unknown	1122	1122	95%	0.0	99.35%	628	MW590479.1

Feedback

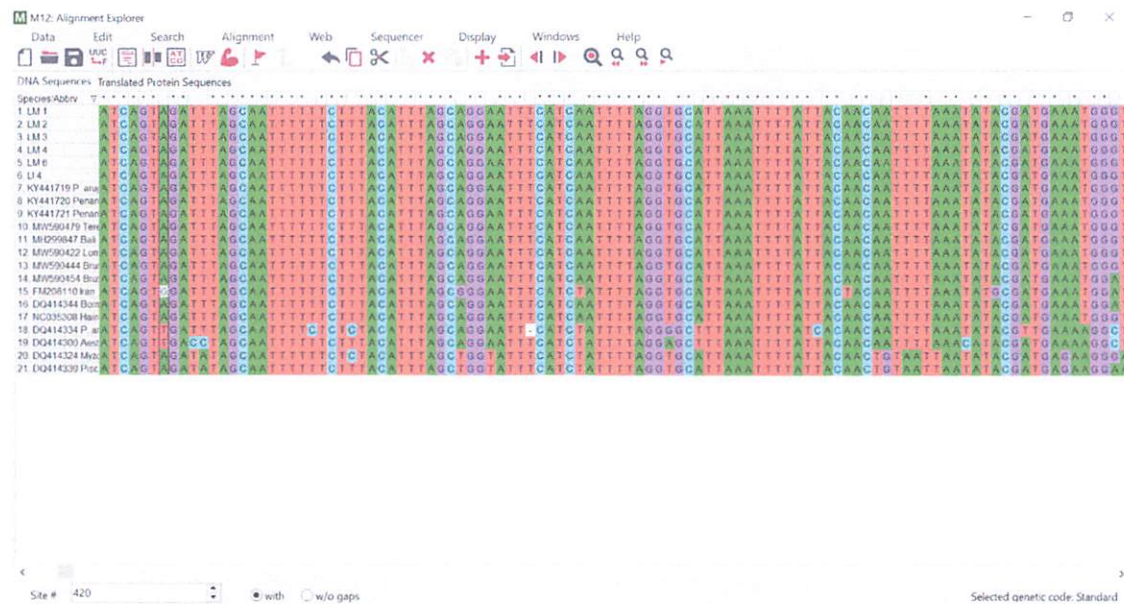
Lampiran 10. Data DNA Polimorfisme di DnaSP

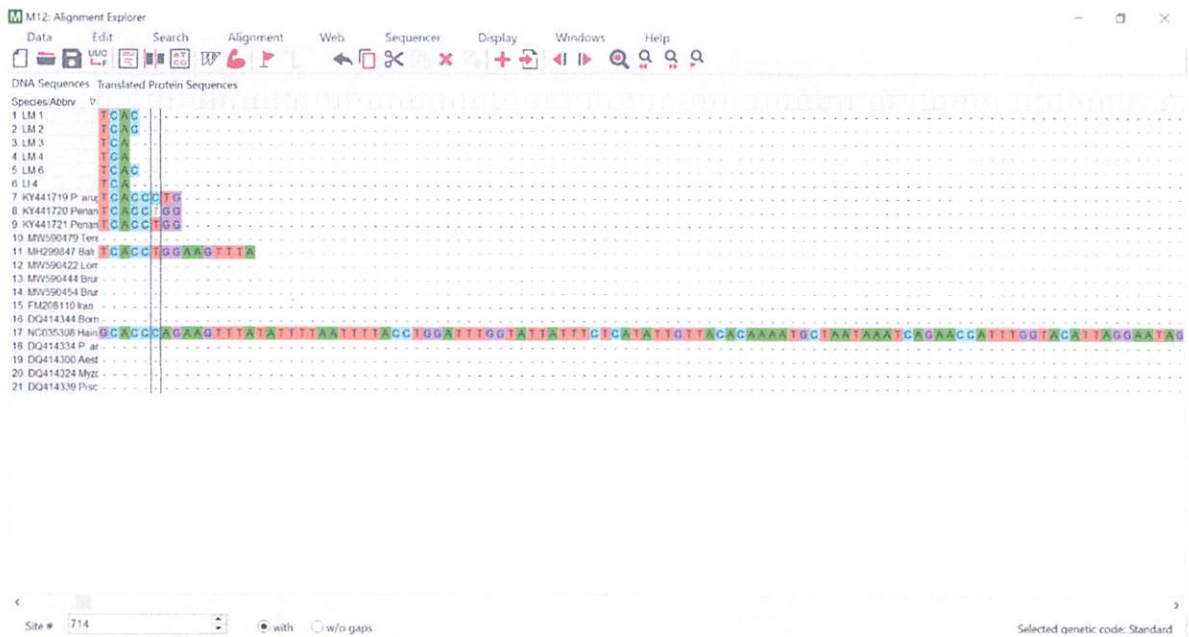
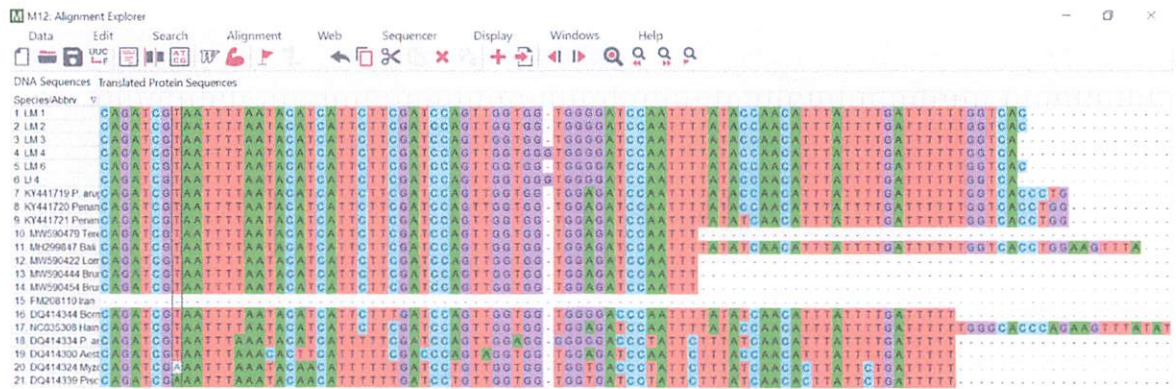


Lampiran 11. Pensejajaran sekuens di MEGA 12









Lampiran 12. Data sekuens berdasarkan situs yang terkonservasi

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

1. LM 1
2. LM 2
3. LM 3
4. LM 4
5. LM 6
6. LI
7. KY441719 P. arugamensis Penang
8. KY441720 Penang
9. KY441721 Penang
10. MW590479 Terengganu
11. MH299847 Bali
12. MW590422 Lombok
13. MW590444 Brunei
14. MW590454 Brunei
15. FM208110 Iran
16. DQ414344 Borneo
17. NC035308 Hainan
18. DQ414334
19. DQ414300
20. DQ414324
21. DQ414339

Site# 1 / 13900 Conserved: 551/13900 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

1. LM 1
2. LM 2
3. LM 3
4. LM 4
5. LM 6
6. LI
7. KY441719 P. arugamensis Penang
8. KY441720 Penang
9. KY441721 Penang
10. MW590479 Terengganu
11. MH299847 Bali
12. MW590422 Lombok
13. MW590444 Brunei
14. MW590454 Brunei
15. FM208110 Iran
16. DQ414344 Borneo
17. NC035308 Hainan
18. DQ414334
19. DQ414300
20. DQ414324
21. DQ414339

Site# 16 / 13900 Conserved: 551/13900 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA

Name	Sequence
1. LM 1	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
2. LM 2	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
3. LM 3	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
4. LM 4	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
5. LM 6	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
6. LI	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
7. KY441719 P. arugamensis Penang	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
8. KY441720 Penang	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
9. KY441721 Penang	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
10. MW590479 Terengganu	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
11. MH299847 Bali	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
12. MW590422 Lombok	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
13. MW590444 Brunei	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
14. MW590454 Brunei	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
15. FM208110 Iran	- - - - - A G A T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A C C A A A T T T A T A A T T C A
16. DQ414344 Borneo	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A T T C A
17. NC035308 Hainan	G A A C T A G T A T A A G G T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T A T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C A
18. DQ414334	G T A C A A G A A T A A G A T T T G T A A T T C G A G C A G A A T T A T C A C A A C C A G G T A G A T T T G T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A T T C A
19. DQ414300	G T A C T A G A A T A A G A T T T G T A A T T C G A G C A G A A C T G T C A C A A C C A G A A G A T T T G T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A T T C A
20. DQ414324	G T A C A T C A A T A A G A A T A A T T A T T C G A A C T G A A T T A T C T C A A C C A G G T A G A T T G C T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C T
21. DQ414339	G T A C A T C A A T A A G A A T A A T T A T T C G A A C T G A A T T A T C T C A A C C A G G T A G A T T G C T A G A A A A T G A T C A A A T T T A T A A C T C T

Site# 80 /139800 Conserved: 551/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA

Name	Sequence
1. LM 1	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
2. LM 2	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
3. LM 3	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
4. LM 4	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
5. LM 6	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
6. LI	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
7. KY441719 P. arugamensis Penang	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
8. KY441720 Penang	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
9. KY441721 Penang	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
10. MW590479 Terengganu	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
11. MH299847 Bali	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
12. MW590422 Lombok	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
13. MW590444 Brunei	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
14. MW590454 Brunei	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
15. FM208110 Iran	A A T A A T T A C A G C A C A T G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T A A T A C C T A T T T T A A T T G G T G G G T T T G G T A A T T G A T T A C
16. DQ414344 Borneo	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G A T T G G
17. NC035308 Hainan	A A T A A T T A C A G C A C A T G G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T C T A A T T G G T G G T T T T G G T A A C T G G C T A C
18. DQ414334	A A T A A T T A C A G C A C A T G G T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C T A T T T T A A T T G G G G G C T T T G G A A A T T G G T T A C
19. DQ414300	A A T A A T T A C A G C A C A T G G C T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T A A T A C C A A T T T T A A T T G G T G G A T T T G G T A A T T G A T T A C
20. DQ414324	T A A A T T A C A G C A C A T G G T T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T T T A A T T G G T G G A T T T G G A A A T T G A C T T C
21. DQ414339	T A A A T T A C A G C T A T G G T T T A A T T A T A A T T T T T T A T A G T T A T A C C A A T T T T A A T T G G T G G G T T T G G A A A T T G A C T T C

Site# 158 /139800 Conserved: 551/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA C V P S

Name	Sequence
1. LM 1	GTACCTTTAATAATTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
2. LM 2	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
3. LM 3	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
4. LM 4	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
5. LM 6	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
6. LI	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
7. KY441719 P. arugamensis Penang	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
8. KY441720 Penang	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
9. KY441721 Penang	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
10. MW590479 Terengganu	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
11. MH299847 Bali	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
12. MW590422 Lombok	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
13. MW590444 Brunei	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
14. MW590454 Brunei	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
15. FM208110 Iran	GTACCAATTAATAATTTGGTGGACCCAGACATAGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
16. DQ414344 Borneo	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
17. NC035303 Hainan	GTACCTTTAATAATTTGGTGGTCCAGACATGGCTTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
18. DQ414334	GTACCAATTAATAATTTGGAGGCCAGACATAGCTTTTCCACGCTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
19. DQ414300	GTATCCACTTAATAATTTGGTGGACCCAGACATAGCAATTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
20. DQ414324	GTACCAATTAATAATTTGGTGGACCTGATATAGCAATTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT
21. DQ414339	GTACCAATTAATAATTTGGTGGACCTGATATAGCAATTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCACCATCATTT

Site# 238 / 139800 Conserved: 551/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA C V P S

Name	Sequence
1. LM 1	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
2. LM 2	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
3. LM 3	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
4. LM 4	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
5. LM 6	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
6. LI	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
7. KY441719 P. arugamensis Penang	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
8. KY441720 Penang	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
9. KY441721 Penang	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
10. MW590479 Terengganu	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
11. MH299847 Bali	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
12. MW590422 Lombok	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
13. MW590444 Brunei	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
14. MW590454 Brunei	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
15. FM208110 Iran	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
16. DQ414344 Borneo	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
17. NC035303 Hainan	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
18. DQ414334	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
19. DQ414300	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
20. DQ414324	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA
21. DQ414339	TATAGCTCATTCTGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTTGCA

Site# 396 / 139800 Conserved: 551/139800 21 taxa selected Data



Lampiran 13. Data sekuens berdasarkan variable dalam situs sekuens

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Name	Sequence
1. LM 1	AGCTTGATCTGCA-TAATTGC
2. LM 2	GGAGCTTGATCTGTA-TAATTGC
3. LM 3	GGAGCTTGATCTGTA-TAATTGC
4. LM 4	GGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
5. LM 6	GAGCTTGATCTGCAATAATTGC
6. LI	TCTGCAATAATTGC
7. KY441719 P. arugamensis Penang	ATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
8. KY441720 Penang	ATTTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
9. KY441721 Penang	ATTTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
10. MW590479 Terengganu	ATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
11. MH299847 Bali	TCAACAAATCATAAAGATATTGGAACTTTATATTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
12. MW590422 Lombok	ATTTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
13. MW590444 Brunel	TTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
14. MW590454 Brunel	ATATTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
15. FM208110 Iran	ACTTTATATTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
16. DQ414344 Borneo	ACTTTATATTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
17. NC035308 Hainan	ATGCGATGACTTTATTCAACTAATCATAAAGATATTGGAACTTTATATTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
18. DQ414334	ACTTTATATTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
19. DQ414300	ACATTTATATTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
20. DQ414324	ACTTTATATTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC
21. DQ414339	ACTTTATATTTTATATTGGAGCTTGATCTGCAATAATTGC

Site# 1 / 139800 Variable: 277/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Name	Sequence
1. LM 1	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
2. LM 2	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
3. LM 3	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
4. LM 4	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
5. LM 6	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
6. LI	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
7. KY441719 P. arugamensis Penang	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
8. KY441720 Penang	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
9. KY441721 Penang	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
10. MW590479 Terengganu	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
11. MH299847 Bali	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
12. MW590422 Lombok	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
13. MW590444 Brunel	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
14. MW590454 Brunel	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
15. FM208110 Iran	AGATTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
16. DQ414344 Borneo	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
17. NC035308 Hainan	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
18. DQ414334	GTACAGAATAAGATTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
19. DQ414300	GTACAGAATAAGATTGTAAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
20. DQ414324	GTACATCAATAAGAAATAATTAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA
21. DQ414339	GTACATCAATAAGAAATAATTAATTCGAGCAGAAATATCAACAACAGGTAGATTATAGAAAATGATCAAATTTATAA

Site# 60 / 139800 Variable: 277/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA K X T A C V P S

Name

1. LM 1	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
2. LM 2	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
3. LM 3	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
4. LM 4	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
5. LM 6	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
6. LI	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
7. KY441719 P. arugamensis Penang	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
8. KY441720 Penang	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
9. KY441721 Penang	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
10. MW590479 Terengganu	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
11. MH299847 Bali	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
12. MW590422 Lombok	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
13. MW590444 Brunei	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
14. MW590454 Brunei	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
15. FM208110 Iran	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
16. DQ414344 Borneo	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
17. NC035308 Hainan	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
18. DQ414334	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
19. DQ414300	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
20. DQ414324	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT
21. DQ414339	AATAATACAGCACATGGTTAATTATAATTTT

Site# 159 / 139800 Variable: 277/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA K X T A C V P S

Name

1. LM 1	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
2. LM 2	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
3. LM 3	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
4. LM 4	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
5. LM 6	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
6. LI	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
7. KY441719 P. arugamensis Penang	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
8. KY441720 Penang	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
9. KY441721 Penang	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
10. MW590479 Terengganu	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
11. MH299847 Bali	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
12. MW590422 Lombok	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
13. MW590444 Brunei	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
14. MW590454 Brunei	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
15. FM208110 Iran	GTACCAATTAATAATTGGTGCCAGACATAGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
16. DQ414344 Borneo	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATAGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
17. NC035308 Hainan	GTACCTTTAATAATTGGTGCCTCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
18. DQ414334	GTACCAATTAATAATTGGTGCCAGACATAGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
19. DQ414300	GTACCAATTAATAATTGGTGCCAGACATAGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
20. DQ414324	GTACCAATTAATAATTGGTGCCAGACATAGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT
21. DQ414339	GTACCAATTAATAATTGGTGCCAGACATAGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACATCATTT

Site# 238 / 139800 Variable: 277/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA C V P S

Name	Sequence
1. LM 1	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
2. LM 2	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
3. LM 3	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
4. LM 4	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
5. LM 6	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
6. U	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
7. KY441719 P. arugamensis Penang	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
8. KY441720 Penang	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
9. KY441721 Penang	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
10. MW590479 Terengganu	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
11. MH299847 Bali	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
12. MW590422 Lombok	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
13. MW590444 Brunei	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
14. MW590454 Brunei	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T C T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
15. FM208110 Iran	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G T T A G G T A C A G G T T G A A C T G T T A T C G G C C A T T A T C A G C T A A T
16. DQ414344 Borneo	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
17. NC035308 Hainan	T A A T T C T C T T T A T C A T C T G C A T T A A T T G A A A G T G G G G T T G G T A C A G G T T G A A C A G T T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
18. DQ414334	T A T T T T A C T T T A T C T T C A G C A T T A A T T G A A A G G G G T T G G T A C A G G A T G A A C T G T A T A T C C A C C A T T A T C A T C T A A T
19. DQ414300	T T A T T C T C T T T A T C A T C A G C A T T A G T T G A A A G G G G T T A G G T A C A G G T T G A A C A G T A T A C C A C C A T T A T C A G C T A A T
20. DQ414324	T A A T T T A T T A T A G G T T C A G C T T A A T T G A A A C A G G T T G G A A C A G G T T G A A C T G T A T A C C A C C A T T A T C A T C T A A T
21. DQ414339	T A A T T T A T T A C T A G G T T C A T C T T A A T T G A A A C A G G T T G G A A C A G G T T G A A C T G T A T A C C A C C A T T A T C A T C T A A T

Site# 317 /139800 Variable: 277/139800 21 taxa selected Data

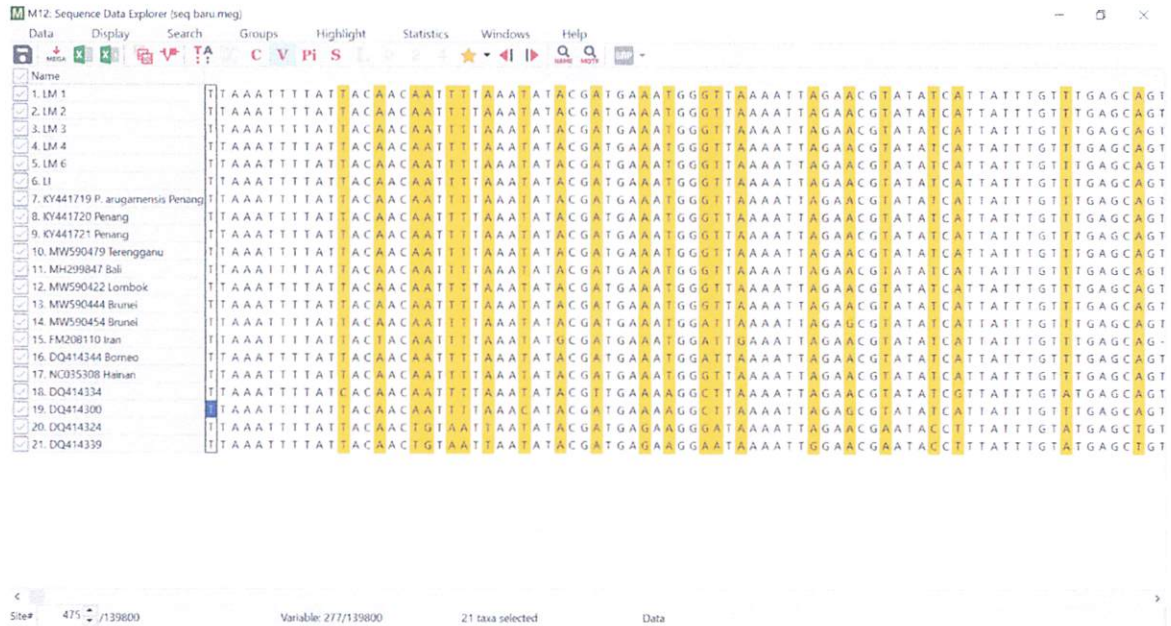
M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA C V P S

Name	Sequence
1. LM 1	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
2. LM 2	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
3. LM 3	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
4. LM 4	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
5. LM 6	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
6. U	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
7. KY441719 P. arugamensis Penang	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
8. KY441720 Penang	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
9. KY441721 Penang	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
10. MW590479 Terengganu	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
11. MH299847 Bali	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
12. MW590422 Lombok	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
13. MW590444 Brunei	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
14. MW590454 Brunei	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
15. FM208110 Iran	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
16. DQ414344 Borneo	T A T A G C T C A T T C A G G T T C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
17. NC035308 Hainan	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
18. DQ414334	T A T A G C T C A T T C T G G C C A T C A G T T A T T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
19. DQ414300	T A T A G C C A T T C T G G T C C A T C A G T T A C C T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G A A T T T C A T C A A T T T A G G A G C T T
20. DQ414324	T T T A G C A C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T A T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C T G G T A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T
21. DQ414339	T T T A G C A C A T T C T G G C C A T C A G T A G A T A T A G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C T G G T A T T T C A T C A A T T T A G G T G C A T

Site# 390 /139800 Variable: 277/139800 21 taxa selected Data



M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA C V P I S

Name	Sequence
1. LM 1	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
2. LM 2	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
3. LM 3	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
4. LM 4	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
5. LM 6	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
6. LI	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
7. KY441719 P. arugamensis Penang	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
8. KY441720 Penang	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
9. KY441721 Penang	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
10. MW590479 Terengganu	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
11. MH299847 Bali	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
12. MW590422 Lombok	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T A T A T C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
13. MW590444 Brunei	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T A T A T C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
14. MW590454 Brunei	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T A T A T C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
15. FM208110 Iran	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T A T A T C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
16. DQ414344 Borneo	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A T C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
17. NC035308 Hainan	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
18. DQ414334	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
19. DQ414300	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
20. DQ414324	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C
21. DQ414339	T T T T A A A C A T C A T T C T T G A T C C A G T T G G T G G - T G G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C

Site# 613 /139800 Variable: 277/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

MEGA C V P I S

Name	Sequence
1. LM 1	C
2. LM 2	C
3. LM 3	C
4. LM 4	G G A T C C A A T T T T A T A C C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A
5. LM 6	C
6. LI	C
7. KY441719 P. arugamensis Penang	C C T G C C T G C C C T G C C T G C C T G C C C T G
8. KY441720 Penang	C C T G C C T G C C C T G C C T G C C T G C C C T G
9. KY441721 Penang	C C T G C C T G C C C T G C C T G C C T G C C C T G
10. MW590479 Terengganu	C C T G G A A G T T T A C T G G A A G T T T A C C T G G A A G T T T A A T C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C C T G G A A G T T T A C T G G A
11. MH299847 Bali	C C T G G A A G T T T A C T G G A A G T T T A C C T G G A A G T T T A A T C A A C A T T T A T T T T G A T T T T T G G T C A C C T G G A A G T T T A C T G G A
12. MW590422 Lombok	C
13. MW590444 Brunei	C
14. MW590454 Brunei	C
15. FM208110 Iran	C
16. DQ414344 Borneo	C
17. NC035308 Hainan	C C C A G A A G T T T A T A T T T T A A T T T T A C C T G G A T T T G G T A T T A T T T C T C A T A T T G T T A C A C A A A A T G C T A A T A A A T C A G A A C
18. DQ414334	C
19. DQ414300	C
20. DQ414324	C
21. DQ414339	C

Site# 712 /139800 Variable: 277/139800 21 taxa selected Data



Lampiran 14. Data sekuens berdasarkan singleton per-situs

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Site# 1 / 139800 Singleton: 68/139800 21 taxa selected Data

Name	Sequence
1. LM 1	AGCTTGATCTGCA-TAATTGG
2. LM 2	CGGAGCTTGATCTG?A-TAATTGG
3. LM 3	GGAGCTTG?CTG?A-TAATTGG
4. LM 4	CGGAGCTTG?CTGCAATAATTGG
5. LM 6	GAGCTTG?CTGCAATAATTGG
6. LI	TCGCAATAATTGG
7. KY441719 P. arugamensis Penang	GC
8. KY441720 Penang	GC
9. KY441721 Penang	GC
10. MW590479 Terengganu	ATATTCGGAGCTTGATCTGCAATAATTGG
11. MH299847 Bali	ATTCGGAGCTTGATCTGCAATAATTGG
12. MW590422 Lombok	TTTATATTCGGAGCTTGATCTGCAATAATTGG
13. MW590444 Brunei	ATATTTTATATTCGGAGCTTGATCTGCAATAATTGG
14. MW590454 Brunei	ACITTTATATTTTATATTCGGAGCTTGATCTGCAATAATTGG
15. FM208110 Iran	ATGCGATGACITTTATCAACTAATCATAAAGATATTGGAACITTTATATTTTATATTCGGAGCTTGATCTGCAATAATTGG
16. DQ414344 Borneo	ACITTTATATTTTATATTCGGAGCTTGATCTGCAATAATTGG
17. NC035308 Hainan	ACITTTATATTTTATATTTGGTGGCTTGATCTGCTATAATTGG
18. DQ414334	ACATTTATATTTTATATTTGGTGGCTTGATCTGCAATAATTGG
19. DQ414300	ACITTTATATTTTATATTTGGTGGCTTGATCTGCTATGTTAGC
20. DQ414324	ACITTTATATTTTATATTTGGTGGCTTGATCTGCTATGTTAGC
21. DQ414339	ACITTTATATTTTATATTTGGTGGCTTGATCTGCTATGTTAGC

Site# 80 / 139800 Singleton: 68/139800 21 taxa selected Data

Name	Sequence
1. LM 1	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
2. LM 2	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
3. LM 3	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
4. LM 4	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
5. LM 6	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
6. LI	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
7. KY441719 P. arugamensis Penang	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
8. KY441720 Penang	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
9. KY441721 Penang	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
10. MW590479 Terengganu	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
11. MH299847 Bali	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
12. MW590422 Lombok	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
13. MW590444 Brunei	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
14. MW590454 Brunei	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
15. FM208110 Iran	AGATTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
16. DQ414344 Borneo	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
17. NC035308 Hainan	GAACTAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
18. DQ414334	GTACAAGAATAAGATTTGTAAATTCGAGCAGAAATATCACAACCAGGTAGATTTGTAGAAAATGATCAAATTTATAACTCA
19. DQ414300	GTAATCAATAAGAATAATTATTCGAAGTGAATATCTCAACCAGGTAGATTTGTAGAAAATGATCAAATTTATAACTCT
20. DQ414324	GTAATCAATAAGAATAATTATTCGAAGTGAATATCTCAACCAGGTAGATTTGTAGAAAATGATCAAATTTATAACTCT
21. DQ414339	GTAATCAATAAGAATAATTATTCGAAGTGAATATCTCAACCAGGTAGATTTGTAGAAAATGATCAAATTTATAACTCT

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Name	Sequence
1. LM 1	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
2. LM 2	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
3. LM 3	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
4. LM 4	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
5. LM 6	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
6. LI	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
7. KY441719 P. arugamensis Penang	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
8. KY441720 Penang	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
9. KY441721 Penang	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
10. MW590479 Terengganu	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
11. MH299847 Bali	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
12. MW590422 Lombok	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
13. MW590444 Brunei	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
14. MW590454 Brunei	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
15. FM208110 Iran	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
16. DQ414344 Borneo	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
17. NC035308 Hainan	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
18. DQ414334	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
19. DQ414300	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
20. DQ414324	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC
21. DQ414339	AATAATACAGCACATGGGTTAATTATAAATTTTATAGTTATACCAATTCIAATTGGTGGTTTTGGTAACTGGCTAC

Site# 159 /139800 Singleton: 68/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Name	Sequence
1. LM 1	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
2. LM 2	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
3. LM 3	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
4. LM 4	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
5. LM 6	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
6. LI	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
7. KY441719 P. arugamensis Penang	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
8. KY441720 Penang	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
9. KY441721 Penang	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
10. MW590479 Terengganu	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
11. MH299847 Bali	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
12. MW590422 Lombok	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
13. MW590444 Brunei	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
14. MW590454 Brunei	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
15. FM208110 Iran	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
16. DQ414344 Borneo	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
17. NC035308 Hainan	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
18. DQ414334	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
19. DQ414300	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
20. DQ414324	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT
21. DQ414339	GTACCTTAATAAATGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATACCAACCATCAAT

Site# 238 /139800 Singleton: 68/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

File Edit View Options Help

Site# 317 /139800 Singleton: 68/139800 21 taxa selected Data

Name	Sequence
1. LM 1	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
2. LM 2	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
3. LM 3	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
4. LM 4	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
5. LM 6	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
6. LI	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
7. KY441719 P. arugamensis Penang	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
8. KY441720 Penang	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
9. KY441721 Penang	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
10. MW590479 Terengganu	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
11. MH299847 Bali	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
12. MW590422 Lombok	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
13. MW590444 Brunei	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
14. MW590454 Brunei	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
15. FM208110 Iran	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
16. DQ414344 Borneo	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
17. NC035308 Hainan	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
18. DQ414334	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
19. DQ414300	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
20. DQ414324	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT
21. DQ414339	TAAATCTCTTTATCAATCGATTAAATGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTGAACAGTCTACCCACCAATATCAGCTAAAT

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

File Edit View Options Help

Site# 396 /139800 Singleton: 68/139800 21 taxa selected Data

Name	Sequence
1. LM 1	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
2. LM 2	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
3. LM 3	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
4. LM 4	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
5. LM 6	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
6. LI	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
7. KY441719 P. arugamensis Penang	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
8. KY441720 Penang	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
9. KY441721 Penang	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
10. MW590479 Terengganu	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
11. MH299847 Bali	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
12. MW590422 Lombok	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
13. MW590444 Brunei	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
14. MW590454 Brunei	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
15. FM208110 Iran	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
16. DQ414344 Borneo	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
17. NC035308 Hainan	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
18. DQ414334	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
19. DQ414300	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
20. DQ414324	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT
21. DQ414339	TATAGCTCATTCGGGCCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGAAATTCATCAATTTTAGGTCAT

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

WEGA C V P I S

Name	Sequence
1. LM 1	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
2. LM 2	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
3. LM 3	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
4. LM 4	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
5. LM 6	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
6. U	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
7. KY441719 P. arugamensis Penang	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
8. KY441720 Penang	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
9. KY441721 Penang	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
10. MW590479 Terengganu	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
11. MH299847 Bali	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
12. MW590422 Lombok	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
13. MW590444 Brunei	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
14. MW590454 Brunei	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
15. FM208110 Iran	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
16. DQ414344 Borneo	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
17. NC035308 Hainan	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A T G G G T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
18. DQ414334	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G T T G A A A G G C T T A A A A T T G A A C G T A T A T C G T T A T T T G T A T G A G C A G T
19. DQ414300	T T A A A T T T T A T T A C A C A A T T T T A A A T A T C G A T G A A A G G C T T A A A A T T G A A C G T A T A T C A T T A T T T G T T T G A G C A G T
20. DQ414324	T T A A A T T T T A T T A C A C T G T A A T T A A T A T C G A T G A G A G G G A T A A A A T T G A A C G A A T A C C T T A T T T G T A T G A G C T G T
21. DQ414339	T T A A A T T T T A T T A C A C T G T A A T T A A T A T C G A T G A G A G G A A T A A A A T T G A A C G A A T A C C T T A T T T G T A T G A G C T G T

Site# 475 / 139800 Singleton: 68/139800 21 taxa selected Data

M12: Sequence Data Explorer (seq baru.meg)

Data Display Search Groups Highlight Statistics Windows Help

WEGA C V P I S

Name	Sequence
1. LM 1	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A C T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
2. LM 2	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A C T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
3. LM 3	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A C T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
4. LM 4	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A C T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
5. LM 6	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A C T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
6. U	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A C T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
7. KY441719 P. arugamensis Penang	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
8. KY441720 Penang	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
9. KY441721 Penang	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
10. MW590479 Terengganu	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
11. MH299847 Bali	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
12. MW590422 Lombok	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
13. MW590444 Brunei	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
14. MW590454 Brunei	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A C T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
15. FM208110 Iran	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
16. DQ414344 Borneo	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
17. NC035308 Hainan	T A T T A A T T A C T G T T G T A T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C T G C T A T T A C A A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
18. DQ414334	T A T T A A T T A C T G T A G T A C T A T T A C T T T T A T C A T T A C C A G A T T A G C G C A G C A A T T A C T A T A T T A C T T A C A G A T C G T A A T
19. DQ414300	T A T T A A T T A C C G T A G T T T A T T A C T T T T A T C A T T A C C T G A T T A G C T G C T G C T A T T A C A T A C T T C T T A C A G A T C G T A A T
20. DQ414324	T A T T T A T T A C A G T A A T T T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C A G C A A T T A C A A T A C T A T T A A C A G A T C G A A A T
21. DQ414339	T A T T T A T T A C A G T A A T T T A T T A C T T T T A T C T T T A C C T G A T T A G C A G C A G C A A T T A C A A T A C T A T T A A C A G A T C G A A A T

Site# 554 / 139800 Singleton: 68/139800 21 taxa selected Data



Lampiran 15. Data morfometrik *P. arugamensis*

data mentah morfometrik - Excel

File Home Insert Draw Page Layout Formulas Data Review View Help Tell me what you want to do

Clipboard Font Alignment Number

Perhitungan morfometrik

Perhitungan morfometrik	Malaysia						Rata-rata	SD
	LM 1	LM 2	LM 3	LM 4	LM 5	LM 6		
Total panjang tubuh	9,27	7,55	8,01	8,01	6,75	6,20	7,63	0,98
Panjang tubuh	8,00	6,77	6,71	7,00	5,93	5,60	6,67	0,77
Lebar tubuh	0,64	0,66	0,61	0,65	0,85	0,69	0,68	0,08
Diameter anterior sucker	0,33	0,35	0,34	0,14	0,27	0,35	0,3	0,08
Diameter posterior sucker	0,18	0,18	0,14	0,38	0,28	0,40	0,26	0,1

data mentah morfometrik - Excel

File Home Insert Draw Page Layout Formulas Data Review View Help Tell me what you want to do

Clipboard Font Alignment Number

Perhitungan morfometrik

Perhitungan morfometrik	Indonesia						Rata-rata	SD
	LI 1	LI 2	LI 3	LI 4	LI 5	LI 6		
Total panjang tubuh	7,55	7,50	5,85	8,52	8,97	6,23	7,44	1,12
Panjang tubuh	7,36	6,62	5,47	7,63	7,47	5,42	6,66	0,92
Lebar tubuh	0,44	0,36	0,34	0,47	0,57	0,34	0,42	0,08
Diameter anterior sucker	0,37	0,21	0,11	0,38	0,32	0,15	0,26	0,11
Diameter posterior sucker	0,22	0,21	0,15	0,31	0,75	0,25	0,32	0,2

Lampiran 16. Komposisi nukleotida pada setiap basa nitrogen

MEGA-result0 [Compatibility Mode] - Excel

Domain	T(U)	C	A	G	Total
LM	39,32411674	15,0537634	30,4147465	15,2073733	651
LI	39,37984496	14,8837209	30,5426357	15,1937984	645
KY441719 P. arugamensis Penang	39,40345369	15,0706436	30,6122449	14,9136578	637
KY441720 Penang	39,40345369	14,9136578	30,6122449	15,0706436	637
KY441721 Penang	39,56043956	14,7566719	30,455259	15,2276295	637
MW590479 Terengganu	38,85350318	14,8089172	31,0509554	15,2866242	628
MH299847 Bali	39,46251768	14,427157	31,1173975	14,9929279	707
MW590422 Lombok	38,81789137	14,85623	30,8306709	15,4952077	626
MW590444 Brunei	39,24050633	14,7151899	30,8544304	15,1898734	632
MW590454 Brunei	39,05511811	14,8031496	31,023622	15,1181102	635
FM208110 Iran	39,52483801	13,6069114	31,3174946	15,5507559	463
DQ414344 Borneo	40,45112782	14,1353383	31,1278195	14,2857143	665
NC035308 Hainan	43,67922777	10,4325227	35,5423551	10,3458944	16161
DQ414334 P. amara Australia	39,15662651	14,9096386	31,0240964	14,9096386	664
DQ414300 Aestabdelia abditovesiculata USA	38,34586466	16,0902256	30,9774436	14,5864662	665
DQ414324 Myzobdella lugubris USA	40,15037594	14,4360902	31,4285714	13,9849624	665
DQ414339 Piscicolaria reducta USA	40,45112782	14,4360902	31,2781955	13,8345865	665
Avg.	42,02706288	12,1100709	33,749005	12,1138612	1551,94118

Nucleotide Composition

Ready Accessibility: Unavailable

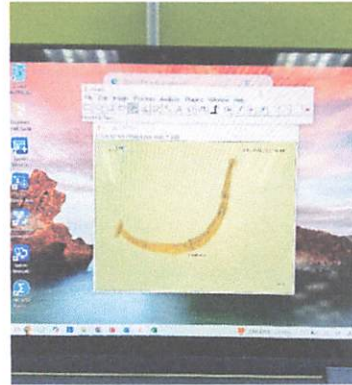
Search

Hari panas yang akan d..

Lampiran 17. Dokumentasi Penelitian



Pengambilan sampel lintah laut di Pusat Pembenihan dan Asuhan Ikan Marin



Pengamatan morfologi dan pengukuran morfometrik



Ekstraksi DNA



Pembuatan mastermix



Amplifikasi pada PCR



Pembuatan gel elektroforesis



Proses elektroforesis



Pemeriksaan hasil elektroforesis di gel dokumen



Pengiriman paket sampel untuk sekuensing DNA oleh pihak ketiga yaitu Perusahaan Sanger Sekuensing di Seri Kembangan, Selangor, Malaysia.