

## IDENTIFIKASI IKAN GENUS MYSTUS DENGAN PENDEKATAN GENETIK

Taufik Budhi Pramono<sup>1,2</sup> Diana Arfiati<sup>3</sup>, Maheno Sri Widodo<sup>3</sup>, Uun Yanuhar<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Program Doktorat Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Jawa Timur  
Indoensia

<sup>2</sup>Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto Jawa  
Tengah Indonesia

<sup>3</sup> Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Jawa Timur Indoensia  
E-mail: tb1pram@yahoo.com

### ABSTRAK

*Ikan-ikan dari Famili Bagridae di Indonesia mencapai 60 jenis dan salah satunya dari genus *Mystus*. Identifikasi ikan hingga level spesies secara akurat sangat diperlukan. DNA barcoding adalah teknik identifikasi baru, cepat dan akurat. Identifikasi dengan pendekatan genetik ini akan membantu dalam memahami struktur stok, manajemen sumberdaya ikan dan konservasi. Identifikasi spesies ikan dilakukan secara molekuler. Gen CO1 diamplifikasi dan produk PCR disekuensing serta dianalisis dengan menggunakan software bioinformatika. Salah satu contoh identifikasi ikan dari genus *Mystus* yang telah dikonfirmasi adalah *Mystus nigriceps* menjadi *Mystus singaringan*.*

**Kata Kunci** : Identifikasi, *Mystus*, DNA barcoding

### PENDAHULUAN

Ikan air tawar di Indonesia yang telah diidentifikasi sekitar 1218 spesies dari 84 famili termasuk 1172 spesies asli dari 79 famili dan 630 spesies bersifat endemik. Ikan dari Famili Bagridae teridentifikasi sebanyak 60 spesies. Uniknya, ikan dari Famili Bagridae tidak ditemukan daerah Wallacea dan Sahul, hanya ditemukan di Sundaland (Hubert *et al.*, 2015). Ikan-ikan famili Bagridae juga ditemukan di DAS Serayu Jawa Tengah. Setijanto *et al.*, (1999) melaporkan bahwa terdapat tiga spesies ikan famili Bagridae di Sungai Serayu dan Mengaji yaitu *Mystus gulio*, *mystus microcanthus* dan *Mystus nigriceps*. Putro (2003) dan Pramono (2010) di Sungai Klawing yang masih merupakan DAS Serayu, masing-masing mendapatkan spesies ikan famili Bagridae lain yaitu ikan Baceman (*Mystus nemurus*) dan yaitu ikan Senggaringan (*Mystus nigriceps*). Penamaan spesies-spesies ikan dari Famili Bagridae yang telah ditemukan dan diteliti di DAS Serayu tersebut berdasarkan karakter morfologi yang mengacu pada Kotellat *et al.*, (1993).

Penamaan dan determinasi spesies yang benar sangat penting untuk melakukan kajian bioekologi dan kajian lainnya. Seiring dengan perkembangan biologi molekuler, telah ditemukan metode baru untuk identifikasi spesies berbasis DNA yang dikenal dengan DNA Barcoding (Floyd *et al.*, 2002; Hebert *et al.*, 2003a; ). DNA barcoding memberikan kecepatan dan keakuratan dalam identifikasi spesies dengan fokus analisis pada segmen kecil dari mtDNA (Muchlisin *et al.*, 2013; Karim *et al.*, 2015). DNA barcoding dapat menjadi solusi krisis taksonomi (Meier *et al.*, 2006).

Penamaan spesies dari ikan Famili Bagridae utamanya ikan Senggaringan (*Mystus nigriceps*) yang telah diteliti sebelumnya perlu diperjelas dengan pendekatan genetik menggunakan metode DNA Barcoding. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonfirmasi penamaan spesies ikan dari genus *Mystus* utamanya *Mystus nigriceps* secara genetik menggunakan marker gen CO1. Harapannya dapat dijadikan dasar dalam manajemen sumberdaya ikan dan konservasi serta budidayanya selanjutnya.

## MATERI DAN METODE

### Ikan Uji

Sejumlah 18 ekor ikan uji dikoleksi dari Sungai Klawing Kabupaten Purbalingga Provinsi Jawa Tengah pada Februari 2017 dengan bantuan nelayan setempat. Untuk keperluan identifikasi spesies diambil sebuah jaringan sirip ekor (*caudal fin*) dan disimpan dalam larutan etanol 95%.

### Ekstraksi, PCR, dan Sekuensing

Ekstraksi DNA genom dari sampel menggunakan metode Quick DNA Tissue/Insect Miniprep Kit (Zymo Research). Gen CO1 diamplifikasi menggunakan pasangan primer universal LCO1490: 5'-ggcacaacatacctaaagatattgg-3' dan HCO2198: 5'-taaacctcagggtagacaaaaaatca-3' (Folmer *et al.*, 1994). Komposisi reaksi PCR (25µl), yaitu 12,5 µl PCR Buffer (2x), 0,5 µl primer forward (10 pmol/µl), 0,5 µl primer reverse (10 pmol/µl), KOD FX Neo (1.0U/µl), 1 µl template DNA, dan 5 µl ddH<sub>2</sub>O. Amplifikasi dilakukan dalam mesin Toyobo KOD FX Neo Catalog No KFX-201.

Reaksi *Polimerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dalam 35 siklus dengan parameter pre denaturasi awal suhu 95°C/3 menit, denaturasi 98°C/10 detik, annealing 50°C/30 detik, extension 68°C/1 menit. Hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v), dimurnikan menggunakan *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Amersham Biosciences Corporation, Arlington Heights, Illinois, USA) dan *Exonuclease* (Amersham)(SAP/EXO). Sekuensing 2 arah (bi-directional) dilakukan oleh First Base CO (Malaysia) menggunakan Big Dye® terminator v3.1 cycle sequencing kit Applied Biosystem.

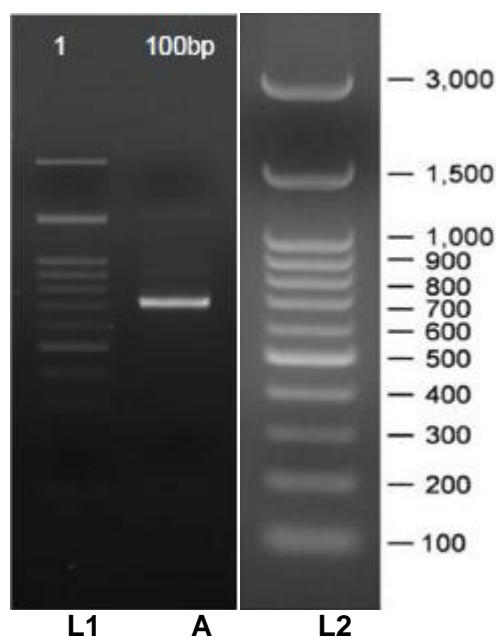
### Analisis Data

Pengeditan hasil sekuensing dan penentuan komposisi nukleotida dianalisis dengan software Mega5 (Tamura *et al.*, 2011). Urutan DNA disejajarkan dengan ClustalW vers. 1.4 (Thompson *et al.*, 1997). Sekuens dibandingkan dengan data GenBank menggunakan BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) (Altschul *et al.*, 1997) dan BOLDSystems (Ratnasingham dan Hebert, 2007). Pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan metode Neighbor\_Joining (Saitou dan Nei, 1987).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

Hasil PCR menunjukkan gen CO1 teramplifikasi dengan panjang 697 bp (Gambar 1). Ukuran panjang amplifikasi hasil dalam penelitian ini sama dengan penelitian yang dilakukan Folmer *et al.*, (1994), yang memperoleh ukuran kurang lebih 700 bp.



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen CO1 sampel ikan uji dari Sungai Klawing dalam gel agarose 1%. L1 adalah DNA Ladder dan A adalah sampel serta L2 adalah panjang garis gen (GeneRuler)

Sekuens yang diperoleh ini tidak ada gap, insersi atau delesi dan tidak memiliki stop kodon. Hal ini menunjukkan bahwa sekuens gen ini merupakan gen fungsional (Gambar 2).

```

1   ACAAAGACAT TGGCACCCCTT TACCTAGTAT TCGGTGCCTG AGCCGGAATA GTCGGTACAG
61  CCCTAAGCTT GCTGATTCGG GCAGAACTAG CCCAACCCGG TGCCCTTCTA GGCGACGACC
121 AAATTTACAA TGTTATTGTA ACTGCTCATG CCTTCATTAT AATTTTCTTT ATAGTAATGC
181 CAATCATGAT CGGAGGCTTC GGAAACTGAC TCGTGCCTCT AATAATTGGA GCACCAGACA
241 TGGCCTTCCC ACGAATAAAT AATATAAGCT TCTGATTATT ACCCCCCTCG TTTCTATTAC
301 TGTTAGCTTC CTCCGGAGTC GAAGCTGGTG CAGGTACAGG ATGAACTGTT TATCCACCCC
361 TTGCCGGCAA TCTTGCACAC GCCGGGGCTT CAGTAGACCT AACAATCTTC TCCCTACACC
421 TTGCAGGGGT ATCCTCCATT CTTGGAGCTA TTAATTTTAT TACAAC TATT ATTAACATGA
481 AACCTCCAGC CATCTCCCAA TACCAAACCC CCTTATTTGT ATGGGCTGTA CTAATTACAG
541 CTGTACTACT ACTACTATCT CTTCCCGTTC TAGCTGCTGG TATCACCATG CTGCTAACAG
601 ATCGAAATCT TAATACTACA TTTTTTGATC CCGCAGGAGG AGGAGATCCA ATTCTTTATC
661 AACACTTATT CTGATTCTTC GGTCACCCTG AAGTGT
    
```

Gambar 2. Hasil Sekuens sampel penelitian

Homologi untuk menentukan identitas spesies dilakukan analisis BLAST (Gambar 3) dan DNA Barcoding menggunakan BOLD system (Gambar 4).

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus singaringan voucher BIF3741 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1106	1106	88%	0.0	99%	<a href="#">KU692660.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus singaringan voucher BIF3660 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1103	1103	88%	0.0	99%	<a href="#">KU692662.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus singaringan voucher BIF3662 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1103	1103	88%	0.0	99%	<a href="#">KU692661.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus singaringan voucher BIF3661 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1077	1077	86%	0.0	99%	<a href="#">KU692659.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus bleekeri voucher MB-2001 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	895	895	99%	0.0	89%	<a href="#">KJ936764.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus bleekeri voucher PUMNH 26/2014 cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	874	874	97%	0.0	89%	<a href="#">KX266834.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus cavasius mitochondrion, complete genome</a>	868	868	99%	0.0	88%	<a href="#">KU870465.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus vittatus mitochondrion, complete genome</a>	865	865	99%	0.0	88%	<a href="#">KX177968.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus bleekeri voucher DUZM118 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	859	859	97%	0.0	88%	<a href="#">KT364779.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Mystus cavasius voucher DUZM119 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	848	848	98%	0.0	87%	<a href="#">KT762365.1</a>

Gambar 3. Hasil BLAST terhadap sekuens sampel penelitian

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Similarity (%)	Status
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		99.84	Published
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		99.84	Published
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		99.84	Published
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		99.83	Published
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		91.96	Early-Release
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		91.96	Early-Release
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		91.96	Private
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		91.96	Private
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		91.96	Private
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>singaringan</i>		91.81	Private
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>albolineatus</i>		89.95	Early-Release
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>albolineatus</i>		89.95	Early-Release
Chordata	Actinopterygii	Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus</i>	<i>albolineatus</i>		89.8	Early-Release

Gambar 4. Hasil BOLD System terhadap sekuens sampel penelitian

Adapun dari hasil BLAST dan BOLD system menunjukkan bahwa homologi sekuens sampel ikan uji memiliki kemiripan dengan ikan *Mystus singaringan*. Hasil BLAST menunjukkan identitas atau tingkat kemiripan mencapai 99% dan hasil BOLD mencapai 99,84%. Berdasarkan species page, BIN Page (Barcode Index Number), dan filogenetik dalam BOLD system dinyatakan bawa sampel ikan uji ini adalah spesies ikan *Mystus singaringan*.

## Pembahasan

Hasil identifikasi spesies ikan dari Famili Bagridae dari Sungai Klwing Jawa Tengah yaitu yang dulunya *Mystus nigriceps* (Pramono, 2010) telah terkonfirmasi secara genetik dalam penelitian menggunakan metode DNA Barcoding menjadi *Mystus singaringan*. Hasil identifikasi sampel uji (KLW PBG) secara genetik ini tidak terbantahkan adalah *Mystus singaringan*, kecuali ada spesies sangat mirip secara genetik namun hal tersebut sangat jarang terjadi. Secara taksonomi, merujuk pada BOLD system dan BLAST merupakan Phylum Chordata, Kelas Actinopterygii, Ordo Siluriformes, Famili Bagridae dan Genus *Mystus* serta speciesnya *Mystus singaringan*.

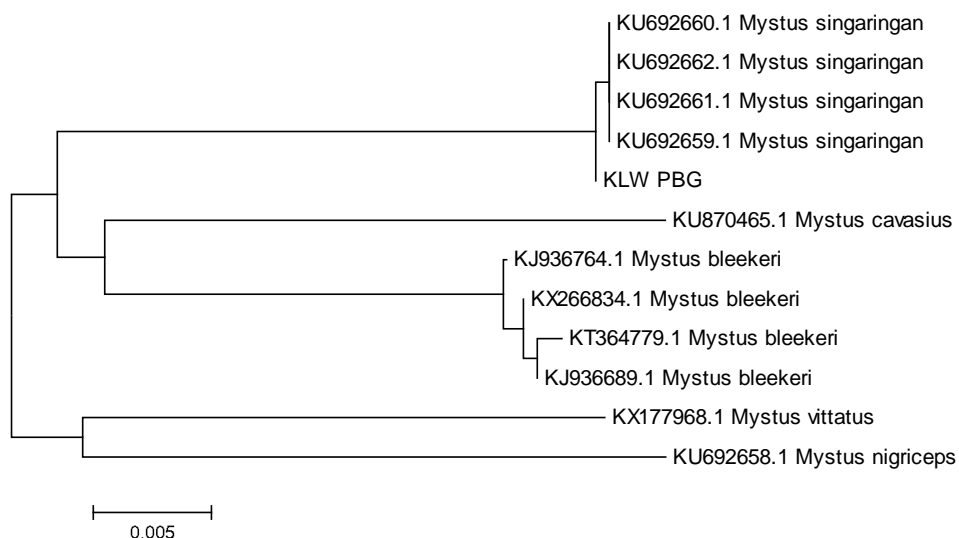
Berdasarkan *barcode index number* (BIN) dalam BOLD system, secara morfologi (Gambar 5), jarak pasangan dan sekuens sampel ikan *Mystus singaringan* dalam penelitian ini masuk dalam satu kluster dengan ikan *M. Singaringan* yang berasal dari Kediri Jawa Timur

(Hubert *et al.*, 2015). Nilai *barcode index number* memiliki arti sebagai sebuah kerangka online yang mengelompokkan secara algoritma yang menghasilkan halaman web untuk setiap kluster. Karena kluster menunjukkan kecocokan tinggi dengan spesies, sehingga sistem ini dapat digunakan untuk verifikasi identitas spesies juga keragaman dokumen ketika informasi taksonomi (Ratnasingham dan Hebert, 2013).



**Gambar 5.** (A) Ikan *Mystus singaringan* dari Sungai Klawing Jawa Tengah; B Ikan *Mystus singaringan* dari Kediri Jawa Timur

Kedekatan antara spesies yang akan diidentifikasi dan yang menjadi rujukan dapat pula dilihat filogenetiknya. Tingkat kekerabatan antara nama spesies terdahulu (*Mystus nigriceps*) dengan kode KLW PBG, rujukannya ternyata lebih dekat kekerabatannya pada *Mystus singaringan* (Gambar 6).



**Gambar 6.** Pohon Filogenetik

Beberapa penelitian identifikasi spesies ikan-ikan di perairan tawar dan laut di Indonesia juga dilakukan dengan menggunakan DNA Barcoding seperti yang dilakukan oleh Muchlisin *et al.*, (2013) di Danau Laut Tawar Aceh, Bulu Babi di Teluk Cendrawasih (Toha *et al.*, 2015), Dahrudin *et al.*, (2016) di Pulau Jawa dan Bali, dan Hubert *et al.*, (2016) di Dataran Sunda, Wallacea dan Sahul. Penggunaan DNA barcoding dapat menjadi solusi krisis taksonomi (Meier *et al.*, 2006) dan perspektif baru dalam ekologi dan sistematika ikan (Hubert *et al.*, 2008), manajemen sumberdaya ikan dan konservasi (Hubert *et al.*, 2016).

DNA barcoding memberikan kecepatan dan keakuratan dalam identifikasi spesies dengan fokus analisis pada segmen kecil dari mtDNA (Muchlisin *et al.*, 2013; Karim *et al.*, 2015). Pada eukariot, mtDNA terdiri dari molekul DNA rantai untai ganda yang berukuran 15-20 kb

(Hurst dan Jiggiins, (2005). DNA barcoding bertujuan untuk menyediakan metode yang kompeten untuk identifikasi hingga tingkat spesies dengan menggunakan penanda molekuler yang merupakan turunan dari lima wilayah gen mitochrome c oxidase I (COI) (Hubert *et al.*, 2008). Penggunaan Barcode ini sangat memungkinkan untuk mengidentifikasi spesies yang berbeda dengan variasi antar spesies yang cukup banyak dan variasi intra spesifik yang rendah (Yao *et al.*, 2010).

Menurut Hurst dan Jiggiins, (2005), DNA barcoding memiliki dua kelebihan yaitu, pertama bersifat haploid dan memiliki wilayah yang sangat lestari (*conserved*) sehingga fragmen COI secara teknis mudah mengamplifikasi tanpa cloning pada ragam spesies. Kedua, mitokondria memiliki ukuran populasi yang efektif kira-kira seperempat dari penanda dan pada hewan rata-rata memiliki tingkat evolusioner yang tinggi. Oleh karena itu memiliki tingkat deklarasasi yang tinggi pula. Spesies yang relatif dekat pun dapat dibedakan menggunakan sekuens yang pendek.

Kelebihan lain DNA barcoding adalah dapat mengidentifikasi spesies yang sulit dibedakan secara morfologi (Hebert *et al.*, 2004) dan menggunakan sampel jaringan yang sangat sedikit sehingga tidak harus mematikan hewannya. Namun demikian, metode ini sangat tergantung pada tersedianya tidaknya data sekuens (*reference sequences*) yang akurat sebagai pembanding (Stoeckle, 2003). Hasil DNA Barcoding dapat digunakan sebagai studi yang lebih luas misalnya studi filogenetik (Erickson dan Driskell, 2012; Huang *et al.*, 2016), filogeografi (Yu, 2014) dan genetika populasi (Draft *et al.*, 2010) serta, variasi genetik untuk stabilitas dan ketahanan populasi.

Pohon filogenetik menggambarkan garis keturunan evolusi dari spesies, organisme atau dari satu nenek moyang berbeda (Hall, 2011). Berdasarkan pohon filogenetik yang dibuat dapat diketahui hubungan genetik antar spesies dalam satu populasi dan antar populasi. Filogeni berguna juga untuk mengorganisir pengetahuan keragaman biologis untuk klasifikasi struktural dan untuk memberikan wawasan ke dalam peristiwa yang terjadi selama evolusi (Taylor, 2014).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Analisis genetik berdasarkan fragmen gen CO1 menunjukkan bahwa sampel penelitian dari Sungai Klawing Jawa Tengah merupakan spesies *Mystus singaringan*. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan mengkaji jarak dan struktur genetik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Altschul, S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST : A New Generation of Protein Database Search Program. *Nucleic Acid Research* 25 : 3389-3402.
- Dahrudin, H., Utama A., Busson F., Sauri S., Hanner R., Keith P., Hadiaty R.K., Hubert N. (2016). Revisiting the Ictyodiversity of Java and Bali through DNA Barocdes : Taxonomic Coverage, Identification Accuray, Cryptic Diversity and Identification of Exotic Species. *Molecular Ecology Resources* : 1-12.
- Draft, K.J., Pauls, S.U., Darrow, K., Miller S.C., Hebert, P.D., Helgen, L.E., Novotny, V and Weiblen, G.D. (2010). Population Genetics of Ecological Communities With DNA Barcodes : An Example From New Guinea Lepidoptera. *PNAS* 107 (1) : 5401-5046.
- Erickson, D.L., and Driskell, A.C. (2012). Construction and Analysis of Phylogenetik Trees Using DNA Barcode Data. *Methods Mol. Biol* 85 (8) : 395-408.
- Floyd, R., Abebe E., Papert A., and Blaxter M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode idetification. *Molecular Ecology* 11 (4) : 839-850.

- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., and Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase sub unit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5) : 294-299.
- Frankham, R. (1996). Relationship of Genetic Variation to Population Size In Wildlife. *Conservation Biology* 10 (6) : 1500-1508.
- Hebert, P. D.N., Cywinska A., Ball S.L., and de Ward J.R. (2003a). Biological Identifications Through DNA Barcodes. Proceeding Royal Society Part B. *Biological Sciences* 270 (1512) : 313-322.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., and Hallwachs, W. (2004). Ten Species In One : DNA Barcoding Reveals Cryptic Species In The Neotropical Skipper Butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101 (41) : 14812-14817.
- Huang, Z., Yang, C., and Ke, D. (2016). DNA Barcoding and Phylogenetic Relationships In Anatiidae. *Mitochondrial DNA* 27 (2) : 1042-1044.
- Hubert, N., Kadarusman., A. Wibowo., F. Busson., D. Caruso., S. Sulandari., N. Nafiqoh., L. Pouyaud., L. Ruber., J.C. Avare., F. Herder., R. Hanner., P. Keith. R.K. Hadiaty. (2015). DNA Barcoding Indonesian Freshwater Fishes : Challenges and Prospects. *DNA Barcodes* 3 : 144-169.
- Hughes, A.R., Inouye, B.D., Johnson, M.T.J., Underwood, N. And Vellend, M. (2008). Ecological Consequences of Genetic Diversity. *Ecology Letters* 11 : 609-623.
- Hurst, G. D. D. And Jiggins, F.M. (2005). Problems with Mitochondrial DNA as a Marker In Population, Phylogeographics and Phylogenetic Studies : The Effects of Inherited Symbions. *Proc R Soc B* 272 : 1525-15234.
- Karim, A., Iqbal, A., Akhtar, R., Rizwan, M., Amar, A., Qamar, U., and Jahan, S. (2015). Barcoding of Fresh Water Fishes From Pakistan. *Mitochondrial DNA* : 1-4.
- Kottelat, M., A.J. Whetten., Sri Nuraini K., dan Sutikna W. (1993). *Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. CV Java Books. Jakarta. 293 p.
- Meier, R., Shiyang K., Vaidya G. And Peter K.L.N. (2006). DNA Barcoding and Taxonomy In Diptera. A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *System Bio.* 55 : 715-728.
- Muchlisin, Z. A., Thomy Z., Fadli N., Sarong, M.A., and Siti-Azizah, M.N. (2013). DNA Barcoding Of Freshwater Fishes From Lake Laut Tawar, Aceh Province, Indonesia. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria* 43 (1) : 21-29.
- Pramono, T. B. (2010). Profil Reproduksi Ikan Senggaringan (*Mystus nigriceps*) : Dasar Pengembangan Domestikasi dan Budidaya. *Tesis*. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pratasik, S.B., Marsoedi., Arfiati D., and Setyohadi D. (2016). Mitochondrial CO1 genetic marker-based species diversity of cuttlefish (Cephalopod : Molusk) in Manado Bay and Lembeh Strait, North Sulawesi, Indonesia. *AAAL-Bioflux* 9 : 1345-1354.
- Putro, S. S. (2003). Ekologi Ikan Baceman (*Mystus nemurus*) Di Sungai Klawing Kabupaten Purbalingga dan Beberapa faktor yang Berkaitan dengan Domestikasinya. *Tesis* Magister Sains Ilmu Lingkungan. Program Pascasarjana Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Ratnasingham S., and Hebert P.D.N. (2007). BOLD : The Barcode of Life Data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*. 7 (3) : 355-364.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4 (4) : 406-425.
- Setijanto., Aryani, E., dan Proklamasiwati. (1999). Distribusi Altitudinal Ikan Sungai : Informasi Dasar Penggunaannya sebagai Indikator Kualitas Air dan Usaha Budidayanya. Laporan Hasil Penelitian. Fakultas Biologi Unsoed. Tidak Dipublikasikan.
- Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, DNA and The Barcode of Life. *BioScience*. 53 : 2-3.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). Mega5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 1-9.

- Taylor, D. R. And Aarssen, L. W. (1988). An Interpretation of Phenotypic Plasticity In *Agropyron Repens* (Gramineae). *American Journal of Botany*. 75 (3) : 401-413.
- Taylor, A.L. (2014). Population Structure and Phylogeography of *Octopus cyanea* and *Lethrinus* Species In The South-Western Indian Ocean. Thesis. Unpublished.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. And Higgins, D.G. (1997). The ClustalX Windows Interface : Flexible Strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25 :4876-4882.
- Toha, A.H.A., Sumitro, S.B., Widodo., and Hakim L. (2015). Color Diversity and Distribution of Sea Urchin *Tripneustes gratilla* in Cendrawasih Bay Ecoregion of Papua, Indonesia. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 41 : 273-278.
- Whitworth, T.L., Dawson R.D., Magalon H., and Baudry E. (2007). *Dna Barcoding cannot Reliably*
- Yao, H., Song J., Liu C., Luo K., Han., Li Y., and Pang. (2010). Use of ITS2 Region as The Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PloS One*. 5 :e131102.doi:10.1371/journal.pone.0013102
- Yu, S. S. (2014). DNA Barcoding and Phylogeographic Analysis of *Nippoacmea* Limpets (Gastropoda : Lottidae) In China. *Journal Mollusca Stud*. 80 (4) : 420-429.