

Variasi genetik populasi ikan brek (*Barbonymus balleroides* Val. 1842) sebagai dampak fragmentasi habitat di Sungai Serayu

[Genetic variation of population barb (*Barbonymus balleroides* Val. 1842) as habitat fragmentation impact in Serayu River]

Bahiyah^{1,2,✉}, Dedy Duryadi Solihin², Ridwan Affandi³

¹Jurusan Biologi, Fakultas Sain dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati, Bandung

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB

³Departemen Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB

✉ Jurusan Biologi, FST, UIN Sunan Gunung Djati

Jln. AH Nasution No. 105, Bandung

Surel: bahiyah3@gmail.com

Diterima : 15 Oktober 2013; Disetujui: 10 Desember 2013

Abstrak

Perubahan karakteristik lingkungan dan pemisahan populasi ikan akibat pembendungan sungai dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan variasi morfologi (morfometrik) dan genetik. Penelitian ini bertujuan untuk memastikan bahwa ikan brek yang dikaji pada penelitian ini adalah spesies *Barbonymus balleroides* dan mengkaji variasi genetik ikan brek pada berbagai habitat (hilir, waduk dan hulu) di Sungai Serayu wilayah Kabupaten Banjarnegara. Penelitian meliputi isolasi dan amplifikasi DNA dengan PCR dan sekuensing, serta pengukuran parameter lingkungan. Hasil penelitian dari pohon filogenetik menunjukkan bahwa spesies ikan brek (*Barbonymus balleroides*) dan *out groupnya* (*Puntius orphoides* dan *Barbonymus gonionotus*) berbeda dengan jarak genetik 'P' sebesar 6,34%. Jarak genetik intraspesies *B. balleroides* memperlihatkan terdapat dua klaster dengan jarak perbedaan 2,0%. Populasi ikan brek yang dianalisis termasuk ke dalam spesies *B. balleroides* berdasarkan panjang fragmen 710 bp gen CO1. Pembangunan Waduk Mrica menyebabkan terjadinya fragmentasi habitat di Sungai Serayu. Hal ini mengakibatkan variasi genetik pada ikan brek. Ikan brek yang mendiami zona bawah waduk membentuk klaster yang terpisah dari ikan brek yang mendiami zona waduk dan atas waduk ditandai adanya basa sitosin (C) pada zona bawah dibandingkan zona lainnya.

Kata penting: karakteristik fisik-kimiawi, mtDNA CO1, susunan nukleotida.

Abstract

The alteration of environmental characteristics and population separation caused by long term river barrage may affect morphological and genetic variation. This research aimed to ensure that the barb of this research is *Barbonymus balleroides* and to analyze genetic variation of barb at various habitats (upstream, reservoir, and downstream zones) in Serayu River, Banjarnegara. This research was conducted through DNA isolation and amplification by PCR and sequencing, along with water quality measurement. Result of phylogenetic tree showed that *Barbonymus balleroides* separated from its' outgroup (*Puntius orphoides* dan *Barbonymus gonionotus*) as 6.34%. Genetic intraspecies distance of *B. balleroides* showed two clusters by similarity 2.0%. Barb population in Serayu River was identified as *B. balleroides* based on 710 bp fragment length of CO1 gene. Mrica reservoir development caused habitat fragmentation in Serayu River and increased genetic variation of barb population. Barb of downstream zone formed separate cluster from barb of reservoir and upstream zones marked basa cytosine (C) to downstream zone compared reservoir and upstream zone.

Keywords: physico-chemical characteristic, mtDNA CO1, nucleotid composition.

Pendahuluan

Nama ilmiah ikan brek masih menjadi perdebatan. Beberapa peneliti menggunakan brek sebagai nama lokal untuk spesies ikan *Puntius orphoides* yang tersebar luas di Sungai Serayu (Pramono & Marnani 2006, Hadisusanto *et al.* 2011, dan Wahyuningsih *et al.* 2011). Kedua spesies ini termasuk kedalam famili Cyp-

rinidae yang dapat dibedakan berdasarkan karakter struktur sisik pada garis sisi (*linea lateralis*). *P. orphoides* mempunyai proyeksi dari pusat ke pinggir seperti jari-jari pada bola dan jari-jari yang ke arah samping tidak melengkung ke arah belakang dan tidak memiliki tonjolan kecil, sedangkan struktur sisik pada *B. balleroides* memiliki garis sisi berjari-jari sisik sejajar atau

melengkung ke ujung, sedikit atau tidak ada proyeksi jari-jari ke samping (Kottelat *et al.* 1993). Selain itu, jumlah sisik pada sisik garis sisi *P. orphoides* berjumlah 31 sampai 34 sisik sedangkan jumlah sisik pada *B. balleroides* memiliki jumlah 28 sampai 31 sisik garis sisi (Weber & de Beaufort 1916).

Ikan brek komplek (*B. balleroides* dan *P. orphoides*) merupakan ikan air tawar yang memiliki nilai ekonomis terutama bagi masyarakat di sekitar Sungai Serayu Jawa Tengah. Daerah persebaran ikan brek meliputi Malaysia, Kamboja, Thailand, Vietnam, Indocina, paparan Sunda, Kalimantan dan beberapa aliran Sungai di Jawa (Weber & de Beaufort 1916). Di Sungai Serayu ikan brek tersebar luas meliputi bagian hilir sungai, di dalam waduk Mrica dan hulu sungai termasuk beberapa anak sungai (Pramono & Marnani 2006, Hadisusanto *et al.* 2011, Wahyuningsih *et al.* 2011).

Pembangunan Waduk Mrica di bagian tengah aliran Sungai Serayu telah menyebabkan terjadinya fragmentasi habitat, sehingga berdampak pada perubahan topografi, terutama ketinggian dan kemiringan badan sungai dari zona atas waduk (hulu) ke zona bawah waduk (hilir). Perubahan kondisi perairan ini diduga akan mengakibatkan penurunan kemampuan adaptasi terhadap lingkungan dan struktur komunitas ikan. Penangkapan ikan yang dilakukan masyarakat secara terus menerus namun tidak ada budi daya, dikhawatirkan dampak tersebut rawan terhadap kepunahan (Kottelat 1999).

Pada saat musim reproduksi, ikan brek akan bergerak dari hilir sungai ke arah hulu dan melakukan pemijahan di daerah hulu sungai. Pada umumnya, ikan-ikan Cyprinidae lebih suka memilih tempat memijah dengan substrat berpasir di hulu sungai (Rahardjo *et al.* 2011). Keberadaan Waduk Mrica diduga akan menyebabkan

pemisahan populasi ikan di Sungai Serayu sehingga dalam jangka waktu lama akan membentuk karakteristik morfologis dan genetik yang berbeda. Fenomena yang sama telah dilaporkan oleh Wibowo (2011) pada ikan belida (*Chitala lopis*) di Sungai Kampar Riau yang menunjukkan adanya variasi genetik akibat pembangunan Bendungan Kotopanjang di bagian aliran Sungai Kampar.

Adanya dugaan variasi genetik antar lokasi dapat ditelusuri dengan memanfaatkan marka genetik yang relatif sudah *conserve* (seperti *cytochrome oxidase 1* (CO1). Gen CO1 digunakan sebagai marka *DNA-barcode*, yang dikembangkan untuk identifikasi semua spesies hewan, yaitu membandingkan urutan DNA gen CO1 dengan data base di *gene bank* yang sudah ada.

Hebert *et al.*, (2003) telah menunjukkan bahwa daerah CO1 sepanjang kurang lebih 650 bp sesuai untuk membedakan antara spesies. Marka ini mampu memilah berbagai spesies ikan pada beragam filum hewan (Ward *et al.* 2005). Dengan demikian informasi mengenai karakteristik genetik dan morfogenetik ikan brek ini diharapkan dapat mengidentifikasi spesies ikan brek secara akurat. Penelitian ini bertujuan untuk memastikan bahwa ikan brek yang dikaji pada penelitian ini adalah spesies *Barbonymus balleroides* dan mengkaji variasi genetik ikan brek pada berbagai habitat (hilir, waduk dan hulu) di Sungai Serayu wilayah Kabupaten Banjarnegara.

Bahan dan metode

Pengambilan sampel dilakukan selama delapan bulan dari bulan Februari-September 2013 di Sungai Serayu wilayah Kabupaten Banjarnegara Jawa Tengah. Sampel ikan dikoleksi secara *purposive sampling* (pengambilan sampel ditentukan dengan kondisi lapangan), kemudian

dilanjutkan dengan *road sampling* (teknik pengambilan sampel dengan cara berjalan sesuai dengan stasiun yang telah ditentukan) (Ratti & Garton 1996).

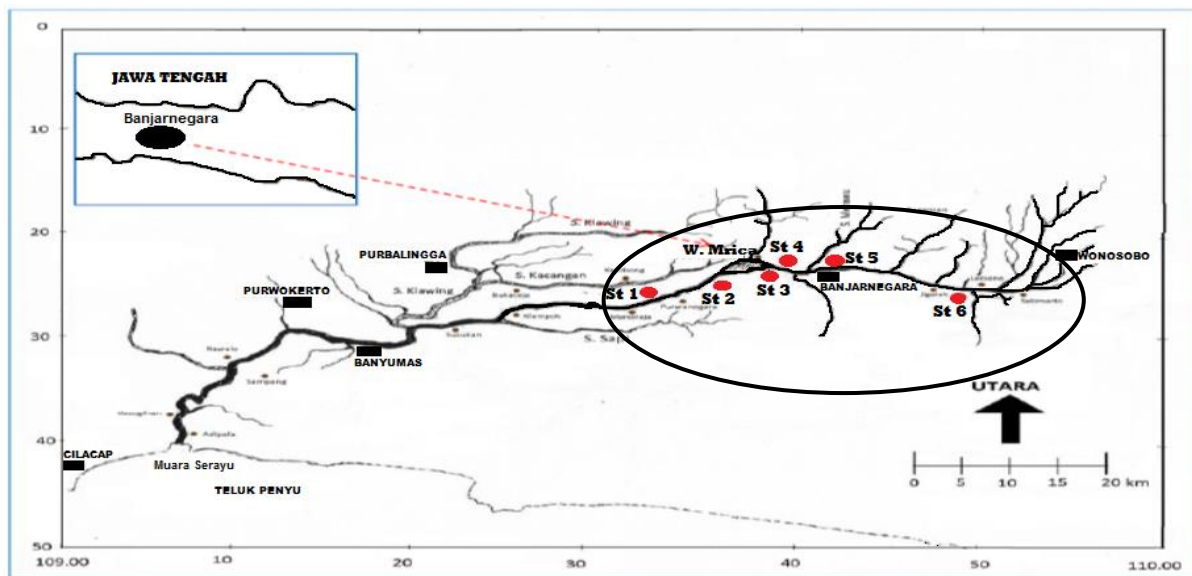
Enam stasiun pengambilan sampel (Gambar 1) tersebut yaitu stasiun I (Mandaraja-Purwonegoro, 07°26'06,9" LS - 109°32' 33,5" BT), stasiun II (Wanadadi, 07° 23'59,4" LS - 109° 35'54,4" BT), stasiun III (Bawang, 07°23'35,6" LS - 109° 36'47,3" BT), stasiun IV (Wanadadi, 07° 23'21,9" LS - 109° 39'40,1" BT), stasiun V (Banjarnegara, 07° 23'21,5" LS - 109° 41' 48,9" BT) dan stasiun VI (Sigaluh, 07° 22'11,5" LS - 109° 42'28,3" BT).

Alat tangkap yang digunakan meliputi jala dan jaring insang. Jala berukuran panjang 3 m dengan mata jaring masing-masing 1" dan 2". Jaring insang panjang 20 m dan lebar 2 m dengan mata jaring ¾ ", 1½", dan 2". Sampel ikan dimasukkan ke dalam kantung plastik berlabel yang berisi alkohol 90%. Analisis genetik dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi PPSHB-IPB.

Pengambilan sampel air dilakukan dua kali baik parameter fisik maupun kimiawi (Tabel 1), pengamatan dilakukan secara *in situ* dan *ex situ*. Parameter fisik meliputi suhu, kekeruhan, kecepatan arus, dan tipe substrat. Parameter kimiawi meliputi pH, kandungan oksigen terlarut, NO₂, NH₃, dan alkalinitas. Sampel air yang diambil dimasukkan kedalam botol 1 L dan ditutup rapat, dibungkus dengan plastik hitam, dan selanjutnya dimasukkan kedalam tabung es. Air yang diambil kemudian diamati di Laboratorium Produktivitas Lingkungan FPIK IPB.

Ekstraksi dan isolasi mtDNA

Sebanyak lima individu dari 30 individu pada masing-masing zona sungai yang ada diambil jaringannya. Jaringan tersebut disimpan di dalam alkohol 90%, kemudian dicuci dengan buffer TE (NaCL 1 M, Tris-HCL 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8) hingga volume 400 µl. Jaringan dilisis dengan ATL 180 µl. Setelah terlisis, sampel diberi proteinase K 20 µl dan diinkubasi pada suhu 56°C selama satu jam, kemudian *fortex* dan *centrifuge* setiap 10 menit.



Gambar 1. Lokasi sampling penelitian dengan enam stasiun di Sungai Serayu (Zona atas (St. V dan VI), zona waduk (St. III dan IV) dan zona bawah (St. I dan II))

Tabel 1. Parameter fisik kimiawi

| Parameter | Satuan | Alat | Lokasi |
|------------------|--------------------|---|----------------|
| <i>Fisik</i> | | | |
| Kekeruhan | m | <i>Turbidimeter</i> | <i>Ex situ</i> |
| Kecepatan arus | m s ⁻¹ | Lagrangian | <i>In situ</i> |
| Suhu | °C | Termometer | <i>In situ</i> |
| Tipe substrat | - | Visualisasi | <i>In situ</i> |
| <i>Kimiawi</i> | | | |
| pH Air | unit | pH meter | <i>In situ</i> |
| Oksigen Terlarut | mg L ⁻¹ | Oksigen meter | <i>In situ</i> |
| NO ₂ | mg L ⁻¹ | <i>Spectrophotometer</i> | <i>Ex situ</i> |
| NH ₃ | mg L ⁻¹ | <i>Spectrophotometer</i> | <i>Ex situ</i> |
| Alkalinitas | mg L ⁻¹ | Larutan H ₂ SO ₄ sebagai <i>titrant</i> | <i>Ex situ</i> |

Sampel yang telah diinkubasi diangkat dan diberi etanol absolut sebanyak 200 µl, kemudian difortex dan disimpan di *freezer* selama dua jam. Selanjutnya, sampel *dicentrifuge* dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit, diangkat dan diganti *coloumnnya*; lalu *dicentrifuge* kembali pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Cairan dibuang dan ditambahkan AW1 sebanyak 500 µl, dan *dicentrifuge* dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Cairan AW1 dibuang dan diganti dengan AW2 500 µl, *dicentrifuge* dengan kecepatan 14000 rpm kembali selama 3 menit, *dicentrifuge* lagi selama 1 menit. *Coloumn ketube* diganti dengan yang baru dan ditambahkan AE 50 µl lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, dan *dicentrifuge* dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit.

Amplifikasi dan kondisi PCR Marka CO1 partial mtDNA

Sebagian fragmen CO1 mtDNA diamplifikasi dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan pasangan *primer* Fish F1-5’TCAACCAACCACAAAGATTGGCAC3’ (*forward*) dengan *reverse* FishR1 5’TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3’ dengan konsentrasi 0,1-1,0 µM dengan target gen CO1 sebesar 655 bp (Ward *et al.* 2005). Komposisi pereaksi yang digunakan terdiri atas 3 µl sampel, 2 µl *primer* (*forward* dan *reverse*), 1 µl dNTP, 8,8 µl

untuk ddH₂O, 5X buffer 5 µl, 5X *enhancer* 5 µl, dan 0,2 µl *Taqpolymerase*. Kondisi PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: *predenaturasi* selama 10 menit pada suhu 94°C, *denaturasi* selama 45 detik pada suhu 94°C, *penempelan primer* selama 45 detik pada 54°C selama 30 detik, *elongation* selama 1 menit pada suhu 72°C, *post PCR* pada suhu 72°C selama 5 menit dan *inkubasi* 10 menit pada suhu 15°C. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus.

Visualisasi pita DNA dilakukan secara elektroforesis pada gel agarose 0,6 mg, TAE 1X 50 ml, dan ETBR 2,5 µl dengan voltase 85 mV selama 60 menit. Hasil elektroforesis diamati dengan sinar ultraviolet dan pita yang didapat difoto. Hasil PCR yang teramplifikasi dengan baik dan pitanya bersih (satu pita tanpa pengotor) kemudian disekuensing di perusahaan yang khusus untuk menyekuensing fragmen DNA yaitu PT. Fist Base Singapura dengan perwakilan di Indonesia yaitu PT. Genetika Science Jakarta.

Analisis data

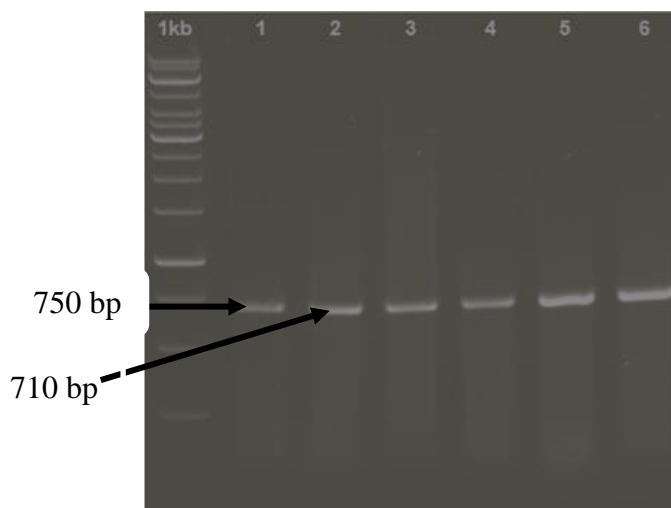
Pengolahan runutan gen *cytochrome oxidase 1* (CO1) parsial dilakukan dengan program MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007). Hasil runutan *di alignment*, kemudian dihitung keragaman dan jarak genetik intra dan antar populasi. Analisis pohon filogenetik data runutan dilakukan menggunakan metode *Neighbor Joining*.

Hasil

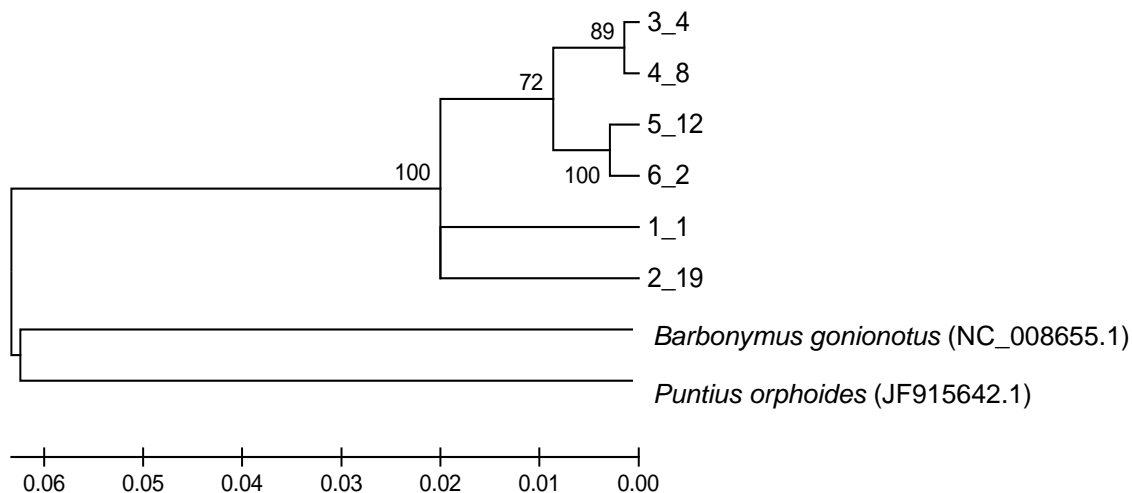
Variasi genetik ikan brek di Sungai Serayu

Analisis genetik berdasarkan penanda mt DNA CO1 pada perwakilan masing-masing stasiun (I–VI) di Sungai Serayu didapatkan panjang fragmen 710 bp (Gambar 2). Setelah dilakukan pensejajaran dengan menggunakan spesies pembanding *Puntius orphoides* (Kode akses JF 915642.1) dan *Barbonymus gonionotus* (Kode akses NC_008655.1) didapatkan hasil pohon filogenetik seperti terlihat pada Gambar 3. Berdasarkan pohon filogenetik tersebut, keenam sam-

pel ikan brek di Sungai Serayu membentuk satu kluster dan terpisah dari *outgroup* (*Barbonymus gonionotus* dan *Puntius orphoides*) pada jarak genetik sebesar 6,34% (Tabel 2). Hal ini membuktikan bahwa ikan brek yang dipakai pada penelitian ini adalah bukan *P. orphoides* yang selama ini juga dikenal sebagai ikan brek. Perbedaan jarak genetik antara *B. balleroides* dengan *P. orphoides* adalah sebesar 13,65% (Tabel 2), sedangkan jarak genetik antara *P. orphoides* dengan *B. gonionotus* adalah 6,3% (Tabel 2).



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA marka CO1 *Barbonymus balleroides* (dari stasiun I - VI)



Gambar 3. Filogenetik *P*-distance ikan brek berdasarkan marka CO1 sepanjang 710 bp

Tabel 2. Estimasi perbedaan jarak evolusi diantara hasil sekuen sepanjang 710 bp

| | 1_1 | 2_19 | 3_4 | 4_8 | 5_12 | 6_2 | 7_Bg | 8_Po |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 1_1 | | | | | | | | |
| 2_19 | 0,046 | | | | | | | |
| 3_4 | 0,050 | 0,022 | | | | | | |
| 4_8 | 0,050 | 0,022 | 0,003 | | | | | |
| 5_12 | 0,052 | 0,036 | 0,017 | 0,017 | | | | |
| 6_2 | 0,053 | 0,036 | 0,017 | 0,017 | 0,006 | | | |
| <i>Barbonymus gonionotus</i> | 0,141 | 0,115 | 0,105 | 0,105 | 0,118 | 0,118 | | |
| <i>Puntius orphoides</i> | 0,162 | 0,135 | 0,125 | 0,128 | 0,133 | 0,136 | 0,125 | |

Keterangan: 1-6 (*B. balleroides*), Bg (*B. gonionotus*) dan Po (*P. orphoides*)

Perbedaan genetik *B. balleroides* dari beberapa lokasi sampling melalui pendekatan jarak genetik 'P' diperlihatkan pada Tabel 2. Jarak genetik intraspecies *B. balleroides* memperlihatkan dua klaster (perbedaan 2,0%): klaster pertama adalah kelompok populasi yang terdiri atas stasiun I dan II dan klaster kedua adalah stasiun III dan IV serta V dan VI. Nilai perbedaan dari klaster kedua adalah 0,15% antara stasiun III dan IV, serta sebesar 0,3% antara stasiun V dan VI. Perbedaan intra populasi antara stasiun I dengan stasiun II adalah 2,3%.

Analisis nukleotida menunjukkan hasil identifikasi posisi nukleotida pada gen CO1 dan macam perubahannya (Tabel 3). Substitusi nukleotida pada ikan brek di stasiun I dibandingkan dengan stasiun lainnya sebanyak 21 nukleotida dan substitusi nukleotida pada ikan brek di stasiun I dan II dibanding stasiun III, IV, V dan VI terjadi sebanyak 10 nukleotida. Substitusi terjadi pada spesies *B. gonionotus* dibandingkan dengan *B. balleroides* sebanyak 99 nukleotida dan terjadi insersi pada *P. orphoides* yaitu urutan nukleotida ke-8 dengan adanya alanin (A) sedangkan pada spesies lain tidak ada.

Delesi terjadi pada ikan brek di stasiun III, IV, V, dan VI pada urutan nukleotida ke 591 dan 592 yaitu sitosin (C) yang terdapat di stasiun I dan II. Substitusi nukleotida terjadi di stasiun III dan IV dibandingkan stasiun lainnya sebanyak 34 nukleotida, substitusi nukleotida di sta-

siun V dan VI dibandingkan stasiun lainnya sebanyak 34 nukleotida. Substitusi nukleotida pada *P. orphoides* dibandingkan *B. balleroides* dan *B. gonionotus* sebanyak 102 nukleotida.

Hasil pengukuran parameter lingkungan Sungai Serayu pada masing-masing stasiun seperti ditunjukkan pada Tabel 4. Suhu air di Sungai Serayu berkisar 25-30 °C, rentang nilai kekeruhan pada aliran Sungai Serayu berkisar antara 5 sampai 82 NTU dan nilai kecepatan arus berkisar antara 0,02-0,20 m det⁻¹. Kondisi pH pada masing-masing lokasi relatif sama yaitu pada kisaran 6 sampai 7. Nilai NO₂ dan NH₃ berkisar antara 0.004 sampai 0.182 mg L⁻¹. Nilai alkalinitas berkisar antara 143 sampai 194 mg L⁻¹.

Pembahasan

Pemisahan ikan brek (*B. balleroides*) dengan *P. orphoides* didukung secara genetik. Pada panjang fragmen 710 bp, pohon filogenetik menunjukkan ikan brek di berbagai stasiun terpisah dengan *P. orphoides* dan *B. gonionotus* dengan jarak genetik 6,34%. Hal ini menunjukkan bahwa ikan brek di Sungai Serayu wilayah Banjarnegara merupakan spesies yang berbeda dengan *P. orphoides* dan memiliki kedekatan dengan *B. gonionotus*. Dengan demikian hasil sekuen gen CO1 pada ikan brek mendukung hipotesis bahwa ikan brek merupakan genus *Barbodes* dengan nama spesies *B. balleroides* berdasarkan analisis morfologi menurut Kottelat & Widjanarti (2005).

Tabel 3. Variasi susunan nukleotida pada gen CO1 dan macam perubahannya

| ST | Letak nukleotida ke- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 2 | 5 | 8 | 24 | 30 | 36 | 73 | 81 | 87 | 96 | 99 | 102 | 108 | 111 | 114 | 117 | 118 | 123 |
| I | A | A | -- | T | T | T | T | T | T | A | T | T | T | G | A | T | C | C |
| II | . | . | -- | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| III | . | . | -- | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| IV | . | . | -- | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| V | . | . | -- | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| VI | . | . | -- | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>B. gon</i> | T | T | -- | . | C | . | C | C | . | G | . | C | C | . | . | . | . | . |
| <i>P. orp</i> | . | . | A | C | A | C | . | . | C | . | A | C | C | A | G | A | T | T |

| ST | Letak nukleotida ke- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 126 | 129 | 141 | 144 | 147 | 153 | 159 | 174 | 189 | 192 | 195 | 198 | 201 | 222 | 225 | 228 | 237 | 246 |
| I | C | T | C | A | C | C | C | T | G | A | T | C | T | C | A | C | C | A |
| II | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| III | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| IV | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| VI | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>B. gon</i> | T | . | T | T | . | T | T | C | . | C | C | . | C | T | G | T | T | C |
| <i>P. orp</i> | T | C | . | T | T | T | . | . | A | . | C | T | . | T | . | A | T | G |

| ST | Letak nukleotida ke- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 252 | 258 | 261 | 270 | 273 | 289 | 291 | 306 | 310 | 312 | 313 | 318 | 321 | 324 | 327 | 330 | 336 | 339 |
| I | G | C | A | C | T | T | A | A | C | G | C | T | T | T | C | T | C | T |
| II | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| III | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| IV | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| VI | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>B. gon</i> | A | . | . | . | C | C | . | G | T | A | T | C | C | . | T | . | . | G |
| <i>P. orp</i> | A | T | C | T | C | C | G | T | . | T | T | . | . | C | G | A | A | G |

| ST | Letak nukleotida ke- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 342 | 345 | 351 | 363 | 366 | 369 | 384 | 387 | 396 | 399 | 411 | 420 | 426 | 441 | 444 | 450 | 453 | 456 |
| I | C | G | G | T | A | T | G | C | A | A | A | T | C | G | A | T | A | A |
| II | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| III | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| IV | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| VI | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>B. gon</i> | T | . | A | C | C | . | A | T | . | . | . | C | . | A | C | . | . | T |
| <i>P. orp</i> | A | A | T | C | . | C | A | . | G | G | G | C | G | T | . | C | C | . |

Tabel 3. (lanjutan)

| ST | Letak nukleotida ke- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 459 | 471 | 480 | 486 | 489 | 501 | 504 | 507 | 513 | 523 | 528 | 531 | 537 | 540 | 543 | 546 | 549 |
| I | A | T | C | C | A | C | C | C | C | T | T | T | C | G | A | A | C |
| II | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . |
| III | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . |
| IV | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . |
| V | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A |
| VI | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A |
| <i>B. gon</i> | . | C | T | . | . | . | . | . | T | C | C | . | T | A | C | G | . |
| <i>P. orp</i> | T | . | T | T | . | T | T | T | . | . | C | C | T | A | T | . | T |

| ST | Letak nukleotida ke- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 551 | 555 | 556 | 557 | 561 | 563 | 565 | 566 | 567 | 568 | 569 | 571 | 572 | 574 | 575 | 576 | 577 |
| I | C | A | G | G | C | C | G | A | A | G | C | C | C | A | C | T | T |
| II | . | . | C | T | . | T | C | T | G | T | . | . | T | C | . | . | G |
| III | . | . | C | T | . | T | . | . | G | . | . | . | T | C | . | . | G |
| IV | . | . | . | T | . | T | . | . | G | . | . | . | T | C | . | . | G |
| V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | T | A | C | T | A | G |
| VI | T | T | . | . | . | . | . | . | . | . | T | T | T | C | T | . | G |
| <i>B. gon</i> | . | . | C | T | . | T | C | T | . | T | . | . | T | C | . | . | G |
| <i>P. orp</i> | . | . | C | T | T | T | C | T | C | T | . | . | T | C | . | A | G |

| ST | Letak nukleotida ke- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 579 | 580 | 581 | 582 | 583 | 584 | 585 | 586 | 587 | 588 | 589 | 590 | 591 | 592 | 593 | 595 | 596 |
| I | T | C | G | G | T | T | T | T | T | C | A | A | C | C | A | C | C |
| II | C | . | T | . | . | . | . | . | C | A | A | G | . | . | . | T | . |
| III | C | . | T | . | G | C | C | G | C | . | G | G | -- | -- | . | T | T |
| IV | C | . | T | . | G | C | C | G | C | . | G | G | -- | -- | . | T | T |
| V | C | . | T | . | G | C | C | G | C | . | G | G | -- | -- | . | T | T |
| VI | C | . | T | . | G | C | C | G | C | . | G | G | -- | -- | . | T | T |
| <i>B. gon</i> | . | T | T | A | G | C | C | G | C | . | G | G | -- | -- | . | T | T |
| <i>P. orp</i> | . | T | T | A | G | C | C | G | C | . | G | G | -- | -- | G | T | T |

| ST | Letak nukleotida ke- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 601 | 602 | 603 | 604 | 605 | 606 | 608 | 609 | 612 | 613 | 614 | 616 | 617 | 619 | 620 | 624 | 625 |
| I | A | G | A | C | A | A | G | G | A | T | T | T | G | T | T | T | G |
| II | . | . | . | . | C | C | A | A | G | A | . | G | A | A | . | A | A |
| III | T | . | C | T | C | C | A | A | G | A | . | G | A | A | . | A | A |
| IV | T | . | C | T | C | C | A | A | G | A | . | G | A | A | . | A | A |
| V | T | . | C | T | C | C | A | A | G | A | . | G | A | A | . | A | A |
| VI | T | . | C | T | C | C | A | A | G | A | . | G | A | A | . | A | A |
| <i>B. gon</i> | T | A | C | T | . | . | A | A | G | A | . | G | A | A | C | A | A |
| <i>P. orp</i> | T | A | C | T | T | T | A | A | G | A | C | G | A | A | . | A | A |

Tabel 3. (lanjutan)

| ST | Letak nukleotida ke- | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 626 | 629 | 638 | 641 | 644 | 650 | 656 | 665 | 668 | 677 | 680 | 692 | 695 | 698 | 695 | 698 |
| I | G | C | T | C | G | T | A | C | T | C | A | T | C | C | C | C |
| II | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| III | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| IV | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| V | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| VI | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>B. gon</i> | T | T | . | . | T | C | . | T | T | . | G | C | A | T | A | T |
| <i>P. orp</i> | T | T | C | T | A | A | G | . | . | T | . | . | . | . | . | . |

Keterangan: sama (.) dan tidak ada atau delesi (--)

Tabel 4. Nilai parameter lingkungan pada masing-masing stasiun

| Parameter | Zona Hilir | | Zona Tengah | | Zona Hulu | |
|--|------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | St. I | St. II | St. III | St. IV | St. V | St. VI |
| Suhu (°C) | 28-30 | 25-30 | 25-30 | 25-29 | 26-28 | 26-29 |
| Kekeruhan (NTU) | 5-82 | 38-39 | 12-30 | 12-34 | 12-56 | 15-26 |
| Kecepatan arus (m det ⁻¹) | 0,04-0,08 | 0,04-0,16 | 0,02-0,03 | 0,02-0,04 | 0,08-0,16 | 0,13-0,20 |
| Tipe substrat | b, p | b, p | b, l | b, l | b, p, l | b, p |
| pH | 6-7 | 6-7 | 6-7 | 6-7 | 6-7 | 6-7 |
| Oksigen terlarut (mg L ⁻¹) | 5-7 | 5-6 | 4-6 | 4-6 | 6-7 | 6-7 |
| NO ₂ (mg L ⁻¹) | 0,004 | <0,004 | 0,004 | 0,012 | 0,006 | 0,006 |
| NH ₃ (mg L ⁻¹) | 0,100 | 0,076 | 0,104 | 0,180 | 0,074 | 0,084 |
| Alkalinitas (mg L ⁻¹) | 143-184 | 148-156 | 143-186 | 174-194 | 149-190 | 143-149 |

Keterangan: b = berbatu, p = pasir, l = lumpur

Analisis nukleotida menunjukkan bahwa terdapat perbedaan susunan nukleotida pada masing-masing stasiun pengambilan contoh. Hal ini menunjukkan adanya variasi intraspecies pada ikan brek (*Barbonymus balleroides*) di Sungai Serayu. Panjang fragment 710 bp menunjukkan adanya delesi dan substitusi nukleotida pada sampel tertentu. Terdapat hasil yang lebih basal dari stasiun I dan II, di urutan nukleotida yang terdelesi pada ikan yang berasal dari stasiun lainnya. Sebelum pembangunan waduk tersebut, ikan brek dari stasiun I dan II dapat beruaya ke stasiun III, IV dan bahkan stasiun V dan VI. Tetapi dengan pembangunan waduk tersebut wilayah persebaran ikan brek terbagi menjadi tiga zona, yaitu zona bagian bawah waduk, bagian

waduk, dan bagian atas waduk. Karena adanya waduk, ikan dari zona bawah tidak dapat beruaya ke waduk dan zona atas, maka ikan brek di zona bawah membentuk klaster tersendiri (terisolasi). Ikan brek di zona bawah lebih jauh terisolasi dari kedua zona lainnya. Substitusi nukleotida yang terjadi pada ikan brek di masing-masing stasiun ada yang dapat menyebabkan perubahan asam amino dan ada pula yang tidak menyebabkan perubahan asam amino hasil translasinya (Nei & Kumar 2000).

Variasi genetik ikan brek di Sungai Serayu telah menunjukkan adanya fenomena fragmentasi habitat pada zona pengambilan sampel selama kurun waktu 25 tahun (tahun 1988-2013). Zona bawah terpisah secara genetik dengan zona

waduk dan atas, keterpisahan zona tersebut berkaitan dengan kondisi lingkungan perairan antar ketiga zona. Perubahan nukleotida yang terjadi pada masing-masing stasiun diduga merupakan respon adaptif terhadap fluktuasi lingkungan yang terjadi di Sungai Serayu. Ikan brek yang berada di zona atas dan waduk belum berbeda secara genetik, karena peluang bertemunya ikan brek zona atas dengan ikan brek waduk lebih besar, bahkan ada kemungkinan anak ikan brek yang berasal dari waduk akan membesar di waduk dan kembali ke atas waduk ketika memijah. Selain itu, eksploitasi yang berlebihan atau gangguan antropogenik dapat mengganggu tingkat diferensiasi genetik, seperti yang dilaporkan oleh Esa *et al.* (2011) pada *Tor douronensis* dan *Tor tambroides* di Semenanjung Malaysia.

Fenomena adanya keterpisahan genetik antar organisme yang berada di sepanjang sungai juga pernah dilaporkan oleh Wibowo (2011) pada ikan belida (*Chitala lopis*) di Sungai Kampar Riau, yang dihasilkan berdasarkan gen Cyt b keragaman genetik terbesar ikan belida Sungai Kampar terdapat pada populasi bagian hilir. Takagi *et al.* (2006) juga melaporkan adanya diferensiasi genetik antara populasi ikan putak *Notopterus notopterus* yang berada di sungai dengan danau berdasarkan analisis sekuen nukleotida dari mitokondria. Adanya diferensiasi genetik tersebut mengindikasikan bahwa populasi ikan putak di danau terisolasi dari populasi di saluran utama Sungai Mekong. Hal serupa juga terjadi pada bangsa udang (Pin *et al.* 2007). *Macrobrachium nipponense* atau udang sungai membentuk dua kelompok yang berbeda berdasarkan sekuen gen CO1 di dua sungai besar di China. Kelompok pertama merupakan udang yang berasal dari Sungai Yangtze dan kelompok kedua merupakan udang yang berasal dari Sungai Lancang China.

Berdasarkan data lingkungan yang terukur pada penelitian ini, ikan brek mampu hidup pada kisaran suhu 25- 30°C. Pada kisaran suhu tersebut ikan brek mampu melakukan aktivitas makan dan tumbuh, hal ini sesuai dengan laporan Wahyuningsih *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa kisaran suhu di Sungai Serayu 21-28°C baik untuk pertumbuhan ikan termasuk ikan brek. Buckel *et al.* (1995) menyatakan bahwa kisaran suhu yang dapat mendukung aktivitas makan dan pertumbuhan ikan di perairan yaitu 21-30°C.

Aliran sungai Serayu termasuk tipe sungai berarus deras dengan kecepatan arus berkisar antara 0,02 sampai 0,20 m det⁻¹. Adanya pembangunan waduk berdampak pada perubahan kecepatan arus permukaan terutama pada bagian waduk yang relatif lebih tenang sedangkan bagian atas lebih deras dibandingkan bagian bawah. Pada musim hujan arus lebih cepat, karena jumlah air yang mengalir lebih banyak. Dettinger & Diaz (2000) menambahkan bahwa tinggi rendahnya kecepatan arus sungai juga dipengaruhi oleh struktur sungai dan faktor lain seperti musim.

Rentang nilai kekeruhan pada aliran Sungai Serayu berkisar 5-82 NTU. Rentang yang cukup jauh di stasiun I diakibatkan adanya buka tutup bendungan, selain itu dipengaruhi juga oleh musim, padahal nilai kekeruhan yang baik untuk mendukung kehidupan ikan antara 0 sampai 40 NTU (Carter *et al.* 2010).

pH perairan Sungai Serayu masih layak untuk kehidupan organisme perairan, sebagaimana hal yang sama ditemukan oleh Maniagasi *et al.* (2013) dalam penelitiannya yaitu berkisar 6-9. Nilai oksigen terlarut yang berada pada kisaran 4-7 mg L⁻¹ baik untuk mendukung kehidupan ikan terutama ikan brek. Kandungan oksigen terlarut yang dapat mendukung kehidupan

organisme akuatik yaitu $>5 \text{ mg L}^{-1}$ (Salmin 2005).

Kadar nilai NO_2 berkisar antara $0,004 \text{ mg L}^{-1}$ dan $0,012 \text{ mg L}^{-1}$, nilai NO_2 yang baik untuk kehidupan ikan adalah $<0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Wedemeyer 1996). Nilai NH_3 berkisar antara $0,074 \text{ mg L}^{-1}$ dan $0,180 \text{ mg L}^{-1}$, kadar amoniak di Waduk yang baik untuk kehidupan organisme perairan yaitu kurang dari $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Wedemeyer 1996). Kadar amoniak di stasiun IV terindikasi melewati nilai yang baik untuk kehidupan ikan, hal ini diduga karena adanya aktivitas pertanian di kawasan sekitar waduk sehingga memberi dampak pada kondisi air di stasiun tersebut. Fenomena yang sama pernah dilaporkan oleh Tatangindatu *et al.* (2013) tentang tingginya kadar amoniak di lokasi yang terdapat aktivitas peternakan.

Nilai alkalinitas perairan berkisar antara 143 mg L^{-1} dan 194 mg L^{-1} . Alkalinitas di Sungai Serayu masih baik untuk kehidupan ikan. Boyd (1988) menyatakan bahwa kisaran alkalinitas untuk ikan adalah 20-300 ppm. Alkalinitas yang mampu menyangga perubahan pH perairan serta dapat mendukung laju pertumbuhan yang optimum pada media budi daya ikan dianjurkan agar kadar alkalinitas berkisar 100-150 ppm, kadar alkalinitas tersebut dapat mencegah fluktuasi pH yang besar (Wedemeyer 1996). Yulfiperius *et al.* (2004) menyatakan bahwa alkalinitas yang baik untuk ikan brek atau ikan lalawak (*Barbonymus sp.*) adalah 80 ppm CaCO_3 .

Simpulan

Populasi ikan brek yang dianalisis berdasarkan marka gen CO1 dengan panjang fragmen 710 bp termasuk ke dalam spesies *Barbonymus balleroides*. Pembangunan Waduk Mrica menyebabkan terjadinya fragmentasi habitat di Sungai Serayu. Hal ini mengakibatkan variasi genetik pada ikan brek. Ikan brek yang mendiami zona

bawah waduk membentuk klaster yang terpisah dari ikan brek yang mendiami zona waduk dan atas waduk ditandai adanya basa sitosin (C) pada zona bawah dibandingkan zona lainnya.

Persantunan

Terima kasih disampaikan kepada Kementerian Keuangan RI melalui Lembaga Pengelolaan Dana Pendidikan atas bantuan dana penelitian yang telah diberikan, Laboratorium Biologi Molekuler PPSHB IPB yang telah membantu dalam menyediakan sarana prasana penelitian, dan Drs. Haryono, M.Si yang telah melibatkan penelitian ini sebagai bagian dari penelitian disertasinya.

Daftar pustaka

- Boyd CE. 1988. *Water quality in warmwater fish ponds*. Fourth Printing Auburn University. Agricultural Experiment Station. Alabama, USA. 625 p.
- Buckel JA, Steinberg ND, Conover DO. 1995. Effects of temperature, salinity, and fish size on growth and consumption of juvenile bluefish. *Journal of Fish Biology*, 47 (4): 696-706.
- Carter MW, Shoup DE, Dettmers JM, Wahl DA. 2010. Effects of turbidity and cover on prey selectivity of adult smallmouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 139:353-361.
- Dettinger MD, Diaz HF. 2000. Global characteristics of stream flow seasonality and variability. *Journal of Hydrometeorology*, 1(4): 289-310.
- Esa YB, Siraj SS, Rahim KAA, Daud SK, Chong HG, Guan TS, Syukri MF. 2011. Genetic characterization of two mahseer species (*Tor douronensis* and *Tor tambroides*) using microsatellite markers from other cyprinids. *Sains Malaysiana*, 40(10): 1087-1095.
- Hadisusanto S, Tussanti I, Trijoko. 2011. Status komunitas ikan di perairan Sungai Klawing dan Serayu, Somagede, Banyumas, Jawa Tengah: upaya pemantauan dalam rangka menjaga kelestariannya. In: Kartamihardja ES *et al.* (eds.). *Prosiding Fo-*

- rum Nasional Pemacuan Sumber Daya Ikan III*, PR 04: 1-5.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society Biology Letters*, 270:96-99.
- Kottelat M, Whitten AJ, Kartikasari SN, Wirjotmodjo S. 1993. *Freshwater fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. Periplus Edition: Singapore. 291 p.
- Kottelat M. 1999. Nomenclature of the genera *Barbodes*, *Cyclocheilichthys*, *Rasbora*, and *Chonerhinos* (Teleostei: Cyprinidae and Tetraodontidae), with comment on the definition of the first reviser. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 47(2):591-600.
- Kottelat M, Widjanarti E. 2005. The fishes of Danau Sentarum National Park and the Kapuas lakes area, Kalimantan Barat, Indonesia. *The Raffles Bulletin of Zoology Supplement*, 13:139-173.
- Maniagasi R, Sipriana S, Mundeng Y. 2013. Analisis kualitas fisika kimia air di areal budi daya ikan Danau Tondano Provinsi Sulawesi Utara. *Budi daya Perairan*, 1(2): 29-37.
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 352 p.
- Pin Y, Hao Z, Li-qiao C, Jin-yun Y, Na Y, Zhimin G, Da-xiang S. 2007. Genetic structure of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) from Yangtze and Lancang River, inferred from COI gene sequence. *Zoological Research*, 28(2):113-118.
- Pramono TB, Marnani S. 2006. *Pola penyerapan kuning telur dan perkembangan organogenesis pada stadia larva ikan brek (Puntius orphoides)*. Program Sarjana Perikanan dan Kelautan. Program Sarjana Perikanan dan Kelautan. Universitas Jenderal Soedirman: Purwokerto. hlm.1-4.
- Rahardjo MF, Sjafei DS, Affandi R, Sulistiono. 2011. *Iktiologi*. Lubuk Agung, Bandung. 396 p.
- Ratti JT, Garton EO. 1996. Research and experimental design. In: Bookhout TA (editor). *Research and management techniques for wildlife and habitats*. Allen Press, New York. pp. 1-23.
- Salmin. 2005. Oksigen terlarut (DO) dan kebutuhan oksigen biologi (BOD) sebagai salah satu indikator untuk menentukan kualitas perairan. *Oseana*, 30(3):21-26.
- Takagi AP, Ishikawa S, Nao T, Hort S, Nakatani M, Nishida M, Kurokura H. 2006. Genetic differentiation of the bronze feather-back *Notopterus notopterus* between Mekong River and Tonle Sap Lake population by mitochondrial DNA analysis. *Fisheries Science*, 72(4):750-754.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. *MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular Biology and Evolution 10.1093/molbev/msm092.
- Tatangindatu F, Kalesaran O, Rompas R. 2013. Studi parameter fisika kimia air pada areal budidaya ikan di Danau Tondano Desa Paleloan Kabupaten Minahasa. *Budi daya Perairan*, 1(2):8-19
- Wahyuningsih E, Lestari W, Setyaningrum N, Sugiarto. 2011. Struktur komunitas dan distribusi ikan di zona atas waduk Sungai Serayu sebagai dasar konservasi. *Prosiding Seminar Nasional Hari Lingkungan Hidup*. 222: 32-38.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions the Royal Society Biological Sciences*. 360:1847-1857.
- Weber M, de Beaufort LF. 1916. *The fishes of the Indo-Australian Archipelago. Ostariophysi: II. Cyprinoidea, Apodes, Synbranchii*. E.J. Brill Leiden. 455 p.
- Wedemeyer GA. 1996. *Physiology of fish in intensive culture system*. International Thompson Publishing, New York. 232 p.
- Wibowo A. 2011. Kajian bioekologi dalam rangka menentukan arah pengelolaan ikan belida (*Chitala lopis* Bleeker 1851) di Sungai Kampar, Provinsi Riau. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor. 203 p.
- Yulfiperius, Toelihere MR, Affandi R, Subardja DS. 2004. Pengaruh alkalinitas terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan ikan lalawak *Barbodes* sp. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 4(1):1-5.