



**KARAKTERISASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER
LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster* Meigen)
BERDASARKAN DNA PENGKODE ITS2**

SKRIPSI

Oleh

Amatullah Sholihah

111810401019

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2016



**KARAKTERISASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER
LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster* Meigen)
BERDASARKAN DNA PENGKODE ITS2**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

Amatullah Sholihah

111810401019

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

1. Ummi Sundari dan Abah Totok Pratikno yang totalitas memberi kasih sayang, mendoakan, dan mengorbankan apa saja untuk saya.
2. Saudara-saudara terkeren, Nurul Hanifah, Muhammad Syaifudin, Firdaus Al-Fidai, dan Agus Tri Wahyudi yang tidak pernah bosan mendukung, mendoakan, dan menjadi tempat cerita.
3. Guru-guru yang membimbing dan mendidik saya dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi.
4. Alamamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

“Banyak manusia yang hanya mengandalkan usahanya semata serta mengabaikan peran Zat Agung yang memiliki kekuasaan mutlak terhadap nasib dan takdirnya. Tahulah kita bahwa Zat Agung itu adalah Tuhan.”

(Ahmad Rifa’i Rif’an)¹

“Bukankah Dia (Allah) yang memperkenankan (doa) orang yang dalam kesulitan apabila dia berdoa kepada-Nya, dan menghilangkan kesusahan dan menjadikan kamu (manusia) sebagai khalifah (pemimpin) di bumi? Apakah di samping Allah ada Tuhan (yang lain)? Sedikit sekali (nikmat Allah) yang kamu ingat.”

(QS. An-Naml: 62)²

¹ Rif’an, Ahmad Rifa’i. 2011. *Man Shabara Zhafira*. Jakarta: Elex Media Komputindo.

² Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al-Qur’an Tajwid dan Terjemahnya*. Bandung: Syaamil Cipta Media.

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

nama : Amatullah Sholihah

NIM : 111810401019

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Lalat Buah (*Drosophila melanogaster* Meigen) berdasarkan DNA Pengkode ITS2” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang telah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata pernyataan ini dikemudian hari tidak benar.

Jember,
Yang menyatakan,

Amatullah Sholihah
NIM 111810401019

SKRIPSI

**KARAKTERISASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER
LALAT BUAH (*Drosophila melanogaster* Meigen)
BERDASARKAN DNA PENGKODE ITS2**

Oleh

Amatullah Sholihah

111810401019

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. rer. nat. Kartika Senjarini

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Rike Oktarianti, M. Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Lalat Buah (*Drosophila melanogaster* Meigen) berdasarkan DNA Pengkode ITS2” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini
NIP 197509132000032001

Dr. Rike Oktarianti, M. Si.
NIP 196310261990022001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Purwatiningsih
NIP 197505052000032001

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M. Pd.
NIP 195805281988021002

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito, Ph. D.
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Lalat Buah (*Drosophila melanogaster* Meigen) berdasarkan DNA Pengkode ITS2; Amatullah Sholihah, 111810401019; 2016: 46 halaman: Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Lalat buah atau *Drosophila melanogaster* merupakan salah satu hewan coba dan model biologi. Salah satu peran *D. melanogaster* sebagai model biologi adalah untuk mengetahui dampak mutasi genetik pada organisme eukariot. Mutasi genetik dalam satu spesies menyebabkan timbulnya variasi genetik yang akan menimbulkan variasi fenotip (*strain*). Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui variasi dalam populasi atau spesies. Terdapat dua metode untuk mengetahui karakter suatu individu, yaitu metode morfologi dan molekuler. Karakterisasi morfologi dilakukan dengan pengamatan konvensional, sedangkan karakter molekuler dapat diketahui dengan bantuan marker molekuler. Salah satu marker molekuler yang digunakan untuk karakterisasi adalah *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2). Karakteristik ITS2 antara lain berukuran kecil (± 700 bp), memiliki banyak salinan dalam genom inti, serta memiliki derajat konservasi pada setiap komponen.

Terdapat 15 strain di Laboratorium Biologi Dasar FMIPA Universitas Jember yang belum dikarakterisasi morfologi dan molekulernya. Oleh karena itu, perlu dilakukan karakterisasi morfologi dan molekuler pada ke-15 strain tersebut untuk mengetahui masing-masing karakter morfologi dan molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter morfologi dan molekuler serta pembuatan pohon filogeni *D. melanogaster* koleksi Laboratorium Biologi Dasar FMIPA Universitas Jember.

Hasil penelitian ini menyatakan bahwa karakter morfologi *D. melanogaster* *wild type* berbeda dengan *strain black*, *clot*, dan *vestigial*. Perbedaan tersebut terletak pada warna tubuh untuk *strain black*, warna mata pada *strain clot*, dan ukuran sayap

pada *strain vestigial*. Berdasarkan karakterisasi molekuler, diketahui bahwa keempat sampel mirip dengan *D. melanogaster* EU306667.1 yang terdapat di *Gene Bank database* dengan *query cover* 91% dan *identity* 99%. Berdasarkan pohon filogeni yang terbentuk, *D. melanogaster wild type* berkerabat paling dekat dengan *D. melanogaster* EU306667.1, sedangkan *strain clot* dan *black* berkerabat paling jauh dengan *D. melanogaster* EU306667.1. *D. melanogaster strain vestigial* adalah sampel mutan yang berkerabat paling dekat dengan *D. melanogaster* EU306667.1. *D. melanogaster strain clot* dan *black* berada dalam satu *clade* dan terpisah *clade* dengan *D. melanogaster wild type*, *strain vestigial*, dan EU306667.1 yang masing-masing berada pada *clade* yang berbeda.

Perbedaan bentuk sayap memiliki kekerabatan lebih dekat dengan *D. melanogaster wild type* dibandingkan dengan warna mata dan warna tubuh. *D. melanogaster* yang bermutasi pada warna mata dan warna tubuh berkerabat dekat dan berkerabat jauh dengan *D. melanogaster wild type*.

PRAKATA

Segala puji bagi Allah atas rahmat dan karunia_nya sehingga penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Lalat Buah (*Drosophila melanogaster* Meigen) berdasarkan DNA Pengkode ITS2.” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dra. Susantin Fajariyah, M. Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi selama masa perkuliahan;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M. Si. selaku Dosen Pembimbing dan ketua *TBV-Bacteria Research Group* yang telah membantu dan meluangkan waktu dan perhatian untuk membimbing dengan kesabaran. Terima kasih atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk bergabung dalam grup riset;
3. Dr. Rike Oktarianti, M. Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu dan perhatian untuk membimbing dengan penuh kesabaran;
4. Dr. Purwatiningsih dan Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M. Pd. Selaku Dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Purnama Ocviandari, S. P., M. P. Dan Ulfatul Inayah selaku teknisi Laboratorium Biologi dan Teknologi dan Laboratorium Biologi Dasar yang telah banyak membantu memberi masukan selama penelitian;
6. Bapak dan ibu dosen serta seluruh staf Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas keikhlasan membantu penulis selama masa perkuliahan;
7. Ummi Sundari dan Abah Totok Pratikno atas doa-doa di sujud yang panjang. Kalau Allah tidak mengirim orang tua sehebat Ummi Abah, bisa jadi aku bukan Ama yang sekarang;

8. Saudara terkeren, Mbak Nurul, Mas Shev, Dek Alfi, Uda Agus, dan jagoan-jagoan kecil. Kalian *moodbooster* terhebat!;
9. Teman-teman TBV & Bacteria Research Group Rina, Dewi, Zakiya, Bella, Suci, Mbak Esti, Yati, Febri, Whenny, Icil, Alfian, Iim, Habib, Aisyah, Fifit, Novita, Mb Riskha, Mas Renam, Mas Mirza, Mbak Elisa, Mbak Ajeng, Mas Washil terima kasih atas bantuan, motivasi, pengalaman, dan perasaan yang terjalin;
10. Teman-teman Amphibi, Hilma, Galuh, Ima, Qori, Nida, Lina, Syafiq, Amin, Eriani, Anis, Lutfita, Risa, Gayut, Galen, dan semua teman-teman seperjuangan terima kasih atas kebersamaan selama ini;
11. Teman-teman seperjuangan, Aisyah, IkaYe, Mbatik, Lail, Eva, dan Agisan terima kasih ilmunya, nasihatnya, pembelajarannya, tegurannya, pengingatnya. Terima kasih untuk semuanya;
12. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga Allah menjaga, melimpahkan rahmat, dan karunia-Nya dan hanya Allah sebaik-baik pembalas kebaikan.

Jember, 21 Juni 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Biologi <i>Drosophila melanogaster</i> Meigen	4
2.2 Karakterisasi Molekuler <i>Drosophila melanogaster</i> Meigen ...	6
2.3 Marker Molekuler untuk Karakterisasi Genetik	8
2.4 Pohon Filogeni	9
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	11
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11

3.2 Alat dan Bahan	11
3.2.1 Alat.....	11
3.2.2 Bahan	11
3.3 Prosedur Penelitian	11
3.3.1 Karakterisasi Morfologi	12
3.3.2 Karakterisasi Molekuler	12
a. Isolasi Genom	12
b. Amplifikasi DNA Pengkode ITS2	13
c. Purifikasi DNA Hasil PCR.....	14
d. Analisis Sekuen DNA Pengkode ITS2 dan Pembuatan Pohon Filogeni.....	14
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Karakter Morfologi <i>Drosophila melanogaster</i> Meigen	16
4.2 Karakter Molekuler berdasarkan DNA Pengkode ITS2	18
BAB 5. PENUTUP	25
5.1 Kesimpulan	25
5.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Perbedaan morfologi <i>D. melanogaster</i> EU306667.1, <i>wild type</i> , <i>strain black</i> , <i>clot</i> , dan <i>vestigial</i>	22



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2. 1 Morfologi <i>D. melanogaster wild type</i>	5
2. 2 Perbedaan <i>D. melanogaster</i> jantan dan betina	5
2. 3 Siklus hidup <i>D. melanogaster</i>	6
2. 4 Mutasi <i>D. melanogaster</i> pada kromosom nomor 2	7
4. 1 Perbandingan warna mata <i>D. melanogaster wild type</i> (A), <i>clot</i> (B), <i>vestigial</i> (C), dan <i>black</i> (D)	16
4. 2 Sayap <i>D. melanogaster wild type</i> (A), <i>clot</i> (B), <i>vestigial</i> (C), dan betina <i>black</i> (D)	17
4. 3 Warna tubuh <i>D. melanogaster wild type</i> (A), <i>clot</i> (B), <i>vestigial</i> (C), dan betina <i>black</i> (D)	18
4. 4 Visualisasi hasil isolasi DNA genom <i>D. melanogaster</i> dengan metode <i>fingerprint analysis wild type</i> (1), <i>strain black</i> (2), <i>strain clot</i> (3), dan <i>strain vestigial</i> (4)	19
4. 5 Visualisasi hasil PCR DNA pengkode ITS2 <i>D. melanogaster wild type</i> (1), <i>strain black</i> (2), <i>strain clot</i> (3), dan <i>strain vestigial</i> (4)	20
4. 6 Pohon filogeni <i>D. melanogaster wild type</i> , <i>strain black</i> , <i>clot</i> , dan <i>vestigial</i> koleksi Laboratorium Biologi Dasar dan <i>D. melanogaster</i> pada <i>Gene Bank database</i>	22
4. 7 Perbandingan urutan basa nukleotida <i>D. melanogaster wild type</i> , <i>strain</i> <i>black</i> , <i>clot</i> , dan <i>vestigial</i> dengan <i>D. melanogaster</i> yang terdapat dalam <i>Gene Bank database</i> . Tanda (*) menunjukkan urutan basa nukleotida yang sama	24

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Alur Penelitian.....	31
B. Komposisi Bahan	32
B.1 Komposisi Bahan untuk Pembuatan Media <i>Rearing</i>	32
B.2 Komposisi Larutan.....	32
C. Sekuen Utuh Hasil Amplifikasi Sekuen DNA Pengkode ITS2 <i>D. melanogaster wild type, strain black, clot, dan vestigial</i>	33
C. 1 <i>D. melanogaster wild type</i>	33
C. 2 <i>D. melanogaster strain black</i>	33
C. 3 <i>D. melanogaster strain clot</i>	33
C. 4 <i>D. melanogaster strain vestigial</i>	34
D. Homologi <i>D. melanogaster wild type, strain black, strain clot, dan strain vestigial</i> dengan <i>D. melanogaster</i> EU306667.1.....	35
D. 1 Homologi <i>D. melanogaster wild type</i> dengan <i>D. melanogaster</i> EU306667.1	35
D. 2 Homologi <i>D. melanogaster strain black</i> dengan <i>D. melanogaster</i> EU306667.1	35
D. 3 Homologi <i>D. melanogaster strain clot</i> dengan <i>D. melanogaster</i> EU306667.1	36
D. 4 Homologi <i>D. melanogaster strain vestigial</i> dengan <i>D. melanogaster</i> EU306667.1	36

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lalat buah atau *Drosophila melanogaster* Meigen merupakan salah satu jenis serangga *family* Drosophilidae yang berperan penting dalam ilmu biologi karena sering digunakan sebagai model biologi dan hewan coba. Salah satu fungsi penting dari model biologi adalah untuk mempelajari pembelahan sel (Okada, 1988) dan berbagai penyakit manusia yang terpaut sex (*sex linkage*) (The Biology Corner, 2014) karena karakteristik materi genetik yang dimiliki. Lebih jauh lagi, sebagai model dalam mempelajari perubahan genetik dan fenotip suatu individu.

Habitat asli *D. melanogaster* berada di Afrika kemudian tersebar ke seluruh dunia. Penyebaran *D. melanogaster* menyebabkan alel-alel dan fenotip *D. melanogaster* berubah guna beradaptasi dengan lingkungan sekitar (Schmidt *et al.*, 2005). Berbagai penelitian telah dilakukan untuk meneliti taksonomi dan filogenetik *D. melanogaster*, namun penelitian-penelitian tersebut belum mampu memecahkan permasalahan mengenai taksonomi dan filogenetik *D. melanogaster*. Hal ini disebabkan terdapat lebih dari 2000 deskripsi *D. melanogaster* (Hales *et al.*, 2015). Beberapa adaptasi lingkungan yang dilakukan oleh *D. melanogaster* menghasilkan perbedaan fenotip dari normal (*wild type*), sehingga dikenal beberapa *strain D. melanogaster*, antara lain *white* (w), *clot* (cl), *claret* (ca), *eyemissing* (eym), *sephia* (se), *curled* (cu), *taxi* (tx), *dumpy* (dp), *miniatur* (m), *vestigial* (vg), *black* (b), dan *ebony* (e).

Perbedaan fenotip disebabkan karena terjadinya mutasi genetik yang mana berperan dalam terbentuknya variasi genotip dalam satu spesies. Variasi tersebut kemudian dikenal dengan sebutan *strain* (Karmana, 2010). Variasi yang terjadi antar spesies disebut sebagai interspesies, sedangkan variasi dalam satu spesies disebut sebagai intraspesies (Wilkerson *et al.*, 2004). Variasi genetik *D. melanogaster* dapat

diketahui melalui struktur genetik, aliran gen, dan diferensiasi interspesies dan intraspesies. Terdapat beberapa marker yang digunakan untuk mengetahui karakteristik genetik makhluk hidup, antara lain *matK1*, *rbcL*, *Cytochrome c-Oxydase subunit I* (COI), dan *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (Chen *et al.*, 2010). Keragaman makhluk hidup eukariot sampai tingkat spesies dapat diketahui dengan menggunakan ITS. Daerah DNA pengkode ITS dibagi menjadi dua, yaitu ITS1 yang memisahkan 18S rRNA dengan 5,8S rRNA dan ITS2 yang memisahkan sub unit kecil 5,8S rRNA dengan sub unit besar 28S rRNA (Wilkerson *et al.*, 2004).

ITS2 sering digunakan untuk analisis filogenetik makhluk hidup karena memiliki karakteristik unggul, antara lain berukuran kecil (± 700 bp), memiliki banyak salinan dalam genom inti, serta memiliki derajat konservasi pada setiap komponen. Hal tersebut menyebabkan daerah ITS2 mudah diisolasi, diamplifikasi, dan dianalisis (Ekasari *et al.*, 2012). Analisis molekuler dalam studi keragaman genetik berfungsi untuk melihat karakteristik gen yang berhubungan dengan adaptasi ekologi. Sehingga studi keragaman genetik memiliki kontribusi yang besar untuk mengetahui kaitan genetik dengan fenotip *D. melanogaster*.

Laboratorium Biologi Dasar FMIPA Universitas Jember memiliki 15 *strain D. melanogaster*, namun belum ada penelitian mengenai morfologi dan molekuler terhadap 15 *strain* tersebut. Oleh karena itu, perlu dilakukan karakterisasi morfologi dan molekuler serta pembuatan pohon filogeni untuk mengetahui kekerabatan pada *strain D. melanogaster* yang terdapat dalam Laboratorium Biologi Dasar. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui kesesuaian data morfologi dan molekuler *D. melanogaster* laboratorium dengan yang terdapat dalam literatur dan *Gene Bank database*.

1.2 Rumusan Masalah

Terdapat 15 *strain D. melanogaster* Meigen di Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember. Karakterisasi berbasis morfologi maupun molekuler terhadap *D. melanogaster wild type*, *strain black*, *clot*, dan

vestigial belum diteliti. Lebih jauh lagi keterkaitan antara karakterisasi morfologi dengan molekuler serta hubungan filogenetiknya belum dilakukan pada koleksi tersebut.

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi morfologi dan molekuler *D. melanogaster wild type, strain black, clot, dan vestigial* koleksi Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember. Selain itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan hubungan filogenetik *D. melanogaster wild type, strain black, clot, dan vestigial*.

1.4 Batasan Masalah

Karakter morfologi dilakukan dengan mengamati warna mata, *bristle* pada thorax, ukuran sayap, dan warna tubuh. Karakter molekuler diamati berdasarkan DNA pengkode ITS2 pada *D. melanogaster wild type, strain black, strain clot, dan strain vestigial*.

1.5 Manfaat

Diharapkan dari hasil penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai hubungan kekerabatan, morfologi, dan profil genetik berdasarkan DNA pengkode ITS2 pada *D. melanogaster wildtype, strain black, strain clot, dan strain vestigial*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi *Drosophila melanogaster* Meigen

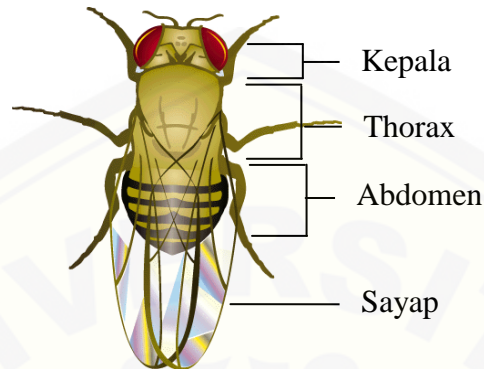
Drosophila melanogaster (*D. melanogaster*) sering digunakan dalam penelitian untuk studi genetik eukariot karena memiliki beberapa kelebihan, antara lain memiliki ukuran tubuh kecil, siklus hidup pendek, dapat memproduksi banyak keturunan dalam waktu singkat, serta murah dan mudah merawatnya (Taufika, 2014). Menurut Borror *et al.* (1992) klasifikasi *D. melanogaster* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Phylum : Arthropoda
Class : Insecta
Ordo : Diptera
Family : Drosophilidae
Genus : *Drosophila*
Species : *Drosophila melanogaster* Meigen

D. melanogaster normal (*wild type*) memiliki ciri-ciri morfologi sebagai berikut: a) terdiri atas tiga segmen tubuh, yaitu kepala, thorax, dan abdomen; (b) memiliki sepasang sayap dan tiga pasang kaki; (c) panjang tubuh $\pm 2 - 4$ mm dengan berat 1 mg; (d) mata majemuk berukuran besar dan berwarna merah; (e) warna tubuh kuning pucat atau coklat muda dengan pigmen-pigmen hitam pada bagian dorsal abdomen (JoVE Science Education Database, 2016). Warna merah mata majemuk disebabkan karena *D. melanogaster* memiliki pigmen kemerahan sebagai sel pigmen primer, yang mana pigmen tersebut mampu menyerap kelebihan sinar biru (Chyb & Gompel, 2013).

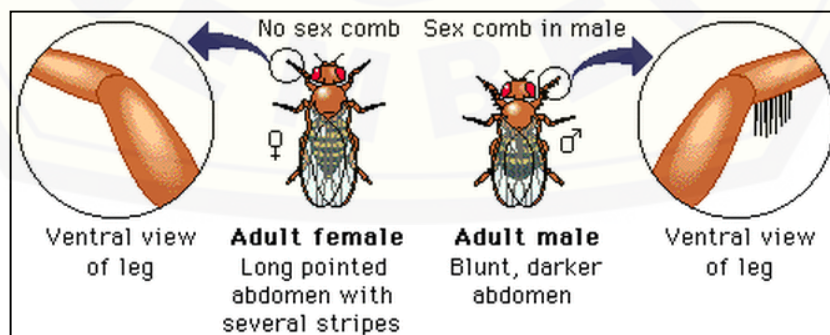
Abdomen *D. melanogaster* bersegmen lima yang terlihat dari garis-garis hitam yang terletak di abdomen. Sedangkan sayap *D. melanogaster wild type* memiliki ukuran yang sama panjang dan lurus, dimulai dari thorax hingga melebihi abdomen

dengan warna transparan (Herskowitz, 1977). Morfologi *D.melanogaster* dapat dilihat pada gambar 2.1.



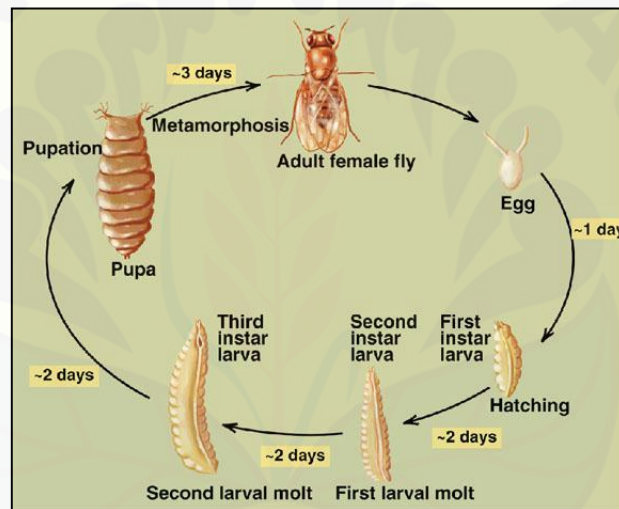
Gambar 2.1 Morfologi *D. melanogaster wild type*
(Sumber: The University of North Carolina, 2015)

Morfologi sex *D. melanogaster* terbagi menjadi jantan dan betina, terdapat beberapa perbedaan morfologi pada keduanya, yaitu ukuran jantan lebih kecil daripada betina (Ward's Science, 2013a). Lalat jantan memiliki *sex comb* (sisir kelamin) pada kaki depan yang berfungsi sebagai alat identifikasi, sedangkan lalat betina tidak memiliki *sex comb* (gambar 2.2). Selain itu dua segmen belakang pada abdomen lalat jantan berfusi menjadi satu sehingga lalat jantan memiliki empat segmen dan membentuk tanda hitam pada bagian dorsal, sedangkan pada lalat betina memiliki segmen abdomen lima buah dan tidak membentuk tanda hitam pada bagian dorsal (Ward's Science, 2013a).



Gambar 2.2 Perbedaan *D. melanogaster* jantan dan betina
(Sumber: The Key to Fly Away, 2014)

D. melanogaster memiliki empat tahap dalam siklus hidupnya yaitu telur, larva, pupa, dan dewasa (gambar 2.3) yang berlangsung selama \pm 12 hari pada suhu kamar (Taufika, 2014). Lalat betina akan melakukan perkawinan dengan lalat jantan setelah mencapai kedewasaan seksual, yakni pada usia 8 jam setelah menetas dari pupa. Selanjutnya lalat betina menyimpan sperma pejantan untuk membuahi telur. Berdasarkan alasan tersebut betina harus dipisahkan sebelum kawin untuk mendapatkan betina *virgin* (Ward's Science, 2013b). *D. melanogaster* akan menghasilkan keturunan baru dalam waktu 8 – 10 hari, lima hari pada tahap telur dan empat hari pada tahap pupa.

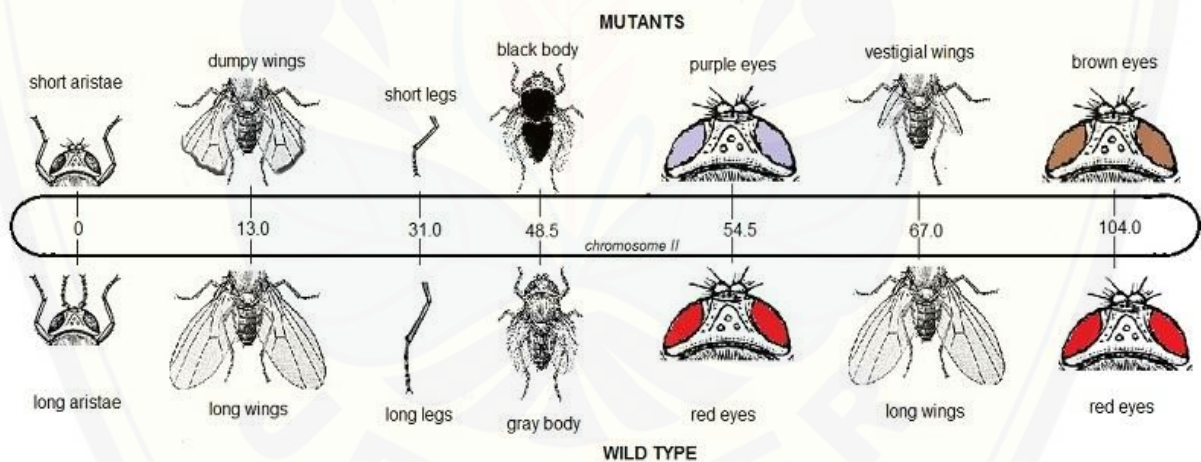


Gambar 2.3 Siklus hidup *D. melanogaster*
(Sumber: The University of British Columbia, 2013)

2.2 Karakterisasi Molekuler *Drosophila melanogaster* Meigen

Diversitas genetik merupakan variasi gen yang menimbulkan variasi di dalam dan antar spesies (Julisaniah, 2008). Besarnya diversitas genetik dalam spesies bergantung pada aliran gen, jumlah individu, tingkat isolasi dari populasi, sistem perkawinan, dan persebaran spesies (Lowe *et al.*, 2004). Aliran gen digunakan oleh spesies untuk mempertahankan hubungan genetik dalam populasi (Pratiwi *et al.*, 2012). Tingkat dan sifat aliran gen tergantung pada reproduksi, mobilitas individu, dan mekanisme penyebaran gamet dan zigot (Lowe *et al.*, 2004).

Karmana (2010) menyatakan bahwa ditemukan *D. melanogaster* yang berbeda dari keadaan normal (*wild type*) disebut sebagai mutan. Mutan-mutan tersebut menghasilkan warna mata, bentuk mata, bentuk sayap, dan warna tubuh yang berbeda dari *wild type*. Karakter fenotip yang berbeda dari *wild type* disebut sebagai fenotip mutan (*mutan phenotype*) karena berasal dari alel *wild type* yang mengalami mutasi (Campbell *et al.*, 2002). Mutasi menyebabkan munculnya variasi dalam spesies yang disebut *strain*. Beberapa contoh *strain D. melanogaster* adalah *black* (b) yang memiliki warna tubuh hitam dan akan semakin hitam seiring dengan bertambahnya umur. *Clot* (cl) yang memiliki warna mata sephia muda dan akan semakin coklat seiring dengan bertambahnya umur *D. melanogaster*. *Vestigial* (vg) yang memiliki sayap mereduksi (Lindsley & Zimm, 1997). Ketiga *strain* tersebut mengalami mutasi pada kromosom nomor 2 (Auliya, 2014). Mutasi yang terjadi pada kromosom nomor 2 dapat dilihat pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 Mutasi *D. melanogaster* pada kromosom nomor 2 (Sumber: The Biology Corner, 2014)

Hasil analisis penelitian Hutter *et al.* (2007) menyebutkan bahwa *D. melanogaster* di Eropa memiliki variasi *D. melanogaster* yang sama dengan *D. melanogaster* di Afrika walaupun keragaman *sequence* DNA *D. melanogaster* di Afrika lebih tinggi daripada di Eropa. Pada penelitian tersebut, Hutter *et al.* (2007) menggunakan ITS untuk mengetahui polimorfisme *D. melanogaster*. Polimorfisme

dapat diuji dengan sequence berulang pada heterokromatin yang berasal dari nenek moyang satu spesies. Marchant & Holm (1988) mengungkapkan bahwa adanya persamaan yang cukup besar pada heterokromatin kromosom nomor 2 dengan kromosom nomor 3.

2.3 Marker Molekuler untuk Karakterisasi Genetik

Penelitian mengenai diversitas genetik mengalami peningkatan sejak sepuluh tahun terakhir. Hal tersebut didukung oleh kemajuan teknologi biomolekuler, salah satunya adanya pengembangan alat untuk mengkarakterisasi genetik yang mempengaruhi fenotip. Selain itu biomolekuler berfungsi untuk menganalisis karakteristik *sequence* gen yang dapat menyebabkan mutasi (Birren *et al.*, 1997). Analisis tersebut dapat dilakukan melalui beberapa teknik biomolekular, antara lain *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Arbitrarily Primed PCR* (AP-PCR), *DNA Amplified Fingerprinting* (DAF), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplification Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan *Sequence tagged Microsatellites* (STMS) juga dapat digunakan untuk analisis diversitas genetik (Bangun, 2007).

Beberapa teknik biomolekular tersebut menggunakan marker molekuler yang berbeda sesuai dengan *sequence* genom yang akan diteliti. Marker molekuler merupakan penanda genetik yang digunakan untuk analisis informasi gen dan filogenetik (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006). Marker molekuler dapat berupa isoenzim atau fragmen DNA (Grisolia & Moreno-cotulio, 2008). Syarat marker molekuler yaitu harus berkorelasi dengan karakter gen yang menjadi target seleksi, sehingga gen yang terseleksi bersifat spesifik. Korelasi antara marker molekuler dengan karakter target seleksi dapat diketahui melalui pengujian-pengujian sebelumnya untuk menyatakan adanya korelasi tersebut.

Marker-marker molekuler dapat menunjukkan diversitas genetik melalui hibridisasi atau amplifikasi sekuen-sekuen spesifik (Grisolia & Moreno-cotulio, 2008). Sekuen tersebut merupakan daerah konservatif, yaitu daerah yang

mengandung informasi genetik dari generasi sebelumnya (Suryanto, 2003). Beberapa contoh marker molekuler adalah *microsatellite* atau *Simple Sequence Repeats* (SSR) (State of The Art in The Management of Animal Genetic Resources, 2006). Selain itu, marker yang sering digunakan untuk analisis informasi genetik adalah *Cytochrome c-Oxydase subunit I* (COI), *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (Chen *et al.*, 2010).

Internal transcribed spacer terletak di ribosomal RNA. Terdapat dua unit *internal transcribed spacer* dalam setiap individu, yaitu ITS1 yang terletak diantara 18S rRNA dan 5,8S rRNA dan ITS2 yang terletak diantara 5,8S rRNA dan 28S rRNA (Beebe *et al.*, 2000). ITS2 digunakan untuk analisis filogeni suatu spesies karena memiliki banyak daerah konservatif (Wilkerson *et al.*, 2004). Daerah konservatif ITS terdiri dari empat heliks, yang mana heliks ketiga adalah yang terpanjang. Selain itu ITS2 memiliki struktur sekunder yang dapat membandingkan karakteristik homolog (Schlotterer *et al.*, 1994).

Hasil penelitian Chen *et al.* (2010) menyebutkan bahwa tingkat keberhasilan menggunakan marker ITS2 lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan *psbA-trnH* (67,6% sampai dengan 72,8%), yaitu terletak antara 90,3% sampai dengan 99,7%. Selain itu, ITS2 berukuran pendek, 160 – 320 base pairs (bp) sehingga ITS2 mudah dianalisis, dapat digunakan untuk melihat hubungan dari subspecies hingga tingkat ordo, dan digunakan untuk melihat adanya kemungkinan kesalahan yang disebabkan oleh struktur sekunder marker molekuler lain (Chen *et al.*, 2010).

2.4 Pohon Filogeni

Hasil analisis molekuler dapat digunakan untuk melihat keragaman genetik *D. melanogaster* dengan membuat pohon filogeni. Pembuatan pohon filogeni dilakukan dengan menyelaraskan sekuen DNA hasil sekuensing dengan beberapa sekuen DNA *D. melanogaster* yang memiliki kemiripan. Penyejajaran dilakukan dengan *multiple alignment* menggunakan program ClustalW, T-coffee, atau Multialin (Patwardhan *et*

al., 2014). Variabel yang digunakan untuk membedakan antar *D. melanogaster* adalah berat molekul pita DNA (Suryanto, 2003).

Terdapat beberapa metode yang digunakan untuk membuat pohon filogeni, antara lain Neighbour-Joining, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, dan Bayesian. Neighbour-Joining memiliki kelebihan analisis yang dilakukan relatif cepat, sedangkan kelemahan metode ini yaitu jika terdapat banyak perbedaan sekuen, estimasi kepercayaan cenderung rendah. Software yang dapat digunakan untuk metode ini adalah PAUP, MEGA, dan PHYLIP. Metode Maximum Parsimony memiliki kelebihan untuk menganalisis ratusan sekuen cukup cepat dan tingkat kepercayaan cukup tinggi jika sekuen memiliki kemiripan. Kelemahan metode Maximum Parsimony adalah jika terdapat variasi substansi pada cabang panjang, maka hasil yang diperoleh kurang baik. Software yang dapat digunakan untuk menganalisis menggunakan metode Maximum Parsimony adalah PAUP, MEGA, dan PHYLIP. Metode pembuatan filogeni yang ketiga adalah Maximum Likelihood, yaitu metode yang dapat menyajikan data filogeni secara lengkap. Kelemahan metode ini adalah analisis lambat karena bergantung pada kesempurnaan akses dan sumber penghitungan. Software yang digunakan untuk analisis dengan metode ini adalah PAUP dan PHYLIP. Metode Bayesian memiliki kelebihan dapat menyajikan data filogeni secara lengkap dan uji bootstrap lebih cepat dibandingkan dengan Likelihood, sedangkan kelemahan metode ini adalah distribusi utama yang menjadi parameter harus spesifik. Software yang dapat digunakan adalah Mr. Bayes (Masrurroh, 2015).

Kestabilan pohon filogeni diperoleh dengan menggunakan metode bootstrap. Uji bootstrap dilakukan dengan pengulangan 500 – 1000 kali untuk mendapatkan tingkat kepercayaan tinggi. Uji bootstrap dikatakan stabil jika memiliki nilai lebih besar sama dengan 70% (Baldauf, 2003).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Mei 2015 sampai Maret 2016 di Laboratorium Biologi Dasar dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember. Sekuensing dilakukan di Lembaga Sekuensing 1st Base Singapura.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah mikroskop stereo Olympus SZ51, optilab, *beaker glass*, gelas ukur, *freezer*, oven, sentrifuge, desikator, mikropipet, tip, eppendorf 500 μ l dan 1,5 ml, vortex, mesin elektroforesis, UV iluminator, dan mesin PCR.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu *D. melanogaster wild type*, *strain black* (b), *strain clot* (cl), *strain vestigial* (vg), *lysis buffer*, *precipitation buffer* (KAc), isopropanol, ethanol 70%, ddH₂O, 2x PCR master mix, 5,8 primer F, 28 primer R, NT *buffer*, NT3 *buffer*, NI *buffer*, ekstrak DNA, *loading dye*, *agarose*, TAE *buffer*, dan marker berupa DNA ladder 1kb dan 100bp.

3.3. Prosedur Penelitian

D. melanogaster yang digunakan pada penelitian ini yaitu *D. melanogaster wild type*, *strain black*, *strain clot*, dan *strain vestigial* yang berasal dari koleksi Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember.

3.3.1. Karakterisasi Morfologi

Metode yang digunakan untuk karakterisasi morfologi *D. melanogaster* yaitu dengan menganalisis lebih dari 10 *whole body* masing-masing *strain* menggunakan mikroskop stereo Olympus SZ51 dan didokumentasikan menggunakan optilab. Pengukuran *D. melanogaster* dilakukan dengan bantuan aplikasi ImageRaster 2. Sebelum diamati, dilakukan kalibrasi skala ImageRaster 2 dengan cara menyesuaikan jumlah baris skala pada perbesaran tertentu. Karakterisasi morfologi meliputi warna mata, ukuran sayap, dan warna tubuh. Pengukuran panjang sayap dan pemberian skala menggunakan ImageRaster 2 yang disesuaikan dengan perbesaran pada saat *D. melanogaster* didokumentasikan. Hasil karakterisasi tersebut kemudian dianalisis menggunakan literatur yang sudah ada.

3.3.2. Karakterisasi Molekuler

a. Isolasi DNA Genom

Metode yang digunakan untuk isolasi genom pada karakterisasi molekuler *fingerprint analysis*. Prinsip metode ini adalah mengetahui profil DNA dengan cara melisis sel dan mengendapkan komponen-komponen yang memiliki berat molekul lebih berat dari DNA (Oorschot & Jones, 1997).

D. melanogaster dimasukkan ke dalam eppendorf 1,5 ml dan disimpan pada suhu -20°C selama 10 menit. Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan cara menambahkan 500 μl *lysis buffer* kemudian ditumbuk menggunakan mikropistil sampai *whole body* hancur. Selanjutnya ditambahkan 100 μl *precipitation buffer* (KAc). Setelah ditambahkan *precipitation buffer*, di-*swirling* selama 20 detik dan diinkubasi *on ice* selama 5 menit. Suspensi tersebut kemudian disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit.

Supernatan hasil sentrifuge dipindah sebanyak 400 μl ke eppendorf 1,5 ml baru dan ditambah 360 μl isopropanol dingin. Suspensi di-*swirling* selama 20 detik dan diinkubasi *on ice* kembali selama 5 menit. Kemudian suspensi disentrifuge kembali dengan kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C , dan selama 15 menit. Supernatan yang

diperoleh dibuang. Pellet yang mengandung DNA genom dicuci menggunakan 200 μl *ethanol* 70% dingin dan disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm, pada suhu 4°C, dan selama 2 – 5 menit. Supernatan dibuang. Tahap terakhir metode ekstraksi DNA ini, yaitu pellet di-*vacum dry* selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 50 μl ddH₂O setril dan disimpan pada suhu -20°C.

DNA genom yang telah diekstrak dapat dilihat melalui proses *running* menggunakan elektroforesis, dengan cara menambahkan 5 μl sampel DNA pada 2 μl *loading dye*, kemudian dimasukkan ke sumuran *gel agarose* 1,5% yang mengandung EtBr. Marker yang digunakan adalah DNA ladder 1kb. *Running* dilakukan pada 100V selama 35 menit dengan TAE *buffer* sebagai *running buffer*. Tahap terakhir adalah hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan UV-Illuminator untuk melihat pita DNA genom *D. melanogaster*.

b. Amplifikasi DNA Pengkode ITS2

DNA ITS2 diamplifikasi menggunakan primer DNA pengkode sekuen ITS2, yaitu 5,8F (5' TGT GAA CTG CAG GAC ACA TGA A 3') dan 28R (5' ATG CTT AAA TTT AGG GGG TAG TC 3') (Wilkerson *et al.*, 2004). Masing-masing reaktan memiliki konsentrasi 0,2 μM untuk setiap primer 200 μM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), satu unit Thermoprime Plus DNA Polymerase, dan 0,01% Tween (Walton *et al.*, 2007).

Amplifikasi DNA dengan metode PCR dilakukan dalam 50 μl campuran yang berisi 2 μl DNA *template*, 2,5 μl primer ITS2, 25 μl PCR Master Mix, dan 20,5 μl ddH₂O steril. Temperatur yang digunakan untuk amplifikasi sampel DNA adalah predenaturasi 94°C selama 5 menit sebelum 35 siklus amplifikasi, kemudian denaturasi 94 °C selama 1 menit, annealing 54°C selama 30 detik, elongasi 72 °C selama 1 menit, dan final extension 94°C selama 5 menit (Walton *et al.*, 2007).

Produk PCR diambil 5 μl dan ditambahkan 2 μl *loading dye* kemudian di-*running* menggunakan elektroforesis dalam 1,5% *gel agarose* yang mengandung EtBr untuk mengetahui kualitas DNA sebelum dilakukan pemurnian. DNA ladder 1 kb

digunakan sebagai marker pada saat *running*. Proses *running* menggunakan elektroforesis pada 100 V selama 45 menit dengan buffer TAE sebagai *running buffer*. Kemudian divisualisasi menggunakan UV-Illuminator.

c. Purifikasi DNA Hasil PCR

Produk PCR pada agel agarose 1% dimurnikan mengikuti prosedur PCR clean-up Gel Extraction NucleoSpin® Extract II. Purifikasi dilakukan dengan memotong gel agarose yang mengandung pita DNA genom dimasukkan kedalam tabung eppendorf 1,5 ml dan ditimbang. Kemudian ditambahkan buffer NT. Selanjutnya sampel diinkubasi pada suhu 50°C selama 5-10 menit lalu divortex hingga homogen. Kemudian sampel dimasukkan kedalam kolom NucleoSpin® Extract II yang sebelumnya telah ditempatkan pada tabung koleksi. Disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik pada suhu 28°C hingga cairan pada kolom berpindah ke tabung koleksi yang nantinya dibuang.

Tahap berikutnya kolom NucleoSpin® Extract II diletakkan pada tabung koleksi. Kemudian ditambahkan 600 µl NT3 *buffer* (buffer pencuci) dan disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik pada suhu 28°C untuk mencuci sampel, tahap ini diulangi satu kali. Sisa ethanol dihilangkan dengan cara diinkubasi 70°C selama 3 menit. Selanjutnya kolom NucleoSpin® Extract II dipindahkan ke tabung eppendorf 1,5 ml. Sampel DNA pada kolom dielusi menggunakan 50 µl NE *buffer* dan diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit. Tahap terakhir yaitu suspensi disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama satu menit pada suhu 28°C untuk mendapatkan DNA murni.

d. Analisis Sekuen DNA Pengkode ITS2 dan Pembuatan Pohon Filogeni

Penentuan urutan DNA murni (sekuensing) dilakukan dengan mengirim DNA hasil purifikasi produk PCR ke 1st Base Singapura. Kemudian data kasar hasil sekuensing dilakukan *editing* dan analisis menggunakan *BioEdit Alignment Sequence Editor*. Hasil analisis tersebut berupa *alignment* sekuen DNA pengkode ITS2 dari masing-masing sampel.

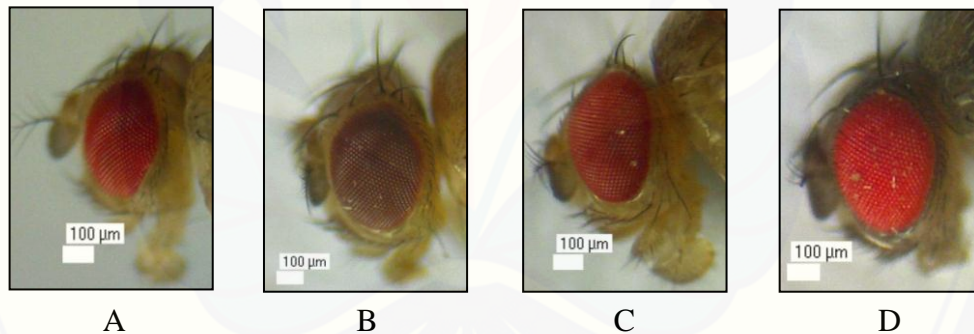
Sekuen tersebut kemudian dibandingkan dengan *database* gen ITS2 di *Gene Bank* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) *online software* yang diakses melalui <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Informasi yang didapat dari pencarian sekuen adalah *D. melanogster* dengan nilai *alignment* tertinggi (*Max Score*) dari sekuen *database*, nilai *alignment* total (*Total Score*) dari semua *alignment* sekuen, presentase basa nukleotida (*query cover*) yang dapat diproses *Gene Bank*, presentase kesalahan (*E value*), presentase kemiripan (*Max Identity*) dari semua *query-subject alignment*, dan *accession* dari semua *database* yang ada. Jika derajat kesamaan sekitar 99-100% mengindikasikan spesies yang sama, 97-98 % mengindikasikan spesies yang berbeda tetapi dalam satu genus, dibawah 97 % mengindikasikan spesies baru (Huard, 2007).

Pohon filogeni dibuat dengan cara memasukkan konsensus basa nitrogen yang telah disejajarkan menggunakan BioEdit ke dalam *Molecular Evolution Genetics Analysis* (MEGA) *software* versi 5.05. Metode analisis yang digunakan yaitu metode *neighbour-joining* dengan 1.000 kali pengulangan pada uji *bootstrap*.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Karakter Morfologi *Drosophila melanogaster* Meigen

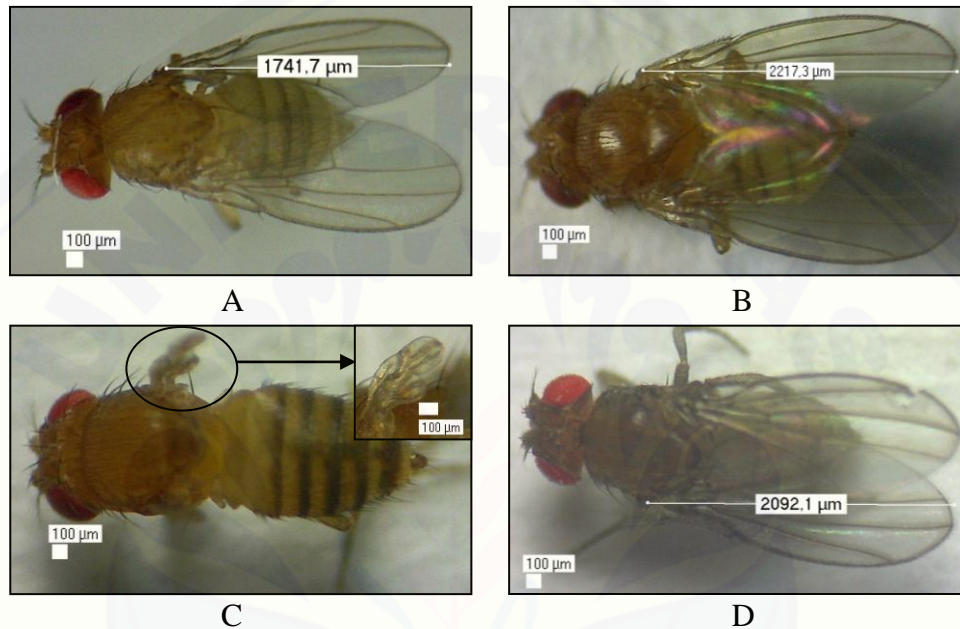
Karakterisasi morfologi dilakukan dengan membandingkan *D. melanogaster wild type* dengan *D. melanogaster strain black, clot, dan vestigial*. Karakterisasi tersebut dilakukan untuk mengetahui perbedaan morfologi *wild type* dengan mutan pada bagian mata (*clot*), sayap (*vestigial*), dan warna tubuh (*black*). Ketiga mutan tersebut dikontrol oleh kromosom 2 (Strickberger, 1962). Karakterisasi meliputi warna mata, ukuran sayap, dan warna tubuh. Perbandingan warna mata dapat dilihat pada gambar 4.1, ukuran sayap dapat dilihat pada gambar 4.2, dan warna tubuh terdapat pada gambar 4.3.



Gambar 4.1 Perbandingan warna mata *D. melanogaster wild type* (A), *strain clot* (B), *strain vestigial* (C), dan *strain black* (D).

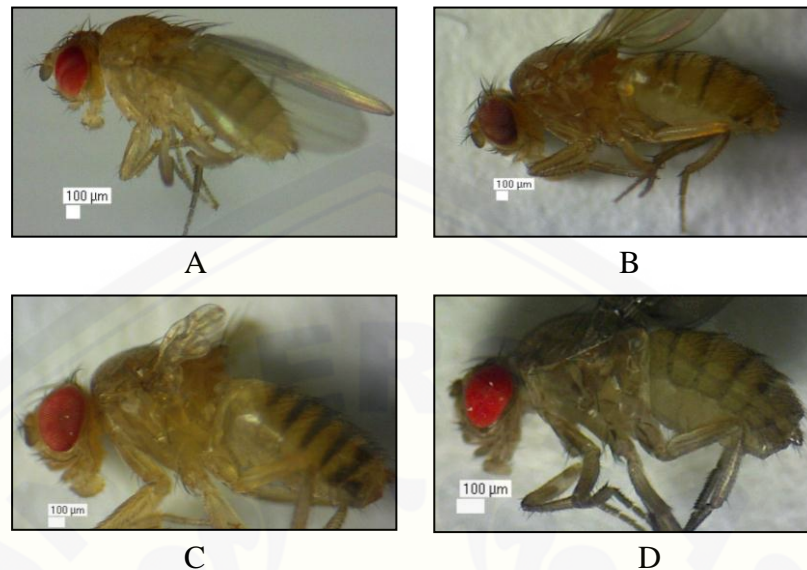
Karakterisasi terhadap warna mata yang telah dilakukan (gambar 4.1) menunjukkan bahwa *D. melanogaster strain vestigial* dan *black* memiliki mata dengan struktur permukaan halus, berbentuk oval, dan berwarna merah. Artinya, kedua mutan tersebut memiliki struktur permukaan, bentuk, dan warna mata yang sama dengan *wild type*. Berbeda dengan *strain clot* yang memiliki mata berwarna coklat. Hal tersebut menandakan bahwa *clot* mengalami mutasi pada kromosom nomor 2 yang mengontrol warna mata (Strickberger, 1962). Kondisi mata tersebut

sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Brooker (2009) bahwa *D. melanogaster wild type* memiliki mata halus dan berwarna merah. Kondisi mata yang halus dikontrol oleh kromosom nomor 3. Sedangkan warna mata pada *D. melanogaster* dikontrol oleh kromosom nomor 1, 2, dan 3 (Brooker, 2009).



Gambar 4.2 Sayap *D. melanogaster wild type* (A), *strain clot* (B), *strain vestigial* (C), dan *strain black* (D).

Gambar 4.2 menunjukkan bahwa ukuran sayap *D. melanogaster wild type* lebih panjang daripada tubuhnya. Kondisi sayap *wild type* pada saat istirahat yaitu tertutup dengan sempurna. Bagian ujung sayap membulat sempurna dan tidak ada lekukan ke dalam. Kondisi sayap dikontrol oleh kromosom nomor 1, 2, dan 4 (Brooker, 2009). Berdasarkan gambar 4.2 diketahui bahwa sayap *D. melanogaster strain clot* dan *black* lebih panjang daripada tubuh, sehingga dapat disimpulkan bahwa *strain clot* dan *black* tidak mengalami mutasi pada bagian sayap. *D. melanogaster strain vestigial* berbeda dengan dua strain lainnya, pada strain ini, bagian sayap mengalami reduksi sehingga sayap berukuran sangat kecil. Perbedaan kondisi sayap mutan dengan *wild type* disebabkan karena terjadi mutasi pada kromosom nomor 2 (Strickberger, 1962).



Gambar 4.3 Warna tubuh *D. melanogaster wild type* (A), *strain clot* (B), *strain vestigial* (C), dan *strain black* (D).

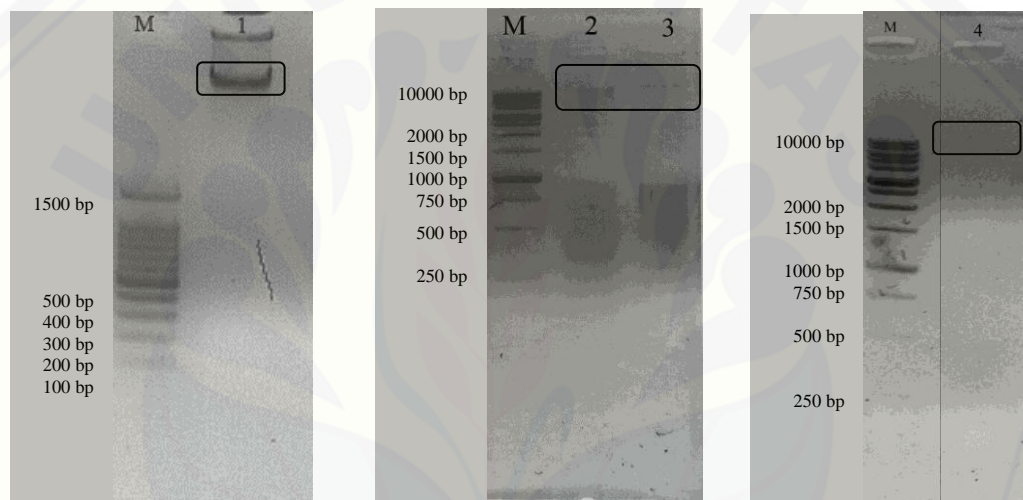
Kromosom 1, 2, dan 3 selain mengontrol warna mata juga mengontrol warna tubuh. Berdasarkan gambar 4.3 diketahui bahwa *D. melanogaster wild type* memiliki warna tubuh coklat terang. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Graf *et al* (1992) yang mengungkapkan bahwa *D. melanogaster wild type* memiliki warna tubuh abu-abu sampai coklat, sedangkan warna tubuh mutan lebih gelap dari abu-abu atau lebih terang dari coklat (kuning). Berdasarkan hasil karakterisasi warna tubuh (gambar 4.3), *D. melanogaster strain clot* dan *vestigial* memiliki warna tubuh coklat menyerupai warna tubuh *wild type*. *D. melanogaster strain black* mengalami mutasi pada kromosom nomor 2 (Strickberger, 1962), sehingga warna tubuh strain ini berbeda dengan *wild type*. Mutasi tersebut menyebabkan tubuh strain *black* berwarna hitam.

4.2. Karakter Molekuler berdasarkan DNA Pengkode ITS2

Visualisasi hasil isolasi genom *D. melanogaster wildtype*, *strain clot*, *vestigial*, dan *black* ditunjukkan pada gambar 4.4, keempat sampel tersebut menunjukkan adanya DNA genom. Hal ini ditunjukkan dengan posisi pita (*band*) yang berada

diatas 1.500 dan 10.000 bp, karena ukuran *band* DNA genom *D. melanogaster* adalah 1,8 Mbp (Adams *et al.*, 2011).

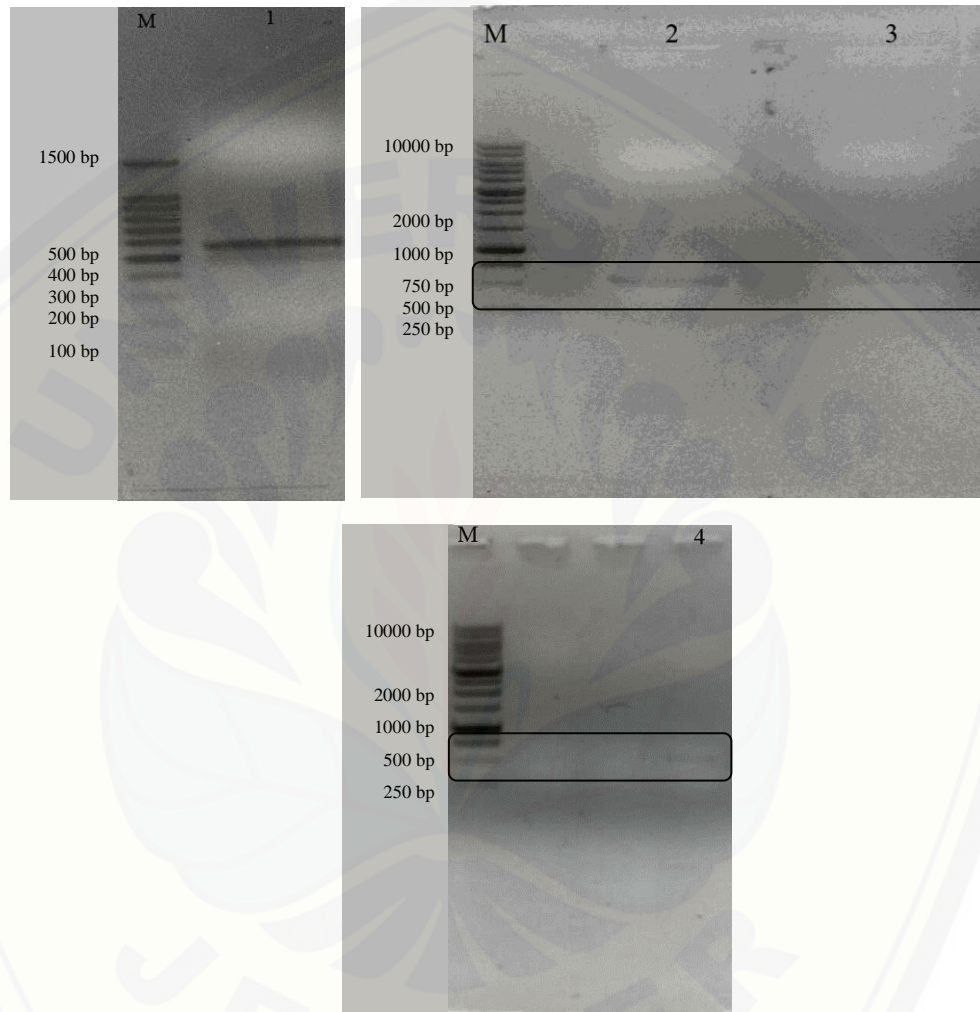
Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR. Hasil amplifikasi DNA dapat dilihat pada gambar 4.5. Prinsip PCR adalah memperbanyak sekuen spesifik DNA sesuai dengan primer yang digunakan, pada penelitian ini primer yang digunakan adalah ITS2. Selanjutnya dilakukan purifikasi DNA yang bertujuan untuk memperoleh DNA murni dari DNA hasil PCR. Hasil purifikasi ini kemudian disekuensing dan dianalisis.



Gambar 4.4 Visualisasi hasil isolasi DNA genom *D. melanogaster wild type* (1), *strain black* (2), *strain clot* (3), dan *strain vestigial* (4).

Berdasarkan hasil pembacaan basa nukleotida (sekuensing) DNA pengkode ITS2, diperoleh sekuen dengan panjang nukleotida yang bervariasi. Prinsip sekuensing hampir sama dengan PCR, hanya saja DNA *template* yang digunakan dapat berupa untai tunggal maupun untai ganda (Masrurroh, 2015). Penyejajaran sekuen DNA menggunakan BioEdit software. Hasil PCR menggunakan ITS2 yang berhasil diamplifikasi memiliki ukuran antara 450 – 480 bp. Hasil ini sesuai dengan prediksi ITS yang dituju yang terdiri dari 5,8S dan 28S atau berukuran 509 bp (Kuracha *et al.*, 2008). Penyejajaran kedua sekuen didapatkan sekuen DNA pengkode ITS2 dengan panjang *D. melanogaster wild type* 490 bp, *strain black* 487 bp, *strain*

clot 450 bp, dan *strain vestigial* 487 bp. Sekuen-sekuen tersebut kemudian dibandingkan dengan sekuen DNA pengkode ITS2 di *Gene Bank database* dengan menggunakan *BLAST online software*.



Gambar 4.5 Visualisasi hasil PCR DNA pengkode ITS2 *D. melanogaster wild type* (1), *strain black* (2), *strain clot* (3), dan *strain vestigial* (4).

Berdasarkan hasil BLAST, diketahui bahwa *D. melanogaster wild type*, *strain black*, *strain clot*, dan *strain vestigial* koleksi Laboratorium Biologi Dasar FMIPA Universitas Jember memiliki kemiripan (*identity*) 99% dan *query cover* 91% dengan *D. melanogaster* yang memiliki *accession number* EU306667.1 pada *Gene Bank database*. *Query cover* yaitu banyaknya sekuen DNA dari organisme koleksi

Laboratorium Biologi Dasar FMIPA Universitas Jember yang dapat dibandingkan dengan sekuen DNA di *Gene Bank database*.

Perbedaan hasil analisis keempat sampel terletak pada nilai *alignment* tertinggi (*max score*) dari sekuen *database* dan nilai *alignment* total (*total score*) dari semua nilai *alignment* sekuen. *Max score* dipengaruhi oleh gap, yaitu adanya insersi atau delesi antara *query* (basa nukleotida yang di-BLAST) dengan *subject* (basa nukleotida pada *Gene Bank database*). *D. melanogaster wild type* memiliki *max score* 804 bits atau 435 bp dan *total score* 804 bits (435 bp). *D. melanogaster strain black, clot, dan vestigial* masing-masing memiliki *max score* 813 bits (440 bp), 749 bits (405 bp), dan 813 bits (440 bp), sedangkan *total score* masing-masing adalah 813 bits (440 bp), 749 (405 bp), dan 813 bits (440 bp). Hal tersebut dapat terjadi karena perbedaan sekuen DNA hanya terdapat pada bagian tertentu, sehingga tidak merubah susunan sekuen DNA secara signifikan.

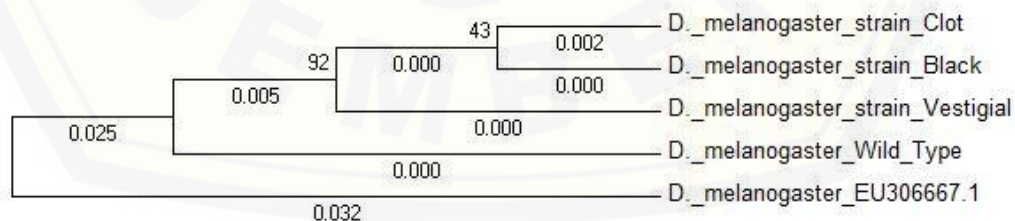
D. melanogaster dengan *accession number* EU306667.1 merupakan lalat buah asal India yang memiliki ciri-ciri fenotip warna tubuh lebih gelap, ukuran sayap lebih panjang dari tubuh, dan mata berwarna merah (Munjali *et al.*, 1997). Perbedaan fenotip pada EU306667.1 dan *D. melanogaster wild type* koleksi Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember menyebabkan keduanya memiliki urutan basa nukleotida yang berbeda (gambar 4.7). Secara umum, perbandingan morfologi *D. melanogaster* EU306667.1, *wild type, strain black, clot, dan vestigial* dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tahap berikutnya yaitu pembuatan pohon filogeni untuk mengetahui kekerabatan dari keempat sampel. Pohon filogeni dibuat menggunakan metode *Neighbor-joining tree* dengan aplikasi *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 5.05. Tes kestabilan filogeni menggunakan metode *bootstrap* dengan pengulangan 1000 kali.

Tabel 4.1 Perbedaan morfologi *D. melanogaster* EU306667.1, *wild type*, *strain black*, *clot*, dan *vestigial*.

Karakter	<i>D. melanogaster</i> EU306667.1	<i>D. melanogaster wild type</i>	<i>D. melanogaster Black</i>	<i>D. melanogaster clot</i>	<i>D. melanogaster vestigial</i>
Mata	Berwarna merah	Berwarna merah	Berwarna merah	Berwarna coklat	Berwarna merah
Ukuran Sayap	Lebih panjang dari ukuran tubuh	Lebih panjang dari ukuran tubuh	Lebih panjang dari ukuran tubuh	Lebih panjang dari ukuran tubuh	Sayap mereduksi
Warna tubuh	Lebih gelap dari <i>D. melanogaster wild type</i>	Coklat	Hitam	Coklat	Coklat

Gambar 4.6 juga menunjukkan *clade D. melanogaster strain black* dan *clot* bertemu pada satu titik. Berdasarkan metode *bootstrap*, keduanya memiliki tingkat kepercayaan yang rendah, karena hanya terdapat 420 kali dari 1000 kali ulangan. *D. melanogaster strain vestigial* berasal dari *clade* yang berbeda dengan dua mutan sebelumnya dan bertemu pada satu titik dengan *clade* yang berasal dari titik *D. melanogaster strain black* dan *clot*. Hasil *bootstrap* pada titik ini juga menunjukkan tingkat kepercayaan yang rendah, karena hanya terdapat 910 kali dari 1000 kali ulangan. Sedangkan *D. melanogaster wild type* berasal dari *clade* yang berbeda dengan tiga sampel sebelumnya.



Gambar 4.6 Pohon filogeni *D. melanogaster wild type*, *strain black*, *clot*, dan *vestigial* koleksi Laboratorium Biologi Dasar dan *D. melanogaster* pada *Gene Bank database*.

BAB 5. PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Karakter morfologi *D. melanogaster strain black*, *clot*, dan *vestigial* berbeda dengan *D. melanogaster wild type*. Perbedaan morfologi *strain black* terletak pada warna tubuh, *strain clot* berbeda pada warna mata, dan *strain vestigial* berbeda pada bagian sayap. Warna tubuh *strain black* adalah hitam, warna mata *strain clot* adalah coklat, dan sayap *strain vestigial* mengalami reduksi.

Keempat sampel memiliki *query cover* 91% dan *identity* 99% dengan *D. melanogaster* EU306667.1. Hasil analisis sekuen DNA berdasarkan pengkode ITS2 menunjukkan bahwa *D. melanogaster wild type* berkerabat dekat dengan *D. melanogaster* EU306667.1. *D. melanogaster strain clot* dan *black* berkerabat paling jauh dengan *D. melanogaster* EU306667.1 dari keempat sampel. *D. melanogaster strain vestigial* adalah mutan yang berkerabat paling dekat dengan *D. melanogaster* EU306667.1 daripada dibandingkan *strain clot* dan *black*. Hipotesis keterkaitan morfologi dan molekuler adalah *D. melanogaster* yang mengalami mutasi pada bagian sayap berkerabat lebih dekat dengan *wild type* jika dibandingkan dengan *D. melanogaster* yang bermutasi pada warna mata atau warna tubuh

5.2. Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan karakterisasi berbasis morfologi dan molekuler pada 11 strain lain yang terdapat di Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M. D., Susan E. C., Robert A. H., Cheryl A. E., Jeannine D. G, Peter G. A., Steven E. S., Peter W. L., Roger A. H., Richard F. G., Reed A. G., Suzanna E. L., Stephen. R., Michael, A., Scott, N. H., Granger, G. S., Jennifer, R. W., Mark, D. Y., Qing, Z., Lin, X. C., Rhonda, C. B., Yu-hui, C. R., Robert, G. B., Mark, C., Barret, D. P., Kenneth, H. W., Clare, D., Evan, G. B., Gregg, H., Catherine, R. N., George, L. G. M., Josep, F. A., Anna, A., A., Cynthia, A., Danita, B., Richard, M. B., Anand, B., James, B., Leyla, L. B., Ellen, M. B., Karen, Y. B., P. V., Benjamin, P. B., Deepali, B., Cherry, J. M., Simon, C., Carl, D., Lionel, B. D., Peter, D., Beatriz, De P., Lisa, E. D., Michael, D., Shannon, D., Boris, C. D., Patrick, D., Kenneth, J. D., Andrei, E. G., Neha, S. G., William, M. G., Ken, G., Anna, G., Fangcheng, G., Judith, R. H., Jarrett, H., Damon, H., Kathryn, A. H., Timothy, J. H., & Ming-hui, W. 2011. "The Genome Sequence of *Drosophila Melanogaster*." *Science* 2185(2000).
- Auliya, R. 2014. *Perbedaan Latar Belakang dan Umur Maternal terhadap Frekuensi Pindah Silang Antara Locus b dengan Locus dp pada Lalat Buah*. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Universitas Jember.
- Baldauf, S. L. 2003. Phylogeny for The Faint of Heart: A Tutorial. *Elsevier* 19 (6): 345-351.
- Bangun, Sarro Ina Ita. 2007. "Marka Molekuler." *ILMU dan BUDAYA* 27(4): 2007.
- Beebe, Nigel W, R D Cooper, Desmond H Foley, and John T Ellis. 2000. "Populations of the South-West Paci c Malaria Vector *Anopheles Farauti* S . S . Revealed by Ribosomal DNA Transcribed Spacer Polymorphisms." 84(November 1998): 244-53.
- Birren, B., E. D. Green, S. Klapholz, R. M. Myers, & J. Roskams. 1997. *Genome Analysis: A Laboratory Manual: Analyzing DNA*. Vol 1. Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Borrer, D. J., C. A. Triplehorn, & N. F. Johnson. 1992. *Pengenalan Pelajaran Serangga*. Terjemah oleh Soetiyono Partosoedjono. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

- Brooker, Robert J. 2009. *Genetic: Analysis & Principles*, Third Edition. New York: McGraw-Hill.
- Campbell, N. A. J. B. Reece, & L. G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Edisi Kelima Jilid 1. Terjemahan oleh R. Lestari. Jakarta: Erlangga.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., Leon, C. 2010. "Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species." *PloS one* 5(1): 1–8.
- Chyb, S. & N. Gompel. 2013. *Atlas of Drosophila Morphology Wild Type and Classical Mutants*. Oxford: Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-384688-4
- Ekasari, T W D, A Retnoningsih, and T Widiанти. 2012. "Analisis Keanakeragaman Kultivar Pisang Menggunakan Penanda PCR-RFLP Pada Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA Ribosom." *Jurnal MIPA* 35(1).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. *Molecular Markers- a Tool for Exploring Genetic Diversity*. Section C. State of The Art in the Management of Animal Genetic Resources:359 – 379.
- Graf, U., N. V. Schaik, F. E. Würigler. 1992. *Drosophila Genetics: A Practical Course*. German: Spreinger-Verlag.
- Grisolia, Alexeia Barufatti, and Vanessa Roma Moreno-cotulio. 2008. "Molecular Markers and Genetic Diversity in Neotropical Felids." *Intechopen* (Figure 2): 105–20.
- Hales, Karen G., Christopher a. Korey, Amanda M. Larracuenta, and David M. Roberts. 2015. "Genetics on the Fly: A Primer on the Drosophila Model System." *Genetics* 201(3): 815–42.
- Herskowitz, I. H. 1977. *Principles of Genetics*. New York: Mac Millan Publishing Company.
- Huard, R.C. 2007. *16S rRNA Sequencing in The Clinical Microbiology Laboratory*. New York: Columbia University Medical Centre.
- Hutter, S., H. Li, S. Beisswanger, D. De Lorenzo, & W. Stephan. 2007. Distinctly Different Sex Ratios In African And European Populations of *Drosophila*

melanogaster Inferred from Chromosome-Wide SNP Data. *Genetics* doi: 10.1534/genetics.107.074922.

James, Anthony A. & P. J. Bryant. 1981. *Mutation Causing Pattern Deficiencies and Duplications in the Imaginal Wing Disk of Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* (85): 39-54.

JoVE Science Education Database. 2016. Essentials of Biology 1: Yeast, Drosophila, and C. elegans. *An introduction to Drosophila melanogaster*. JoVE, Cambridge, MA. doi: 10.379/5082

Julisaniah, Nur Indah. 2008. "Cucumber (Cucumis Sativus L.) Relationship Analysis Using RAPD-PCR and Isozyme Methods." *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity* 9(2): 99–102.
<http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D0902/D090205.pdf> (March 22, 2015).

Karmana, I Wayan. 2010. "Pengaruh Macam Strain Dan Umur Betina Terhadap Jumlah Turunan Lalat Buah." 4(2): 1–6.

Kuracha, M. R., V. R. Tamalampudi, B. Duvvuri, S. K. Duvvuri, & P. Nagaraja Rao. 2008. *The untranslated internal transcribed spacer region (ITS-1 and ITS-2) of the nuclear ribosomal genes as a tool for phylogenetic analysis of insect orders*. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/164431395?report=genbank&log\\$=nuclotop&blast_rank=26&RID=JHR1DF8C01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/164431395?report=genbank&log$=nuclotop&blast_rank=26&RID=JHR1DF8C01R) [08 Mei 2016]

Lindsley, D. L. & G. G. Zimm. 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. California: Academic Press, Inc.

Lowe, Andrew, Stephen Harris, and Paul Ashton. 2004. *Genetics : Design , Analysis , and Application*. London: Blackwell Publishing.

Marchant, G. E., and D. G. Holm. 1988. "Genetic Analysis of the Heterochromatin of Chromosome 3 in Drosophila Melanogaster. II. Vital Loci Identified Through EMS Mutagenesis." *Genetics* 120: 519–32.

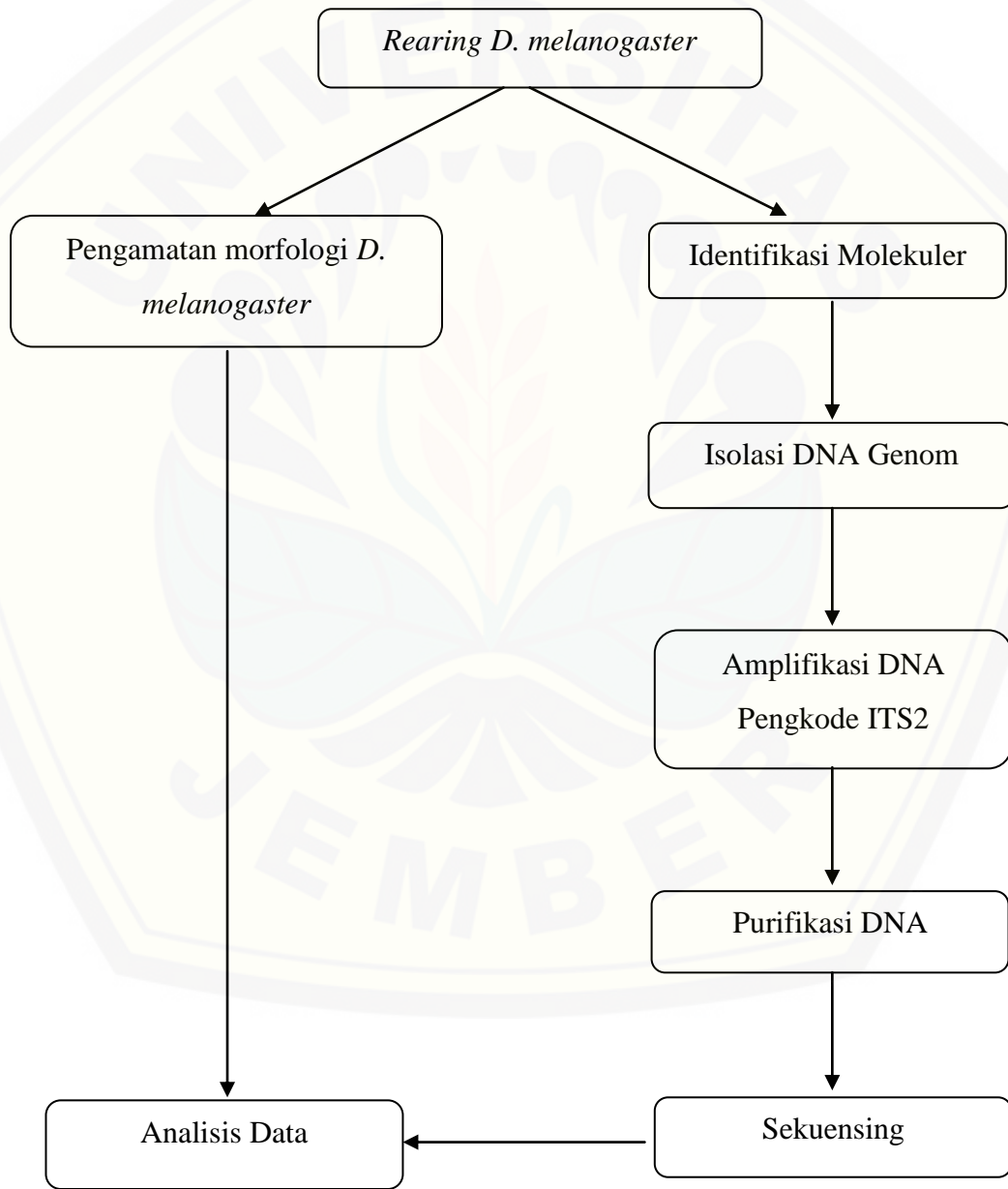
Masrurroh, Dewi. 2015. *Identifikasi Isolat Bakteri Fibrinolitik BA 9920 Asal Perairan Pantai Bandalit Jember Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA*. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Universitas Jember.

- Munjal, A. K., D. Karan, P. Gibert, B. Moreteu, R. Parkash, & J. R. David. 1997. Thoracic Trident Pigmentation in *Drosophila melanogaster*: Latitudinal and Altitudinal Clines in Indian Population. *Genet Sel Evol*: 601-610.
- Nations, Food and Agriculture Organization of the United. 2006. "Molecular Markers – a Tool for Exploring Genetic Diversity." *The State of The World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*: 359–79.
- Okada, T. 1988. Family Drosophilidae. Tokyo: Department of Biology, Tokyo Metropolitan University.
- Oorschot, Roland A. H. van, and Maxwell K. Jones. 1997. "DNA Fingerprints from Fingerprints." *Nature* 387(1992): 767.
- Patwardhan, A., Ray S., Roy A. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies – A Review. *J Phylogen Evolution Biol* 2: 131.
- Pratiwi, Putri et al. 2012. "Analisis Variasi Genetik Beberapa Populasi Globba *Leucantha* Miq . Di Sumatera Barat Dengan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)." 2056.
- Schlotterer, Christian, Marie-Theres Hauser, Arndt Von Haeseler, and Diethard Tautz. 1994. "Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in *Drosophila*." 11(3): 513–22.
- Schmidt, P. S., L. Matzkin, M. Ippolito, and W. F. Eanes. 2005. "GEOGRAPHIC VARIATION IN DIAPAUSE INCIDENCE , LIFE-HISTORY TRAITS , AND CLIMATIC ADAPTATION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*." 59(8): 1721–32.
- Strickberger, Monroe W. 1962. *Experiments in Genetics with Drosophila*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Suryanto, D. 2003. "Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler." Universitas Sumatera Utara.
- Taufika, R. 2014. *Perbedaan Strain dan Umur Betina terhadap Jumlah Keturunan Lalat Buah (*Drosophila melanogaster* Meigen)*. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Fakultas Metmatika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Universitas Jember.

- The Biology Corner. 2014. Gene Linkage & Chromosome Maps. http://biologycorner.com/APbiology/inheritance/12-2_gene_linkage.html [04 Maret 2015].
- The Key to Fly Away. 2014. The Fruit Fly: An Excellent Animal. <http://keytoflyaway.weebly.com/key-to-fly-away/the-fruit-fly-an-excellent-animal> [05 Mei 2015].
- The University of British Columbia. 2013. Lecture 13: *Drosophila* Development. http://www.zoology.ubc.ca/~bio463/lecture_13.htm [05 Mei 2015]
- The University of North Carolina. 2015. Learning Modules: Fruit Fly Module. www.unc.edu/depts/our/hhmi/hhmift_learning_modules/fruitflymodule/images/wildtype.jpg.gif [04 Maret 2015].
- Walton, C., Somboon, P., Loughlin, S. M. O., Zhang, S., Harbach, R. E., Linton, Y., Dinh, H., Butlin, R.K. 2007. "Genetic Diversity and Molecular Identification of Mosquito Species in the *Anopheles Maculatus* Group Using the ITS2 Region of rDNA." 7: 93–102.
- Ward's Science. 2013a. *Drosophila*. [Serial On Line] https://www.wardsci.com/assetsvc/asset/en_US/id/16920425/contents [16 April 2016]
- Ward's Science. 2013b. *Drosophila: Fruit Fly*. <https://www.wardsci.com/www.wardsci.com/images/Drosophila%281%29.pdf> [17 April 2016]
- Wilkerson, Richard C., John F. Reinert, and Cong Li. 2004. "Ribosomal DNA ITS2 Sequences Differentiate Six Species in the *Anopheles crucians* Complex (Diptera: Culicidae)." *Journal of Medical Entomology* 41(3): 392–401. <http://jme.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1603/0022-2585-41.3.392>.

LAMPIRAN

Lampiran A. Alur Penelitian



Lampiran B. Komposisi Bahan**B. 1 Komposisi Bahan untuk Pembuatan Media *Rearing***

No.	Nama Media (per 60 botol)	Bahan	Komposisi
1.	Media <i>rearing</i>	Gula merah Agar-agar putih Pisang ambon Fermipan	1 Ons 2 Bungkus 2 Sisir Secukupnya

B. 2 Komposisi Larutan

No.	Nama Larutan	Bahan	Komposisi	Keterangan
1.	Lysis Buffer (per 100mL)	Tris 50 mM EDTA 10 mM dari 0,5 M 2% SDS dari 20% SDS Aquades	0,6057 gr 2 mL 10mL 100 mL	pH = 8,0
2.	Larutan EDTA 0,5 M (per 100 mL)	EDTA NaOH Aquades	14,6 gr 2 gr 100 mL	
3.	Larutan TAE 5x (per 500mL)	Tris Base Acetic Acid Glacial EDTA 0,5 M Aquades	12,1 gr 2,88 mL 50 mL 450 mL	pH = 8,0
4.	Gel Agarose 1,5% (per 100 mL)	Agarose Aquades EtBr	1,5 gr 100 mL 4 μ L	

Lampiran C. Sekuen Utuh Hasil Amplifikasi Sekuen DNA Pengkode ITS2 *D. melanogaster wild type, strain black, strain clot, dan strain vestigial*

C. 1 D. melanogaster wild type

ATGCTGTTATGTA CTTTAATTAATTTTATAGTGCTGCTTGGACTACATATG
GTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAATTAAGTTGCTTATAAATTTTATAAG
CATATGGTATATTATTGGATAAATAATAAATTTTATTCATAATATTTAAA
AAATAAATGAAAAACATTATCTCACATTTGAATGTGAAAAACGAAGAGA
AATATTTTCTTTTCAATCAAATAATACTGAGAAATGTCTAGCATAAAAA
ATTGAAATATTTTTCATCTAGAATTGTCTCTTATTAATGATTCGGAAATAG
AAAAATCTTGGTTATGTTATTATTCTTCGTTGGTTCGTTAAAAATGGATAA
ATAAAAACTTTGCATACAAGAATTAATAAAAAATGTTATAACGAATTTAAT
TAAATGTTTTATCCATTATATATAAA

C. 2 D. melanogaster strain black

ATGCTGTTATGTA CTTTAATTAATTTTATAGTGCTGCTTGGACTACATATG
GTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAATTAAGTTGCTTATAAATTTTATAAG
CATATGGTATATTATTGGATAAATAATAAATTTTATTCATAATATTTAAA
AAATAAATGAAAAACATTATCTCACATTTGAATGTGAAAAACGAAGAGA
AATATTTTCTTTTCAATCAAATAATACTGAGAAATGTCTAGCATAAAAA
ATTGAAATATTTTTCATCTAGAATTGTCTCTTATTAATGATTCGGAAATAG
AAAAATCTTGGTTATGTTATTATTCTTCGTTGGTTCGTTAAAAATGGATAA
ATAAAAACTTTGCATACAAGAATTAATAAAAAATGTTATAACGAATTTAAT
TAAATGTTTTATCATTATATATAAAGAATTTATGGCAAGATAAAGTTATAT
ACAACCTCAACTCATATGGGACTACCCCTAAATTTAAGCAT

C. 3 D. melanogaster strain clot

ATGCTGTTATGTA CTTTAATTAATTTTATAGTGCTGCTTGGACTACATATG
GTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAATTAAGTTGCTTATAAATTTTATAAG
CATATGGTATATTATTGGATAAATAATAAATTTTATTCATAATATTTAAA

AAATAAATGAAAAACATTATCTCACATTTGAATGTGAAAAACGAAGAGA
AATATTTTCTTTTTCAATCAAATAATACTGAGAAATGTCTAGCATAAAAA
ATTGAAATATTTTTCATCTAGAATTGTCTCTTATTAATGATTCGGAAATAG
AAAAATCTTGGTTATGTTATTATTCTTCGTTGGTTCGTTAAAAATGGATAA
ATAAAAACCTTGCATACAAGAATTAATAAAAATGTTATAACGAATTTAAT
TAAATGTTTTATCATTATATATAAAGAATTTATGGCAAGATAAAG

C. 4 D. *melanogaster strain vestigial*

ATGCTGTTATGTACTTTAATTAATTTTATAGTGCTGCTTGGACTACATATG
GTTGAGGGTTGTAAGACTATGCTAATTAAGTTGCTTATAAATTTTTATAAG
CATATGGTATATTATTGGATAAATATAATAATTTTTATTCATAATATTTAAA
AAATAAATGAAAAACATTATCTCACATTTGAATGTGAAAAACGAAGAGA
AATATTTTCTTTTTCAATCAAATAATACTGAGAAATGTCTAGCATAAAAA
ATTGAAATATTTTTCATCTAGAATTGTCTCTTATTAATGATTCGGAAATAG
AAAAATCTTGGTTATGTTATTATTCTTCGTTGGTTCGTTAAAAATGGATAA
ATAAAAACCTTGCATACAAGAATTAATAAAAATGTTATAACGAATTTAAT
TAAATGTTTTATCATTATATATAAAGAATTTATGGCAAGATAAAGTTATAT
ACAACCTCAACTCATATGGGACTACCCCCTAAA

Lampiran D. Homologi *D. melanogaster* wild type, strain black, strain clot, dan strain vestigial dengan *D. melanogaster* EU306667.1

D. 1 Homologi *D. melanogaster* wild type dengan *D. melanogaster* EU306667.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45847), rRNA	883	883	98%	0.0	99%	NR_133558.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45845), rRNA	883	883	98%	0.0	99%	NR_133549.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster chromosome X: Y rDNA sequence	883	3418	98%	0.0	99%	CP007120.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster clone BACR10E13, complete sequence	883	4153	99%	0.0	99%	AC246465.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	883	883	98%	0.0	99%	GU597379.1
<input type="checkbox"/> D.melanogaster 18S, 5.8S 2S and 28S rRNA genes, complete, and 18S rRNA gene, 5' end, clone	883	883	98%	0.0	99%	M21017.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45846), rRNA	878	878	98%	0.0	99%	NR_133554.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster chromosome X 211000022278724 sequence	878	878	98%	0.0	99%	DS484101.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (CR41583), rRNA	878	878	99%	0.0	99%	NR_003998.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (CR40679), rRNA	833	833	99%	0.0	98%	NR_004047.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac	804	804	91%	0.0	99%	EU306667.1

D. 2 Homologi *D. melanogaster* strain black dengan *D. melanogaster* EU306667.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45847), rRNA	894	894	99%	0.0	100%	NR_133558.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45845), rRNA	894	894	99%	0.0	100%	NR_133549.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster chromosome X: Y rDNA sequence	894	3463	99%	0.0	100%	CP007120.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster clone BACR10E13, complete sequence	894	4210	100%	0.0	100%	AC246465.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	99%	0.0	100%	GU597379.1
<input type="checkbox"/> D.melanogaster 18S, 5.8S 2S and 28S rRNA genes, complete, and 18S rRNA gene, 5' end, clone	894	894	99%	0.0	100%	M21017.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45846), rRNA	889	889	99%	0.0	99%	NR_133554.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster chromosome X 211000022278724 sequence	889	889	99%	0.0	99%	DS484101.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (CR41583), rRNA	889	889	100%	0.0	99%	NR_003998.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster ribosomal RNA (CR40679), rRNA	845	845	100%	0.0	98%	NR_004047.1
<input type="checkbox"/> Drosophila melanogaster 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac	813	813	91%	0.0	99%	EU306667.1

D. 3 Homologi *D. melanogaster* strain *clot* dengan *D. melanogaster* EU306667.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45847), rRNA	830	830	99%	0.0	100%	NR_133558.1
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45845), rRNA	830	830	99%	0.0	100%	NR_133549.1
Drosophila melanogaster chromosome X; Y rDNA sequence	830	3212	99%	0.0	100%	CP007120.1
Drosophila melanogaster clone BACR10E13, complete sequence	830	3902	99%	0.0	100%	AC246465.1
Drosophila melanogaster 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	830	830	99%	0.0	100%	GU597379.1
D.melanogaster 18S, 5.8S 2S and 28S rRNA genes, complete, and 18S rRNA gene, 5' end, clone	830	830	99%	0.0	100%	M21017.1
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45846), rRNA	824	824	99%	0.0	99%	NR_133554.1
Drosophila melanogaster chromosome X 211000022278724 sequence	824	824	99%	0.0	99%	DS484101.1
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (CR41583), rRNA	824	824	99%	0.0	99%	NR_003998.1
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (CR40679), rRNA	780	780	99%	0.0	98%	NR_004047.1
Drosophila melanogaster chromosome X	750	3717	99%	0.0	97%	AE014298.5
Drosophila melanogaster genomic scaffold 211000022280732	750	1468	99%	0.0	97%	CP000208.2
Drosophila melanogaster 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spac	749	749	91%	0.0	99%	EU306667.1

D. 4 Homologi *D. melanogaster* strain *vestigial* dengan *D. melanogaster* EU306667.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45847), rRNA	894	894	99%	0.0	100%	NR_133558.1
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45845), rRNA	894	894	99%	0.0	100%	NR_133549.1
Drosophila melanogaster chromosome X; Y rDNA sequence	894	3463	99%	0.0	100%	CP007120.1
Drosophila melanogaster clone BACR10E13, complete sequence	894	4210	100%	0.0	100%	AC246465.1
Drosophila melanogaster 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	99%	0.0	100%	GU597379.1
D.melanogaster 18S, 5.8S 2S and 28S rRNA genes, complete, and 18S rRNA gene, 5' end, clone	894	894	99%	0.0	100%	M21017.1
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (pre-rRNA:CR45846), rRNA	889	889	99%	0.0	99%	NR_133554.1
Drosophila melanogaster chromosome X 211000022278724 sequence	889	889	99%	0.0	99%	DS484101.1
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (CR41583), rRNA	889	889	100%	0.0	99%	NR_003998.1
Drosophila melanogaster ribosomal RNA (CR40679), rRNA	845	845	100%	0.0	98%	NR_004047.1
Drosophila melanogaster 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spac	813	813	91%	0.0	99%	EU306667.1