

## DNA barcode dan haplotype network ikan lokal dari Telaga Banyu Biru Kabupaten Pasuruan

Dwi Anggorowati Rahayu<sup>1</sup>), Endik Deni Nugroho<sup>2</sup>), Haryono<sup>3</sup>), Nia Kurniawan<sup>4</sup>), Rodiyati Azrianingzih<sup>4</sup>)

<sup>1</sup> Jurusan Biologi, Universitas Negeri Malang,

Jl. Semarang 5, Malang 65145, Surel: [doewira\\_89@yahoo.com](mailto:doewira_89@yahoo.com)

<sup>2</sup> Jurusan Biologi Universitas Borneo Tarakan, Jl. Amal Lama 1, Tarakan

<sup>3</sup> Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911

<sup>4</sup> Jurusan Biologi Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang 65145

### Abstrak

Sengkaring dan tambra merupakan ikan air tawar lokal dari Telaga Banyu Biru, Kabupaten Pasuruan. Kedua ikan tersebut merupakan ikan yang dikeramatkan masyarakat dan keberadaannya mengalami penurunan. DNA barcode dengan menggunakan gen *Cytochrome-C Oxidase Sub Unit I (COI)* memberikan alternatif penentuan jenis secara tepat. Spesies acuan yang digunakan didapatkan dari (BPPBAT), Cijeruk, Bogor yaitu *Tor douronensis*, *Tor tambroides*, dan *Tor soro*. Amplifikasi gen *COI* dengan menggunakan primer universal. Berdasarkan sekuen gen *COI*, ikan sengkaring dan tambra diidentifikasi sebagai *Tor douronensis*. Topologi filogenetik menunjukkan sampel dengan spesies acuan menghasilkan dua cluster besar dengan nilai bootstrap 100/99. Sengkaring (SKRG-1 dan SKRG-2) dan tambra (TABR-1 dan TABR-2) berada satu cluster dengan *Tor douronensis* (TORD-1 dan TORD-2) dengan nilai bootstrap 100%. *Tor tambroides* (TORT-1 dan TORT-2) dan *Tor soro* (TORS-1 dan TORS-2) membentuk cluster yang terpisah. Sengkaring dan tambra adalah varian dari *Tor douronensis* yang ditunjukkan dengan perbedaan jarak genetik sebesar 0,1 % dan 0,7%. Ditemukan 5 basa automorfi penentu spesies. Median joining network membuat deskripsi variasi ikan sengkaring, tambra dengan spesies acuan menjadi 8 haplotype dengan 3 haplogroup. Novel barcode ikan sengkaring, tambra, dan spesies acuan akan membantu upaya pemantauan, konservasi, dan pangkalan data ikan lokal Indonesia yang akan terekam dalam *Barcoding of Life Data System*.

Kata kunci: sengkaring, tambra, Telaga biru

### Pendahuluan

Telaga Banyu Biru merupakan perairan alami yang berasal dari sumber air berwarna putih jernih agak kebiru-biruan. Di telaga tersebut terdapat ikan lokal yaitu ikan sengkaring dan tambra, keduanya merupakan ikan anggota famili Cyprinidae, genus *Tor*. Mayoritas masyarakat di sekitar Telaga Banyu Biru dan Pasuruan memer-cayai bahwa keduanya merupakan ikan keramat dan bermitos. Sepintas secara morfo-logi kedua ikan tersebut memiliki kemiripan (Rahayu *et al.* 2012). Hal inilah yang menarik untuk segera dilakukan penelitian terkait status taksonomi kedua ikan tersebut.

Berdasarkan Daftar Merah Jenis Terancam Punah yang diterbitkan IUCN tahun 1990 tercantum 29 jenis ikan dari Indonesia, diantaranya semua genus *Tor* (Kottelat *et al.* 1993). Terbitan IUCN tahun 2012 tercantum 12 jenis dari ikan genus *Tor* yang terancam punah, diantaranya *Tor tambroides* dan *Tor tambra* dari Indonesia. Kottelat *et al.* (1993) menyatakan bahwa di Indonesia terdapat empat jenis ikan genus *Tor* yaitu *Tor tambroides* Blkr, *Tor douronensis* (C.V.), *Tor Tambra* (C.V.) dan *Tor soro* (C.V.). Bleeker sebelumnya memberi nama *Labeobarbus*, dan membedakan jenisnya berdasarkan ukuran cuping pada bibir bawah. Selanjutnya Kottelat *et al.* (1993) menyatakan bahwa secara taksonomi dan sistematik jenis ikan Genus *Tor* belum jelas.

Identifikasi spesies dapat diatasi secara cepat, tepat dan akurat dengan menggunakan marka molekular yang telah terstandarisasi yaitu *DNA Barcoding* yang dapat dihubungkan secara komprehensif dengan analisis morfologi (Ward *et al.* 2005, Meyer & Paulay 2005, Hebert & Gregory 2005, Hajibabei *et al.* 2007, dan Hubert *et al.* 2008). Teknologi *Barcoding* dengan menggunakan penanda gen mitokondria dapat digunakan untuk mengidentifikasi hampir semua spesies hewan (Ward *et al.* 2005), baik interspesifik maupun intraspesifik (Hebert *et al.* 2003). Gen yang banyak digunakan sebagai penanda *barcoding* yaitu gen pengkode protein *cytochrome-c oxidase I* (COI) dengan panjang sekitar 648 bp (Folmer *et al.* 1994 dan Zhang & Hewitt 1997). Gen COI memberikan peluang yang sangat cepat dan akurat sebagai *marker* untuk identifikasi berbagai variasi taksa dan mengungkapkan beberapa kelompok hewan yang belum diketahui tingkat taksonominya (Popa *et al.* 2007, Rock *et al.* 2008, dan Arief *et al.* 2009). Hebert *et al.* (2003) menyatakan bahwa dengan menggunakan gen COI suatu spesies menunjukkan intraspesies jika memiliki variasi sekuen intraspesies < 3% dan masuk dalam satu genus jika memiliki sekuen *divergence* antara 3-6% (Freitas *et al.* 2011).

Novel *DNA Barcode* ikan sengkaring dan tambra, bahkan ikan genus *Tor* yang ditemukan di perairan Indonesia belum ada rekaman pangkalan datanya baik di *Gene Bank* maupun *Barcoding of Life Data System*. Pada penelitian ini penentuan posisi takson ikan sengkaring dan tambra diperkuat dengan adanya spesies acuan (*Tor soro* dari Danau Toba, Sumatra Utara; *Tor douronensis* dari Padang, Sumatra Barat dan *Tor tambroides* dari Kalimantan Barat) yang berhasil didomestikasi di Balai Penelitian dan Pengembangan Budi Daya Air Tawar (BPPBAT), Cijeruk, Bogor. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan status taksonomi ikan sengkaring dan tambra berdasarkan *DNA Barcode COI*, menyediakan novel sekuen *DNA Barcode COI* serta *haplotype network* ikan Genus *Tor* yang ditemukan di perairan Indonesia. Novel *Barcode* ikan sengkaring, tambra, dan spesies acuan akan membantu upaya pemantauan, konservasi, dan pangkalan data ikan lokal Indonesia yang akan terekam dalam *Barcoding of Life Data System*.

### **Bahan dan metode**

Ikan sengkaring dan tambra diambil dari Telaga Banyu Biru Kabupaten Pasuruan, sedangkan sampel spesies acuan didapatkan dari BPPBAT, Cijeruk, Bogor. Sampel untuk analisis genetik diambil dari bagian sirip pektoral masing-masing dua individu untuk tiap jenis ikan dan dipreservasi dalam etanol 96%. Isolasi DNA total dilakukan dengan menggunakan *KIT Roche* dengan modifikasi. Amplifikasi PCR dengan menggunakan rancangan primer yang didesain oleh Palumbi *et al.* (1991) yaitu COIf (5'-CCTGC AGGAGGAGGA GAYCC-3') dan COIe (5'-CCAGAATTAGAGGGAATCAGTG-3'). Selanjutnya dilakukan elektroforesis menggunakan agarosa 1% dan dilanjutkan dengan sekuensing di Macrogen, Korea dan analisis genetik.

Tahapan analisis genetik yang dilakukan adalah pengecekan kromatogram dengan software *sequencer* selanjutnya dianalisis dengan menggunakan *DNASTAR* untuk melihat kromatogram sekuen dan membuat *consensus* (menggabungkan primer *foward* dan *reverse*). Setelah membuat *consensus*, hasil *consensus* dicocokkan di *BLAST* secara online. Sebelum tahap *alignment*, setiap sampel harus ditranslasi menjadi protein (tanpa adanya stop kodon di bagian tengah) dengan menggunakan *SeqMan* (*DNASTAR*).

Perhitungan jarak genetik menggunakan model filogenetik Kimura 2 Parameter dan Maximum Likelihood dengan nilai repetisi bootstrap 1000 kali ulangan. Analisis variasi sekuen basa nukleotida dan *haplotype* antara ikan sengkaring dan tambra dilakukan dengan menggunakan program komputer *DnaSP V.5.0*, serta membuat haplogroup berdasarkan analisis *median joining network* ikan sengkaring dan tambra dengan spesies acuan dan gen referensi berdasarkan sekuen gen *COI* menggunakan program komputer *Network 4.1.0.8* (Bandelts *et al.* 1999).

**Hasil dan pembahasan**

Komposisi basa nukleotida dari sengkaring, tambra dengan spesies acuan adalah A=26,79%, C=23,16%, G=19,17% serta T=30,93%. Total basa nukleotida A+T sebesar 57,73%, sedangkan G+C sebesar 42,33%, nilai GC < AT relatif seimbang dan umumnya kandungan GC pada vertebrata sebesar 40-45%. Translasi protein yang dihasilkan dari 408 bp adalah 136 asam amino. Hasil translasi tersebut mengindikasikan tidak ditemukan pseudogen pada sekuen asam amino, sehingga sekuen gen *COI* ini sangat kuat digunakan sebagai standar *barcode* identifikasi sengkaring dan tambra serta spesies acuan.

Hasil *alignment* 10 sekuen gen *COI* dari sengkaring dan tambra dengan spesies acuan menunjukkan 29 substitusi basa nukleotida yang terdiri atas 24 transisi, 5 transversi, dan tidak ditemukan adanya indel (insersi dan delesi). Salah satu contoh basa nukleotida yang menunjukkan transisi adalah basa nomer 27, di mana Tambra 1 memiliki basa A (Adenin) yang dimiliki juga oleh Tambra 2; Sengkaring 1 dan 2; *Tor tambroides* 1 dan 2; serta *Tor duoronensis* 1 dan 2, sedangkan *Tor soro* menunjukkan basa nukleotida G (Guanin). Contoh basa nukleotida yang mengalami transversi adalah basa nukleotida nomer 108, di mana Tambra menunjukkan basa T (Timin), sedangkan *Tor tambroides* menunjukkan basa nukleotida A (Adenin) (Tabel 1).

Lima dari 22 basa nukleotida yang mengalami substitusi diduga dapat digunakan sebagai penanda untuk membedakan spesies. *Tor soro* memiliki automorfi pada basa nukleotida nomer 39 (Guanin); 102 (Timin) yang tidak dimiliki oleh jenis lainnya. *Tor tambroides* menunjukkan automorfi pada basa nukleotida nomer 51 (Sitosin); 108 (Adenin); 334 (Sitosin); 378 (Guanin) serta nomer 400 (Timin). Tambra memiliki automorfi pada basa nomer 164 dan 187 yaitu Tambra 1 (Guanin), sedangkan Tambra 2 (Sitosin). Karakter automorfi merupakan karakter unik yang hanya dimiliki oleh satu spesies saja, yang dapat membedakan dengan spesies lainnya. Perubahan asam amino ditunjukkan pada posisi basa nomer 55, 63, 111, dan 134.

Tabel 1. Substitusi basa nukleotida sekuen gen *COI* sengkaring dan tambra

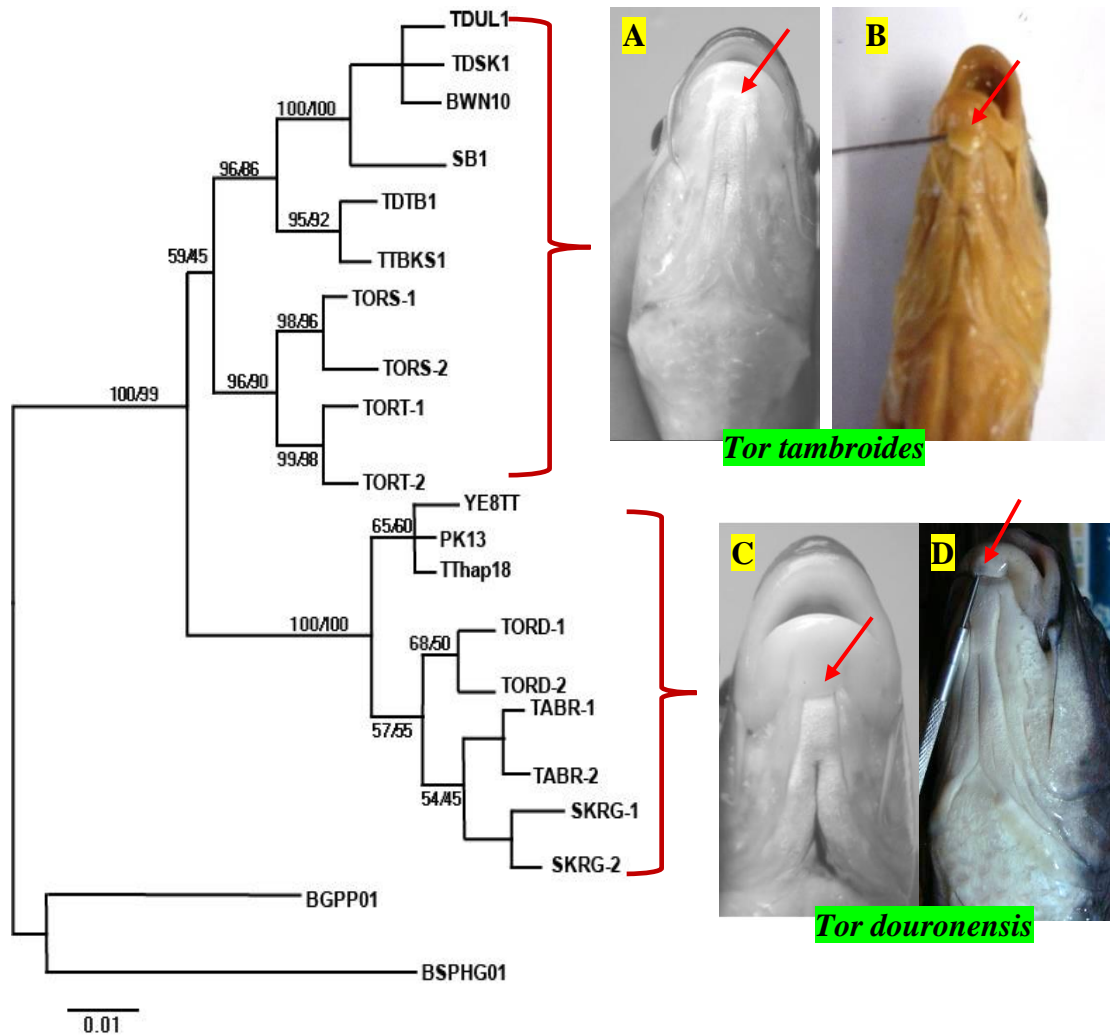
KODE	SAMPSEL/ SPESIES	Variasi Basa Nukleotida (Basa ke-)																											
		3	27	39	51	53	78	102	108	129	135	147	164	187	195	225	268	294	309	312	334	351	367	363	366	375	378	400	401
TABR-1	Tambra	C	T	A	A	C	A	C	T	T	G	A	G	G	T	C	C	G	G	G	A	A	T	A	C	G	A	A	A
TABR-2	Tambra	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SKRG-2	Sengkaring	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SKRG-1	Sengkaring	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
TORD-1	<i>Tor duoronensis</i>	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
TORD-2	<i>Tor duoronensis</i>	T	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
TORS-1	<i>Tor soro</i>	T	C	G	C	T	G	T	.	C	A	G	.	.	C	T	T	A	A	A	.	G	C	G	T	A	.	T	.
TORS-2	<i>Tor soro</i>	T	C	G	C	T	G	T	.	C	A	G	.	.	C	T	T	A	A	A	.	G	C	G	T	A	.	T	C
TORT-1	<i>Tor tambroides</i>	T	C	.	C	T	.	.	A	C	A	G	.	.	C	T	T	A	A	A	C	G	C	G	T	A	G	.	.
TORT-2	<i>Tor tambroides</i>	T	C	.	C	T	.	.	A	C	A	G	.	.	C	T	T	A	A	A	C	G	C	G	T	A	G	.	.

Konstruksi pohon filogenetik dibuat berdasarkan hasil *alignment* gen *COI* antara sampel dengan spesies acuan serta antara sampel, spesies acuan dengan referensi (Esa *et al.* 2008). Topologi pohon filogenetik antara sampel dengan spesies acuan menunjukkan dua *cluster* besar yang didukung dengan nilai bootstrap 100/99. Sengkaring (SKRG-1 dan SKRG-2) dan Tamba (TABR-1 dan TABR-2) berada satu *cluster* dengan *Tor douronensis* (TORD-1 dan TORD-2) yang didukung dengan nilai bootstrap 100%. *Tor tambroides* (TORT-1 dan TORT-2) dan *Tor soro* membentuk *cluster* yang terpisah (TORS-1 dan TORS-2) (Gambar 1). Menurut Hrbek *et al.* (2003), persentase bootstrap 1000 kali ulangan dengan nilai di atas 80% pada percabangan menunjukkan hasil yang sangat baik karena nilai tersebut mendukung secara kuat bahwa sampel yang berada dalam satu cabang adalah benar atau berada dalam satu spesies. Konstruksi topologi pohon filogenetik tersebut dibuat berdasarkan metode *ML* dengan (model perhitungan Kimura-2 Parameter), *MP* dan *NJ* dengan (model perhitungan Kimura-2 Parameter). Model perhitungan kimura-2 parameter tersebut digunakan karena efektif untuk analisis *DNA Barcoding* (mempertimbangkan titik substitusi transisi dan transversasi) (Hebert *et al.* 2003).

Perbandingan konstruksi topologi filogenetik dilakukan antara sengkaring, tambra, spesies acuan dengan Esa *et al.* (2008), diketahui bahwa sengkaring dan tambra berada satu *cluster* dengan kelompok *Tor tambroides*, sedangkan *Tor soro* dan *Tor tambroides* dari BPPBAT, Cijeruk, Bogor satu *cluster* dengan kelompok *Tor douronensis* (Gambar 1). Topologi tersebut ditunjang dengan nilai bootstrap yang tinggi yaitu 100/90 dengan menggunakan model perhitungan algoritmik Kimura-2 Parameter. Pengelompokan ini menjadi tanda tanya besar karena terdapat perbedaan pendapat dalam membedakan karakter morfologi ikan sengkaring dan tambra dengan *Tor douronensis* dan *Tor tambroides* dari penelitian Esa *et al.* (2008) tersebut.

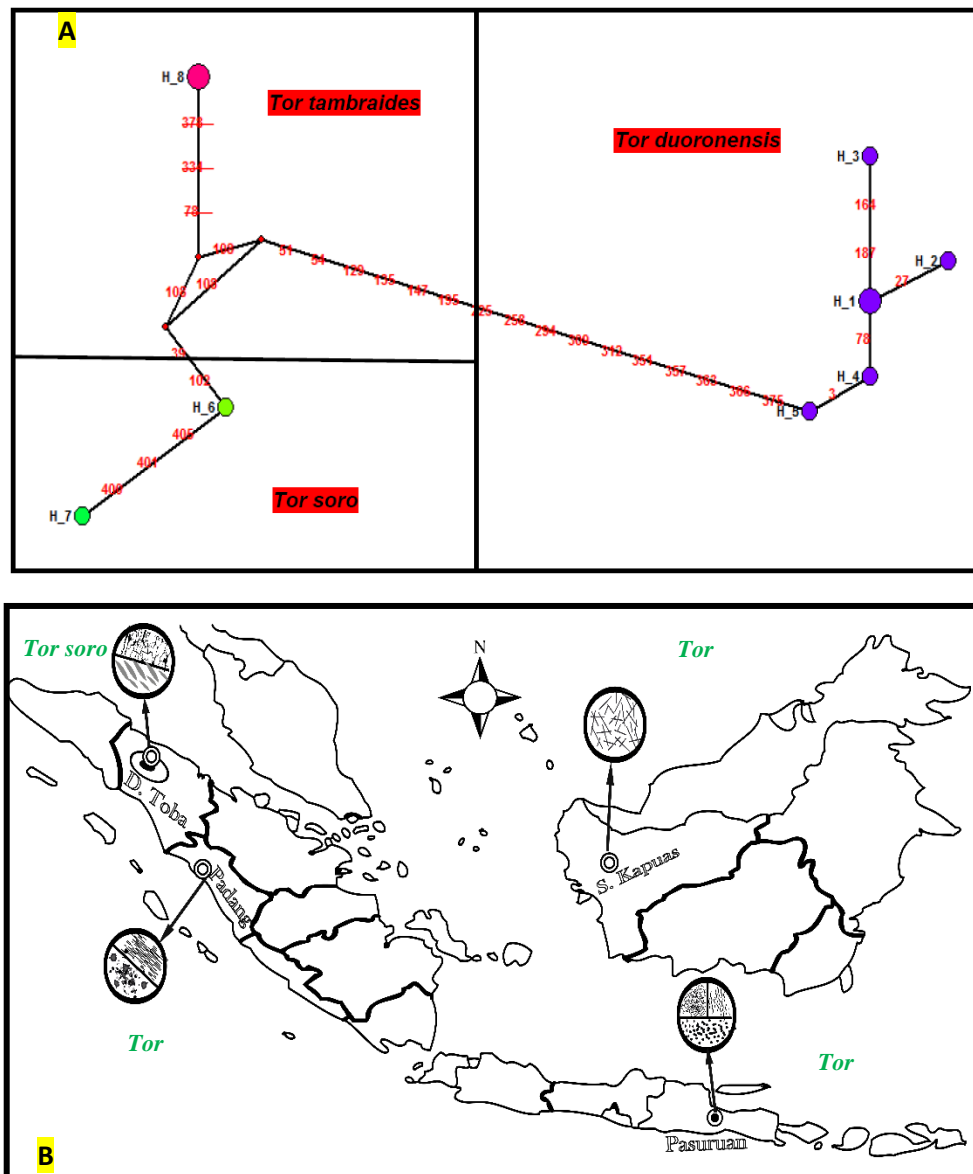
Esa *et al.* (2008) berhasil mendeterminasi ikan *Tor douronensis* dan *Tor tambroides* yang berada di Sarawak, Malaysia. Sampel yang dideterminasi adalah sampel jaringan sirip yang tidak diketahui karakter morfologi penentu spesies ikan genus *Tor* tersebut. *Tor tambroides* memiliki ukuran cuping yang pendek atau sedang yang memiliki karakter pola warna silver dan kemerahan (*komunikasi pribadi*). Hal ini yang menjadi kehati-hatian dalam menentukan status taksonomi ikan sengkaring dan tambra. Weber & de Beaufort (1916) menyebutkan bahwa *Tor tambroides* memiliki ukuran cuping yang panjang dan mencapai sudut mulut, sedangkan *Tor douronensis* memiliki cuping yang pendek dan tidak mencapai sudut mulut.

Topologi filogenetik yang dihasilkan dari perbandingan data sekuender dengan Esa *et al.* (2008) menunjukkan hasil yang serupa dengan topologi yang dihasilkan dan mendukung bahwa *Tor douronensis* dan *Tor tambroides* merupakan dua spesies yang berbeda. Namun, kesalahan dalam determinasi karakter morfologi berdampak besar pada kesalahan dalam penentuan status taksonomi ikan sengkaring dan tambra. Topologi sampel dengan spesies acuan dan gen referensi menghasilkan pohon filogeni yang konsisten dan identik, hanya berbeda pada nilai bootstrap, sehingga dapat disimpulkan bahwa ikan sengkaring dan tambra adalah *Tor douronensis*.



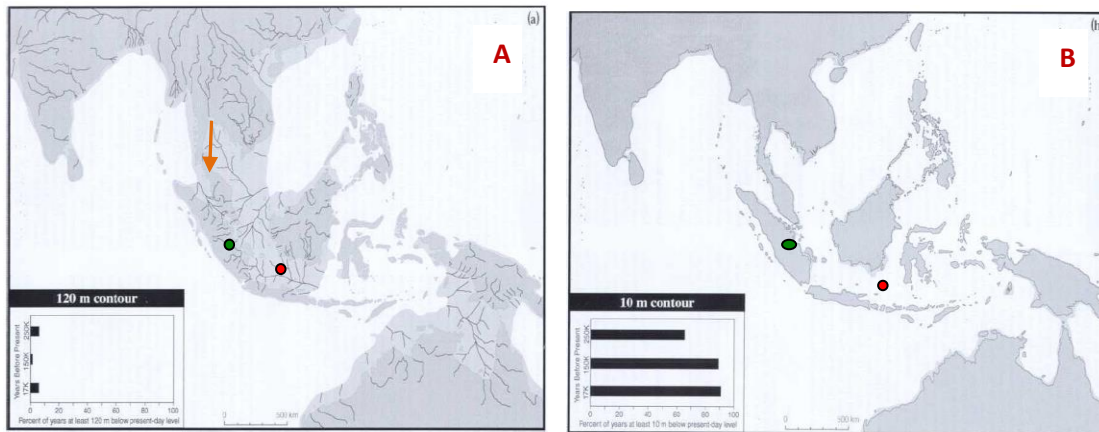
Gambar 1. Topologi filogenetik sengkaring dan tambra dengan spesies acuan dan referensi gen berdasarkan sekuen gen COI. A. *Tor douronensis* di Sarawak, Malaysia; B. *Tor tambroides* di LIPI, Cibinong, Bogor; C. *Tor tambroides* dari Sarawak, Malaysia; D. Sengkaring di Banyu Biru, Kabupaten Pasuruan. SKRG-1 = Sengkaring 1; SKRG-2 = Sengkaring-2; TABR-1 = Tambra-1; TABR-2 = Tambra-2; TORS-1=*Tor soro*-1; TORS-2 =*Tor soro*-2; TORT-1=*Tor tambroides* 1; dan TORT-2 =*Tor tambroides*-2; TDUL1, TDSK1, BWN10, SB1, TTBKS1 = *Tor douronensis*; YE8TT, PK13, Tthap18 = *Tor tambroides* dari Sarawak, Malaysia

*Median joining network* membuat deskripsi variasi ikan sengkaring, tambra dengan spesies acuan menjadi 8 *haplotype* dengan 3 haplogroup. *Haplotype network* tersebut menunjukkan bahwa ikan sengkaring dan tambra berada satu kelompok dengan *Tor douronensis* dari Padang, Sumatra Barat. Masing-masing ikan tersebut memiliki *haplotype* yang berbeda, tidak homolog. Ikan sengkaring memiliki *haplotype* homolog sendiri (*haplotype* 1), Tambra 1 (*haplotype* 2), Tambra 2 (*haplotype* 3), dan *Tor douronensis* memiliki *haplotype* yang berbeda (*haplotype* 4 dan 5). Hal ini mengindikasikan bahwa sengkaring dan tambra di Telaga Banyu Biru berkerabat dekat dengan *Tor douronensis* dari Padang (Gambar 2). Belum ada pengelompokan ikan genus *Tor* di Indonesia, sehingga penelitian awal ini dapat digunakan sebagai kajian referensi untuk memetakan ikan *Tor* khususnya di Jawa, dan Indonesia pada umumnya.



Gambar 2. Haplotype network dan distribusi geografis haplotype ikan Tor  
 A. Haplotype network dari 8 haplotype berdasarkan sekuen gen COI. Haplotype ditunjukkan dengan bentuk lingkaran dan pola yang berbeda, jumlah individu ditunjukkan dengan bentuk lingkaran yang berbeda (besar=2 individu; kecil=1 individu). Percabangan antar haplotype ditunjukkan dengan substitusi berdasarkan posisi alignment sekuen gen COI.  
 B. Distribusi geografis haplotype ikan Tor di Indonesia.

Kedekatan ikan sengkaring, tambra dari Telaga Banyu Biru, Pasuruan dengan *Tor duoronensis* dari Padang (Sumatra Utara) dapat dihubungkan dengan adanya sungai purba sekitar 17.000 sampai 20.000 tahun lalu pada Era Pleistocene (Gambar 3). Aliran sungai purba ini menghubungkan antara Sumatra Barat dan Jawa Timur. Adanya aliran sungai purba ini memungkinkan ikan dapat berenang menuju aliran sungai yang terhubung dengan sungai purba menuju ke lokasi lain. Hal ini dapat ditelusuri dari sejarah Jawa, Sumatra, dan Kalimantan yang dahulu merupakan daerah Paparan Sunda Besar.



Gambar 3. Peta daerah Paparan Sunda. A. Paparan Sunda Era Pleistocene, B. Paparan Sunda Era Meiosin. Peta ini diilustrasikan berdasarkan kedalaman air laut (120 m dan 10 m) (Voris et al. , 2000). Keterangan: panah kuning (percabangan garis) menunjukkan aliran sungai purba, bulatan hijau merupakan daerah Padang, Sumatra Barat dan bulatan merah merupakan Telaga Banyu Biru, Pasuruan

Pemisahan Jawa dan Sumatra terjadi sekitar zaman pertengahan Miosen (Gambar 3) saat es di kutub mencair, sehingga menyebabkan sungai purba di daerah Paparan Sunda tertutupi dan kondisi air laut yang meningkat menyebabkan terbentuknya daratan (Voris 2000). Pemisahan ini diyakini adalah akibat gerakan lempeng bumi, letusan Gunung Krakatau serta fluktuasi air laut (Hall 1996). Faktor sejarah sungai purba di Jawa serta Sumatera memungkinkan sengkaring, tambra, dan *Tor douronensis* merupakan satu spesies dan berkerabat dekat. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat variasi spesies *Tor duoronenesis* antara sengkaring, tambra dan *Tor douronensis* dari Padang (Sumatra Barat), dikarenakan terisolasi di dua tempat yang berbeda yang telah berlangsung bertahun-tahun.

### Simpulan

Berdasarkan novel *DNA Barcode*, ikan sengkaring dan tambra diidentifikasi sebagai *Tor douronensis*, hal ini ditunjang pula dengan jarak genetik < 3%, sedangkan *Tor tambroides* dan *Tor soro* memiliki rentangan jarak genetik antara 4,43%-5,82%. Sengkaring dan tambra di Telaga Banyu Biru berkerabat dekat dengan *Tor douronensis* dari Padang, namun membentuk *haplotype* yang berbeda.

### Persantunan

Kami ucapkan terimakasih atas bantuan, arahan dan kesempatan untuk menyelesaikan penelitian ini kepada Kepala Dinas Balai Penelitian dan Pengembangan Budi Daya Air Tawar (BPPBAT), Cijeruk, Bogor yang telah memberikan izin identifikasi sampel spesies acuan serta Bapak Sidi Asih dan Peneliti di BPPBAT, Bogor yang telah membantu selama penelitian di lapangan.

### Daftar pustaka

- Arief IA, Khan HA. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32: 9-17.
- Esa BY, Siraj SS, Daud SK, Rahin KAA, Jeffrine RRJ, Soon GT. 2008. Mitochondrial DNA diversity of *Tor tambroides* Valenciennes (Cyprinidae) from five natural populations in Malaysia. *Zoological Studies*, 47(3): 360-367.
- Folmer O, Hoeh BW, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA Primers for amplification of mitochondrial *Cytochrome-c Oxidase Subunit I* from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- Freitas PD, Machado CB, Ishizuka TK, Galetti JPM. 2011. Molecular identification of species from Genus *Salminus* (Characidae) through DNA Barcoding. *Poster in Barcoding Fish in the Fourth International Barcode of Life Conference*.
- Hajibabei M, Siregar G, Hebert P, Hickey DA. 2007. DNA Barcoding: How it completes taxonomy, molecular phylogenetic, and population genetics. *TRENDS in Genetics* Vol.xxx No.x.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA Barcodes. *The Royal Society*. 270: 313-321.
- Hebert PDN. 2004. Identification of birds through DNA Barcodes. *Plos Biology*. 2: e312.
- Hebert PDN, Gregory TN. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5): 852-859.
- Hrbek T, Seckinger, Meyer A. 2006. A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 986-998
- Hubert N, Hanner R, Holm EM, Nicholas E. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA Barcodes. *PLoS One*. 3(6): e2490.
- IUCN 2012. IUCN Red List of threatened species. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Diunduh pada 15 Maret 2013.
- Kottelat M, Whitten AJ, Kartikasari SN, Wirjoatmodjo S. 1993. *Ikan air tawar Indonesia Bagian Barat dan Sulawesi*. Periplus Edition. Jakarta.
- Meyer CP, Paulay G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Bio*. 3(12): e422.
- Popa LO, Popa OP, Gargarea P, Murariu D. 2007. Sequence analysis of the 5' COI gene region from *Dama dama* (Linnaeus, 1758) (Mammalia: Cervidae). *Travaux du Museum National d' Histoire Naturelle*, L: 537-542.
- Rahayu DA, Nugroho ED, Azriyaningsih R. 2012. *Community perceptions around Banyu Biru Lake on sengkaring fish existence and its implications in conservation strategy. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Global Resource Conservation 2012 Meeting*. Malang. Indonesia.
- Rock J, Costa FO, Walker JD, North WA, Hutchinson FW, Carvalho RG. 2008. DNA barcodes of fish of The Scotia Sea, Antarctica indicates priority groups for taxonomic and systematics focus. *Antarctic Science*, 20(3): 253-262.
- Voris HK. 2000. Maps of pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *Journal of Biogeography*, 27: 1157-1167.



- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. *DNA Barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of The Royal Society.* 360: 1847-1857.
- Weber M, de Beaufort LF. 1916. *The fishes of the Indo-Australian Archipelago. III. Ostariophysi: II Cyprinoidea, Apodes, Synbranchi.* E. J. Brill, Leiden. xv+455 pp.
- Zhang DX, Hewitt GM. 1997. *Assesment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insect. Insect Molecular Biology,* 6: 143-150.