

JENIS-JENIS LAMUN DI PANTAI LEMBONGAN, NUSA LEMBONGAN DAN ANALISISNYA DENGAN PCR RUAS *rbcL*

SEAGRASS SPECIES AT LEMBONGAN BEACH, NUSA LEMBONGAN AND THEIR ANALYSIS USING PCR OF *rbcL* FRAGMENT

Maliza Kurnia, Made Pharmawati, Deny S. Yusup

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Bali
E-mail: pharmawati@hotmail.com

INTISARI

Penyebaran lamun di Bali terdapat di wilayah pesisir diantaranya di perairan Pantai Timur Nusa Dua, Pulau Serangan, Pantai Sanur dan pantai-pantai di Nusa Lembongan. Di Bali dilaporkan delapan spesies lamun. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi lamun secara morfologi dan penyiapan material serta kondisi reaksi PCR yang tepat untuk metode analisis molekuler. Penelitian ini merupakan penelitian tahap awal dalam analisis molekuler lamun. Pengambilan sampel lamun di Pantai Lembongan (depan Ketut Losmen) di Nusa Lembongan, Kecamatan Nusa Penida, Propinsi Bali. Metode ekstraksi DNA yang digunakan adalah metode Doyle dan Doyle dengan modifikasi. Hasil penelitian menunjukkan terdapat lima jenis lamun yang ditemukan di Pantai Lembongan, Nusa Lembongan yaitu *Cymodocea rotundata*, *Enhalus acoroides*, *Halodule pinifolia*, *Thalassodendron ciliatum* dan *Thalassia hemprichii*. Hasil ekstraksi DNA menunjukkan pita DNA dengan ukuran besar yang disertai smear DNA. Optimasi reaksi PCR ruas *rbcL* dilakukan pada konsentrasi DNA 30 ng dan 50 ng. Hasil elektroforesis produk PCR menunjukkan hasil yang lebih jelas pada konsentrasi DNA template 50ng.

Kata Kunci: Ekstraksi DNA, Lamun, Morfologi, PCR *rbcL*

ABSTRACT

Seagrasses in Bali are distributed on coastal areas of south east Bali coastal waters of Nusa Dua, Serangan Island, Sanur Beach and beaches in Nusa Lembongan. In Bali, it has been reported that there are eight species of seagrasses. This research aimed to identify seagrass species on Lembongan Beach based on morphological characters and optimize PCR condition for molecular analysis. This research is a preliminary research on molecular method for seagrass analysis. Seagrass sampling was conducted in Lembongan Beach (in front of Ketut's Losmen) in Nusa Lembongan, Nusa Penida Subdistrict, Bali Province. DNA extraction method used was the method of Doyle and Doyle with modifications. Result showed that there are five species found in Lembongan Beach, Nusa Lembongan. These seagrass are *Cymodocea rotundata*, *Enhalus acoroides*, *Halodule pinifolia*, *Thalassodendron ciliatum* and *Thalassia hemprichii*. DNA extraction resulted in high size of DNA and smear DNA. Optimization of PCR reaction of *rbcL* fragment was done at DNA concentration of 30 ng and 50 ng. The electrophoresis of PCR products showed that DNA concentration of 50 ng had thicker band than concentration of 30 ng.

Keywords: DNA extraction, Morphology, PCR *rbcL*, Seagrass

PENDAHULUAN

Lamun merupakan tumbuhan angiospermae yang memiliki bunga, daun, dan rhizoma (Nontji, 1987; Nasmia, 2012). Tumbuhan lamun merupakan tumbuhan yang produktif di laut dangkal dan bersih, tumbuhan tersebut juga dapat tumbuh pada substrat yang berpasir, berlumpur ataupun yang berbatu (Mann, 2000; Short and Coles, 2003). Di Indonesia terdapat 12 spesies lamun yang tersebar di Kalimantan, Sulawesi, Jawa, Sumatra, Bali, Nusa Tenggara, Papua, Ambon, dan Maluku Utara (Kiswara dan Hutomo, 1985; Kuriandewa, 2009). Di Bali dilaporkan terdapat delapan spesies lamun (Yusup dan Asy'ari, 2010).

Penelitian lamun lebih banyak dari segi ekologi yang meliputi kerapatan, pemetaan dan biota laut yang berasosiasi dengan lamun. Pada umumnya identifikasi spesies lamun dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi. Pantai di Nusa Lembongan merupakan pantai yang ditumbuhi lamun. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Alhanif (1996) di Nusa Lembongan terdapat 6 spesies lamun yang ditemukan di daerah Jungutbatu.

Penggunaan penanda DNA dalam genetika molekuler telah mampu mendeteksi gen dan sifat-sifat tertentu, evaluasi keanekaragaman dan evolusi pada tingkat genetik (Hoon-Lim *et al.*, 1999). Dalam penggunaan penanda DNA diperlukan DNA dengan kualitas yang baik.

Ekstraksi DNA dengan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) merupakan metode yang paling umum digunakan pada tumbuhan. Modifikasi metode banyak dilakukan untuk mendapatkan metode yang sesuai untuk dapat mengurangi degradasi DNA. Modifikasi dari

metode yang telah ada tersebut misalnya dengan meningkatkan konsentrasi EDTA untuk mengurangi smear (Tenriulo dkk., 2001; Pharmawati, 2009).

Alves (2001) menyatakan ekstraksi DNA dapat dilakukan dari bahan segar seperti daun yang masih muda dan dapat juga dari bagian lainnya seperti bunga, akar dan batang. Selain dari sampel yang segar ekstraksi DNA juga dapat dilakukan dari bahan yang telah diawetkan atau yang dikeringkan seperti misalnya dikeringkan dengan menggunakan silika gel atau dari herbarium.

Ruas *rbcL* merupakan ruas pada kloroplas yang banyak digunakan untuk identifikasi pada tumbuhan (Moreira *et al.*, 2000). Ruas ini diamplifikasi menggunakan primer spesifik dengan teknik PCR. Dalam reaksi PCR, penggunaan konsentrasi DNA yang tepat diperlukan untuk mendapatkan hasil PCR yang jelas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis lamun yang terdapat di Pantai Lembongan (di depan Ketut Losmen) Nusa Lembongan, Kecamatan Nusa Penida, Bali dan mempelajari kondisi PCR ruas *rbcL* pada lamun.

MATERI DAN METODE

Pengambilan sampel dan identifikasi lamun

Sampel lamun diambil di Pantai Lembongan (di depan Ketut Losmen) Nusa Lembongan dengan koordinat S 8°40,1639' dan E 115°26,8788' menggunakan metode jelajah dan mengambil setiap spesies lamun yang berbeda yang ditemui di lokasi.

Identifikasi spesies lamun dilakukan berdasarkan morfologi dengan cara melihat karakteristik akar, batang atau rhizoma, ujung daun dan bentuk daun berdasarkan Lanyon (1985).

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi yaitu menggunakan 50 mM EDTA pada buffer ekstraksi. Daun lamun yang telah halus dimasukkan ke dalam tabung mikro, kemudian ditambahkan 1 ml buffer ekstraksi CTAB (100 mM Tris/HCL, pH 8, 1.4 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8, 1% Polyvinylpyrrolidone (PVP), 3% mercaptoethanol). Tabung diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dalam penangas air. Kemudian tabung disentrifuge pada 8.000 rpm selama 10 menit, supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung mikro yang baru.

Selanjutnya ditambahkan kloroform isoamilalkohol (CIA) dengan perbandingan 24:1 sebanyak volume supernatan yang diambil. Kemudian di vortex selama 1 menit agar homogen, lalu disentrifuge pada 8.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya lapisan atas supernatan dipindahkan ke tabung mikro yang baru, lalu ditambahkan isopropanol dingin sejumlah volume supernatan yang diambil, dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 2,5 jam. Selanjutnya tabung disentrifuge pada 8.000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Endapan di dasar tabung dicuci dengan menggunakan etanol 70% dan disentrifuge selama 5 menit. Selanjutnya endapan dikering anginkan dan ditambahkan 50 µl air steril.

Visualisasi DNA

Visualisasi DNA dilakukan dengan elektroforesis pada 1% gel agarosa. Pewarnaan dilakukan dengan menambahkan *etidium bromide*. Sebagai pembanding digunakan lambda DNA 50 ng dan 100 ng. Masing-masing sampel sebanyak 3 ul selanjutnya dimasukkan ke dalam masing-masing sumur gel, dan dielektroforesis pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah elektroforesis selesai, gel diangkat dan diamati pada UV transiluminator (*Bio-Rad*).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR dilakukan menggunakan primer *rbcL* P609 dengan urutan basa 5'GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3' dan P610 dengan urutan basa 5'ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' Lucas *et al.* (2012). Reaksi PCR *rbcL* terdiri dari H₂O sebanyak 39 µl, buffer PCR 1x, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 0,2 mM, Taq 1 U, primer P 609 0,75 mM dan primer P 610 0,75 mM. DNA *template* sebanyak 30 ng dan 50 ng

Siklus termal PCR yaitu denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit sebanyak 1x, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 57°C selama 2 menit, pemanjangan 72°C selama 2 menit, yang diulang 35x, diikuti pemanjangan akhir 72°C selama 7 menit sebanyak 1x dan disimpan pada suhu penyimpanan pada suhu 4°C. Hasil PCR diamati dengan cara elektroforesis menggunakan gel agarosa 1%.

HASIL

Identifikasi lamun

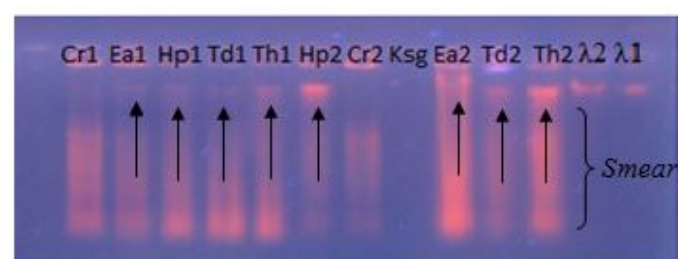
Lamun yang ditemukan adalah lima jenis yaitu *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata*, *Thalassia hemprichii*, *Halodule pinifolia*, dan *Thalassodendron ciliatum* (Gambar 1).



Gambar 1. Jenis-jenis lamun A. *Enhalus acoroides*, B. *Cymodocea rotundata*, C. *Thalassia hemprichii*, D. *Halodule pinifolia*, dan E. *Thalassodendron ciliatum*.

Ekstraksi DNA lamun

Ekstraksi DNA yang dilakukan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi (Pharmawati, 2009) menghasilkan pita DNA dengan konsentrasi DNA berkisar antara 20 ng – 300 ng. DNA hasil ekstraksi masih terlihat *smear* (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA lamun λ1 dan λ2 DNA 50 ng dan 100 ng

Keterangan:

Cr: *Cymodocea rotundata* Td: *Thalassodendron ciliatum*

Ea: *Enhalus acoroides* Th: *Thalassia hemprichii*

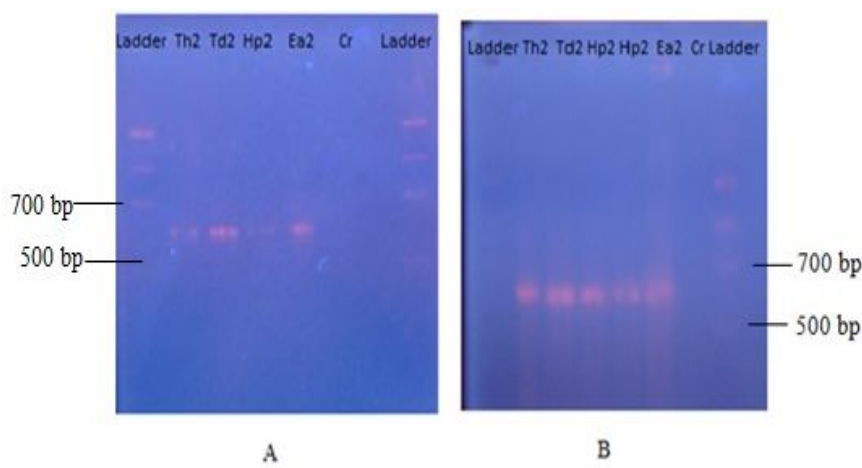
Hp: *Halodule pinifolia*

Ksg : Kosong

↑ : Menunjukkan DNA

PCR ruas *rbcL*

PCR menggunakan primer P609 dan P610 menggunakan konsentrasi DNA *template* 30 ng menghasilkan produk PCR pada sampel *Enhalus acoroides*, *Halodule pinifolia*, *Thalassodendron ciliatum* dan *Thalassia hemprichii*. PCR yang dihasilkan berukuran 600 bp. Pada sampel *Cymodocea rotundata* tidak dihasilkan produk PCR. Konsentrasi DNA *template* kemudian dinaikkan menjadi 50 ng dan produk PCR terlihat lebih tebal, tetapi produk PCR tetap tidak dihasilkan pada sampel *Cymodocea rotundata* (Gambar 3). Gambar A (kiri) PCR menggunakan DNA *template* 30 ng dan Gambar B (kanan) menggunakan DNA *template* 50 ng.



Gambar 3. Hasil elektroforesis DNA dari PCR dengan menggunakan primer P609 dan P610 A). DNA *template* 30 ng, B). DNA *template* 50 ng.

Keterangan:

Th2: *Thalassia hemprichii*

Ea2: *Enhalus acoroides*

Td2: *Thalassodendron ciliatum*

Cr : *Cymodocea*

rotundata

Hp2: *Halodule pinifolia*

PEMBAHASAN

Identifikasi lamun secara morfologi

Terdapat lima jenis lamun yang ditemukan di Pantai Lembongan, Nusa Lembongan, Kecamatan Nusa Penida, Bali berdasarkan ciri morfologi. Jenis-jenis lamun tersebut adalah *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata*, *Thalassia hemprichii*, *Halodule pinifolia*, dan *Thalassodendron ciliatum*.

Ciri morfologi dari *Enhalus acoroides* adalah daunnya sangat panjang berbentuk seperti pita, tepi daun berbentuk seperti lidi yang keras. Rhizoma tebal dan panjang, tanpa sisik, tetapi ditutupi seperti bulu hitam panjang (helai serat) (Lanyon, 1985). Daun mempunyai tulang daun, terdapat dalam pasangan pelepah bonggol, akarnya dapat menjulur ke bawah berwarna putih dan kaku (Azkab, 1988).

Ciri morfologi dari *Cymodocea rotundata* adalah memiliki rhizoma yang menjalar, memiliki sisik antar rhizoma yang berjauhan, memiliki akar tidak bercabang dan tidak memiliki rambut akar, tiap nodus hanya ada satu tegakan (Mckenzie, 2008). Ujung daun berbentuk bulat atau tumpul (Lanyon, 1985).

Ciri morfologi dari *Thalassia hemprichii* adalah rhizomanya berbuku-buku, memiliki sisik rhizoma yang berdekatan, dipermukaan akar tidak ditutupi oleh jaringan hitam, batangnya tertutupi oleh serat-serat halus berwarna coklat, ujung daun bulat dan kadang-kadang sedikit bergerigi (Lanyon, 1985; Kannan *et al.*, 1999). Jenis ini paling banyak ditemukan, biasanya berasosiasi dengan jenis lain dan tumbuh baik sampai kedalaman 25 meter, pada umumnya tumbuh pada substrat yang berpasir (Anggraini, 2008).

Ciri-ciri morfologi dari *Halodule pinifolia* adalah memiliki rhizoma yang kecil, akar merayap, memiliki banyak nodus, pada tiap nodusnya berakar tunggal dan tidak bercabang, masing-masing nodus terdiri dari satu tegakan, ujung daun membulat, satu tangkai daun memiliki 1 sampai 2 helai daun (Lanyon, 1985).

Thalassodendron ciliatum umumnya mendominasi pada zona subtidal dan berasosiasi dengan terumbu karang. Memiliki akar memanjang sering bercabang, memiliki batang yang keras seperti kayu, rhizoma memiliki tebal hingga 5 mm, daun berbentuk seperti sabit (pita) dan ujung daun seperti gigi (Lanyon, 1985).

Ekstraksi DNA, elektroforesis DNA dan elektroforesis hasil PCR

Pada penelitian ini ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi. Modifikasi yang digunakan ialah memodifikasi EDTA menjadi 50 mM. Surzycki (2000) menyatakan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi EDTA menjadi 50 mM berfungsi untuk melindungi DNA dari aktivitas DNase dengan mengikat kalsium dan magnesium sebagai kofaktor DNase.

Hasil ekstraksi *Cymodocea rotundata* tidak menunjukkan pita DNA. Hal ini dapat terjadi karena kurangnya bahan yang diekstraksi atau kurang sempurnanya proses penggerusan. Dalam ekstraksi DNA, jika digunakan sampel yang kering seperti sampel dari herbarium atau sampel yang dikeringkan menggunakan silika gel, maka diperlukan jumlah sampel yang lebih banyak agar pita DNA dapat terlihat (Hidayat dan Ana, 2009)

Pada sampel lainnya, hasil ekstraksi menunjukkan pita DNA yang cukup jelas, namun terdapat *smear*. *Smear* dapat terjadi karena pada proses penggerusan daun tidak menggunakan nitrogen cair sehingga enzim DNase bekerja mendegradasi DNA (Utami dkk., 2012). Penambahan konsentrasi EDTA untuk mencegah terjadinya fragmentasi DNA oleh DNase sehingga mencegah terjadinya degradasi DNA dengan cara mengikat ion magnesium yang merupakan kofaktor DNase sehingga *smear* pada DNA hasil ekstraksi akan berkurang sehingga pita DNA akan terlihat jelas (Porebski *et al.*, 1997; Surzycki 2000).

PCR ruas *rbcL* menghasilkan produk pada sampel *Thalassia hemprichii*, *Thalassodendron ciliatum*, *Halodule pinifolia* dan *Enhalus acoroides*. Sedangkan pada sampel *Cymodocea rotundata* tidak menghasilkan produk PCR. Tidak adanya produk PCR dikarenakan konsentrasi DNA yang kurang pada reaksi PCR. Untuk memperbanyak produk PCR, konsentrasi DNA *template* ditingkatkan menjadi 50 ng. Produk PCR menggunakan DNA *template* 50 ng menunjukkan pita-pita DNA yang lebih tebal.

Produk PCR ruas *rbcL* menghasilkan pita DNA dengan ukuran 600 bp pada sample *Thalassodendron ciliatum*, *Thalassia hemprichii*, *Halodule pinifolia* dan *Enhalus acoroides*. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat *length polymorphism* pada ruas *rbcL*. Untuk mengamati polimorfisme, maka diperlukan proses lebih lanjut seperti pemotongan dengan enzim restriksi (PCR-RFLP) atau *sequencing*.

SIMPULAN

Jenis lamun yang ditemukan di Nusa Lembongan dengan menggunakan metode jelajah adalah *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata*, *Halodule pinifolia*, *Thalassodendron ciliatum* dan *Thalassia hemprichii*. Ekstraksi dengan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi dengan meningkatkan konsentrasi EDTA menjadi 50 mM menghasilkan pita DNA yang cukup jelas, namun masih terdapat *smear*. Reaksi PCR ruas *rbcL* dengan menggunakan konsentrasi DNA *template* yang lebih tinggi menghasilkan produk DNA yang terlihat lebih tebal.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada peneliti di *Indonesian Biodiversity Reserch Center (IBRC)*, Universitas Udayana atas bantuan selama penelitian. Penelitian ini merupakan

bagian dari penelitian keragaman genetik lamun yang didanai oleh PEER Science Research Grant, USAID.

KEPUSTAKAAN

- Alhanif, R. 1996. Komunitas Lamun dan Kepadatan Perifiton pada Padang Lamun di Perairan Pesisir Nusa Lembongan, Kecamatan Nusa Penida, Propinsi Bali. Fakultas Perikanan Institut Pertanian Bogor. Skripsi Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan. *Skripsi*. Tidak dipublikasikan.
- Alves, M.J.C. 2001. *Mitochondrial DNA Variation in the Highly Endangered Cypinid Fish *Anaocypris Hispanica* : Importance for Conservation*. Nature.com news@ nature.com naturejobs aturrevents about npgh.
- Anggraini, K. 2008. *Mengenal Ekosistem Perairan*. Jakarta. Grasindo.
- Azkab, M.H. 1988. *Pertumbuhan dan Produksi Lamun, *Enhalus acoroides* di Rataan Terumbu di Pari Pulau Seribu*. Dalam: P3O-LIPI, Teluk Jakarta: Biologi, Budidaya, Oseanografi, Geologi dan Perairan. Jakarta: Balai Penelitian Biologi Laut, Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi-LIPI.
- Doyle J.J and Doyle J.L. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus. Moscow*, 12 (1):13-15.
- Hidayat, T., dan Ana, R.,W. 2009. *Beberapa Modifikasi Perlakuan untuk Mengekstraksi DNA dari Bahan Herbarium*. Jurusan Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.1-9.
- Hoon-Lim, S., Peng Teng, P.C, Lee, Y.H, and Goh C.J. 1999. RAPD analysis of some Species in the Genus *Vanda* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 83:193-196.
- Kannan, L., Thangaradjou, T. and Anantharaman, P. 1999. Status of Seagrasses of India. *Seaweed Resources Utilzn*, 21(1 & 2): 25 – 33.
- Kiswara, W., dan Hutomo, M. 1985. Habitat dan Sebaran Geografik Lamun. *Oseana*, 10:21-30.
- Kuriandewa, T.E. 2009. *Tinjauan tentang Lamun di Indonesia: Lokakarya Nasional I Pengelolaan Ekosistem Lamun “Peran Ekosistem Lamun dalam Produktivitas Hayati dan Meregulasi perubahan Iklim*. Sheraton Media Jakarta, 18 November 2009. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Available:http://pksplipb.or.id/index.php?option=com_content&task=view&id=133&Itemid=1. Opened: 01 Oktober 2014.
- Lanyon, J. 1985. *Guide to the Identification of Seagrasses in the Great Barrier Reef Region*. GBRMPA. Queensland Australia.
- Lucas, C., Thirunavakkarasu, T., and Jutta P.M. Development of a DNA Barcoding System for Seagrasses: Successful but Not Simple. *PLoS ONE*, 7 (1): e29987.
- Mann, K.H. 2000. *Ecology of Coastal Water : With Implication for Management*.Blackwell Science, Inc. Massachusets.
- McKenzie, L. 2008. Seagrass Watch. *Prosiding of Workshop for Mapping Seagrass Habitats in North East Arnhem Land, Northern Territory*. Cairns. Australia. 9 – 16.
- Moreira, D., H. Le Guyader and H. Phillipe. 2000. The Origin of Red Algae and the Evolution of Chloroplasts. *Nature*, 405: 69-72.
- Nasmia. 2012. *Produk Alam Laut dari Rumput Laut (Seaweeds) dan Lamun (Seagrass)*.Tugas Mata Kuliah Bioteknologi Bahan Hayati Alam Laut. Ilmu Pertanian. Program Pascasarjana S3.Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Nontji, A., 1987. *Laut Nusantara*. Jakarta. Penerbit Jambatan.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi Ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. Proteaceae. *Jurnal Biologi*, 8(1):12-16.
- Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R. 1997. Modification of CTAB DNA Extractions Protocol for Plants Cotaining High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 8-15.
- Short, F.T., and Coles, R. 2003. Global Seagrass Research Method. *Elsevier Science*, Amsterdam. 473pp.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. New York.
- Tenriulo, A., Emma, S., Andi, P., dan Rosmiat. 2001. Ekstraksi DNA Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dengan Metode Fenol Kloroform. *Marina Chimica Acta*, 2(2):6-10.
- Utami, A., Riani, M., Nur, A.P., Laksmi. A., Popi, A.K., Waras, N. 2012. Variasi Metode Isolasi DNA Daun Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Prosiding Seminar Nasional Kimia Unesa 2012*. 205-214.
- Yusup, D.S., dan Asy'ari. 2010. Komunitas Tumbuhan Lamun di Kawasan Perairan Sekitar Denpasar. *Prosiding Seminar Nasional Biologi: Biodiversitas dan Bioteknologi Sumberdaya Aquatik*. Fakultas Biologi Universitas Jendral Soedirman, Purwokerto.