



**AMPLIFIKASI GEN CO1 IKAN PARI YANG
DIPERDAGANGKAN DI TPI TASIK AGUNG REMBANG
MENGUNAKAN EMPAT PASANG PRIMER**

Skripsi

diajukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Biologi

oleh

Nur Hidayah

4411416035

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
2020**

PERNYATAAN

Dengan ini, saya:

nama : Nur Hidayah

NIM : 4411416035

Program studi : Biologi

menyatakan bahwa skripsi berjudul *Amplifikasi Gen COI Ikan Pari yang Diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang Menggunakan Empat Pasang Primer* ini benar-benar karya saya sendiri bukan jiplakan dari karya orang lain atau pengutipan dengan cara-cara yang tidak sesuai dengan etika keilmuan yang berlaku baik sebagian atau seluruhnya. Pendapat atau temuan orang atau pihak lain yang terdapat dalam skripsi ini telah dikutip atau dirujuk berdasarkan kode etik ilmiah. Atas pernyataan ini, saya secara pribadi siap menanggung resiko/sanksi hukum yang dijatuhkan apabila ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam karya ini.

Semarang, 5 Juni 2020



Nur Hidayah

4411416035

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul *Amplifikasi Gen CO1 Ikan Pari yang Diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang Menggunakan Empat Pasang Primer* disusun oleh Nur Hidayah (NIM 4411416035) telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi FMIPA UNNES pada tanggal 5 Juni 2020 dan disahkan oleh panitia ujian.

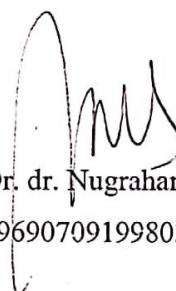
Semarang, 5 Juni 2020

Panitia

Sekretaris,



Ketua
Sugianto, M.Si.
196102191993031001



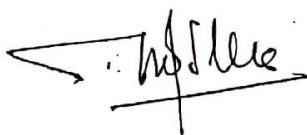
Dr. dr. Nugrahaningsih WH, M.Kes.
196907091998032001

Ketua penguji,



Dr. Partaya, M.Si.
196007071988031002

Anggota penguji/
Pembimbing I,



Dr. Ning Setiati, M.Si
195903101987032001

Anggota penguji/
Pembimbing II,



Prof. Dr. Priyantini Widiyaningrum, M.S.
196004191986102001

MOTTO

Padukanlah ikhtiar dan doa di setiap pekerjaan, dan akhirilah dengan tawakal.

PERSEMBAHAN

Untuk Bapak dan Ibu

PRAKATA

Puji syukur pada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan baik. Penulis telah banyak menerima bantuan, kerjasama, dan sumbangan pikiran dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang atas kesempatan yang diberikan untuk menempuh pendidikan di UNNES.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan ijin penelitian.
3. Ketua Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang yang membantu kelancaran administrasi dalam menyelesaikan tugas akhir.
4. Dr. Ning Setiati, M.Si selaku pembimbing dan ketua penelitian payung yang telah memberikan saran, arahan, dan masukan dalam menyelesaikan tugas akhir.
5. Dr. Partaya, M.Si. dan Prof. Dr. Ir. Priyantini Widiyaningrum, M. S. selaku penguji yang telah memberikan kritik dan saran untuk menyelesaikan tugas akhir.
6. Muhammad Abdullah, S.Si., M.Sc. selaku dosen wali penulis atas segala dukungan dan masukan.
7. Teman-teman yang mendukung dan membantu dalam pelaksanaan penelitian (Tim Penelitian Pari).
8. Bapak, Ibu, dan Kakakku atas segala pengorbanan, dukungan, dan doa.
9. Kekasihku tercinta atas segala bantuan, masukan, dan doa.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tugas akhir ini masih jauh dari kesempurnaan. Namun demikian, semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Semarang, 5 Juni 2020

Penulis

ABSTRAK

Hidayah, N. (2020). *Amplifikasi Gen CO1 Ikan Pari yang Diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang Menggunakan Empat Pasang Primer*. Skripsi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Pembimbing Dr. Ning Setiati, M.Si.

Kata kunci: amplifikasi, gen CO1, ikan pari, primer.

Ikan pari adalah ikan kelas Chondrichthyes yang masuk dalam *red list* IUCN. Ikan pari memberikan kontribusi ekonomi yang tinggi dimana dimanfaatkan untuk keperluan konsumsi, kesehatan, dan perdagangan. TPI Tasik Agung adalah tempat pelelangan ikan di Kabupaten Rembang yang berpotensi menghasilkan ikan pari cukup tinggi dengan produksi ikan pari yang selalu mengalami peningkatan sehingga dikhawatirkan menyebabkan ketersediaan di alam semakin terbatas. Perlu adanya upaya konservasi dengan identifikasi secara molekuler menggunakan gen CO1. Keberhasilan gen CO1 dalam mengidentifikasi spesies tidak lepas dari amplifikasi dalam teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Penggunaan primer FishF1, FishR1, FishF2, FishR2, dan HCO2198R untuk amplifikasi gen COI ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang belum pernah dilakukan, sehingga perlu dilakukan penelitian tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengamplifikasi gen CO1 ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang menggunakan empat pasang primer.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Riset FMIPA Unnes. Pengambilan sampel dilakukan di TPI Tasik Agung Rembang sebanyak 5 jenis ikan pari yaitu *Himantura gerrardi*, *Himantura uarnocoides*, *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali*, dimana masing-masing jenis diperoleh 1 ekor. Sampel diisolasi DNANYA menggunakan protokol dari *TIANamp Marine Animals DNA Kit*. DNA hasil isolasi diukur kuantitasnya menggunakan nano spektrofotometer dan diuji kualitasnya dengan elektroforesis. Amplifikasi DNA dilakukan melalui teknik PCR yang diawali dengan optimasi suhu *annealing* primer. Produk PCR divisualisasi menggunakan gel agarosa 2%. Data hasil penelitian berupa pita fragmen gen CO1 yang tampak pada hasil visualisasi gel agarosa 2% selanjutnya dianalisis secara deskriptif untuk mengambil simpulan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelima sampel memiliki kemurnian, konsentrasi, dan kualitas DNA cukup baik yang dapat digunakan untuk tahap amplifikasi. Hasil optimasi suhu *annealing* keempat pasang primer terdapat pada suhu 54°C. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa Gen COI ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang jenis *Himantura gerrardi* berhasil diamplifikasi oleh pasangan primer FishF1-FishR1, *Himantura uarnocoides* oleh pasangan primer FishF1-FishR1 dan FishF2-FishR2, *Himantura walga* oleh pasangan primer FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R, *Neotrygon kuhlii* oleh pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, dan FishF1-HCO2198R, dan *Rhinobatos penggali* oleh pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R.

DAFTAR ISI

	Halaman
PERNYATAAN.....	ii
PENGESAHAN	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA.....	v
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB	
I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Penegasan Istilah.....	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Morfologi Ikan Pari.....	7
2.2 Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Tasik Agung	8
2.3 Konservasi.....	8
2.4 Gen CO1 (<i>Cytochrome c Oxidase 1</i>)	9
2.5 Primer.....	12
2.6 Amplifikasi DNA dengan Teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	15
2.7 Elektroforesis	18
2.8 Spektrofotometri	19
2.9 Kerangka Pikir	20
III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.1 Subjek Penelitian	21
3.2 Variabel Penelitian.....	21
3.3 Hipotesis	21
3.4 Alat dan Bahan.....	22
3.5 Bagan Alir Penelitian	23
3.6 Prosedur Penelitian	24
3.6.1 <i>Pengambilan Sampel</i>	24
3.6.2 <i>Isolasi DNA</i>	24
3.6.3 <i>Kuantifikasi DNA Hasil Isolasi</i>	25
3.6.4 <i>Uji kualitas DNA Hasil Isolasi</i>	25
3.6.5 <i>Amplifikasi DNA</i>	25
3.6.6 <i>Visualisasi Produk PCR</i>	27
3.7 Metode Analisis Data.....	27
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil	28

4.1.1 Kuantitas dan Kualitas DNA Hasil Isolasi.....	28
4.1.2 Optimasi Suhu Annealing Primer.....	29
4.1.3 Amplifikasi DNA.....	31
4.2 Pembahasan.....	34
4.2.1 Kuantitas dan Kualitas DNA Hasil Isolasi.....	34
4.2.2 Optimasi Suhu Annealing Primer.....	36
4.2.3 Amplifikasi DNA.....	37
V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	42
5.2 Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA.....	43
LAMPIRAN.....	48

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1.1	Produksi Perikanan Laut Menurut Kabupaten di Jawa Tengah2
2.1	Data Produksi dan Nilai Produksi Ikan di TPI Tasik Agung8
2.2	Perbedaan Kode Genetik Genom Mitokondria dengan Genom Lain10
2.3	Perbedaan DNA Inti dan DNA Mitokondria.....10
2.4	Primer Universal untuk Amplifikasi Gen CO114
3.1	Jenis Ikan Pari Pada Subjek Penelitian21
3.2	Alat Penelitian22
3.3	Bahan Penelitian.....22
3.4	Primer yang Digunakan Pada Penelitian26
3.5	Komposisi <i>Cocktail</i> PCR26
3.6	Program PCR.....26
4.1	Konsentrasi dan Kemurnian DNA Hasil Isolasi28

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi Ikan Pari	7
2.2 Pemetaan Genom DNA Mitokondria <i>Himantura gerrardi</i>	11
2.3 Amplifikasi DNA Secara <i>In Vitro</i> dengan Teknik PCR	17
2.4 Kerangka Pikir Penelitian.....	20
3.1 Bagan Alir Tahapan Pelaksanaan Penelitian.....	23
4.1 Hasil Elektroforesis DNA Hasil Isolasi	29
4.2 Hasil Elektroforesis Optimasi Suhu <i>Annealing</i> Primer.....	30
4.3 Visualisasi Produk PCR oleh Pasangan Primer FishF1-FishR1	31
4.4 Visualisasi Produk PCR oleh Pasangan Primer FishF2-FishR2	32
4.5 Visualisasi Produk PCR oleh Pasangan Primer FishF1-HCO2198R.....	33
4.6 Visualisasi Produk PCR oleh Pasangan Primer FishF2-HCO2198R.....	33
4.7 Posisi Penempelan Primer Pada Gen CO1	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Pengambilan Sampel di TPI Tasik Agung Rembang	48
2 Jenis-Jenis Ikan Pari yang Digunakan Pada Penelitian	49
3 Isolasi DNA	50
4 Kuantifikasi dan Amplifikasi DNA	52
5 Status Konservasi Ikan Pari di Pulau Jawa Berdasarkan Data <i>International Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i> (IUCN)	53

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan sumberdaya alam yang melimpah, salah satunya pada sektor sumberdaya laut yang memiliki biodiversitas yang sangat tinggi. Salah satu biota dengan diversitas jenisnya yang tinggi yaitu ikan pari. Ikan pari adalah ikan yang masuk dalam kelas Chondrichthyes atau ikan bertulang rawan. Secara umum ikan pari memiliki ekor yang menyerupai cambuk dengan bentuk tubuh pipih dan gepeng melebar (*depressed*). Ikan pari memiliki penyebaran habitat yang sangat luas dari dangkalan perairan pantai hingga ke lautan dalam.

Berdasarkan data *Southeast Asian Fisheries Development Center* (SEAFDEC) (2018), jumlah produksi ikan pari di Indonesia pada tahun 2016 mencapai 26.371 ton untuk famili *Dasyatidae*, 3.711 ton untuk famili *Myliobatidae*, dan 5.436 ton untuk famili *Mobulidae*. Nelayan memanfaatkan ikan pari untuk keperluan konsumsi dan perdagangan, seperti pemanfaatan kulit ikan pari untuk bahan industri kerajinan tas kulit, sepatu, gelang, dompet, ikat pinggang, dan sebagainya (Arlyza, 2013). Daging ikan pari selain digunakan sebagai bahan konsumsi, minyaknya dapat digunakan sebagai bahan baku farmasi serta tulangnya untuk bahan baku lem (Madduppa *et al*, 2016). Menurut Riyanto *et al* (2013) jaringan tulang rawan pari mengandung glikosaminoglikan yang dimanfaatkan dalam terapi osteoarthritis atau untuk kesehatan persendian.

Pemanfaatan ikan pari jika tidak diimbangi dengan upaya konservasi dapat menyebabkan terjadinya penurunan populasi dan jenisnya secara cepat dan memerlukan waktu yang lama untuk pulih kembali. Berdasarkan data *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) dari 28 spesies ikan pari di Jawa, 3 spesies kategori *critically endangered*, 6 spesies kategori *endangered*, 7 spesies *vulnerable*, 3 spesies termasuk *near threatened*, 3 spesies *least concern*, dan 6 spesies kategori data *deficient* (data selengkapnya dimuat pada Lampiran 2). Fakta tersebut semakin diperparah sehubungan dengan karakteristik biologinya, dimana tingkat pertumbuhan dan kematangan yang lambat serta

fekunditas ikan pari yang relatif rendah (Wijayanti *et al*, 2018), sehingga perlu dilakukan upaya konservasi untuk menjaga keberlanjutannya.

Berdasarkan data Badan Pusat Statistik Provinsi Jawa Tengah (2020), Kabupaten Rembang memiliki produksi perikanan laut paling besar dibandingkan dengan Kabupaten lain di Jawa Tengah pada tahun 2016-2017. Data tersebut disajikan pada Tabel 1.1 berikut:

Tabel 1.1 Produksi Perikanan Laut Menurut Kabupaten di Jawa Tengah

Kabupaten/Kota	Produksi (Ton)	
	2016	2017
Kabupaten Cilacap	13188	22120.06
Kabupaten Kebumen	1265	3248.55
Kabupaten Purworejo	52	9.51
Kabupaten Wonogiri	85	0.92
Kabupaten Rembang	70037	136358.77
Kabupaten Pati	54489	34216.48
Kabupaten Jepara	7804	232.01
Kabupaten Demak	16424	3060.91
Kabupaten Kendal	1471	3479.17
Kabupaten Batang	27281	6812.39
Kabupaten Pekalongan	5257	15493.89
Kabupaten Pemalang	29184	12086.53
Kabupaten Tegal	1457	130312.23
Kabupaten Brebes	8519	700.85

(Badan Pusat Statistik Provinsi Jawa Tengah, 2020)

TPI Tasik Agung adalah tempat pelelangan ikan yang ada di Kabupaten Rembang wilayah pantai utara Jawa Tengah yang berpotensi menghasilkan ikan pari cukup tinggi dibandingkan dengan pantai selatan. Hal tersebut dikarenakan kawasan pantai utara berhadapan dengan perairan yang memiliki kondisi energi gelombang yang rendah oleh tiupan angin lokal (*wind sea*) Laut Jawa, sementara kawasan pantai selatan berhadapan dengan perairan berenergi gelombang yang tinggi karena badai (*swell*) yang datang dari Samudera Hindia (Setyawan & Pamungkas, 2017). Rendahnya gelombang laut di pantai utara tersebut sangat cocok dengan habitat yang disenangi ikan pari yaitu di perairan tenang dengan gelombang laut yang rendah.

Koordinator TPI Tasik Agung Rembang menjelaskan bahwa perdagangan ikan pari di TPI Tasik Agung Rembang dimulai dari pendaratan ikan melalui proses pembongkaran, penyortiran, dan pengangkutan. Ikan pari yang diangkut ke TPI akan dilakukan pelelangan kemudian diperdagangkan ke berbagai wilayah dan luar negeri. Ikan pari termasuk komoditas ekspor dan telah memberikan kontribusi ekonomi yang tinggi bagi masyarakat, dimana kulit ikan pari yang dibuat kerajinan memiliki nilai jual yang sangat tinggi. Tingginya nilai jual ikan pari mengakibatkan pemanfaatan dan permintaan pasar meningkat sehingga produksi juga meningkat meskipun sudah terdapat papan informasi mengenai larangan untuk tidak menangkap dan menjual ikan pari tertentu.

Produksi ikan pari hasil tangkapan nelayan yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang pada bulan Agustus 2019 sampai bulan Desember 2019 selalu mengalami peningkatan. Pada bulan Agustus produksi ikan pari sebesar 413 kg, meningkat pada bulan September sebesar 497 kg, sebesar 569 kg pada bulan Oktober, meningkat lagi sebesar 576 kg pada bulan November, dan sebesar 648 kg pada bulan Desember (TPI Tasik Agung, 2020). Produksi yang terus meningkat ini dikhawatirkan menyebabkan ketersediaan di alam semakin terbatas. Disamping produksi yang terus meningkat, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Novi & Setiati (2019) menyebutkan bahwa ikan pari hasil tangkapan nelayan yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung jenisnya sedikit, meliputi *Dasyatis kuhlii*, *Gymnura micrura*, dan *Rhynchobatus australiae*. Berdasarkan data tersebut maka dibutuhkan upaya konservasi untuk menjaga keberlanjutannya.

Informasi mengenai jenis ikan pari sangat penting diketahui karena rencana konservasi tanpa pengetahuan yang memadai tentang jenisnya mengarah pada eksploitasi berlebihan dan pengurangan signifikan dalam keanekaragaman ikan pari. Teknik yang dapat digunakan untuk mengetahui jenis ikan pari secara akurat dan cepat adalah identifikasi dengan teknik molekuler. Menurut Wehantouw *et al* (2017), teknik molekuler dapat membantu keberlanjutan dunia hayati yang semakin terancam karena minimnya informasi genetik membuat spesies dikhawatirkan punah sebelum dikenali. Efektifitas teknik molekuler sangat penting untuk konservasi sumberdaya genetik suatu spesies dengan tingkat akurasi yang tinggi dalam upaya kelestarian makhluk hidup.

Keunggulan teknik molekuler dibandingkan dengan teknik konvensional yaitu: (1) Beberapa spesies memiliki karakteristik morfologi eksternal yang sangat mirip. Oleh karena itu, sulit untuk membedakan mereka satu sama lain hanya dengan karakteristik morfologi. Teknik molekuler dapat membantu membedakan spesies tersebut secara akurat; (2) Perbedaan morfologi dapat sangat bervariasi selama berbagai tahap perkembangan, tetapi individu pada tahap perkembangan yang berbeda dapat diidentifikasi dengan teknik molekuler; dan (3) Teknik molekuler dapat memungkinkan untuk penemuan spesies samar. Menggunakan teknik molekuler, jarak evolusi molekuler yang besar antara spesies-spesies ini dapat terungkap (Bingpeng *et al*, 2018).

Teknik molekuler menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) banyak digunakan untuk identifikasi spesies. Beberapa keunggulan DNA mitokondria diantaranya sangat efisien dengan 93% mewakili wilayah pengkodean (Chinnery & Hudson, 2013), pewarisan secara maternal (Sharma & Sampath, 2019), tingkat mutasi tinggi (Susanti *et al*, 2018), dan replikasi yang berlangsung terus menerus (Muthiadin *et al*, 2018). DNA mitokondria digunakan secara luas pada studi genetika populasi, identifikasi spesies, identifikasi penyakit, filogeni kedokteran hewan, dan sebagainya (Wibowo *et al*, 2013).

Salah satu gen pada DNA mitokondria yang paling populer digunakan untuk identifikasi yaitu gen *Cytochrome c oxidase 1* (CO1). Gen CO1 telah terbukti mengungkap identitas spesies, pola filogeni dan keanekaragaman genetik spesies air (Tan *et al*, 2019). Keberhasilan gen CO1 dalam identifikasi spesies ikan pari telah ditunjukkan dalam beberapa penelitian, seperti yang telah dilakukan oleh Cerutti-Pereyra *et al* (2012) di Australia Barat dan Puckridge *et al* (2013) di Indonesia pasifik bagian barat. Selain itu, gen CO1 juga digunakan untuk identifikasi ikan pari di beberapa wilayah di Indonesia seperti yang telah dilakukan oleh Madduppa *et al* (2016) di tempat pelelangan ikan di Palabuhan Ratu, Muara Saban, dan Lampung.

Keberhasilan gen CO1 dalam mengidentifikasi spesies tidak lepas dari amplifikasi gen tersebut dalam teknik *polymerase chain reaction* (PCR). PCR adalah teknik untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan kopi sekuen DNA secara *in vitro*. Teknik ini menggunakan metode enzimatik

yang diperantarai primer (Hewajuli & Dharmayanti, 2014). Primer universal seringkali berhasil mengamplifikasi banyak kelompok hewan, akan tetapi primer tersebut gagal mengamplifikasi gen CO1 berbagai kelompok hewan lainnya seperti pada kelas Chondrichthyes. Dalam penelitian Ward *et al* (2005) berhasil menggunakan primer FishF1, FishR1, FishF2, dan FishR2 untuk amplifikasi gen CO1 ikan pari di Australia dan digunakan variasi primer HCO2198R pada penelitian Ward *et al* (2008) yang berhasil digunakan untuk amplifikasi gen CO1 ikan pari di Australasia. Demikian juga dalam penelitian Holmes *et al* (2009), pasangan primer tersebut berhasil mengamplifikasi ikan pari di perairan Australia. Dalam penelitian Peloa *et al* (2015), pasangan primer FishF1-HCO2198R berhasil mengamplifikasi 1 dari 4 sampel kelas Chondrichthyes di desa Tumbak, Minahasa Utara. Cerutti-Pereyra *et al*, (2012) juga berhasil menggunakan pasangan primer FishF2 dan FishR2 untuk amplifikasi gen CO1 ikan pari di Australia barat.

Penelitian dan kajian mengenai penggunaan primer FishF1, FishR1, FishF2, FishR2 dan HCO2198R untuk amplifikasi gen CO1 ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan amplifikasi gen CO1 ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang menggunakan empat pasang primer tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan maka dapat dirumuskan masalah penelitian : Apakah gen CO1 ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang dapat di amplifikasi menggunakan empat pasang primer?

1.3 Penegasan Istilah

1. Amplifikasi pada penelitian ini adalah proses melipatgandakan fragmen gen CO1 dari DNA mitokondria ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang secara *in vitro* dengan teknik PCR menggunakan empat pasang primer.
2. Gen CO1 pada penelitian ini adalah fragmen dari genom mitokondria pada ikan pari dengan panjang sekitar 1500 bp untuk di amplifikasi pada sebagian gennya

dengan panjang produk amplifikasi bergantung pada pasangan primer yang digunakan.

3. Ikan pari adalah ikan bertulang rawan kelas Chondrichthyes. Pada penelitian ini ikan pari yang digunakan diperoleh di TPI Tasik Agung Rembang sebanyak 5 jenis yaitu *Himantura gerrardi*, *Himantura uarnocoides*, *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali*.
4. TPI Tasik Agung adalah tempat pelelangan ikan yang ada di Kabupaten Rembang Jawa Tengah, dimana produksi perikanan lautnya selalu meningkat dengan salah satu jenis ikan yang diperdagangkan adalah ikan pari.
5. Primer adalah rangkaian basa nukleotida dengan panjang berkisar 18-30 basa yang akan melekat pada sekuen yang komplemen dan mengapit sekuen spesifik yang akan diamplifikasi. Pasangan primer yang digunakan pada penelitian ini adalah FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengamplifikasi gen CO1 ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang menggunakan empat pasang primer.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dalam penelitian ini adalah:

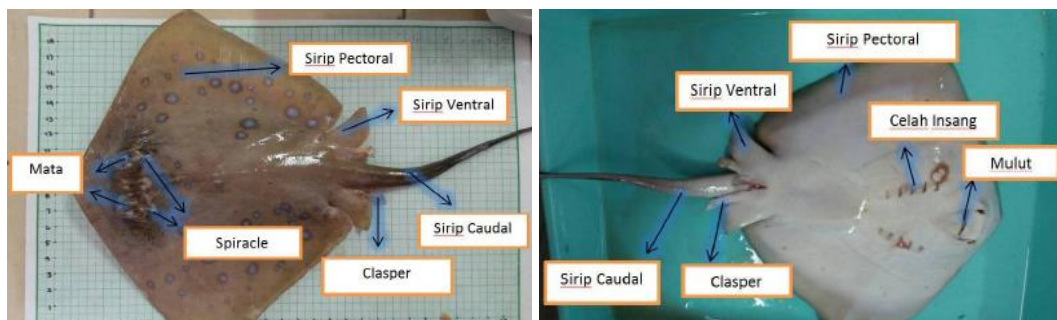
1. Memberikan informasi mengenai pasangan primer yang dapat mengamplifikasi gen CO1 ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang.
2. Sebagai langkah awal penelitian identifikasi molekuler gen CO1 ikan pari yang nantinya dapat digunakan sebagai upaya konservasi ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang.
3. Menambah bahan referensi dan sebagai ilmu pengetahuan terbaru yang berhubungan dengan amplifikasi gen CO1.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Morfologi Ikan Pari

Ikan pari merupakan kelompok ikan bertulang rawan kelas Chondrichthyes. Ikan pari dilengkapi ekor panjang seperti cambuk dengan beberapa jenis ikan pari pada dasar ekornya terdapat satu sampai lima duri tajam. Keberadaan duri tersebut yang membuat ikan pari disebut sebagai ikan *sting rays* atau ikan duri penyengat (Puckridge *et al*, 2013). Ikan pari yang dilengkapi dengan duri penyengat seperti pada spesies *Manta japonica*, sedangkan spesies tanpa duri penyengat seperti pada spesies *Manta tarapacana* (FAO, 2014). Morfologi ikan pari dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi Ikan Pari

Secara umum ikan pari memiliki bentuk tubuh pipih dan gepeng melebar (*depressed*) sehingga sirip dada menyerupai piringan cakram yang lebarnya dapat mencapai dua kali atau lebih dari panjangnya. Kepala ikan pari cenderung menonjol dan mata terletak di bagian samping kepala, seperti pada famili Dasyatidae. Famili Mobulidae, kepala tidak menonjol dari sirip dada dan mata terletak pada tingkat yang sama atau di bawah sirip dada. Bagian belakang mata terdapat lubang yang berfungsi untuk bernafas. Udara hasil pernafasan dibuang melalui celah insang yang berjumlah lima sampai enam pasang dan terdapat di sisi kepala bagian ventral. Setiap sisi kepala tanpa tanduk memanjang seperti pada spesies *Pteroplatytrygon violacea*, sedangkan spesies dengan tanduk memanjang seperti pada *Manta alfredi* (FAO, 2014).

2.2 Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Tasik Agung

Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Tasik Agung adalah salah satu tempat pelelangan ikan yang ada di Desa Tasik Agung, Kecamatan Rembang, Kabupaten Rembang, Jawa Tengah. Secara geografis terletak di antara 111°00-111°30 BT dan 6°30-7°30 LS.

Berdasarkan data dari TPI Tasik Agung (2020), produksi dan nilai produksi ikan yang diperdagangkan di TPI tersebut meningkat dari tahun 2018 ke tahun 2019 (Tabel 2.1). Jenis ikan yang diperdagangkan meliputi ikan telo, ekor kuning, petek, manyung, togek, pari, demang kunting, kerapu, kapasan, balak, abangan, badong, dan lain-lain. Alat tangkap yang digunakan adalah *purse seine*, payang/jabur, dan bundes/krikrit.

Tabel 2.1 Data Produksi dan Nilai Produksi Ikan di TPI Tasik Agung

No	Tahun	Produksi (Kg)	Nilai produksi (Rp)
1.	2018	10.225.333	63.054.540.000
2.	2019	71.733.600	70.428.400.000

(TPI Tasik Agung, 2020)

2.3 Konservasi

Konservasi adalah melestarikan daya dukung, mutu, fungsi, dan kemampuan lingkungan secara seimbang. Tujuan konservasi yaitu (1) mewujudkan kelestarian sumberdaya alam hayati serta keseimbangan ekosistemnya, sehingga dapat lebih mendukung upaya peningkatan kesejahteraan dan mutu kehidupan manusia, dan (2) melestarikan kemampuan dan pemanfaatan sumberdaya alam hayati dan ekosistemnya secara serasi dan seimbang (Rachman, 2012). Konsep yang berkembang adalah konservasi terkait sumberdaya alam dan lingkungan. Konservasi ini dapat dipandang dari ekonomi dan ekologi. Konservasi dari segi ekonomi berarti memanfaatkan SDA untuk memenuhi kebutuhan sekarang. Dari segi ekologi, konservasi merupakan pemanfaatan SDA untuk memenuhi kebutuhan masa sekarang dan masa yang akan datang. Menurut ilmu lingkungan konservasi adalah suatu upaya efisiensi penggunaan energi, produksi, transmisi, atau distribusi yang mengakibatkan konsumsi energi berkurang (Retnoningsih *et al*, 2018).

Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 60 Tahun 2007 Tentang Konservasi Ikan menjelaskan konservasi jenis ikan adalah upaya melindungi,

melestarikan, dan memanfaatkan sumberdaya ikan, untuk menjamin keberadaan, ketersediaan, dan kesinambungan jenis ikan bagi generasi sekarang maupun yang akan datang. Konservasi jenis ikan dilakukan dengan tujuan untuk melindungi jenis ikan yang terancam punah, mempertahankan keanekaragaman jenis ikan, memelihara keseimbangan dan kemantapan ekosistem, dan memanfaatkan sumberdaya ikan secara berkelanjutan.

Ikan pari sangat rentan dan populasinya mengalami penurunan secara signifikan, bahkan beberapa spesies terancam punah. Oleh karena itu penting untuk dilakukan konservasi. Sesuai yang dijelaskan dalam pasal 22 Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 60 Tahun 2007, konservasi jenis ikan dapat dilakukan melalui penggolongan jenis ikan, penetapan status perlindungan jenis ikan, pemeliharaan, pengembangbiakan, penelitian, dan pengembangan.

2.4 Gen CO1 (*Cytochrome c Oxidase I*)

Gen CO1 (*Cytochrome c oxidase 1*) adalah fragmen dari genom DNA mitokondria (mtDNA) dengan panjang sekitar 1500 bp. DNA mitokondria (mtDNA) adalah genom sirkular beruntai ganda dengan panjang bervariasi antara spesies (15.000-17.000 bp) (Chinnery & Hudson, 2013). Struktur beruntai ganda dari mtDNA berdasarkan komposisi nukleotidanya terdiri dari *heavy strand* (H) yang kaya guanin dan *light strand* (L) yang kaya sitosin (Sharma & Sampath, 2019). MtDNA mengandung 37 gen, 28 pada untai H dan 9 pada untai L. Tiga belas gen menyandikan satu komponen polipeptida dari mitokondria rantai respirasi, tempat produksi energi seluler melalui fosforilasi oksidatif (OXPHOS). Dua puluh empat gen mengkode produk RNA: 22 molekul tRNA mitokondria, rRNA 16 s (subunit ribosom besar) dan rRNA 12 s (subunit ribosom kecil) (Chinnery & Hudson, 2013). MtDNA mengkodekan 13 polipeptida dari OXPHOS yang terlokalisasi ke membran dalam mitokondria. Ini termasuk tujuh subunit kompleks I (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5, dan ND6), satu subunit kompleks III (Cytochrome b), tiga subunit kompleks IV (COI, COII, dan COIII), dan dua kompleks V (ATPase 6 dan ATPase 8) (Mposhi *et al*, 2017), yang semuanya diperlukan untuk pembentukan ATP oleh fosforilasi oksidatif. Sebagian besar protein mitokondria dikodekan oleh

genom inti dan diimpor ke mitokondria oleh sistem translokasi yang terlokalisasi ke membran mitokondria luar dan dalam (Sharma & Sampath, 2019).

Menurut Albert *et al* (2015), perbedaan genom mitokondria dengan genom lain yaitu:

1. Genom mitokondria sangat efisien dengan 93% mewakili wilayah pengkodean. Sebagian besar gen berdekatan, dipisahkan oleh satu atau dua pasangan basa *non-coding*. Genom mitokondria hanya berisi satu daerah *non-coding* yang dikenal sebagai daerah *D-loop* (*displacement loop*). *D-loop* berisi situs inisiasi replikasi genom mitokondria (asal sintesis untai H) dan juga merupakan situs dari kedua promotor transkripsi untai H (HSP1 dan HSP2) (Chinnery & Hudson, 2013)
2. Sebanyak 30 atau lebih tRNAs menentukan asam amino dalam genom sitosol dan kloroplas, sedangkan dalam genom mitokondria hanya 22 tRNAs yang diperlukan untuk sintesis protein mitokondria
3. Kode genetik genom mitokondria berbeda dari genom lain: 4 dari 64 kodon memiliki makna yang berbeda dari kodon yang sama pada genom lain. Perbedaan kode genetik genom mitokondria dengan genom lain menurut Albert *et al* (2015) dapat dilihat pada Tabel 2.2:

Table 2.2 Perbedaan Kode Genetik Genom Mitokondria dengan Genom Lain

Kodon	Kode umum	Kode Mitokondria			
		Mamalia	Invertebrata	Yeast	Tumbuhan
UGA	STOP	Trp	Trp	Trp	STOP
AUA	Ile	Met	Met	Met	Ile
CUA	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu
AGA	Arg	STOP	Ser	Arg	Arg
AGG					

(Albert *et al*, 2015)

Beberapa perbedaan DNA mitokondria dengan DNA inti menurut Nunnari & Suomalainen (2012) disajikan pada Tabel 2.3:

Tabel 2.3 Perbedaan DNA Inti dan DNA Mitokondria

Sifat	DNA Inti	DNA Mitokondria
Ukuran (bp)	$\sim 3 \times 10^9$	16.569
Bentuk	<i>Linear double helix</i>	<i>Circular double helix</i>
Pewarisan	Kedua orang tua	Maternal

besi pada *cytochrome* berada pada keadaan yang bergantian antara teroksidasi (Fe^{3+}) dan tereduksi (Fe^{2+}) dalam rantai transpor elektron pada proses fosforilasi oksidatif di mitokondria. Berdasarkan struktur hem yang diikat, *cytochrome* dibagi atas *cytochrome a*, *b*, dan *c* (Kadri, 2012). *Cytochrome c oksidase* dianggap sebagai enzim terminal dalam rantai transpor elektron respirasi mitokondria. Enzim bekerja di membran mitokondria bagian dalam. Subunit I *cytochrome c oksidase* (COI, COI, CCOI, COX1 atau MT-CO1) adalah salah satu dari tiga subunit DNA mitokondria (mtDNA) (Susanti *et al*, 2018).

Gen COI adalah gen yang sering digunakan untuk mengidentifikasi spesies hewan karena laju mutasinya cepat untuk membedakan spesies yang terkait erat. Gen ini memiliki tingkat evolusi yang cepat untuk memungkinkan diskriminasi tidak hanya spesies yang terkait erat tetapi juga kelompok filogenografi dalam satu spesies tunggal (Susanti *et al*, 2018). Gen COI sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuennya, serta banyak bagian yang bersifat *conserve* (lestari). Susunan asam amino dari protein yang disandi gen COI jarang mengalami substitusi sehingga gen COI bersifat stabil dan dapat digunakan sebagai analisis filogeni, namun basa-basa pada triple kodonnya masih berubah dan bersifat *silent* yaitu perubahan basa yang tidak merubah jenis asam amino. Hal ini membuat COI dianggap efektif untuk merekonstruksi filogenetik dalam bidang evolusi bahkan di bawah tingkat spesies (Wirdateti *et al*, 2016).

2.5 Primer

Primer adalah rangkaian basa nukleotida yang komplemen pada template sehingga tidak terdapat pada lokasi lain pada template. Primer yang digunakan ada dua, yaitu: (1) oligonukleotida yang mempunyai sekuen identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat, dan (2) oligonukleotida yang mempunyai sekuen identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain. Menurut Sasmito *et al* (2014), primer yang baik ditentukan oleh beberapa karakter, antara lain:

1. Panjang primer

Panjang primer berkisar 18-30 basa. Primer dengan panjang lebih dari 30 basa tidak disarankan, karena tidak menunjukkan spesifisitas yang lebih tinggi.

Selain itu, primer yang panjang dapat berakibat terhibridasi dengan primer lain sehingga tidak membentuk polimerisasi DNA

2. *Primer Melting Temperature (T_m)*

Primer Melting Temperature (T_m) atau suhu leleh merupakan temperatur yang diperlukan oleh primer untuk mengalami disosiasi/lepas ikatan dengan DNA template. Cara termudah menghitung untuk mendapatkan suhu leleh adalah menggunakan rumus sederhana $T_m = [(G+C) \times 4] + [(A+T) \times 2]$.

3. *Primer Annealing Temperature (T_a)*

Primer Annealing Temperature (T_a) merupakan suhu yang diperkirakan agar primer dapat berkaitan dengan template secara stabil. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer sehingga menghasilkan produk PCR yang kurang efisien. Sebaliknya, suhu *annealing* yang terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA di tempat yang tidak spesifik. Menurut Fatchiyah *et al* (2011), suhu *annealing* biasanya 5°C dibawah T_m primer yang sebenarnya.

4. *Selisih Primer Melting Temperature (ΔT_m)*

Pasangan primer dengan selisih suhu leleh yang lebih dari 5°C menyebabkan penurunan proses amplifikasi, bahkan memungkinkan tidak terjadi proses amplifikasi.

5. *GC Content*

Presentase basa G dan C pada primer antara 40% hingga 60%.

6. *GC Clamp*

Primer harus tidak boleh memiliki lebih dari 3 basa G atau C pada 5 basa terakhir ujung 3' karena ujung 3'-nya bisa melipat membentuk struktur dimer yang mengakibatkan ujung 3' primer tidak terikat pada template.

7. *Secondary Structures*

Jenis *secondary structures* yang menyebabkan primer tidak dapat menempel dengan template DNA yaitu:

- a. *Loop/Hairpin*, yaitu struktur yang dibentuk oleh basis pasangan asam polinukleat antara urutan komplementer untai tunggal DNA.
- b. *Self Dimer* dan *Cross Dimer*

Primer yang berikatan dengan primer lainnya yang sejenis disebut dengan *self dimer*. Primer yang berikatan dengan primer pasangannya (reverse dan forward) disebut dengan *cross dimer*.

8. *Self Complementary (SC) dan Pair Complementary*

Complementary pada primer dan pasangan primer harus dihindari, karena *self complementary* dapat menyebabkan struktur hairpin dan *pair complementary* dapat menyebabkan struktur dimer.

9. *Repeat dan Runus*

Pengulangan satu jenis basa yang cukup panjang (*runus*) harus dihindari karena dapat menyebabkan terjadinya *breathing* pada primer dan *mispirming*.. Primer sebaiknya juga tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa lebih dari 4 kali (*repeat*), karena dapat menyebabkan struktur *hairpin*.

Primer universal adalah suatu primer yang komplementer dengan suatu sekuen nukleotida yang umum terdapat dalam banyak molekul DNA sehingga dapat berhibridasi dengan bermacam-macam DNA cetakan (Yuwono, 2006). Primer universal yang digunakan untuk amplifikasi gen CO1 diantaranya disajikan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Primer Universal untuk Amplifikasi Gen CO1

No.	Nama	Lokasi sampel	Primer
1.	Ikan hias	Kanada	FishF1, FishR1
2.	Chondrichthyes	Australasia	FishF1, FishR1, HCO2198
3.	Ikan laut	Jepang	FishF1, FishR1
4.	Ikan air tawar	Brazil	FishF1, FishR1
5.	Ikan mas	China	FishF1, FishR1, FishF2, FishR2

(Intiaz *et al*, 2017)

Penggunaan beberapa pasangan primer untuk amplifikasi gen CO1 ikan telah berhasil digunakan oleh beberapa peneliti, yaitu:

1. Primer FishF1 dan FishR1. Posisi penempelan primer ini pada gen CO1 adalah pada basa ke 6475 sampai basa ke 7126 (Ivanova *et al*, 2007). Primer ini digunakan oleh banyak peneliti dalam identifikasi kebanyakan hewan air seperti identifikasi ikan teleosts dan Chondrichthyes di Laut Australia oleh Ward *et al* (2005). Ward *et al* (2008) menggunakan primer ini untuk identifikasi Chondrichthyes di Australasia. Dalam penelitian Holmes *et al* (2009), pasangan primer tersebut digunakan untuk identifikasi ikan pari dan

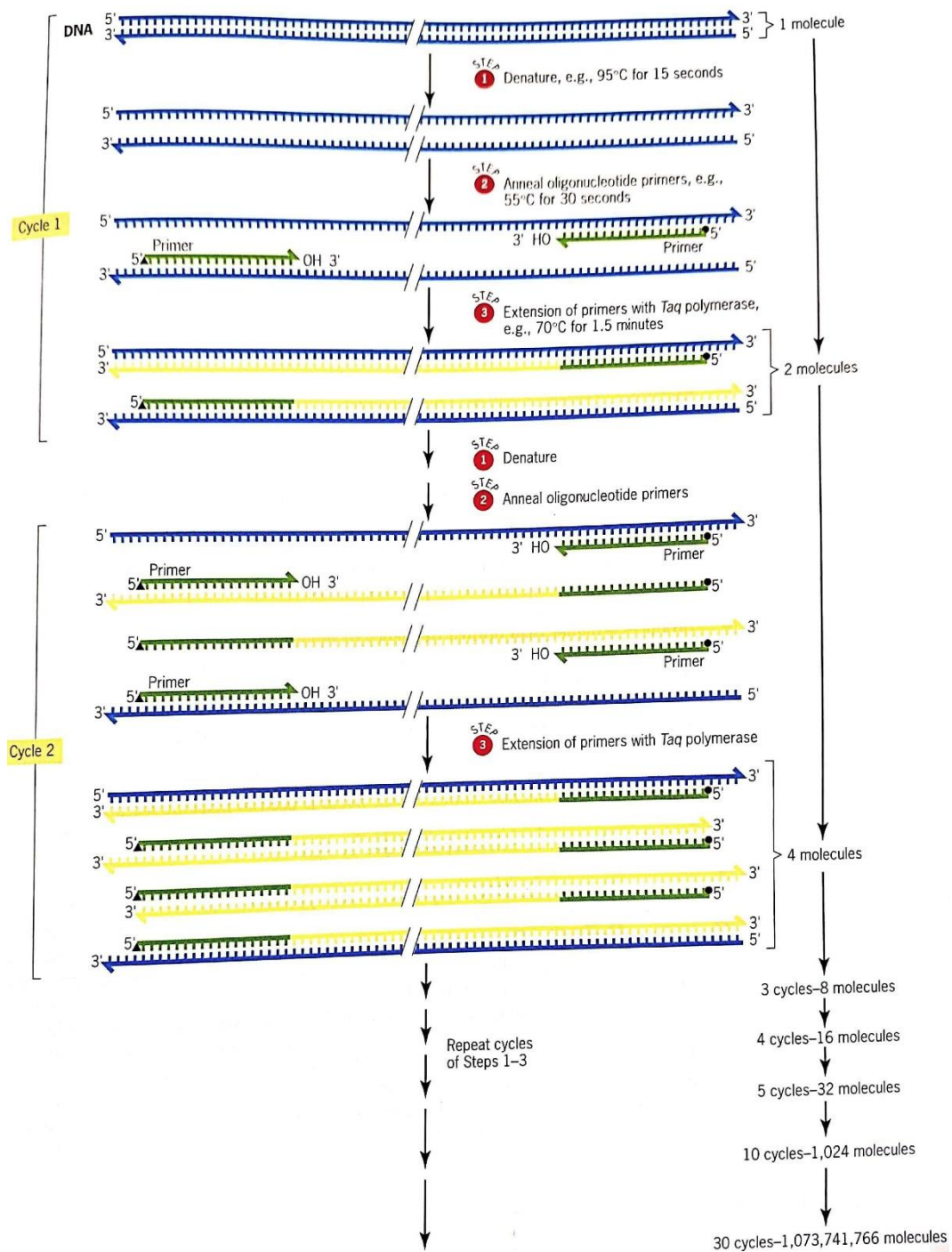
ikan hiu di perairan Australia. Fahmi *et al* (2017) menggunakan primer ini sebagai DNA *barcoding* gen CO1 ikan hias di kawasan Bandung dan Jakarta. Bingpeng *et al* (2018) menggunakan primer ini untuk identifikasi beberapa spesies ikan di Selat Taiwan. Setiati *et al* (2020) juga menggunakan primer ini dan berhasil mengamplifikasi 4 dari 5 sampel ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang.

2. Primer FishF2 dan FishR2. Posisi penempelan primer ini pada gen CO1 adalah pada basa ke 6474 sampai basa ke 7127 (Ivanova *et al*, 2007). Primer ini telah digunakan oleh Ward *et al* (2005), Ward *et al* (2008), Holmes *et al* (2009), Fahmi *et al* (2017), Bingpeng *et al* (2018), dan Setiati *et al* (2020). Cerutti-Pereyra *et al* (2012) juga menggunakan primer ini untuk identifikasi ikan pari di Australia barat. Demikian juga Zhang & Hanner (2011) yang menggunakan primer ini untuk identifikasi ikan di Laut Jepang Selatan.
3. Primer FishF1 dan HCO2198R. Posisi penempelan primer ini pada gen CO1 adalah pada basa ke 6475 sampai basa ke 7123 (Ajamma *et al*, 2016). Primer ini telah digunakan oleh Ward *et al* (2008) dan Holmes *et al* (2009). Peloa *et al* (2015) menggunakan primer ini untuk amplifikasi Chondrichthyes di desa Tumbak, Minahasa Utara.
4. Primer FishF2 dan HCO2198R. Posisi penempelan primer ini pada gen CO1 adalah pada basa ke 6475 sampai basa ke 7123 (Ajamma *et al*, 2016). Primer ini telah digunakan oleh Ward *et al* (2008) dan Holmes *et al* (2009).

2.6 Amplifikasi DNA dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan kopi sekuen DNA secara *in vitro*. Prinsip dasar PCR adalah sekuen DNA spesifik diamplifikasi menjadi dua kopi selanjutnya menjadi empat kopi dan seterusnya. Teknik ini menggunakan metode enzimatik yang diperantarai primer (Hewajuli & Dharmayanti, 2014). Beberapa komponen utama PCR menurut Yusuf (2010) yaitu DNA cetakan, oligonukleotida primer, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), DNA polymerase, dan buffer.

Siklus PCR terbagi atas tiga langkah utama yaitu denaturasi, *annealing*, dan ekstensi (Gambar 2.3). Siklus ini berulang 30-35 siklus. Siklus utama ini diawali terlebih dahulu dengan denaturasi awal untuk memaksimalkan proses denaturasi cetakan DNA, karena apabila denaturasi tidak sempurna akan menyebabkan kegagalan proses PCR (Fatchiyah *et al*, 2011). Denaturasi cetakan DNA untuk memisahkan utas ganda DNA molekul target pada suhu 93°-95°C. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penurunan aktifitas DNA polimerase, sedangkan suhu denaturasi yang terlalu rendah akan menyebabkan proses denaturasi tidak sempurna. Selanjutnya suhu diturunkan sekitar 50°-70°C sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada DNA cetakan yang berantai tunggal. Suhu *annealing* adalah suhu yang dibutuhkan agar primer menempel pada template DNA (Hewajuli & Dharmayanti, 2014). DNA hanya akan teramplifikasi bila urutan basa pada primer cocok dengan urutan basa pada DNA sampel. Amplifikasi DNA akan lebih efisien apabila suhu *annealing* tidak kurang dari 37°C agar tidak terjadi *mispriming*, sedangkan suhu yang terlampau tinggi dapat menyebabkan produk PCR tidak terbentuk karena penempelan primer pada template DNA lepas kembali. Oleh karena itu, pada suhu sekitar 55°C akan dihasilkan amplifikasi produk yang mempunyai spesifitas yang tinggi. Setelah proses *annealing*, suhu dinaikkan sekitar 70°-72°C untuk melakukan proses ekstensi atau pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target yang akan bergerak dari ujung-5' menuju ujung-3' dari untai tunggal DNA (Fatchiyah *et al*, 2011).



Gambar 2.3 Amplifikasi DNA Secara *In Vitro* dengan Teknik PCR (Brooker, 2015)

Prakoso *et al* (2016) menjelaskan bahwa tidak munculnya pita DNA pada proses amplifikasi dapat disebabkan oleh rendahnya kualitas DNA template. DNA template yang terkontaminasi dengan sisa-sisa zat saat proses isolasi (seperti buffer lisis, etanol, sisa debris sel) akan sulit teramplifikasi. Keberhasilan amplifikasi juga ditentukan oleh ada atau tidaknya urutan basa DNA template yang komplemen

dengan urutan basa pada primer. Demikian juga ketepatan suhu *annealing* primer diperlukan agar primer dapat menempel secara spesifik pada DNA template.

2.7 Elektroforesis

Elektroforesis adalah proses migrasi fragmen DNA di dalam gel yang direndam dalam larutan penyangga. Perjalanan molekul DNA di dalam gel mengikuti arus listrik dari kutub negatif menuju kutub positif. Semakin besar tegangan arus listrik, perjalanan molekul DNA akan semakin cepat, demikian juga sebaliknya (Sulandari & Zein, 2003). Elektroforesis terdiri dari beberapa komponen utama yaitu larutan buffer yang berfungsi sebagai pembawa komponen, media pemisah sebagai tempat proses pemisahan terjadi berupa gel agarosa atau poliakrilamid, dan elektroda yang berfungsi sebagai penghubung arus listrik dengan media pemisah (Harahap, 2018).

Ada dua medium yang sering digunakan dalam menggunakan elektroforesis. Pertama adalah gel poliakrilamida. Gel ini memiliki resolusi tinggi pada hasil pemisahannya. Membutuhkan tegangan listrik yang tinggi pada pengerjaannya dan dilakukan pada medan listrik vertikal. Persiapan pengerjaan membutuhkan waktu relatif lama, mahal dan memiliki laju pemisahan yang lebih lambat (Harahap, 2018). Kedua adalah gel Agarosa. Agarosa merupakan polisakarida yang diekstrak dari rumput laut. Ukuran pori agarosa sesuai untuk pemisahan polimer asam nukleat yang tersusun dari ratusan nukleotida (Langga *et al*, 2012). Kelebihan dari gel ini yaitu lebih mudah, sederhana dan laju pemisahannya lebih cepat membentuk fragmen-fragmen dan tidak bersifat toksik. Kelemahan gel ini memiliki sensitifitas tinggi dan mudah rusak sehingga memerlukan ketelitian pada proses pengerjaannya (Harahap, 2018).

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi proses elektroforesis, seperti yang dijelaskan oleh Fatchiyah *et al* (2011), yaitu:

1. Konsentrasi agarosa. Molekul besar seperti genom utuh dielektroforesis dengan agarosa berkonsentrasi 0,8%, sedangkan hasil amplifikasi DNA dielektroforesis dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 1,5-2%.
2. Ukuran molekul DNA. Ukuran dan struktur molekul DNA mempengaruhi mobilitas saat dielektroforesis. Secara berurutan mobilitas molekul berbeda

dalam hal kecepatan. DNA sirkular memiliki mobilitas lebih besar daripada DNA linear, dan fragmen DNA memiliki mobilitas lebih besar daripada genom utuh.

3. Voltase. DNA merupakan molekul negatif. Umumnya digunakan voltase 100 V, sedangkan bila diperlukan pemisahan yang sempurna maka digunakan voltase 50 V meskipun lebih lambat tetapi hasil pemisahannya lebih maksimal.
4. Suhu. Molekul DNA akan cepat terurai pada suhu tinggi dan menyatu pada suhu rendah.

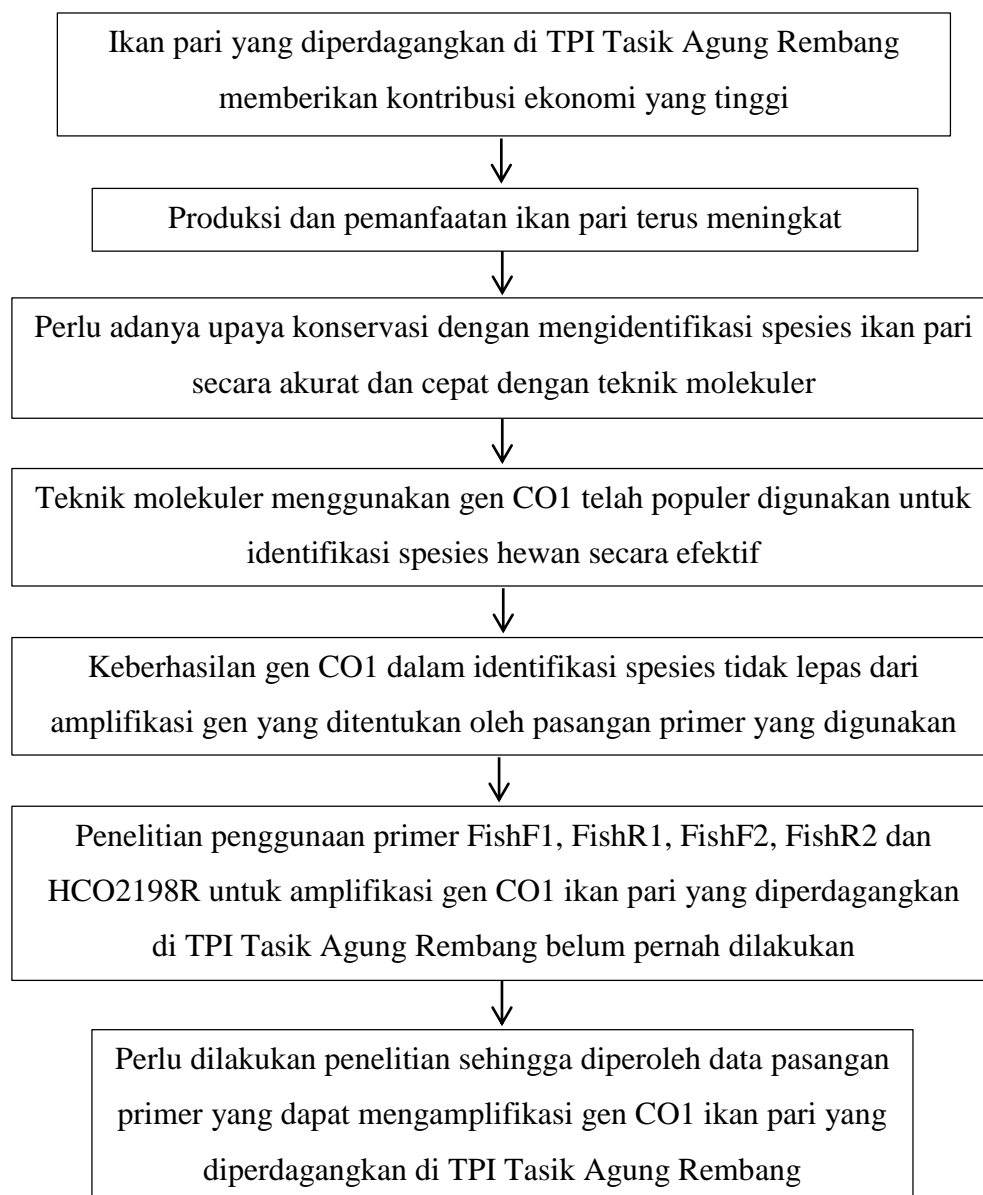
2.8 Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah teknik pengukuran yang didasarkan pada penyerapan radiasi ultraviolet (UV) oleh zat penyerap. Radiasi ini, memiliki rentang spektrum sekitar 190-800 nm (Passos & Saraiva, 2018). Prinsip dasar dari spektrofotometri adalah penyerapan (absorpsi) radiasi UV oleh molekul dengan panjang gelombang tertentu. Spektrofotometri banyak dipakai untuk analisis kuantitatif untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi asam nukleat dan protein. Pengukuran kemurnian dan konsentrasi dapat dilakukan menggunakan dua panjang gelombang, yaitu 260 nm dan 280 nm. Radiasi UV pada panjang gelombang 260 nm dapat diserap oleh pita ganda DNA, sedangkan pada panjang gelombang 280 nm diserap oleh protein. Nilai kemurnian DNA berkisar 1,8-2,0 (Fatchiyah *et al*, 2011).

Nano spektrofotometer adalah teknologi yang didasarkan pada teknik spektrofotometri yang memungkinkan penggunaan volume sampel yang sangat kecil (1 μ l). Nano spektrofotometer mengukur serapan relatif sampel pada berbagai panjang gelombang untuk memberikan perkiraan kemurnian dan kuantitas asam nukleat. Dalam spektrofotometer ini, sampel ditempatkan di antara dua permukaan optik dan penyerapan cahaya dalam panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Alat ini telah digunakan untuk pengukuran absorbansi dalam analisis asam nukleat dan protein. Misalnya telah digunakan untuk mengevaluasi integritas DNA genom yang diisolasi dari darah, untuk kuantifikasi DNA pada pasien melanoma ganas dan kanker prostat (Passos & Saraiva, 2018).

2.9 Kerangka Pikir

Kerangka pikir penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Kerangka Pikir Penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada tiga tempat yaitu:

1. Pengambilan sampel dilakukan di TPI Tasik Agung Rembang.
2. Optimasi suhu *annealing* primer dan amplifikasi DNA dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Unnes.
3. Isolasi DNA, kuantifikasi DNA, elektroforesis, dan visualisasi DNA dilakukan di Laboratorium Riset FMIPA Unnes.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2020 sampai Mei 2020.

3.1 Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah ikan pari sebanyak 5 jenis yang diperoleh dari hasil tangkapan nelayan yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang dengan masing-masing jenis sebanyak satu ekor (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Jenis Ikan Pari Pada Subjek Penelitian

No	Kode Sampel	Jenis	Status Konservasi
1	A	<i>Himantura gerrardi</i>	<i>Vulnerable</i>
2	B	<i>Himantura uarnocoides</i>	<i>Vulnerable</i>
3	C	<i>Himantura walga</i>	<i>Near threatened</i>
4	D	<i>Neotrygon kuhlii</i>	<i>Deficient</i>
5	E	<i>Rhinobatos penggali</i>	<i>Vulnerable</i>

3.2 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah amplifikasi gen CO1 ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang menggunakan empat pasang primer.

3.3 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah gen CO1 ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang dapat diamplifikasi menggunakan empat pasang primer.

3.4 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 3.1 dan 3.2.

Tabel 3.1 Alat Penelitian

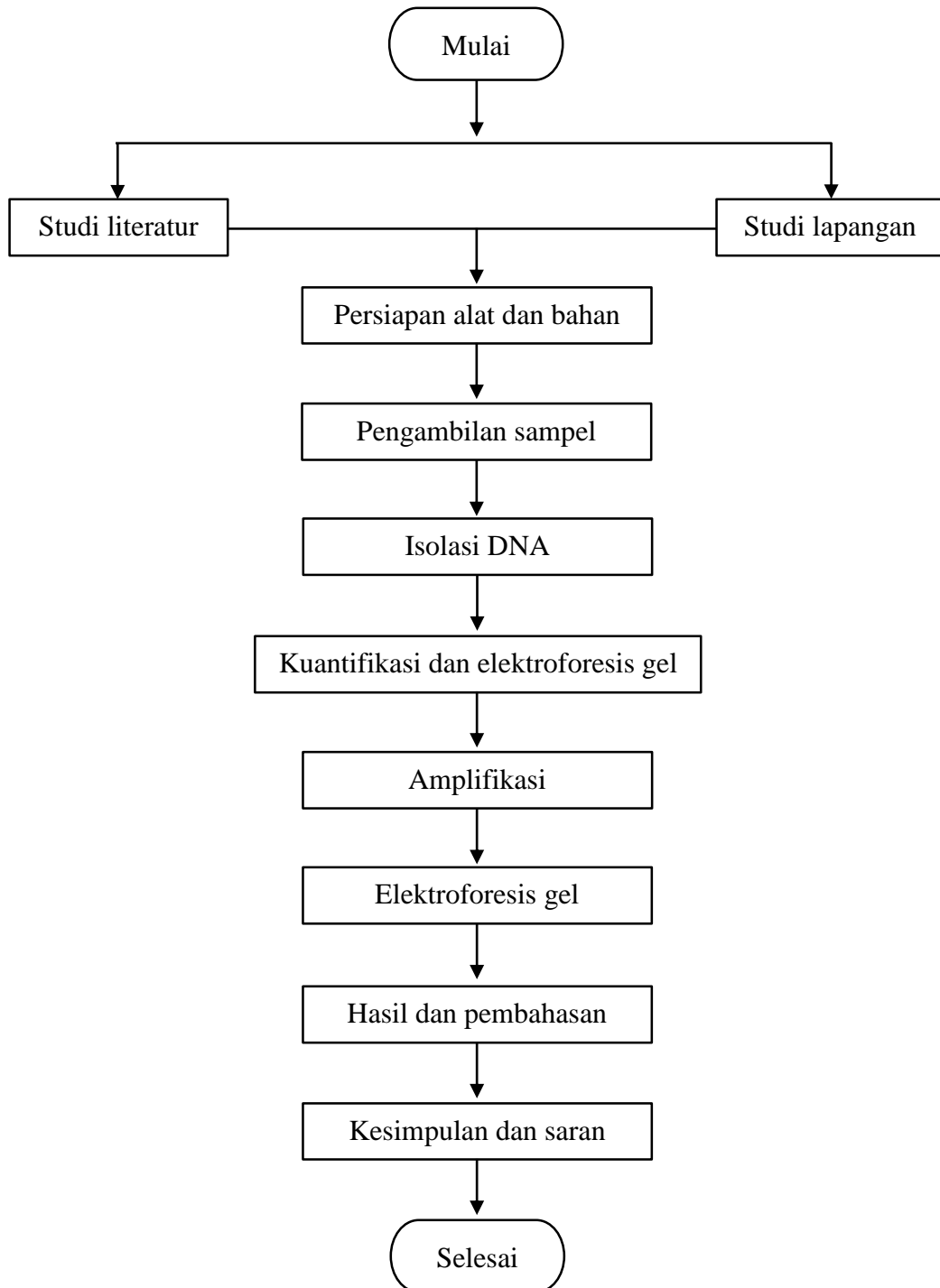
Uraian	Alat	Fungsi
Pengambilan sampel	Gunting dan pinset	Memotong sampel
	Plastik	Menyimpan sampel
	<i>Spidol marker</i>	Menandai sampel
	<i>Freezer</i>	Menyimpan sampel dan reagen
Isolasi DNA	<i>Hand gloves</i>	Keselamatan kerja
	Neraca analitik	Menimbang sampel dan agarosa
	<i>Microtube</i>	Menyimpan isolat DNA
	<i>Spin column</i> dan <i>collection tube</i>	Menampung larutan proses isolasi DNA
	<i>Micropipete</i>	Mengambil larutan
	Tip	Mengambil larutan
	<i>Microcentrifuge</i>	Memisahkan molekul
	<i>Waterbath</i>	Menginkubasi sampel
Kuantifikasi DNA	<i>Vortex</i>	Menghomogenisasi larutan
	<i>Spindown</i>	Mengendapkan larutan
	<i>Nano spektrofotometer</i>	Kuantifikasi DNA
Amplifikasi DNA	Tisu <i>Kim Tech</i>	Membersihkan lensa <i>Nano spektrofotometer</i>
	<i>Thermal cycler</i>	Mengamplifikasi DNA
	<i>Micropipete</i>	Mengambil larutan
	Tip	Mengambil larutan
Visualisasi DNA	<i>Microtube</i>	Menyimpan DNA
	<i>Micropipete</i>	Mengambil larutan
	Tip	Mengambil larutan
	<i>Microwave</i>	Pemanas, digunakan dalam proses pembuatan gel
	Erlenmeyer	Tempat pembuatan gel agarosa
	Spatula	Mengambil bubuk agarosa
	<i>well-forming combs & tray</i>	Mencetak gel
<i>Chamber/ tank</i>	<i>Running gel</i>	
<i>UV Transilluminator</i>	Memvisualisasi DNA hasil elektroforesis	

Tabel 3.2 Bahan Penelitian

Uraian	Bahan
Pengambilan sampel	Sampel sirip ikan pari dan tisu
Isolasi DNA	Buffer GA, proteinase-K, buffer GB, etanol absolut, buffer GD, buffer PW, dan buffer TE
Kuantifikasi DNA	Akuades steril

Amplifikasi DNA	2x Taq PCR Master Mix (with loading dye), ddH ₂ O, primer FishF1, FishR1, FishF2, FishR2, dan HCO2198R
Visualisasi DNA	Bubuk agarosa, akuades, TAE 1x, GelRed, dan DNA ladder

3.5 Bagan Alir Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alir Tahapan Pelaksanaan Penelitian

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengambilan Sampel

Ikan pari sebanyak 5 jenis yaitu *Himantura gerrardi*, *Himantura uarnocoides*, *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali*, dimana masing-masing jenis diperoleh 1 ekor. Sampel diambil pada bagian sirip dada sekitar 5 cm menggunakan gunting dan pinset, pengambilan sampel ini didasarkan pada penelitian Holmes *et al* (2009).

3.6.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan untuk mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen sel lainnya. Pada penelitian ini isolasi dilakukan berdasarkan protokol *TIANamp Marine Animals DNA Kit*. Sampel sirip ikan pari yang telah diambil dipotong-potong sepanjang 1 mm dan ditimbang sebanyak 30 mg. Sampel dimasukkan dalam *microtube* 1,5 ml dan ditambahkan 200 µl buffer GA. Sampel divortex selama 15 detik. Ditambahkan RNase 4 µl, divortex selama 15 detik dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah itu, ditambahkan 20 µl proteinase-K dan divortex kembali selama 15 detik. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 56 °C selama 1 jam sampai sampel lisis dengan sempurna, setiap 15 menit sampel divortex selama 15 detik dan *dispindown*. Ditambahkan 200 µl buffer GB dan divortex selama 15 detik. Kemudian diinkubasi pada suhu 70 °C selama 10 menit dan *dispindown*. Ditambahkan 200 µl etanol absolut dan divortex selama 15 detik dilanjutkan *dispindown*. Setelah itu sampel dipipet untuk dipindahkan ke *Spin Column* dalam *Collection Tube*. Disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 detik. Ditambahkan 500 µl buffer GD dan disentrifus kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 detik. Supernatan dalam *Collection Tube* dibuang dan *Collection Tube* dipasang ke *Spin Column* lagi. Ditambahkan 600 µl buffer PW dan disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 detik. Supernatan dalam *Collection Tube* dibuang dan *Collection Tube* dipasang ke *Spin Column* lagi. Ditambahkan 600 µl buffer PW dan disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 detik. Supernatan dalam *Collection Tube* dibuang dan *Collection Tube* dipasang ke *Spin Column* lagi. Dilanjutkan disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit sampai pelet kering dengan sempurna. *Collection Tube* dilepas dari

Spin Column dan *Spin Column* ditempatkan di *microtube* 1,5 ml. Ditambahkan 50 µl buffer TE. Diinkubasi selama 2-5 menit dalam suhu ruang dan disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit.

3.6.3 Kuantifikasi DNA Hasil Isolasi

DNA hasil isolasi diukur kuantitasnya menggunakan nano spektrofotometer untuk melihat konsentrasi dan kemurnian DNA sampel. Sebanyak 1 µl hasil isolasi DNA diteteskan pada lensa nano spektrofotometer yang telah dibersihkan menggunakan tisu *Kim Tech*. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

3.6.4 Uji kualitas DNA Hasil Isolasi

Kualitas DNA hasil isolasi dilihat dengan visualisasi menggunakan elektroforesis pada gel agarosa 0,8%. Tahapan elektroforesis mengikuti panduan dari Sulandari & Zein (2003). Pembuatan gel agarosa 0,8% dengan menimbang bubuk agarosa sebanyak 0,4 gram dan ditambahkan TAE (*Tris Acetic Acid EDTA*) 1x ke dalam erlenmeyer sampai volume 50 ml. Kemudian dipanaskan dalam *microwave* sampai larutan menjadi jernih. Larutan didinginkan pada suhu kamar sampai hangat. Pewarna *GelRed* diambil sebanyak 5 µl dimasukkan dalam 50 ml larutan agarosa dan dicampur sampai homogen. Larutan agarosa dituang ke dalam *tray* dan dipasang *well-forming combs*, ditunggu sampai gel sampai mengeras. Setelah mengeras, *well-forming combs* diambil dengan hati-hati dan *tray* dimasukkan pada bak elektroforesis yang telah diisi larutan buffer TAE 1x sampai semua gel terendam. DNA hasil isolasi diambil sebanyak 1 µl diletakkan diatas parafilm, ditambahkan *loading dye* 1 µl kemudian diaduk sampai merata dan dimasukkan ke dalam sumuran gel. Running dilakukan pada 100 volt selama 30 menit. Setelah itu, gel dilihat di atas *UV Transilluminator*.

3.6.5 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan melalui teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada masing-masing sampel menggunakan empat pasang primer. Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah primer FishF1, FishR1, FishF2, FishR2,

dan HCO2198R dengan pasangan FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R. Penggunaan primer ini didasarkan pada keberhasilan pasangan primer tersebut dalam mengamplifikasi gen CO1 ikan pari yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti (Ward *et al*, 2005; Ward *et al*, 2008; Holmes *et al*, 2009; Cerutti-Pereyra *et al*, 2012; Peloa *et al*, 2015). Proses awal yang dilakukan yaitu optimasi suhu *annealing* primer. Optimasi bertujuan untuk menentukan suhu optimum primer untuk menghasilkan ampikon yang optimal. Optimasi dilakukan dengan metode *gradient* PCR dengan 8 variasi suhu. Variasi suhu yang digunakan ditentukan berdasarkan rentang T_m primer yang digunakan. Sekuen dan T_m masing-masing primer disajikan pada Tabel 3.3 berikut:

Table 3.3 Primer yang Digunakan Pada Penelitian

Primer	Sekuen	T_m
FishF1	5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3'	66,3
FishR1	5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3'	66,3
FishF2	5'-TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC-3'	63,2
FishR2	5'-ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA-3'	66,3
HCO2198R	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'	61,6

Total volume *cocktail* PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12,5 μ l didasarkan pada penelitian Holmes *et al* (2009). Komposisi *cocktail* PCR ditunjukkan pada Tabel 3.4:

Tabel 3.4 Komposisi *Cocktail* PCR

No	Bahan	Volume
1.	2x Taq PCR Master Mix (with loading dye)	6,25 μ l
2.	Primer Forward	1 μ l
3.	Primer Reverse	1 μ l
4.	ddH ₂ O	3,25 μ l
5.	DNA sampel	1 μ l
	Total	12,5 μ l

Komposisi *cocktail* PCR yang telah dicampur dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 15 detik dan *dispindown*. PCR dilakukan menggunakan mesin *Thermal cycle* dengan program 35 siklus. Program PCR pada penelitian ini didasarkan pada penelitian Holmes *et al* (2009) dengan sedikit modifikasi. Program PCR disajikan pada Tabel 3.5 berikut:

Tabel 3.5 Program PCR

No	Tahap	Temperatur (°C)	Waktu
1.	Pre-denature	94	3 menit
2.	Denature	94	30 detik
3.	Annealing	54	30 detik
4.	Extension	72	1 menit
5.	Final extension	72	5 menit

3.6.6 Visualisasi Produk PCR

Visualisasi dilakukan dengan mengikuti panduan dari Sulandari & Zein (2003). Produk PCR divisualisasi menggunakan gel agarosa 2%. Pembuatan gel agarosa 2% dengan menimbang 1 gram bubuk agarosa dan ditambahkan TAE 1x ke dalam erlenmeyer sampai volume 50 ml. Dipanaskan dalam *microwave* sampai larutan menjadi jernih. Larutan didinginkan pada suhu kamar sampai hangat. Pewarna *GelRed* diambil sebanyak 5 µl dimasukkan dalam 50 ml larutan agarosa dan dicampur sampai homogen. Larutan agarosa dituang ke dalam *tray* dan dipasang *well-forming combs*, ditunggu sampai gel sampai mengeras. *Tray* dimasukkan pada bak elektroforesis yang telah diisi larutan buffer TAE 1x sampai semua gel terendam. *DNA ladder* sebanyak 3 µl dan produk PCR sebanyak 3 µl dimasukkan ke dalam sumuran gel. Running dilakukan pada 50 volt selama 1 jam. Setelah itu, gel dilihat di atas *UV Transilluminator*.

3.7 Metode Analisis Data

Data hasil penelitian berupa pita fragmen gen CO1 yang tampak pada hasil visualisasi gel agarosa 2% selanjutnya dianalisis secara deskriptif untuk mengambil simpulan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Kuantitas dan Kualitas DNA Hasil Isolasi

Sebanyak 5 sampel ikan pari yang diperoleh dari hasil tangkapan nelayan yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang diisolasi untuk mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen sel lainnya berdasarkan protokol *TIANamp Marine Animals DNA Kit*. DNA hasil isolasi diukur kuantitasnya menggunakan nano spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm sehingga diperoleh nilai kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi. Hasil pengukuran tersebut disajikan pada Tabel 4.1 berikut:

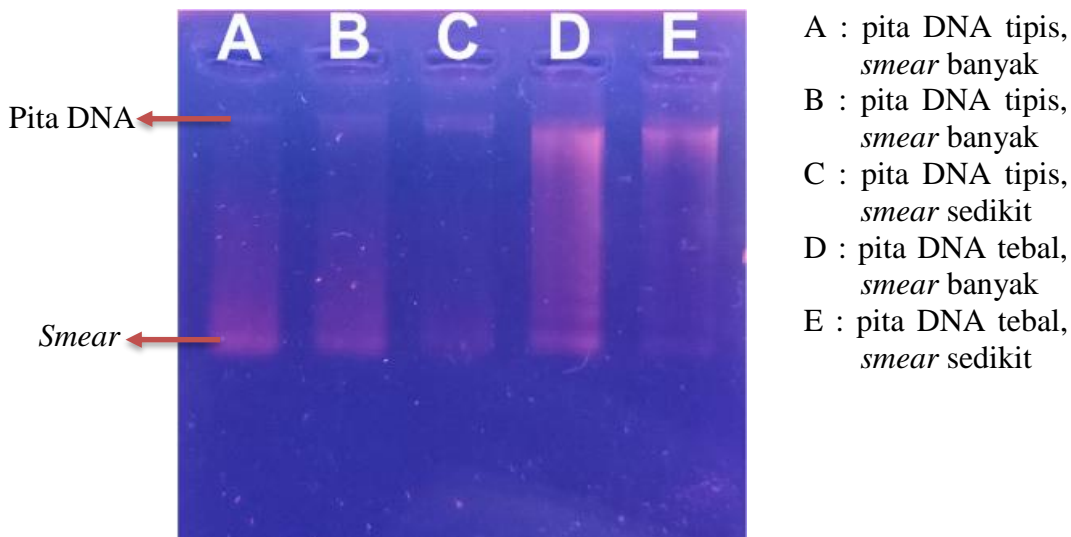
Tabel 4.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Hasil Isolasi

Pengukuran	Sampel	Nilai	Keterangan
Kemurnian (absorbansi λ 260/ λ 280)	<i>Himantura gerrardi</i>	1,861	Nilai kemurnian DNA berkisar 1,8-2,0 <1,8 terdapat kontaminan protein >2,0 terdapat kontaminan RNA (Fatchiyah <i>et al</i> , 2011)
	<i>Himantura uarnocoides</i>	1,718	
	<i>Himantura walga</i>	1,479	
	<i>Neotrygon kuhlii</i>	1,795	
	<i>Rhinobatos penggali</i>	2,222	
Konsentrasi (ng/ μ L)	<i>Himantura gerrardi</i>	30,128	Konsentrasi DNA berkisar 20-100 ng/ μ L (Sauer <i>et al</i> , 1998)
	<i>Himantura uarnocoides</i>	11,300	
	<i>Himantura walga</i>	39,650	
	<i>Neotrygon kuhlii</i>	36,250	
	<i>Rhinobatos penggali</i>	43,550	

Berdasarkan Tabel 4.1 didapatkan hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA yang bervariasi. Hasil pengukuran kemurnian DNA berkisar antara 1,479-2,222. Sampel dengan nilai kemurnian DNA pada kisaran 1,8-2,0 terdapat pada sampel *Himantura gerrardi*. Nilai kemurnian <1,8 terdapat pada sampel *Himantura uarnocoides*, *Himantura walga*, dan *Neotrygon kuhlii*, sedangkan nilai kemurnian >2,0 terdapat pada sampel *Rhinobatos penggali*. Pada Tabel 4.1 juga didapatkan hasil pengukuran konsentrasi DNA yang diperoleh berkisar antara 11,300-43,550 ng/ μ L. Sampel *Himantura gerrardi*, *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali* diperoleh nilai konsentrasi pada

kisaran 20-100 ng/ μ L, sedangkan sampel *Himantura uarnocoides* nilai konsentrasi <20 ng/ μ L.

DNA hasil isolasi selanjutnya diuji kualitasnya melalui elektroforesis gel agarosa 0,8%. Hasil elektroforesis tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis DNA Hasil Isolasi.

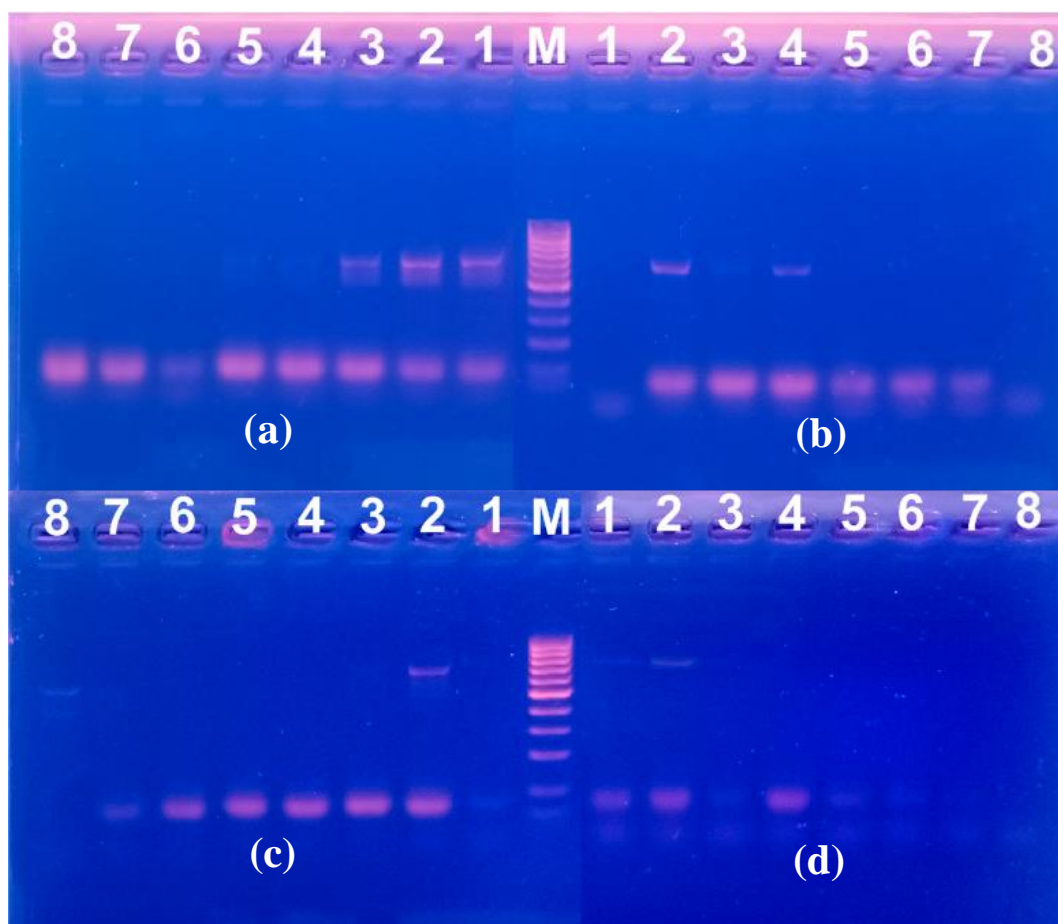
Keterangan: A= *Himantura gerrardi*; B= *Himantura uarnocoides*; C= *Himantura walga*; D= *Neotrygon kuhlii*; E= *Rhinobatos penggali*.

Berdasarkan Gambar 4.1 menunjukkan semua sampel DNA hasil isolasi menghasilkan pita DNA. Pita tersebut ada yang tebal dan ada yang tipis serta beberapa sampel terlihat adanya *smear* (kontaminan RNA). Sampel *Himantura gerrardi* dan *Himantura uarnocoides* terlihat pita DNA yang tipis dan terdapat *smear*. Sampel *Himantura walga* terlihat pita DNA yang dihasilkan tipis dan sangat sedikit *smear*. Sampel *Neotrygon kuhlii* dihasilkan pita DNA yang tebal tetapi masih terdapat banyak *smear*. Sampel *Rhinobatos penggali* dihasilkan pita DNA yang tebal dan sangat sedikit *smear*. Menurut Sauer *et al* (1998), DNA dengan kualitas yang baik ditunjukkan dengan pita DNA yang tebal dan sedikit atau tidak ada *smear*. Dengan demikian, sampel *Rhinobatos penggali* memiliki kualitas DNA yang lebih baik dibandingkan dengan sampel lain.

4.1.2 Optimasi Suhu Annealing Primer

Optimasi dilakukan dengan 8 variasi suhu pada sampel dengan kualitas paling baik yaitu sampel *Rhinobatos penggali*. Penggunaan variasi suhu *annealing* ditentukan berdasarkan rentang T_m primer yang digunakan dan dilakukan secara

gradient pada proses PCR untuk menentukan suhu *annealing* yang optimal. Optimasi menggunakan pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R dengan berbagai suhu *annealing* yang berbeda (51°C, 54°C, 56°C, 59°C, 61°C, 63°C, 66°C, 68°C) dideteksi melalui elektroforesis gel agarosa 2% dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil Elektroforesis Optimasi Suhu *Annealing* Primer.

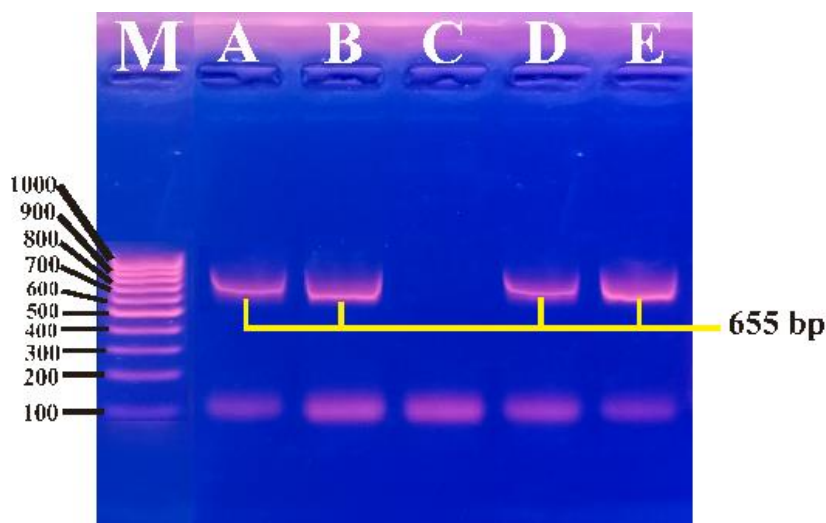
Keterangan: (a)= FishF1-FishR1; (b)= FishF2-FishR2; (c)= FishF1-HCO2198R; (d)= FishF2-HCO2198R; M= DNA ladder; 1= 51°C; 2= 54°C; 3= 56°C; 4= 59°C; 5= 61°C; 6= 63°C; 7= 66°C; 8= 68°C. Optimasi dilakukan pada sampel *Rhinobatos penggali*.

Suhu *annealing* optimal yang dipilih adalah suhu yang dapat menghasilkan pita DNA paling tebal, jelas, dan ukuran produk PCR sesuai target. Hasil PCR *gradient* menunjukkan pita DNA paling tebal dan jelas terdapat pada suhu 2 (54°C), baik pada pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R. Suhu *annealing* optimal terbaik yang telah dipilih pada empat pasang primer selanjutnya digunakan untuk mengamplifikasi semua sampel.

4.1.3 Amplifikasi DNA

Semua sampel diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan empat pasang primer dengan suhu *annealing* 54°C. Sampel yang berhasil teramplifikasi ditandai dengan munculnya pita DNA pada gel dengan ukuran pita DNA bervariasi bergantung pada posisi penempelan primer dengan gen CO1 sampel. Menurut Ward *et al* (2008), pita DNA yang dihasilkan berukuran sekitar 655 bp. Ketebalan pita DNA yang dihasilkan bergantung pada konsentrasi DNA sampel, sedangkan *smear* bergantung pada kemurnian DNA sampel tersebut. Selain itu, sedikit dan kurang homogenya DNA sampel yang diambil juga mempengaruhi ketebalan pita, sehingga meskipun hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA baik tetapi saat amplifikasi sampel DNA yang diambil sedikit dan kurang homogen dapat memungkinkan menghasilkan pita yang tipis.

Hasil amplifikasi oleh empat pasang primer ditunjukkan oleh Gambar 4.3, 4.4, 4.5, dan 4.6.

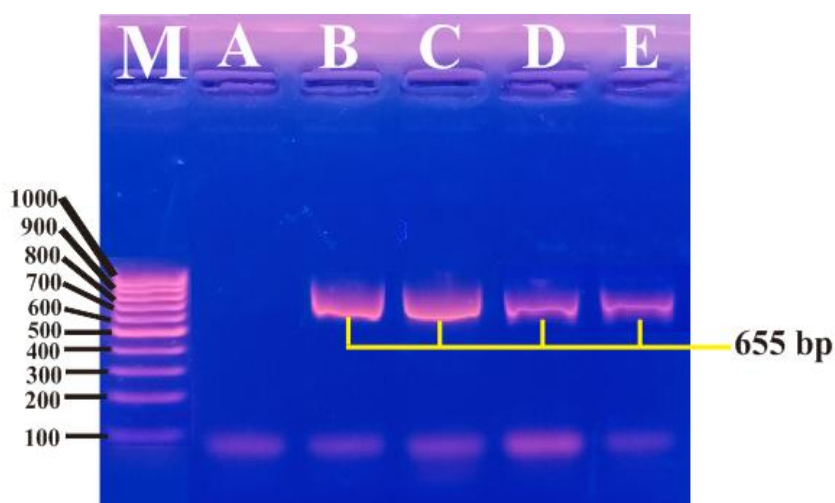


Gambar 4.3 Visualisasi Produk PCR oleh Pasangan Primer FishF1-FishR1
Keterangan: M= DNA ladder; A= *Himantura gerrardi*; B= *Himantura uarnocoides*; C= *Himantura walga*; D= *Neotrygon kuhlii*; E= *Rhinobatos penggali*.

Berdasarkan hasil amplifikasi (Gambar 4.3) menunjukkan bahwa pasangan primer FishF1-FishR1 berhasil mengamplifikasi sampel *Himantura gerrardi*, *Himantura uarnocoides*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali*, sedangkan sampel *Himantura walga* gagal teramplifikasi. Ukuran pita masing-masing sampel terlihat berbeda bergantung pada posisi penempelan primer dengan gen CO1

sampel tetapi masih sekitar 655 bp. Ketebalan pita masing-masing sampel juga sedikit berbeda, pada sampel *Himantura gerrardi* dan *Neotrygon kuhlii* menghasilkan pita yang sedikit lebih tipis dibandingkan sampel *Himantura uarnocoides* dan *Rhinobatos penggali* dimungkinkan karena konsentrasi maupun sampel DNA yang terambil sedikit dan kurang homogen.

Hasil amplifikasi oleh pasangan primer FishF2-FishR2 dapat dilihat pada Gambar 4.4 berikut.

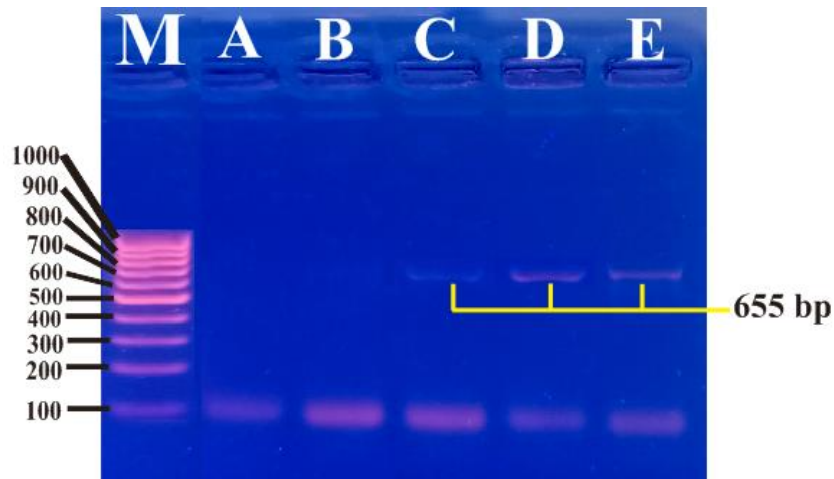


Gambar 4.4 Visualisasi Produk PCR oleh Pasangan Primer FishF2-FishR2.

Keterangan: M= DNA ladder; A= *Himantura gerrardi*; B= *Himantura uarnocoides*; C= *Himantura walga*; D= *Neotrygon kuhlii*; E= *Rhinobatos penggali*.

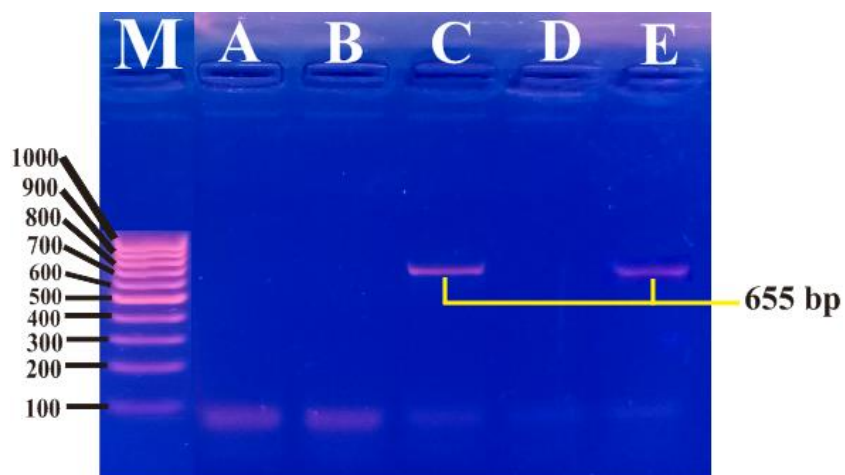
Berdasarkan Gambar 4.4 menunjukkan bahwa pasangan primer FishF2-FishR2 berhasil mengamplifikasi sampel *Himantura uarnocoides*, *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali* dengan ukuran pita DNA yang bervariasi bergantung pada posisi penempelan primer dengan gen CO1 masing-masing sampel tetapi masih sekitar 655 bp, sedangkan sampel *Himantura gerrardi* gagal teramplifikasi. Pita yang dihasilkan pada sampel *Neotrygon kuhlii* dan *Rhinobatos penggali* lebih tipis dibandingkan sampel *Himantura uarnocoides* dan *Rhinobatos penggali* dikarenakan konsentrasi maupun sampel DNA yang terambil sedikit dan kurang homogen.

Selanjutnya hasil amplifikasi oleh pasangan primer FishF1-HCO2198R ditunjukkan oleh Gambar 4.5 berikut.



Gambar 4.5 Visualisasi Produk PCR oleh Pasangan Primer FishF1-HCO2198R. Keterangan: M= DNA ladder; A= *Himantura gerrardi*; B= *Himantura uarnocoides*; C= *Himantura walga*; D= *Neotrygon kuhlii*; E= *Rhinobatos penggali*.

Berdasarkan Gambar 4.5 menunjukkan bahwa pasangan primer FishF1-HCO2198R berhasil mengamplifikasi tiga sampel yaitu sampel *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali*, sedangkan sampel *Himantura gerrardi* dan *Himantura uarnocoides* gagal teramplifikasi. Ukuran pita ketiga sampel hampir sama yaitu sekitar 655 bp, namun ketebalan pita yang dihasilkan lebih tipis dibandingkan dengan pita hasil amplifikasi oleh pasangan primer FishF1-FishR1 dan FishF2-FishR2. Demikian juga hasil amplifikasi oleh pasangan primer FishF2-HCO2198R yang ditunjukkan oleh Gambar 4.6 berikut.



Gambar 4.6 Visualisasi Produk PCR oleh pasangan primer FishF2-HCO2198R. Keterangan: M= DNA ladder; A= *Himantura gerrardi*; B= *Himantura uarnocoides*; C= *Himantura walga*; D= *Neotrygon kuhlii*; E= *Rhinobatos penggali*.

Gambar 4.6 menunjukkan bahwa pasangan primer FishF2-HCO2198R hanya berhasil mengamplifikasi dua sampel yaitu sampel *Himantura walga* dan *Rhinobatos penggali* dengan ukuran pita yang hampir sama yaitu sekitar 655 bp, sedangkan sampel *Himantura gerrardi*, *Himantura uarnocoides*, dan *Neotrygon kuhlii* gagal teramplifikasi. Sama halnya dengan hasil amplifikasi oleh pasangan primer FishF1-HCO2198R, pita yang dihasilkan oleh pasangan primer FishF2-HCO2198R juga lebih tipis dibandingkan dengan pasangan primer FishF1-FishR1 dan FishF2-FishR2. Dengan demikian, hal tersebut dipengaruhi oleh pasangan primer yang digunakan.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Kuantitas dan Kualitas DNA Hasil Isolasi

DNA dapat menyerap cahaya ultraviolet (UV) karena adanya basa purin dan pirimidin. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol menyerap cahaya pada 280 nm, sehingga kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm. Nilai kemurnian DNA berkisar 1,8-2,0. Nilai kemurnian DNA di bawah 1,8 mengindikasikan masih terdapat kontaminan berupa protein. Nilai kemurnian DNA di atas 2,0 mengindikasikan masih terdapat kontaminan berupa RNA (Fatchiyah *et al*, 2011).

Berdasarkan hasil pengukuran kemurnian DNA menunjukkan bahwa masing-masing sampel memiliki kemurnian bervariasi yang berkisar antara 1,479-2,222. Hasil pengukuran kemurnian dari 5 sampel, terdapat 1 sampel yang menghasilkan DNA murni dan 4 sampel yang masih mengandung kontaminan. Sampel yang menghasilkan DNA murni yaitu sampel *Himantura gerrardi* dengan kemurnian 1,861, sedangkan sampel yang mengandung kontaminan yaitu sampel *Himantura uarnocoides*, *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali* dengan kemurnian masing-masing sampel berturut-turut 1,718, 1,479, 1,795, dan 2,222. Berdasarkan penjelasan Fatchiyah *et al* (2011), maka sampel dengan kemurnian DNA di bawah 1,8 yaitu sampel *Himantura uarnocoides*, *Himantura walga*, dan *Neotrygon kuhlii* masih terdapat kontaminan berupa protein,

sedangkan sampel dengan kemurnian diatas 2,0 yaitu sampel *Rhinobatos penggali* terdapat kontaminan berupa RNA.

Selain diukur kemurniannya, DNA hasil isolasi juga diukur konsentrasinya dengan tujuan untuk mengetahui banyak sedikitnya DNA yang terkandung dalam larutan. Dalam penelitian Sauer *et al* (1998) menjelaskan bahwa kisaran konsentrasi efektif untuk kuantifikasi adalah antara 20 sampai 100 ng/ μ L. Konsentrasi DNA hasil isolasi mempengaruhi kualitas hasil amplifikasi. Konsentrasi yang terlalu rendah menyebabkan penempelan primer pada DNA cetakan menjadi rendah, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi dimungkinkan juga mengandung kontaminan yang tinggi sehingga dapat mengganggu penempelan primer pada DNA cetakan. Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi DNA dari 5 sampel terdapat 1 sampel yang menghasilkan konsentrasi rendah dan 4 sampel menghasilkan konsentrasi baik. Sampel yang menghasilkan konsentrasi rendah yaitu sampel *Himantura uarnocoides* dengan konsentrasi 11,300 ng/ μ L, sedangkan sampel yang menghasilkan konsentrasi baik yaitu sampel *Himantura gerrardi*, *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali* dengan konsentrasi masing-masing sampel berturut-turut 30,128 ng/ μ L, 39,650 ng/ μ L, 36,250 ng/ μ L, dan 43,550 ng/ μ L.

Hal yang mempengaruhi kemurnian dan konsentrasi DNA adalah dari aspek teknis pelaksanaan tahap yang dilakukan, seperti dalam proses penghancuran sampel yang kurang sempurna menyebabkan DNA dalam sel tidak lisis sempurna selama proses isolasi sehingga DNA yang dihasilkan kurang maksimal. Suhu dan waktu pada tahap inkubasi yang kurang tepat dapat menyebabkan sel tidak sepenuhnya lisis dan dapat menghasilkan DNA yang rendah serta kontaminan dalam DNA. DNA pada supernatan terdapat pada lapisan paling atas, sementara protein membentuk lapisan tengah, dan komponen organik terletak di bawah karena memiliki berat jenis besar. Pengambilan supernatan yang tidak teliti dan hati-hati dapat menyebabkan materi yang tidak diharapkan selain DNA ikut terambil. Selain itu, kontaminan berupa RNA dapat disebabkan karena penambahan larutan RNase pada tahap isolasi yang kurang sesuai, sedangkan kontaminan protein disebabkan penambahan proteinase-K yang kurang sesuai.

DNA hasil isolasi selanjutnya diuji kualitasnya dengan melakukan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Sampel dengan kualitas DNA baik adalah sampel yang menghasilkan pita DNA tebal dan sedikit atau tidak ada *smear* (Sauer *et al*, 1998). Berdasarkan hasil elektroforesis yang dilakukan pada 5 sampel menunjukkan bahwa secara keseluruhan DNA dari setiap sampel berhasil diisolasi, dapat dilihat dari pita DNA yang tampak pada gel meskipun pita DNA tersebut ada yang tebal dan ada yang tipis serta terlihat adanya *smear*. Sampel *Himantura gerrardi* dan *Himantura uarnocoides* terlihat pita DNA yang tipis dan terdapat *smear*. Sampel *Himantura walga* terlihat pita DNA yang dihasilkan tipis dan sangat sedikit *smear*. Sampel *Neotrygon kuhlii* dihasilkan pita DNA yang tebal tetapi masih terdapat banyak *smear*. Sampel *Rhinobatos penggali* dihasilkan pita DNA yang tebal dan sangat sedikit *smear*. Dari hasil tersebut maka sampel *Rhinobatos penggali* memiliki kualitas DNA yang lebih baik dibandingkan dengan sampel lain. Perbedaan hasil pada masing-masing sampel bergantung pada banyaknya konsentrasi DNA yang diisolasi. Semakin tebal pita DNA maka semakin tinggi konsentrasinya dan sebaliknya, semakin tipis pita DNA maka semakin rendah konsentrasinya. Pita DNA yang terdapat *smear* mengindikasikan tingkat kemurnian DNA yang kurang baik. *Smear* pada hasil elektroforesis yang nampak di bawah dekat pita DNA menunjukkan bahwa DNA yang diisolasi tidak utuh sehingga adanya fragmen-fragmen DNA yang terbentuk akibat perlakuan fisik selama proses isolasi seperti penyimpanan sampel pada *freezer* dan pencairan sampel yang berulang-ulang, sedangkan penampakan *smear* yang terletak pada bagian paling bawah setiap lajur menunjukkan adanya kontaminan berupa RNA. Menurut Sauer *et al* (1998) *smear* yang terletak paling bawah menunjukkan adanya kontaminan RNA. Pada penelitian ini, sampel yang berhasil diisolasi yang ditunjukkan dengan adanya pita meskipun masih terdapat *smear* masih dapat digunakan untuk proses amplifikasi melalui teknik PCR.

4.2.2 Optimasi Suhu Annealing Primer

Pemilihan primer yang tepat sangat mempengaruhi keberhasilan amplifikasi. Hal ini penting karena primer merupakan inisiator dalam sintesis DNA target. Penggunaan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R,

dan FishF2-HCO2198R pada penelitian ini didasarkan pada keberhasilan pasangan primer tersebut dalam mengamplifikasi gen COI ikan pari yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti (Ward *et al*, 2005; Ward *et al*, 2008; Holmes *et al*, 2009; Cerutti-Pereyra *et al*, 2012; Peloa *et al*, 2015). Ketepatan suhu *annealing* primer juga diperlukan agar primer dapat menempel secara spesifik pada kedua ujung DNA target. Suhu *annealing* yang terlalu rendah menyebabkan terjadinya *mispriming*, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan produk PCR tidak terbentuk karena penempelan primer pada template DNA lepas kembali. Suhu *annealing* yang tepat didapatkan dari optimasi menggunakan PCR *gradient*. Optimasi dilakukan pada sampel dengan kualitas paling baik yaitu sampel *Rhinobatos penggali*. Suhu *annealing* yang dipilih ditentukan berdasarkan pita yang tampak paling jelas dan tebal pada hasil elektroforesis gel.

Hasil analisa elektroforesis gel menunjukkan bahwa pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R dengan suhu *annealing* 54°C dihasilkan pita paling tebal dibandingkan dengan pita pada suhu lain. Pada suhu lain terlihat pita yang lebih tipis dan beberapa suhu tidak menunjukkan adanya pita pada gel. Pita yang tipis disebabkan karena suhu *annealing* tersebut kurang sesuai dengan primer yang digunakan sehingga primer tidak menempel secara spesifik dan proses amplifikasi kurang maksimal. Tidak munculnya pita pada gel dikarenakan suhu yang tidak sesuai sehingga menyebabkan tidak terjadinya penempelan primer dan enzim polimerase tidak dapat mengkatalisis pemasangan sekuen DNA komplemen ke dalam DNA sampel yang pada akhirnya tidak terbentuk DNA baru. Berdasarkan hasil tersebut maka pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R dengan suhu *annealing* 54°C selanjutnya dapat digunakan untuk amplifikasi semua sampel.

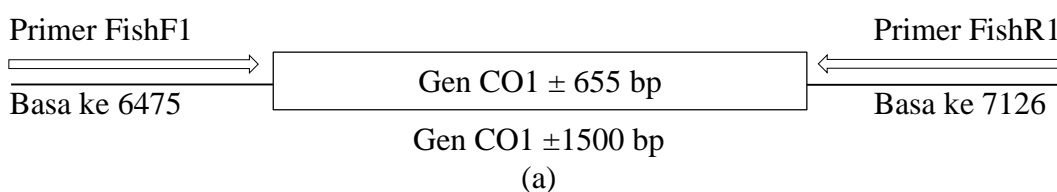
4.2.3 Amplifikasi DNA

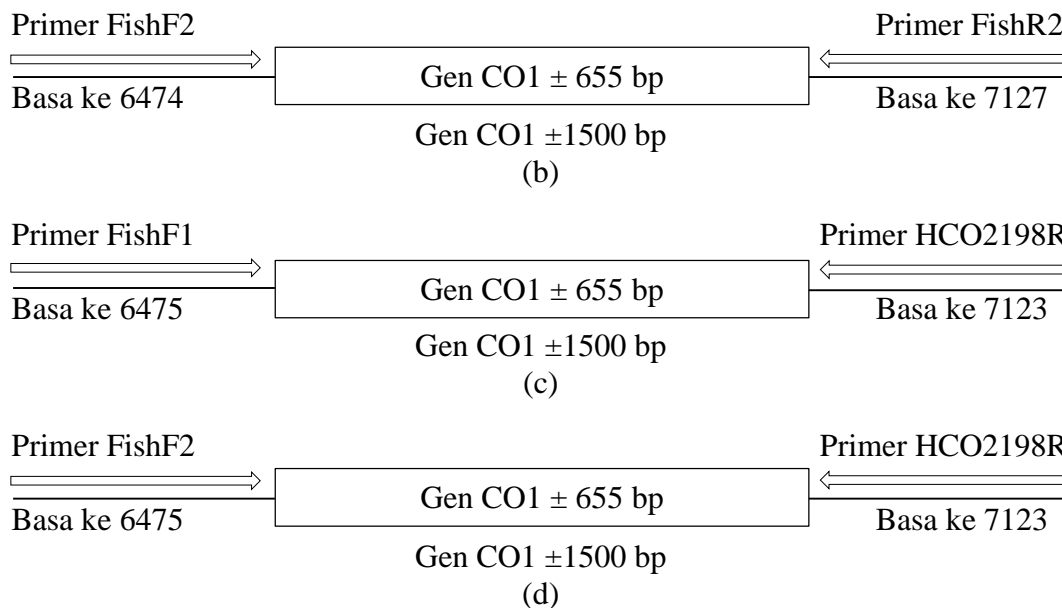
Amplifikasi dilakukan dengan teknik PCR dan divisualisasi dengan gel agarosa 2% dengan pewarna GelRed. GelRed adalah pewarna asam nukleat fluoresen ultra sensitif, non-sitotoksik, non-mutagenik, sangat stabil dan ramah

lingkungan yang dirancang untuk menggantikan etidium bromida (EtBr) yang sangat beracun (Biotium, 2020).

Amplifikasi gen CO1 sampel ikan pari menggunakan pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R. Pasangan primer ini sebelumnya sukses mengamplifikasi berbagai spesies ikan pari oleh beberapa peneliti. Ward *et al* (2005) berhasil menggunakan primer FishF1, FishR1, FishF2, dan FishR2 untuk amplifikasi gen CO1 ikan pari di Australia dengan produk PCR 655 bp dan digunakan variasi primer HCO2198R pada penelitian Ward *et al* (2008) yang berhasil mengamplifikasi gen CO1 ikan pari di Atlantik Utara dan Australasia dengan produk PCR antara 652 sampai 655 bp. Demikian juga dalam penelitian Holmes *et al* (2009), pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R berhasil mengamplifikasi gen CO1 ikan pari di perairan Australia dengan produk PCR 652 sampai 655 bp. Cerutti-Pereyra *et al* (2012) juga berhasil menggunakan pasangan primer FishF2-FishR2 untuk identifikasi ikan pari di Australia barat dengan panjang produk PCR rata-rata pada 550 bp. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Setiati *et al* (2020) menggunakan pasangan primer FishF1-FishR1 dan FishF2-FishR2 berhasil mengamplifikasi 4 dari 5 sampel ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang.

Posisi penempelan primer pada gen CO1 untuk primer FishF1-FishR1 adalah basa ke 6475 sampai basa ke 7126, primer FishF2-FishR2 adalah basa ke 6474 sampai basa ke 7127 (Ivanova *et al*, 2007), primer FishF1-HCO2198R adalah basa ke 6475 sampai basa ke 7123, dan primer FishF2-HCO2198R adalah basa ke 6475 sampai basa ke 7123 (Ajamma *et al*, 2016). Jumlah basa yang teramplifikasi masing-masing primer sekitar 655 bp (Ward *et al*, 2008). Posisi penempelan primer tersebut pada gen CO1 yang memiliki panjang sekitar 1500 bp dapat dilihat pada gambar 4.7.





Gambar 4.7 Posisi Penempelan Primer Pada Gen CO1.

Keterangan: (a)= FishF1-FishR1; (b)= FishF2-FishR2; (c)= FishF1-HCO2198R; (d)= FishF2-HCO2198R.

Berdasarkan hasil amplifikasi menunjukkan bahwa pasangan primer FishF1-FishR1 berhasil mengamplifikasi sampel *Himantura gerrardi*, *Himantura uarnocoides*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali*. Pasangan primer FishF2-FishR2 berhasil mengamplifikasi sampel *Himantura uarnocoides*, *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali*. Hasil ini sama dengan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Setiati *et al* (2020) dimana berhasil mengamplifikasi sampel ikan pari yang sama pada penelitian ini. Hasil elektroforesis pada penelitian ini juga menunjukkan bahwa pasangan primer FishF1-HCO2198R berhasil mengamplifikasi sampel *Himantura walga*, *Neotrygon kuhlii*, dan *Rhinobatos penggali*, sedangkan pasangan primer FishF2-HCO2198R berhasil mengamplifikasi sampel *Himantura walga*, dan *Rhinobatos penggali*. Sampel yang berhasil teramplifikasi menunjukkan bahwa adanya urutan DNA pada primer tersebut yang komplemen atau homolog dengan urutan pada gen CO1 sampel tersebut. Sampel yang gagal teramplifikasi dapat disebabkan adanya variasi genetik dalam gen CO1 pada sampel tersebut sehingga memungkinkan primer tidak menemukan pasangan basa yang cocok untuk melakukan penempelan. Menurut Zhang *et al* (2001) bahwa sampel yang gagal teramplifikasi diduga adanya variasi

genetik pada sampel, sehingga penempelan primer tidak berhasil dilakukan karena adanya satu atau lebih basa primer tidak cocok dengan sekuen gen target.

Hasil amplifikasi menunjukkan ukuran pita DNA setiap sampel pada suatu pasang primer yang dihasilkan berbeda, hal tersebut bergantung pada posisi penempelan primer oleh adanya urutan DNA primer yang komplemen dengan urutan DNA pada gen CO1 sampel tersebut. Menurut Ward *et al* (2008), pita DNA yang dihasilkan berukuran sekitar 655 bp. Ketebalan pita DNA yang dihasilkan masing-masing sampel juga berbeda bergantung hasil pengukuran kuantitas DNA sampel, pita tebal menunjukkan konsentrasi DNA yang tinggi dan pita tipis menunjukkan konsentrasi DNA yang rendah. Demikian juga *smear* yang terlihat pada gel bergantung pada kemurnian DNA sampel tersebut. DNA murni ditunjukkan dengan tidak ada *smear*, sedangkan *smear* menunjukkan masih terdapat kontaminan jika kemurnian DNA lebih kecil atau lebih besar dari kisaran efektifnya. Selain itu, ketebalan pita DNA yang berbeda pada setiap sampel juga dapat disebabkan oleh sedikit maupun kurangnya kehomogenan DNA sampel yang terambil, sehingga meskipun hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA baik tetapi saat amplifikasi sampel DNA yang terambil sedikit dan kurang homogen dapat memungkinkan menghasilkan pita DNA yang tipis.

Hasil amplifikasi pada setiap pasangan primer menghasilkan pita DNA yang berbeda meskipun pada sampel yang sama. Penggunaan primer HCO2198R yaitu pada pasangan primer FishF1-HCO2198R dan FishF2-HCO2198R menghasilkan pita DNA yang lebih tipis dibandingkan dengan pasangan primer FishF1-FishR1 dan FishF2-FishR2 yang menghasilkan pita DNA lebih tebal. Hal tersebut dapat dikarenakan %GC pada primer HCO2198R hanya 34,62%, sedangkan menurut Sasmito *et al* (2014) menjelaskan bahwa suatu primer sebaiknya memiliki %GC pada rentang antara 40% hingga 60%. Rendahnya %GC pada primer HCO2198R inilah yang menyebabkan penurunan efisiensi proses PCR karena primer tidak mampu bersaing untuk menempel secara efektif pada sampel.

Pada penelitian ini, sampel yang berhasil teramplifikasi selanjutnya dapat dilakukan penelitian identifikasi molekuler yang nantinya dapat diketahui jarak genetik dan pohon filogeninya. Ikan pari yang telah diidentifikasi dilakukan penetapan status perlindungan dan konservasi jenis ikan dengan tujuan sesuai yang

tertulis dalam Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 60 Tahun 2007 yaitu untuk melindungi jenis ikan yang terancam punah, mempertahankan keanekaragaman jenis ikan, memelihara keseimbangan dan kemantapan ekosistem, dan memanfaatkan sumberdaya ikan secara berkelanjutan.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Gen COI ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang jenis *Himantura gerrardi* berhasil diamplifikasi oleh pasangan primer FishF1-FishR1, *Himantura uarnocoides* oleh pasangan primer FishF1-FishR1 dan FishF2-FishR2, *Himantura walga* oleh pasangan primer FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R, *Neotrygon kuhlii* oleh pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, dan FishF1-HCO2198R, dan *Rhinobatos penggali* oleh pasangan primer FishF1-FishR1, FishF2-FishR2, FishF1-HCO2198R, dan FishF2-HCO2198R. Hasil amplifikasi ditandai dengan munculnya pita berukuran sekitar 655 bp.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, peneliti menyarankan menggunakan pasangan primer FishF1-FishR1 atau FishF2-FishR2 untuk penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi secara molekuler yang nantinya dapat diketahui jarak genetik dan pohon filogeni ikan pari yang diperdagangkan di TPI Tasik Agung Rembang.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajamma, Y. U., Mararo, E., Omondi, D., Onchuru, T., Muigai, A. W., Masiga, D., & Villinger, J. (2016). Rapid and high throughput molecular identification of diverse mosquito species by high resolution melting analysis. *F1000Research*, 5.
- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Robert, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of The Cell, Sixth Edition*. Amerika: Garland Science.
- Arlyza, I. S., Solihin, D. D., & Soedharma, D. (2013). Distribution Patterns of the Morphology, Species, and Sex in the Stingray Species Complex of *Himantura uarnak*, *Himantura undulata*, and *Himantura leopardain* Indonesia. *Makara Journal of Science*.
- Badan Pusat Statistik Provinsi Jawa Tengah. (2020). *Produksi Perikanan Laut Menurut Kabupaten di Jawa Tengah Tahun 2016-2017*.
- Bingpeng, X., Heshan, L., Zhilan, Z., Chunguang, W., Yanguo, W., & Jianjun, W. (2018). DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. *PloS one*, 13(6), e0198109.
- Biotium. (2020). *GelRed Nucleic Acid Gel Stain*. <http://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/> (diakses pada 19 April 2020).
- Brooker, R. J. (2015). *Genetics: Analysis & Principles, Fifth Edition*. New York: McGraw-Hill Education.
- Cerutti-Pereyra, F., Meekan, M. G., Wei, N. W. V., O'Shea, O., Bradshaw, C. J., & Austin, C. M. (2012). Identification of rays through DNA barcoding: an application for ecologists. *PLoS One*, 7(6), e36479.
- Chen, X., Cai, J., Ding, W., Xiang, D., & Ai, W. (2016). Complete mitochondrial genome of the Sharpnose stingray *Himantura gerrardi* (Myliobatiformes: Dasyatidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(6), 3989-3990.
- Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *British medical bulletin*, 106(1), 135-159.
- Fahmi, M. R., Kusumah, R. V., Ardi, I., Sinansari, S., & Kusrini, E. (2017). DNA Barcoding Ikan Hias Introduksi. *Jurnal Riset Akuakultur*, 12(1), 29-40.
- Fatchiyah, LE., Widyarti, S., & Rahayu, S. (2011). *Biologi Molekuler, Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2014). *On Board Guide for the Identification of Pelagic Sharks and Rays of the Western Indian Ocean*.

- Harahap, M. R. (2018). Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1).
- Hewajuli, D. A., & Dharmayanti, N. L. P. I. (2014). Perkembangan Teknologi Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction dalam Mengidentifikasi Genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases. *JITV*, 19(1).
- Holmes, B. H., Steinke, D., & Ward, R. D. (2009). Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 95(2-3), 280-288.
- IMTIAZ, A., NOR, S. A. M., & NAIM, D. M. (2017). Progress and potential of DNA barcoding for species identification of fish species. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 18(4), 1394-1405.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). (2020). *The IUCN Red List of Threatened Species*.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 544-548.
- Kadri, H. (2012). Hemoprotein dalam Tubuh Manusia. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 1(1).
- Langga, I. F., Restu, M., & Kuswinanti, T. (2012). Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi DNA tanaman bitti (*Vitex cofassus* Reinw) serta analisis keragaman genetik dengan teknik RAPD-PCR. *J. Sains & Teknologi*, 12(3), 265-276.
- Madduppa, H., Ayuningtyas, R. U., Subhan, B., & Arafat, D. (2016). Exploited but unevaluated: DNA barcoding reveals skates and stingrays (Chordata, Chondrichthyes) species landed in the Indonesian fish market. *Indon J Mar Sci*, 21(2), 77-84.
- Mposhi, A., Van der Wijst, M. G., Faber, K. N., & Rots, M. G. (2017). Regulation of mitochondrial gene expression, the epigenetic enigma. *Front. Biosci.(Landmark Ed)*, 22, 1099-1113.
- Muthiadin, C., Aziz, I. R., & Darajat, A. Z. (2018). DNA Mitokondria Untuk Identifikasi Ikan yang Kaya Spesies. In *Prosiding Seminar Biologi*.
- Noviati & Setiati, N. (2019). *Identifikasi Morfologi Ikan Pari di TPI Tasik Agung Rembang*. (belum publikasi).
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145-1159.
- Passos, M. L., & Saraiva, M. L. M. (2019). Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement*, 135, 896-904.

Peloa, A., Wullur, S., & Sinjal, C. A. (2015). Amplifikasi Gen Cytochrome Oxidase Subunit I (CO1) Dari Sampel Sirip Ikan Hiu Dengan Menggunakan Beberapa Pasangan Primer. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 3(1), 37-42.

PERATURAN PEMERINTAH REPUBLIK INDONESIA NOMOR 60 TAHUN 2007 TENTANG KONSERVASI SUMBERDAYA IKAN.

Prakoso, S. P., Wirajana, I. N., & Suarsa, I. W. (2016). Amplifikasi Fragmen Gen 18s Rrna Pada Dna Metagenomik Madu Dengan Teknik Pcr (Polymerase Chain Reaction). *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences (IJLFS)*, 7, 1-7.

Puckridge, M., Last, P. R., White, W. T., & Andreakis, N. (2013). Phylogeography of the Indo-West Pacific maskrays (Dasyatidae, Neotrygon): A complex example of chondrichthyan radiation in the Cenozoic. *Ecology and Evolution*, 3(2), 217-232.

Rachman, M. (2012). Konservasi nilai dan warisan budaya. *Indonesian Journal of Conservation*, 1(1).

Retnoningsih, A., Wilonoyudho, S., Setyowati, D. L., Hardati, P., Mastuti, N. K. T., Rahayuningsih, M., Handoyo, E., Yuniawan, T., Pratama, H., & Utomo, A. P. Y. (2018). *Pendidikan Konservasi Tiga Pilar*. Semarang: UNNES Press.

Riyanto, B., Nurhayati, T., & Pujiastuti, A. D. (2013). Karakterisasi Glikosaminoglikan dari Tulang Rawan Ikan Pari Air Laut (Neotrygon Kuhlii) dan Pari Air Tawar (Himantura Signifer) Characterisation Of Glycosaminoglycan From Marine Skate (Neotrygon Kuhlii) And Freshwater Skate (Himantura Signifer) Cartilage. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 6(3), 224-232.

Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: mini review. In *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)*, 5, 93-102.

Sauer, P., Muller, M., & Kang, J. (1998). Quantitation of DNA. *Qiagen News*, 2, 23-26.

Setiati, N., Partaya, & Hidayah, N. (2020). *The use of two pairs primer for COI gene amplification on traded stingray at fish auction Tasik Agung Rembang*. (belum publikasi).

Setyawan, W. B., & Pamungkas, A. (2017). Perbandingan karakteristik oseanografi pesisir utara dan selatan Pulau Jawa: pasang-surut, arus, dan gelombang. In *Prosiding Seminar Nasional Kelautan dan Perikanan III 2017*. Universitas Trunojoyo Madura.

Sharma, P., & Sampath, H. (2019). Mitochondrial DNA integrity: role in health and disease. *Cells*, 8(2), 100.

- Southeast Asian Fisheries Development Center (SEAFDEC). (2018). *Fishery Statistical Bulletin of Southeast Asia 2016*.
- Sulandari, S., & Zein, M. S. A. (2003). *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.
- SUSANTI, R., ISWARI, R. S., FIBRIANA, F., & INDRIAWATI, I. (2018). The duck cytochrome oxidase I (CO1) gene: Sequence and patterns analysis for potential barcoding tool. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 19(3), 997-1003.
- Tan, M. P., Amornsakun, T., Siti Azizah, M. N., Habib, A., Sung, Y. Y., & Danish-Daniel, M. (2019). Hidden genetic diversity in snakeskin gourami, *Trichopodus pectoralis* (Perciformes, Osphronemidae), inferred from the mitochondrial DNA CO1 gene. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2), 2966-2969.
- Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Tasik Agung. (2020). *Data Produksi dan Raman TPI Tasik Agung II Kabupaten Rembang*.
- TIANamp Marine Animals DNA Kit Handbook. *TIANamp Marine Animals DNA Kit for Isolation of Genomic DNA from Marine Animal Tissues*. China: Tiangen
- Ward, R. D., Holmes, B. H., White, W. T., & Last, P. R. (2008). DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research*, 59(1), 57-71.
- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., & Hebert, P.D.N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1462, 1847-1857.
- Wehantouw, A., Ginting, E., & Wullur, S. (2017). Identifikasi sirip ikan hiu yang didapat dari pengumpul di Minahasa Tenggara menggunakan DNA Barcode. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 1(1), 62-68.
- Wibowo, S. E., Djaelani, M. A., & Kusumaningrum, H. P. (2013). Pelacakan Gen Sitokrom Oksidase Sub Unit I (COI) DNA Mitokondria Itik Tegal (*Anas domesticus*) Menggunakan Primer Universal. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 15(1), 20-26.
- Wijayanti, F., Abrari, M. P., & Fitriana, N. (2018). Keanekaragaman Spesies dan Status Konservasi Ikan Pari di Tempat Pelelangan Ikan Muara Angke Jakarta Utara. *Jurnal Biodjati*, 3(1), 23-35.
- Wirdatei, W., Indriana, E., & Handayani, H. (2016). Analisis Sekuen DNA Mitokondria Cytochrome Oxidase I (COI) mtDNA Pada Kukang Indonesia (*Nycticebus spp*) sebagai Penanda Guna Pengembangan Identifikasi Spesies. *Jurnal biologi indonesia*, 12(1).

- Yuwono, T. (2006). *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: C.V ANDI OFFSET.
- Zhang, J. B., & Hanner, R. (2011). DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(1), 31-42.
- Zhang, X. H., Meaden, P. G., & Austin, B. (2001). Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(7), 3161-3167.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Pengambilan Sampel di TPI Tasik Agung Rembang



TPI Tasik Agung Rembang



Ikan pari



Pemotongan sirip ikan pari

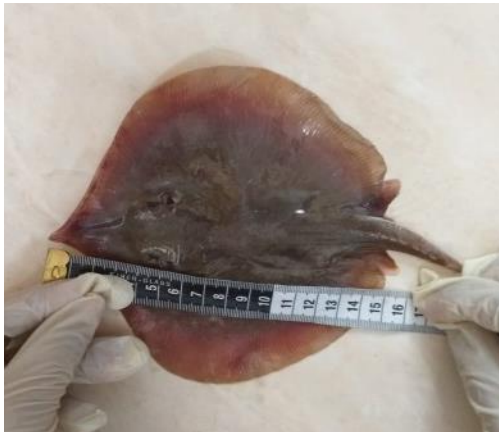
Lampiran 2
Jenis-Jenis Ikan Pari yang Digunakan Pada Penelitian



Himantura gerrardi



Himantura uarnocoides



Himantura walga



Neotrygon kuhlii



Rhinobatos penggali

Lampiran 3 isolasi DNA



Penimbangan sampel sebanyak
30 mg



Penambahan proteinase-K



Sampel divortex



Sampel dispin-down



Inkubasi sampel dalam *waterbath*



Penambahan buffer



Penambahan etanol absolut



Sampel dipindahkan ke *Spin Column* dalam *Collection Tube*



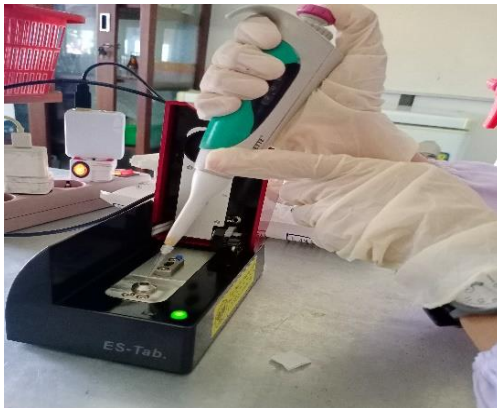
Sampel disentrifus menggunakan *microcentrifuge*



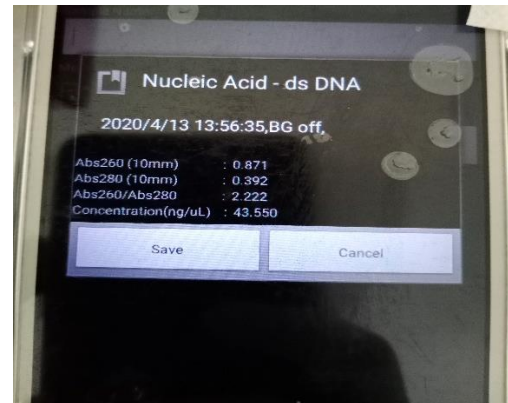
Hasil isolasi DNA

Lampiran 4

Kuantifikasi dan Amplifikasi DNA



Pengukuran kuantitas DNA menggunakan nano spektrofotometer



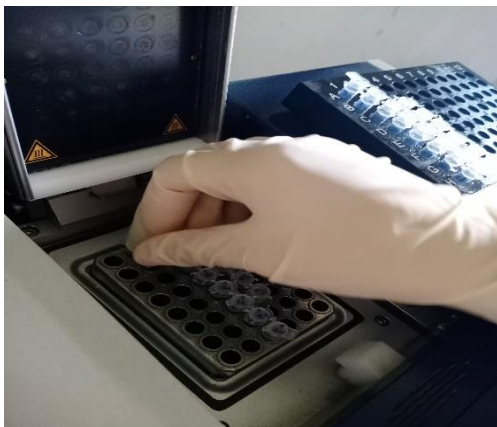
Hasil kuantifikasi DNA



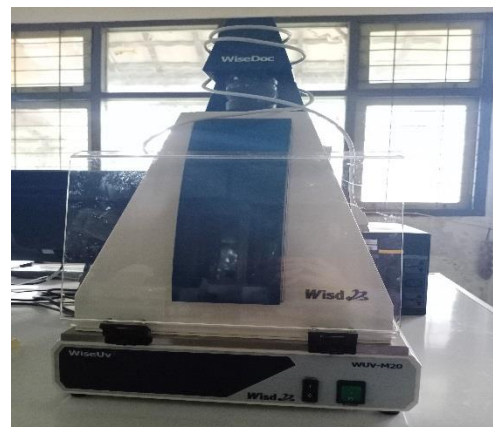
Optimasi suhu *annealing* primer dengan metode *gradient* PCR



Pembuatan *cocktail* PCR



Amplifikasi menggunakan *Thermal cycler*



Visualisasi dengan *UV Transilluminator*

Lampiran 5

Status Konservasi Ikan Pari di Pulau Jawa Berdasarkan Data *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN)* (IUCN, 2020)

Red List Category	Spesies
Critically Endangered	<i>Urolophus javanicus</i>
	<i>Rhynchobatus springeri</i>
	<i>Rhynchobatus cooki</i>
Endangered	<i>Urogymnus polylepis</i>
	<i>Aetomylaeus vespertilio</i>
	<i>Aetomylaeus maculatus</i>
	<i>Pastinachus solocirostris</i>
	<i>Aetobatus flagellum</i>
	<i>Carcharhinus borneensis</i>
	<i>Pateobatis uarnacoides</i>
Vulnerable	<i>Rhinobatos penggali</i>
	<i>Maculabatis pastinacoides</i>
	<i>Urogymnus granulatus</i>
	<i>Carcharhinus falciformis</i>
	<i>Chaenogaleus macrostoma</i>
	<i>Gymnura poecilura</i>
Near Threatened	<i>Squalus hemipinnis</i>
	<i>Chiloscyllium hasselti</i>
	<i>Halaaelurus maculosus</i>
Least Concern	<i>Hexatrygon bickelli</i>
	<i>Etmopterus fusus</i>
	<i>Brevitrygon imbricata</i>
Data Deficient	<i>Squatina legnota</i>
	<i>Narcine maculata</i>
	<i>Okamejei boesemani</i>
	<i>Proscyllium habereri</i>
	<i>Etmopterus splendidus</i>