

Filogenetik Ikan Ekstremofil *Edible* Populasi Magelang Menggunakan Gen *Cytochrome Oxydase I*

Jefri Permadi^{1*}, Ana Rochvita², Rr. Citra Permata Kusuma Anggraini³, dan Flandrianto Sih Palimirmo⁴

Program Studi Budidaya Perikanan Air Tawar, Politeknik Muhammadiyah Magelang, Indonesia^{1,2,3}

Balai Riset Pemuliaan Ikan, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Indonesia⁴

*jefripermadi@pmm.ac.id

OPEN ACCESS

Citation: Jefri Permadi, Ana Rochvita, Rr. Citra Permata Kusuma Anggraini, dan Flandrianto Sih Palimirmo. 2022. Filogenetik Ikan Ekstremofil *Edible* Populasi Magelang Menggunakan Gen *Cytochrome Oxydase I*. *Journal of Research and Technology* Vol. 8 No. 1 Juni 2022: Page 87–98.

Abstract

The *Cethol* fish was used as a dietary raw material of chips fish by local people in Magelang. The population of the fish was decreased and impacted to fish chips production. The *Cethol* fish farming could be the one of solution to maintain the stock of this fish as dietary raw material. Nevertheless, the taxonomic status of *Cethol* fish as the primary information of in Magelang still unclear. Taxonomic status is of organisms is useful to inform biology, reproduction and traits of candidate species will be farmed. The aim of research is revealing the taxonomic status of *Cethol* fish in Magelang using common barcoding marker *Cytochrome Oxidase I (COI)* from mitochondrial DNA. The *COI* gene sequences of *Cethol* fish from Magelang and other sequence samples from NCBI were used to construct the phylogenetic tree and haplotype network approach to reveal the similarity and clustered of the fish sequence samples. The maximum likelihood and minimum evolution were considered as construction tree method by Kimura 2 parameter statistic model and 1000 bootstrap value. The Median joining statistic model was generated to reveal grouping form and substitution rate of each samples. The phylogenetic tree was constructed from *COI* gene of *Cethol* fishes from Magelang are grouped in the same clade and monophyletic with the *Poecilia reticulata* *COI* gene from South America as the origin of the fish species. Meanwhile, the *P. reticulata* from Bengkulu, Sumatera and Java were clearly separated with the samples from Magelang but still in haplogroup with the South America sequence samples. Those result are strengthen the previously notion that the *Cethol* fish in Magelang is a group species of *P. reticulata* from South America.

Keywords: *Extremophile, Cethol, Magelang Chips, Poecilia reticulata.*

Abstrak

Ikan Cethol yang menjadi bahan baku peyek Petho mengalami penurunan populasi, sehingga berpengaruh terhadap keberlangsungan produksi makanan tersebut di Magelang. Upaya budidaya ikan tersebut menjadi salah satu solusi untuk menjaga ketersediaan stok ikan di alam, namun status taksonomi ikan Cethol di Magelang belum sepenuhnya terungkap sehingga hal tersebut akan menjadi kendala dalam melakukan budidaya. Penelitian ini dilakukan untuk mengungkap status taksonomi ikan tersebut menggunakan penanda genetik berupa gen COI dari DNA mitokondria. Metode yang dilakukan dengan pendekatan hubungan kekerabatan ikan *P. reticulata* populasi Magelang dengan populasi lainnya di Indonesia, Asia, Amerika, dan Eropa yang diuji melalui konstruksi pohon filogenetik dengan maximum likelihood dan minimum evolution dengan model statistik Kimura-2-parameter dengan nilai 1000 bootstrap. Analisis haplotype network menggunakan model statistika median joining untuk melihat model pengelompokan dan jarak substitusi basa dari masing-masing sampel. Hasil analisis filogenetik dan haplotype network menunjukkan adanya pemisahan percabangan yang signifikan antara *P. reticulata* populasi Magelang dengan Populasi lain di Jawa dan Bengkulu, namun berada dalam kelompok percabangan dan haplogruop yang sama dengan populasi asal yaitu Amerika Latin. Hal tersebut memperkuat dugaan bahwa ikan Cethol populasi Magelang termasuk dalam spesies *P. reticulata* yang berasal dari Amerika Latin.

Kata Kunci: Ekstremofil, Cethol, Magelang, Peyek, *Poecilia reticulata*.

1. Pendahuluan

Topografi wilayah Magelang dikelilingi oleh pegunungan dengan aliran anak sungai yang bermuara di sungai Progo. Aliran sungai tersebut menjadi habitat yang sesuai bagi ikan air tawar. Anak sungai di wilayah Magelang memiliki variasi ketinggian dan tipe vegetasi riparian merupakan habitat ikan untuk pengasuhan larva, memijah dan mencari makan termasuk ikan Cethol *P. reticulata* yang merupakan ikan Ekstremofil yaitu organisme yang dapat hidup pada kondisi habitat perairan yang ekstrim, dimanfaatkan sebagai bahan baku peyek Cethol yang merupakan makanan khas di Magelang (Darma dan Putra, 2020; Pambuko *et al.*, 2020; Kurniawan dan Mustikasari, 2021). Berdasarkan laporan masyarakat sekitar, keberadaan ikan *P. reticulata* di wilayah Magelang saat ini sudah mulai sulit sehingga berpotensi mengganggu keberlangsungan produksi peyek Cethol ini. Berdasarkan hal tersebut, ikan *P. reticulata* memiliki nilai penting bagi masyarakat sehingga upaya budidaya ikan menjadi alternatif solusi bagi masalah tersebut. Langkah awal yang dapat dilakukan sebelum budidaya adalah mengetahui status taksonomi ikan *P. reticulata* di alam. Populasi ikan *P. reticulata* berdasarkan laman *International Union for Conservation of Nature (IUCN) redlist*

saat ini adalah kategori *Less Concern* (Lyons, 2021), yaitu status populasi ikan tersebut kurang diperhatikan. Hal tersebut disebabkan oleh minimnya kajian status taksonomi spesies dan populasi ikan *P. reticulata* di dunia, termasuk di wilayah Magelang, sehingga kepastian dari status taksonomi yang menjadi informasi dasar untuk menduga populasinya belum terkonfirmasi. Dugaan keberadaan spesies *P. reticulata* di wilayah Magelang mengacu pada penelitian Rahayu *et al.*, (2019), berdasarkan indeks kesamaan sekuens gen *Cytochrome Oxydase I* (COI) pada DNA mitokondria yang merupakan gen penanda dalam *barcoding* hewan dan tumbuhan ini memiliki nilai 90-100% untuk spesies *P. reticulata* dan *P. mexicana*.

Gen COI merupakan bagian dari DNA mitokondria yang berperan dalam proses respirasi tingkat seluler. Gen-gen mitokondria seperti UCP2 (*mitochondrial uncoupling protein 2*), (*cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2 [COX4I2]*), *HIG1 domain family member 1A [HIGD1A]* dan *cytochrome-b5 reductase [CYB5R]*) diketahui berperan dalam menurunkan jumlah reseptor pada proses fosforilasi oksidatif dan metabolisme energi saat pemberian suplementasi asam lemak (Tian *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2018). Selain berperan dalam metabolisme energi, gen COI bersifat maternal yaitu diturunkan langsung dari induk betina tanpa melalui proses rekombinasi, sehingga gen ini memiliki sifat yang konservatif dan dianggap sesuai untuk mengungkap kekerabatan suatu spesies.

Introduksi kelompok ikan *Poeciliid* di wilayah Indonesia berdasarkan catatan jejak introduksi spesies *P. reticulata* terjadi pada tahun 1920an. Introduksi tersebut pada mulanya bertujuan untuk mengendalikan populasi larva nyamuk malaria, namun relung habitat larva nyamuk malaria lebih luas dari ikan *P. reticulata*, menjadi salah satu faktor yang menghambat ikan ini untuk berperan maksimal dalam mengendalikan larva nyamuk dan populasi ikan *P. reticulata* masih banyak ditemukan di luar habitat aslinya hingga saat ini termasuk di Indonesia (Eidman, 1989). Ikan *P. reticulata* yang ada di wilayah Magelang hingga saat ini masih dianggap spesies yang sama dengan *P. reticulata* yang diintroduksi pada masa lampau di wilayah Asia, Eropa, dan Amerika, meskipun pada masing-masing habitat introduksi tersebut memiliki perbedaan kondisi lingkungan dan pola predasi yang berhubungan pada mekanisme adaptasi dan spesiesi. Untuk memperkuat dugaan tersebut, peneliti melakukan konstruksi pohon filogenetik dan pengelompokan ikan *P. reticulata* populasi Magelang menggunakan gen COI dan data sekunder dari gen bank NCBI sebagai pembandingan.

2. Metode Penelitian

Sampel ikan *P. reticulata* diambil dari saluran irigasi persawahan di wilayah Srumbung, Kabupaten Magelang dengan koordinat -8° 25' 23.6' LS dan 110° 19' 21"BT. DNA ikan *P. reticulata* populasi Magelang diekstraksi menggunakan GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit. Amplifikasi DNA pada suhu 90°C selama 30 detik, 54°C selama 30 detik, 72°C selama 1 menit, dan *post extension* pada suhu 72°C selama 5 menit. Primer COI yang digunakan adalah Universal Primer dengan urutan Forward 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' dan Reverse 5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3'. Selanjutnya dilakukan elektroforesis menggunakan agarosa 1% dan dilanjutkan dengan sekuensing di 1st BASE, Singapura dan analisis genetik. DNA hasil sekuensing selanjutnya diverifikasi menggunakan

BLAST di gen bank NCBI kemiripan diatas 90%. Sekuens DNA *P. reticulata* populasi Magelang selanjutnya disejajarkan dengan program Clustal W dalam *software* Mega 6. Pensejajaran tersebut juga melibatkan data sekunder dari genbank NCBI (Tabel 1). Pohon filogenetik dikonstruksi dengan pendekatan *minimum evolution*, dan *maximum likelihood* menggunakan model statistik Kimura-2-P dengan nilai *bootstrap* 1000 (Kimura, 1980). Nilai *bootstrap* merepresentasikan banyaknya ulangan pohon filogenetik yang dikonstruksi dengan pendekatan *minimum evolution* dan *maximum likelihood* untuk menghasilkan pohon yang valid.

Analisis *haplotype network* antar sampel *P. reticulata* dilakukan dengan menggunakan program komputer DnaSP v.5.0, serta membuat *haplogroup* berdasarkan analisis *median joining network* antar populasi dengan kerabatnya berdasarkan *haplotype* menggunakan program komputer Network 4.1.0.8 (Bandelts *et al.*, 1999)

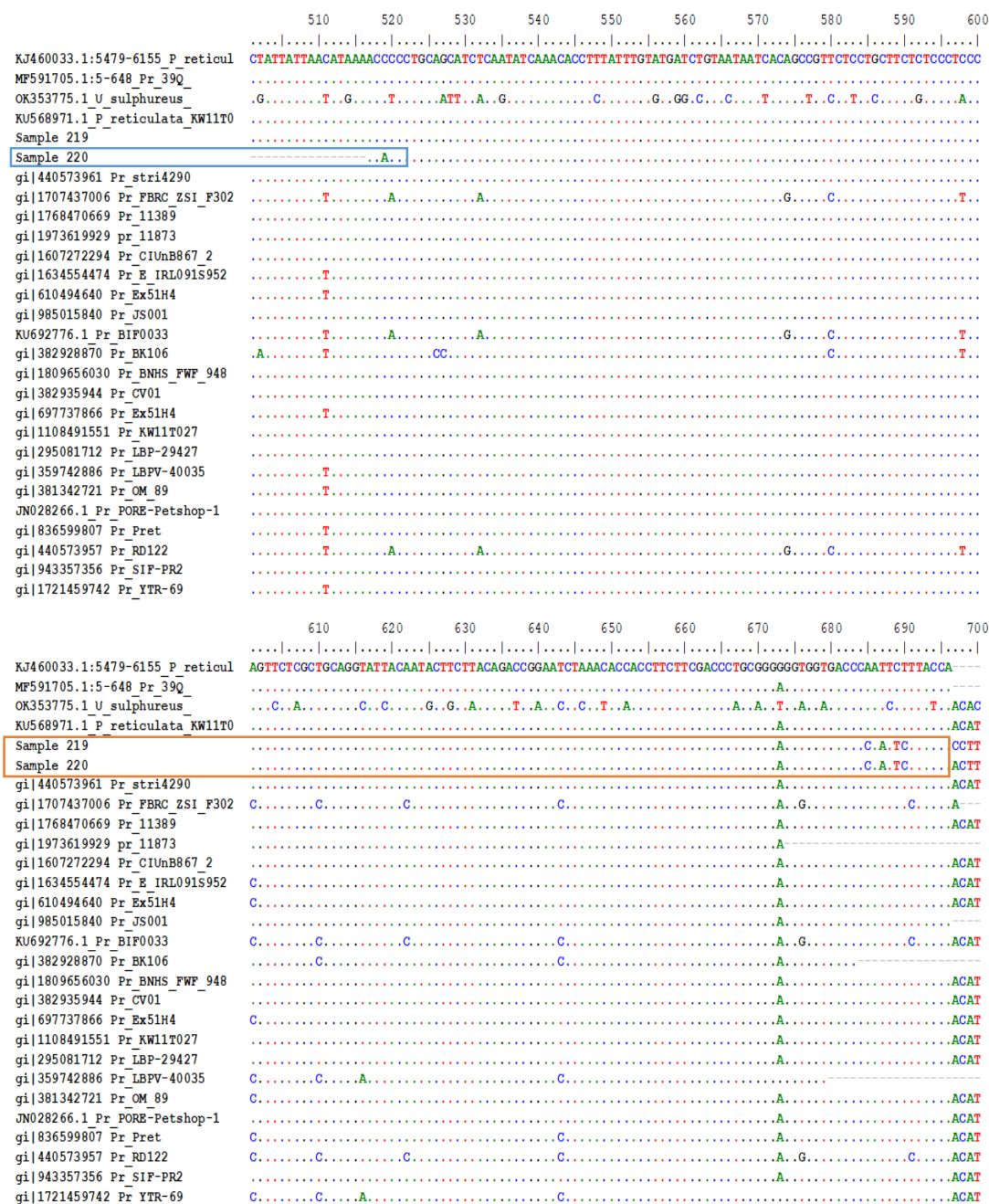
Tabel 1. Sekuens Pembandingan dari Bank Data Gen NCBI

| No | Nomor Akses | Asal Sekuens | Negara | Referensi |
|-----|-------------|----------------------|-------------------|-----------------------------------|
| 1. | JX968696 | Pedernales river | Republik Dominica | Alda <i>et al.</i> , 2013 |
| 2. | MK860778 | Hyderabad | India | Laskar <i>et al.</i> , 2019 |
| 3. | MN083133 | Dhaka | Bangladesh | Ahmed <i>et al.</i> , 2019 |
| 4. | MT012659 | Bangladesh | Bangladesh | Ahmed <i>et al.</i> , 2020 |
| 5. | MK464043 | Cerrado river | Brazil | Bagley <i>et al.</i> , 2019. |
| 6. | MK628405 | Ing River | Thailand | Panprommin <i>et al.</i> , 2019 |
| 7. | KJ554388 | Mediterania | Mediterania | Geiger <i>et al.</i> , 2014 |
| 8. | KT599873 | Santa Monica Lake | Panama | Martinez <i>et al.</i> , 2016 |
| 9. | MK440717 | Nira | India | Verma <i>et al.</i> , 2019 |
| 10. | JQ734533 | Cape Verde | Cape Verde | Luce and Lemoine. 2012 |
| 11. | KM287034 | Rhine river | Germany | Knebelberger <i>et al.</i> , 2015 |
| 12. | KU568971 | South Africa Market | South Africa | Van Der Walt <i>et al.</i> , 2017 |
| 13. | MF591705 | Kerala | India | Prasannan and Pillai, 2017 |
| 14. | GU702171 | Paraiba do Sul River | Brazil | Pereira <i>et al.</i> , 2011 |
| 15. | JN989142 | Parana river | Brazil | Pereira <i>et al.</i> , 2013 |
| 16. | JQ667563 | Indian market | India | Khedkaret <i>et al.</i> , 2012 |
| 17. | JN028266 | Canada | Canada | April <i>et al.</i> , 2011 |
| 18. | KP700521 | | Central america | Bagley <i>et al.</i> , 2015 |
| 19. | JX968694 | | Central America | Alda <i>et al.</i> , 2013 |
| 20. | KR871635 | Cochin backwater | India | Deepak <i>et al.</i> , 2015 |
| 21. | MK355289 | Columbia | Columbia | Papamija <i>et al.</i> , 2018 |
| 22. | KU692776 | Jawa | Indonesia | Dahrudin <i>et al.</i> , 2017 |
| 23. | JQ665833 | Manna river Bengkulu | Indonesia | Wibowo <i>et al.</i> , 2013 |

3. Hasil dan Pembahasan

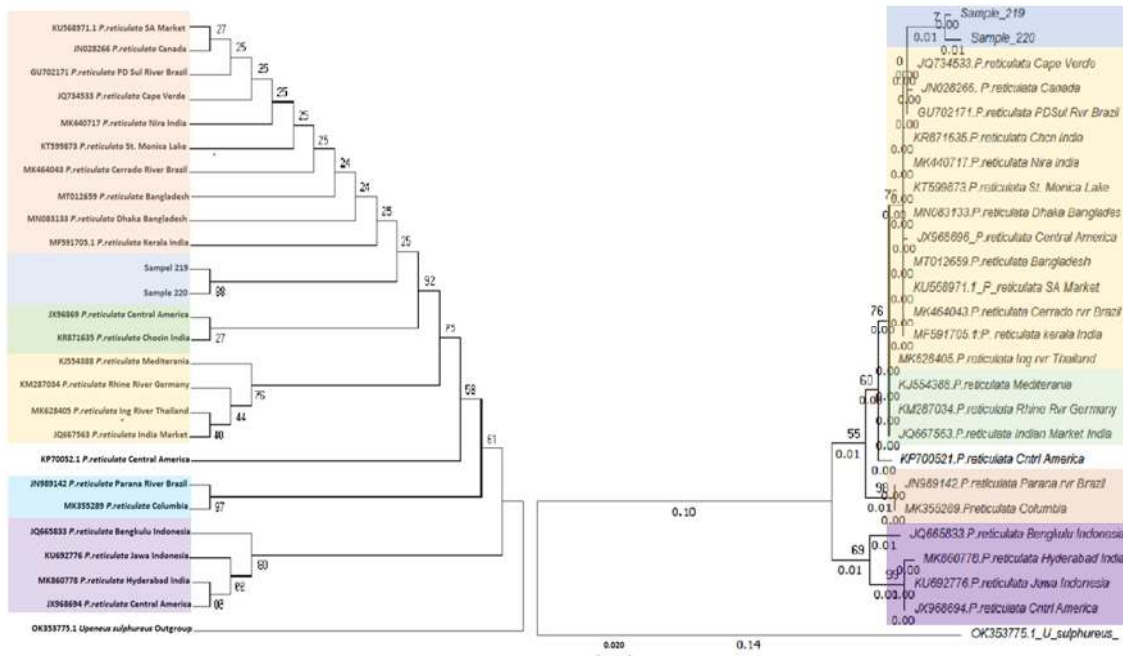
Penelitian ini menggunakan sampel gen COI ikan *P. reticulata* yang diambil dari saluran irigasi di Wilayah Srumbung Kabupaten Magelang dan sekuens gen COI dari sampel *P. reticulata* yang diambil dari gen bank NCBI (Tabel 1). Hasil analisis polimorfisme gen COI

menggunakan program Mega 6 pada gen COI dari sampel *P. reticulata* dengan label 219 dan 220 menunjukkan adanya polimorfisme (perubahan sekuens) yang didominasi dengan variasi substitusi (Gambar 1). Sampel 220 teridentifikasi menunjukkan polimorfisme pada gen COI berupa substitusi basa pada urutan 520 dari C ke A. Selain itu, kedua sampel 219 dan 220 juga memiliki pola polimorfisme yang sama, diantaranya substitusi basa pada urutan 673 dari G ke A, urutan 685 dari A ke C, urutan 687 dari T ke A, urutan 689 dari C ke T, dan urutan 690 dari T ke C.



Gambar 1. Profil Sekuens Gen COI pada Beberapa Sampel *P. reticulata*

Substitusi basa sampel *P. reticulata* yang terjadi pada beberapa 6 titik sekuens gen COI mengindikasikan bahwa populasi ikan *P. reticulata* di Magelang lebih bervariasi secara genetik dari populasi lainnya. Fenomena polimorfisme tunggal nukleotida mitokondria menjadi dasar pengelompokan organisme dalam suatu populasi karena sifat DNA mitokondria yang lebih konservatif dibanding DNA nukleus (Susmiarsih, 2012). Substitusi basa DNA tersebut diketahui tidak merubah karakter asam aminonya. Substitusi sinonim juga terjadi pada ikan *Chitala lopis* sebanyak 13 titik dan bersifat sinonimus dan *Kriptopterus limpok* (Persada *et al.*, 2021; Singkam *et al.*, 2011). Polimorfisme DNA disebabkan karena adanya mutasi yang terjadi secara acak. Dalam penelitian ini, polimorfisme sampel 219 dan 220 populasi Magelang berbeda dengan pola polimorfisme sekuens dari NCBI. Perbedaan pola polimerfisme tersebut mengindikasikan bahwa mutasi DNA antar populasi tersebut terjadi secara acak dan merupakan bagian dari mekanisme mutasi. Berdasarkan penelitian Gilbey *et al.*, (1999) pada juvenile ikan Salmon Atlantik menunjukkan bahwa polimorfisme DNA mitokondria berkaitan dengan faktor temperatur, pertumbuhan, umur serta konsumsi oksigen. Pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel 219 dan 220 menunjukkan keduanya dalam satu sub kelompok baik dengan *maximum likelihood* dan *minimum evolution* (Gambar 2).

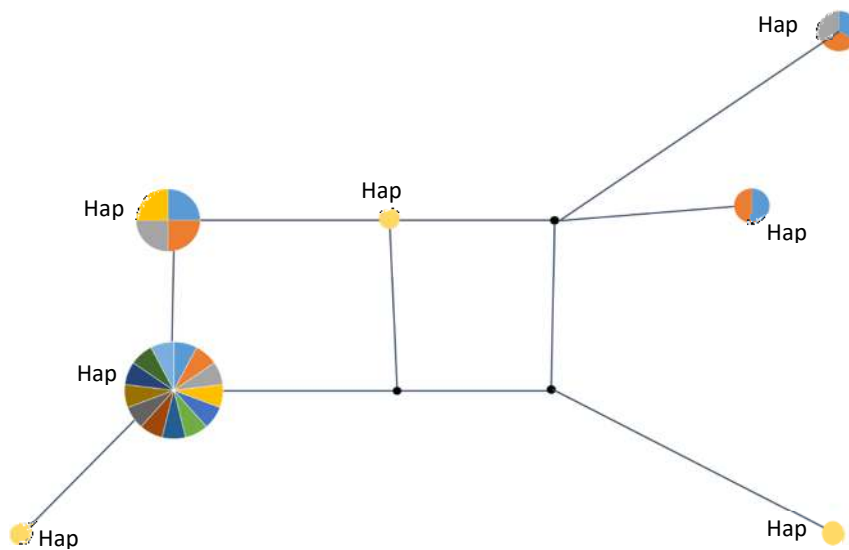


Gambar 2. Pohon Filogenetik Gen COI Berdasarkan *Maximum Likelihood* (Kanan) dan Pohon Filogenetik Gen COI Berdasarkan *Minimum Evolution* (Kiri)

Hasil konstruksi pohon dua pohon filogenetik menggunakan *maximum parsimony* dan *minimum evolution* menunjukkan kedua sampel *P. reticulata* dari Kabupaten Magelang berada dalam satu klade dengan sekuens *P. reticulata* dari India, Afrika Selatan, dan Amerika Tengah baik pada pohon filogenetik *maximum parsimony* dan *minimum evolution*. Sementara itu, terdapat 1 sekuens *P. reticulata* populasi Bengkulu (JQ665833) yang terpisah percabangan (klade) dengan populasi Magelang namun berada dalam satu klade dengan populasi Jawa

(KU692776), Central America (JX968694) dan Hyderabad, India (MK860778). Sekuens *P. reticulata* populasi Magelang yang terpisah Klade dengan populasi ikan di Jawa dan Bengkulu dimana hal tersebut juga terjadi pada penelitian Hariyanto *et al.*, (2019) yang menunjukkan bahwa *P. reticulata* populasi Jawa Timur terpisah klade dengan *P. reticulata* populasi Sukabumi. Polimorfisme gen COI yang tinggi di menjadi salah satu sebab *P. reticulata* populasi Jawa terpisah satu sama lain. Hal ini mengindikasikan bahwa ikan *P. reticulata* populasi Magelang berada dalam kelompok spesies tersebut.

Berdasarkan analisis *haplotype network* dari gen COI ikan *P. reticulata* terbentuk 8 *haplogroup* dimana *haplogroup* 2 adalah spesies *Upeneus sulphureus* yang merupakan *outgroup* dan tidak ditampilkan pada gambar *haplotype network*. *P. reticulata* populasi Magelang terpisah dalam dua haplogroup, sampel 219 terkelompok dalam *haplogroup* 1 (Hap 1) yang terdiri dari 13 sampel dan sampel 220 berada pada *haplogroup* 3 (Hap 3) dengan arah percabangan dari Hap 1. *Haplogroup* 5 terdiri dari 5 sampel, 3 sampel terkelompok dalam *haplogroup* 4 dan *haplogroup* 7 sebanyak 2 sampel dari lokasi yang berbeda. Pola pengelompokan *P. reticulata* berdasarkan analisis *haplotype network* mengindikasikan bahwa sampel dari populasi Magelang dan Populasi lain tidak mengindikasikan adanya *cluster* pengelompokan berdasarkan asal sampel. Keterangan sampel dari masing-masing *haplogroup* disajikan pada Tabel 2.



Gambar 3. *Haplotype Network* Gen COI dari *P. reticulata*

Keterangan: Sampel sekuens yang dianalisis diinterpretasikan dalam bentuk lingkaran yang terpisah yang dihubungkan dengan garis. Ukuran lingkaran menginterpretasikan banyaknya sampel sekuens yang terkelompok pada suatu lingkaran, sedangkan panjang garis penghubung menginterpretasikan jumlah substitusi gen COI yang terjadi antar kelompok sampel. Semakin panjang garis, maka jumlah substitusi gen COI semakin banyak.

Tabel 2. Kelompok Sampel Berdasarkan Pengelompokan dari Analisis *Haplotype Network*

| No | Kelompok <i>Haplotype</i> | Sampel | ID Sekuens |
|----|---------------------------|-----------------------|------------|
| 1. | Hap 1 | Kerala India | MF591705.1 |
| | | South Africa Market | KU568971.1 |
| | | Magelang 1 | 219 |
| | | Dominica | JX968696 |
| | | Bangladesh1 | MN083133 |
| | | Bangladesh2 | MT012659 |
| | | Cerrado rvr, Brazil | MK464043 |
| | | St. Monk Lake, Panama | KT599873 |
| | | Nira, India | MK440717 |
| | | Cape Verde | JQ734533 |
| | | PD Sul, Rvr, Brazil | GU702171 |
| | | Kanada | JN028266 |
| | | Cochin India | KR871635 |
| 2. | Hap 3 | Magelang 2 | 220 |
| 3. | Hap 4 | Hyderabad, India | MK860778 |
| | | Jawa, Indonesia | KU692776 |
| | | Central America | JX968694 |
| 4. | Hap 5 | Ing River, Thailand | MK628405 |
| | | Mediterania | KJ554388 |
| | | Rhine river, Germany | KM287034 |
| | | India Market | JQ667563 |
| 5. | Hap 6 | Bengkulu, Indonesia | JQ665833 |
| 6. | Hap 7 | Parana river, Brazil | JN989142 |
| | | Columbia | MK355289 |
| 7. | Hap 8 | Central America | KP700521 |

Fenomena pengelompokan populasi spesies invasif dalam satu *haplogroup* juga terjadi pada kelompok serangga *H. axyridis*, pengelompokan tersebut terjadi karena diversitas genetik populasi serangga yang rendah (Blekhman *et al.*, 2020).

Variasi gen yang terjadi pada DNA mitokondria dapat terjadi akibat adanya pengaruh faktor lingkungan dan translokasi ke gen-gen nukleus (Sharma *et al.*, 2019), dimana kondisi tersebut dapat berbeda pada masing-masing organisme pada habitat yang berbeda serta merupakan gejala mikroevolusi. Pengelompokan *P. reticulata* yang ditemukan di wilayah Magelang dengan 13 sekuens CO1 dari populasi Kanada, Asia Selatan (India dan Bangladesh), Afrika Selatan dan Amerika Latin (Brazil, Panama dan Dominika) merefleksikan perjalanan sejarah introduksi *P. reticulata* dari Amerika Latin ke wilayah Asia Tenggara pada masa kolonial Belanda, dimana hal tersebut juga dapat menggambarkan kebutuhan *P. reticulata* untuk mengendalikan populasi larva Malaria di negara-negara tempat berlabuhnya kolonial Belanda pada saat itu.

4. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil konstruksi pohon filogenetik serta *haplotype network* ikan *P. reticulata* populasi Magelang menggunakan gen COI yaitu dua sampel sekuens ikan *P. reticulata* populasi Magelang berada lama klade yang sama dan berada pada kelompok kluster yang sama dari populasi Amerika Latin, namun sampel sekuens dari populasi Magelang memiliki substitusi basa yang relatif banyak. Hasil menggunakan gen COI tersebut memperkuat dugaan bahwa ikan Cethol yang menjadi bahan dasar peyek Petho di Magelang termasuk dalam spesies *P. reticulata*. Untuk memperkuat dugaan tersebut perlu dilakukan penelitian identifikasi morfologi dan anatomi dari ikan tersebut.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Kemendikbud dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah Penelitian Dosen Pemula tahun 2021.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, M. S., Datta, S. K., Saha, T., and Barua, A. 2020. DNA barcoding of fresh water fishes of Bangladesh (direct submission to NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT012659> accessed on 24/11/2021.
- Ahmed, M. S., Zhilik, A. A., Chowdhury, N. Z., and Ahmed, S. 2019. DNA Barcoding of Freshwater Fishes of Bangladesh (for Freshwater species DUZM-FF) *direct submission to NCBI*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN083133> accessed on 24/11/2021.
- Alda, F., Reina, R. G., Doadrio, I., & Bermingham, E. (2013). Phylogeny and biogeography of the *Poecilia sphenops* species complex (Actinopterygii, Poeciliidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(3), 1011-1026.
- April, J., Mayden, R. L., Hanner, R. H., & Bernatchez, L. (2011). Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), 10602-10607.
- Bagley, J. C., Alda, F., Breitman, M. F., Bermingham, E., van den Berghe, E. P., & Johnson, J. B. (2015). Assessing species boundaries using multilocus species delimitation in a morphologically conserved group of neotropical freshwater fishes, the *Poecilia sphenops* species complex (Poeciliidae). *PLoS One*, 10(4), e0121139.
- Bagley, J. C., De Podesta Uchoa de Aquino, P., Breitman, M. F., Hrbek, T., Langeani, F. and Colli, G. R. 2019. DNA barcode and minibarcode identification of freshwater fishes from Cerrado headwater streams in central Brazil (direct submission to NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MK464043> accessed on 24/11/2021.
- Bandelts H. J., Forster P., and Rohl A. (1999) Median Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biological Evolution* 16 (1): 37-48. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036.
- Blekhman, A., Goryacheva, I., Schepetov, D., & Zakharov, I. (2020). Variability of the mitochondrial CO1 gene in native and invasive populations of *Harmonia axyridis* Pall. comparative analysis. *PloS one*, 15(4), e0231009.
- Dahrudin, H., Hutama, A., Busson, F., Sauri, S., Hanner, R., Keith, P, Hadiaty, R. and Hubert, N. (2017). Revisiting the ichthyodiversity of Java and Bali through DNA barcodes:

- taxonomic coverage, identification accuracy, cryptic diversity and identification of exotic species. *Molecular Ecology Resources*, 17(2), 288-299.
- Darma, R. B., & Putra, A. S. (2020, Januari). Kelimpahan Ikan di Aliran Sungai Elo, Magelang, Jawa Tengah. *Prosiding Seminar Nasional MIPA Kolaborasi* (Vol. 2, No. 1, pp. 149-153).
- Deepak, J., Nidhin, B., and Harikrishnan, M. 2015. DNA barcodes for fish larvae inhabiting Cochin backwaters (Direct submission to NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KR871635> accessed on 24/11/2021.
- Du, X., Shen, T., Wang, H., Qin, X., Xing, D., Ye, Q., ... & Li, X. (2018). Adaptations of hepatic lipid metabolism and mitochondria in dairy cows with mild fatty liver. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 9544-9558.
- Eidman H, 1989. Exotic aquatic species introduction into Indonesia. In: Exotic aquatic organisms in Asia. Proceedings of the Workshop on Introduction of Exotic Aquatic Organisms in Asia. Asian Fish. Soc. Spec. Publ., 3:57-62. Manila, Philippines [ed. by Silva De] Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, 57-62.
- Geiger, M. F., Herder, F., Monaghan, M. T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., Berrebi, P., Bohlen, J, Casal-Lopez, M, Delmastro, G. B., Denys, G. P. J., Dettai, A., Doadrio, I., Kalogianni, E., Kärst, H., Kottelat, M., Kovačić, M., Laporte, M., Lorenzoni, M., Marčić, Z., Özüluğ, M., Perdices, A., Perea, S., Persat, H., Porcelotti, S., Puzzi, C., Robalo, J., Šanda, R., Schneider, M., Šlechtová, V., Stoumboudi, M., Walter, S., and Freyhof, J. (2014). Spatial Heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot Affects Barcoding Accuracy of Its Freshwater Fishes. *Molecular Ecology Resources* 14, 1210–1221.
- Gilbey, J., Verspoor, E., & Summers, D. (1999). Size and MEP-2* variation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the River North Esk, Scotland. *Aquatic Living Resources*, 12(4), 295-299.
- Hariyanto, S., Adro'i, H., Ali, M., & Irawan, B. (2019). DNA Barcoding: A Study of Guppy Fish (*Poecilia reticulata*) in East Java, Indonesia. *Biosaintifika*, 11(2), 272-278.
- Khedkar, G. D., Jamdade, R. A., Hanner, R. H. and Hebert, P. D. N. 2012. DNA Barcoding can Help Ornamental Fish Trading in Changing Regime (Direct submission to NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JQ667563> accessed on 24/11/2021.
- Kimura (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16 (2): 111-20.
- Knebelsberger, T., Dunz, A. R., Neumann, D., & Geiger, M. F. (2015). Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding. *Molecular ecology resources*, 15(3), 562-572.
- Kurniawan, A., & Mustikasari, D. (2021). Review tentang Kemampuan Ikan Ekstremofil untuk Hidup di Perairan Asam dan Terkontaminasi Logam Berat Pascapenambangan Timah. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 19(3), 541-554.
- Laskar, B. A., Adimalla, H., Fatima, F., Deepa, J., and Chandra, K. (2019). Freshwater Biology Regional Centre, Zoological Survey of India, Plot 366/1 Hyderguda, Attapur, Hyderabad, Telangana 500048, India (direct submission to NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK860778.1> accessed on 24/11/2021.

- Luce, K., & Lemoine, M. (2012). First record of freshwater fish on the Cape Verdean archipelago s. *African Zoology*, 47(2), 341-344.
- Lyons, T. J. 2021. *Poecilia reticulata*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2021:e.T60444A3100119. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T60444A3100119.en>. Downloaded on 28 November 2021.
- Martínez, C., Chavarría, C., Sharpe, D. M., & De León, L. F. (2016). Low predictability of colour polymorphism in introduced guppy (*Poecilia reticulata*) populations in Panama. *PLoS one*, 11(2), e0148040.
- Pambuko, Z. B., Salma, T. F., Wijayanti, E., Sholihin, T., Ismailah, N., & Rochman, N. (2020). Katalog Digital MitraMu untuk Memperluas Jangkauan Promosi Produk UMKM di Bandongan, Magelang. *Community Empowerment*, 5(3), 147-151.
- Panprommin, D., Soontornpravit, K., Tuncharoen, S., and Iamchuen, N. 2019. Utility of DNA barcoding for species identification of larval fish in the lower Ing River, Thailand (direct submission to NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK628405> accessed on 24/11/2021.
- Papamija, C., Buitrago-Bitar, M. A., Londono, J. M., and Munoz, J. E. 2018. Molecular characterization of fish fauna in two natural reserves from Colombia (direct submission to NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK355289> accessed on 24/11/2021.
- Pereira, L. H., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC genetics*, 14(1), 1-14.
- Pereira, L. H., Maia, G. M., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial Dna*, 22(sup1), 71-79.
- Persada, A. P., Solihin, D. D., & Affandi, R. 2021. Karakteristik genetik ikan belida *Chitala lopis* (Bleeker, 1851) asal Lampung dan Kalimantan berdasarkan gen COI. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 21(1), 49-60.
- Prasannan, K. and Pillai, P. M. 2017. Barcoding of selected hillstream fishes of southern Western Ghats, Kerala, India. *Poecilia reticulata* isolate 39Q cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gen - Nucleotide - NCBI (nih.gov) (Accessed on 01/01/2021).
- Rahayu, D. A., Nugroho, E. D., & Listyorini, D. (2019). DNA Barcoding Ikan Introduksi Khas Telaga Sari, Kabupaten Pasuruan. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 7(2), 51-62.
- Sharma, N., Pasala, M. S., & Prakash, A. (2019). Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. *Environmental and molecular mutagenesis*, 60(8), 668-682.
- Singkam, A. R., Solihin, D. D., & Affandi, R. (2011). Keragaman Morfometrik dan Gen Cytochrome b DNA Mitokondria *Kryptopterus limpok* di Sungai Batang Hari. In *BPPKSDI Jatiluhur: Prosiding Forum Nasional Pemacuan Sumber Daya Ikan III*.
- Susmiarsih, T. (2012). Peran genetik DNA mitokondria (mtDNA) pada motilitas spermatozoa. *Majalah Kesehatan Pharmamedika*, 2(2).
- Tian, J., Lu, R., Ji, H., Sun, J., Li, C., Liu, P., Lei, C., Chen, L., & Du, Z. (2015). Comparative analysis of the hepatopancreas transcriptome of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed with lard oil and fish oil diets. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.010>

- Van der Walt, K. A., Mäkinen, T., Swartz, E. R., & Weyl, O. L. F. (2017). DNA barcoding of South Africa's ornamental freshwater fish—are the names reliable? *African Journal of Aquatic Science*, 42(2), 155-160.
- Verma, C., Gorule, P., Kharat, S., and Kumkar, P. 2019. Freshwater fishes of Nira (Direct submission). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MK440717> accessed on 24/11/2021.
- Wibowo, A., Farajalah, A., & Husnah, H. (2013). DNA barcoding of freshwater fish species of Manna River (Bengkulu) and Semanka River (Lampung). *Indonesian Fisheries Research Journal*, 19(1), 9-17.