

## Karakteristik genetik ikan belida *Chitala lopis* (Bleeker, 1851) asal Lampung dan Kalimantan berdasarkan gen *COI*

[Genetic characteristic of giant featherback, *Chitala lopis* (Bleeker, 1851) from Lampung and Kalimantan using COI Gene]

Alam Putra Persada<sup>1,2</sup>, Dedy Duryadi Solihin<sup>2\*</sup>, Ridwan Affandi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Magister, Sekolah Pascasarjana IPB. IPB University.  
Jalan Raya Dramaga, Bogor 16680

<sup>2</sup>Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University.  
Jalan Raya Dramaga, Bogor 16680

<sup>3</sup>Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB.  
IPB University.

Jalan Raya Dramaga, Bogor 16680

\*Korespondensi: [alamputra.persada@gmail.com](mailto:alamputra.persada@gmail.com), [dduryadi@yahoo.com](mailto:dduryadi@yahoo.com), [affandi\\_ridwan@yahoo.com](mailto:affandi_ridwan@yahoo.com)

Diterima: 8 Agustus 2020; Disetujui: 5 Januari 2021

### Abstrak

Barkoding DNA berdasarkan gen parsial *Cytochrome Oxidase subunit I (COI)* mitokondria telah banyak digunakan pada identifikasi spesies dan studi biodiversitas. Penggunaan gen *COI* mampu memperoleh karakteristik genetik, variasi genetik, dan filogeni. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis keragaman genetik spesies ikan belida *Chitala lopis* asal Lampung dan Kalimantan. Analisis yang digunakan yaitu menghitung jarak genetik dengan model *Kimura two parameter (K2P)*, melihat variasi nukleotida, polimorfisme dan merekonstruksi pohon filogenetik menggunakan software MEGA 7.0. Sebanyak sembilan individu ikan belida dikoleksi dari tiga populasi yaitu: Lampung, Kalimantan Barat dan Kalimantan Selatan. Hasil analisis urutan nukleotida yang didapat menunjukkan 689 pb situs konservatif, 18 pb situs variasi, 13 pb situs parsimoni, dan 2 pb situs singleton dari 707 pb gen parsial *COI*. Jarak rata-rata intraspecies, *ingroup*, *outgroup* berdasarkan K2P adalah 1,24%, 1,43% & 1,58% (Kode akses Genbank: AP008922.1; KM213054.1), 13,00%. *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)* yang diperoleh sebanyak 13 situs. Sampel Kalimantan Barat memiliki dua *SNP* pada situs (471 dan 528). Kalimantan Selatan memiliki sembilan *SNP* (situs ke 120, 129, 144, 201, 306, 324, 474, 615 dan 644). Berdasarkan jarak genetik, perbedaan terbesar terletak pada sampel Kalimantan Selatan (1,58%) dibandingkan dengan Lampung dan Kalimantan Barat. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik K2P *neighbor-joining*, menunjukkan bahwa sampel Kalimantan Selatan berada pada grup yang berbeda. Sampel Kalimantan Barat menunjukkan kekerabatan lebih dekat dengan grup Lampung.

Kata penting: barkoding DNA, belida, *COI*, *SNP*

### Abstract

DNA barcoding based on partial *Cytochrome Oxidase subunit I (COI)* gene in the mitochondrial has widely used in species identification and biodiversity studies. *COI* gene application is expected to obtain genetic characteristic, genetic variations and phylogeny of giant featherback. The aim of this research was to analyze genetic diversity of giant featherback *Chitala lopis* in Lampung and Kalimantan. To analyse genetic distance, *Kimura two parameter (K2P)* model was performed where to determine nucleotide variation & polymorphism and also reconstructed of phylogenetic tree was used MEGA 7.0 software. Total nine individuals were obtained from three populations, i.e. Lampung, West Kalimantan and South Kalimantan. The results showed that giant featherback has 689 bp conserve, 18 bp variation, 13 bp parsimony-informative, and 2 bp singleton sites from 707 bp *COI* partial gene. The average within-species, in-group, and out-group based on K2P distances were 1.24%, 1.43% & 1.58% (AP008922.1; KM213054.1), and 13.00% respectively. The *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)* was obtaining from 13 *SNP* sites. West Kalimantan samples have two *SNP* (471 and 528 site). The South Kalimantan samples showed more specific nucleotides with nine *SNP* (120, 129, 144, 201, 306, 324, 474, 615 and 644). Based on genetic

distance, the biggest difference was in the South Kalimantan sample (1.58%) compared with Lampung and West Kalimantan. The results of the K2P neighbour-joining phylogenetic tree reconstruction show that the South Kalimantan samples are in a different group. The West Kalimantan sample shows that it is closely related to the Lampung.

Keywords: COI, DNA barcoding, giant featherback, SNP

## Pendahuluan

Ikan belida (*Chitala lopis*) merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang memiliki nilai ekonomis tinggi di Indonesia. Persebarannya meliputi daerah Jawa, Lampung, Sumatra Selatan, Bengkulu, Jambi, Riau dan Kalimantan (Kottelat *et al.* 1993). Adanya aktivitas penangkapan berlebih (*overfishing*) dan perubahan lingkungan maupun kerusakan lingkungan perairan, menyebabkan kelestarian ikan ini terancam punah. Ikan belida termasuk dalam kategori ikan air tawar yang dilindungi menurut peraturan pemerintah nomor 7 tahun 1999 tentang pengawetan jenis tumbuhan dan satwa. Pada tahun 2018 ada empat jenis ikan belida yang dilindungi pemerintah, yaitu belida Borneo (*Chitala borneensis*), belida Sumatra (*Chitala hypselonotus*), belida lopis (*Chitala lopis*), dan belida Jawa (*Notopterus notopterus*) (Men. LHK 2018). *Conservation Assessment and Management Plan (CAMP)* mengategorikan *Chitala* spp. terutama jenis *Chitala lopis* sebagai spesies langka (Sarkar *et al.* 2008).

Dalam menjaga kelestariannya, perlu adanya upaya konservasi ikan belida, salah satunya dengan cara konservasi genetik. Salah satu upaya dalam konservasi genetik adalah dengan mengetahui karakteristik genetik ikan belida dengan menganalisis DNA mitokondria. Hasil analisis gen mtDNA dapat

memberikan informasi dalam melakukan identifikasi spesies, mengklarifikasi taksonomi dan menentukan sebaran populasi hewan yang diamati (Hebert *et al.* 2003). Gen mtDNA sering digunakan untuk mendapatkan informasi keragaman genetik karena berevolusi sangat cepat dan dapat digunakan untuk membedakan interspesies dan intraspesies hewan yang berkerabat dekat (Solihin 1994).

Beberapa tahun terakhir penggunaan gen mitokondria yang paling populer adalah gen *Cytochrome Oxidase subunit I (COI)*. Gen *COI* merupakan salah satu marka molekular yang berasal dari DNA mitokondria. Gen ini banyak digunakan sebagai *DNA barcoding*, identifikasi spesies, karakterisasi dan pengelompokan spesies dari berbagai taksa hewan (Solihin 1994, Hebert *et al.* 2003).

Penggunaan gen *COI* sebagai DNA Barcoding, mampu untuk mengidentifikasi ikan pada berbagai stadia ikan, maupun status ikan *cryptic species* (Ward *et al.* 2005). Gen ini juga banyak digunakan pada spesies ikan untuk merekonstruksi pohon filogeni, species origin, maupun sebaran populasi (Page & Hughes 2010).

Penelitian tentang ikan belida sudah banyak dilakukan dengan berbagai kajian, seperti biometrik ikan belida di Sumatra dan Kalimantan (Sunarno *et al.* 2007), keragaman

**Tabel 1** Sumber sampel ikan belida yang dianalisis gen *COI*

No.	Kode Sampel	Asal Sampel	Bentuk Sampel	Sumber
1	BKS 1	Kalimantan Selatan	Darah	Koleksi Balai Cibalagung
2	BKS 2	Kalimantan Selatan	Darah	
3	BKS 3	Kalimantan Selatan	Darah	
4	BKB 1	Kalimantan Barat	Darah	Pedagang
5	BKB 2	Kalimantan Barat	Darah	
6	BKB 3	Kalimantan Barat	Darah	
7	BL 1	Lampung	Darah	Penduduk lokal
8	BL 2	Lampung	Darah	
9	BL 3	Lampung	Darah	

genetik dan biometrik ikan belida budidaya di Riau (Nugroho *et al.* 2019), struktur populasi ikan belida di Riau (Wibowo 2012), keragaman genetik ikan belida di Riau (Wibowo *et al.* 2010), plastisitas ikan belida di Riau (Wibowo & Marson 2012), biologi reproduksi (Adjie *et al.* 1999, Santoso 2009, Sunarno & Syamsunarno 2015) dan ekobiologi ikan belida di Riau (Wibowo & Subagja 2014). Dari beberapa penelitian tersebut, belum banyaknya informasi dasar mengenai karakter genetik gen parsial *COI* ikan belida dari beberapa sungai di Indonesia berdasarkan spesifik lokasi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat keragaman genetik ikan belida *Chitala lopis* (Bleeker, 1851) yang berasal dari wilayah Lampung, Kalimantan Barat, dan Kalimantan Selatan.

#### Bahan dan metode

Penelitian ini dilaksanakan dari September 2018 hingga Desember 2019. Koleksi

sampel ikan belida berasal dari Lampung dan Kalimantan (Tabel 1), Lampung (tiga individu), Kalimantan Barat (tiga individu), dan Kalimantan Selatan (tiga individu). Sampel Kalimantan Selatan diperoleh dari Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Lingkungan dan Toksikologi Perikanan Budidaya Air Tawar Cibalagung, Bogor. Analisis genetik dilaksanakan di Laboratorium Konservasi Genetik, Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) IPB Bogor.

#### Koleksi sampel

Sampel DNA berasal dari darah. Sampel darah diambil sebanyak  $\pm 0,5$  ml menggunakan spuit dengan Teknik *Puncturing the Caudal Vessel* (Pembuluh darah Bagian Caudal) (MUAWC 2008). Darah yang diperoleh lalu dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 ml yang berisi buffer EDTA 10% dengan perbandingan  $\pm$  darah 7:3 EDTA dan diberi label.

### Amplifikasi DNA

Proses amplifikasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer gen *COI* universal yaitu *COI Fish F1* dan *COI Fish R1* (Ward *et al.* 2005):

FishF1-  
5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3';

FishR1-  
5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3'.

Target dari primer gen *COI* menghasilkan produk PCR sepanjang 707 pb. Total volume pereaksi PCR yang diperoleh adalah 25 µl, dengan komposisi DDH<sub>2</sub>O: 10,8 µl, 5x Buffer Q5: 4 µl, 5x Enhancer Q5: 5 µl, dNTP: 1 µl, Primer *COI Fish F1*: 1 µl, Primer *COI Fish R1*: 1 µl, DNA total: 2 µl, dan Taq DNA Polymerase: 0,2 µl.

Kondisi PCR yang digunakan meliputi tahapan pradenaturasi 94 °C selama 3 menit, denaturasi (94 °C, 45 detik), *annealing* (57 °C, 45 detik), *extension* (72 °C, 1 menit) sebanyak 35 siklus, elongasi akhir (*final extension*) pada suhu 72 °C selama 5 menit, dan pendinginan 20 °C selama 10 menit. Produk PCR dimigrasikan pada gel agarose 1,2%. Produk PCR yang menunjukkan pita *single band* akan dilanjutkan ketahap proses sekuensing di 1st BASE, Malaysia.

### Analisis data

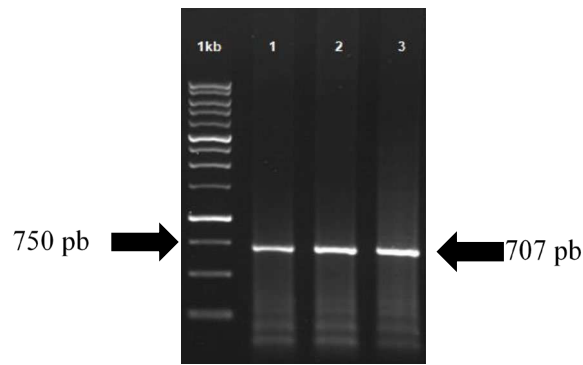
Hasil pembacaan untai DNA diperiksa dahulu untuk memastikan tidak adanya error. Hasil dari tiap urutan DNA, disejajarkan berdasarkan sekuens *forward* dan *reverse* untuk mendapatkan sekuens utuh. Sekuens utuh tersebut kemudian dikoreksi dengan primer

*forward* dan *reverse* dari gen *COI* agar diperoleh sekuens sesuai target dari primer yang digunakan. Pensejajaran sekuens menggunakan program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 7.0 (Kumar *et al.* 2016). Hasil sekuens tersebut kemudian dilakukan BLAST-n (*Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide*) di situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Jarak genetik dianalisis berdasarkan model *Kimura 2-parameter* dengan nilai bootstrap 1000 kali. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan model *Kimura 2-parameter*, serta *bootstraps* sebanyak 1000 kali pengulangan (Kumar *et al.* 2016). Selanjutnya sekuens dari *GenBank Chitala lopis* (AP008922.1 dan KM213054.1) ditambahkan sebagai *ingroup* dan *Notopterus notopterus* (AP008924.1) sebagai *outgroup*.

### Hasil

Hasil amplifikasi gen *COI* diperoleh 707 pb (pasang basa) (Gambar 1). Pensejajaran dengan runutan gen *COI* utuh *Chitala lopis* berukuran 1.548 pb (AP008922.1), posisi urutan gen *COI* parsial pada penelitian ini dimulai pada basa ke 24 hingga pada basa ke 731.

Identifikasi spesies ikan belida dilakukan dengan mencocokkan sekuens gen *COI* dengan spesies terdekat yang terdapat pada *GenBank*. Hasil yang diperoleh disajikan pada Tabel 2. Nilai kemiripan (*percent identity*)



**Gambar 1** Visualisasi pita hasil *PCR* gen *COI* parsial

Keterangan: (1kb) Marker ukuran 1kb, (1) Kalimantan Barat, (2) Kalimantan Selatan, (3) Lampung.

**Tabel 2** Hasil identifikasi gen *COI* ikan belida di BLAST-n NCBI

No	Sampel	Spesies Terdekat	Query Cover (%)	Percent Identity (%)	Kode akses
1	BL 1	<i>Chitala lopsis</i>	100	99,15	AP008922.1
2	BL 2	<i>Chitala lopsis</i>	100	99,15	AP008922.1
3	BL 3	<i>Chitala lopsis</i>	100	99,15	AP008922.1
4	BKB 1	<i>Chitala lopsis</i>	100	98,59	AP008922.1
5	BKB 2	<i>Chitala lopsis</i>	100	98,59	AP008922.1
6	BKB 3	<i>Chitala lopsis</i>	100	98,59	AP008922.1
7	BKS1	<i>Chitala lopsis</i>	100	97,60	AP008922.1
8	BKS 2	<i>Chitala lopsis</i>	100	97,60	AP008922.1
9	BKS 3	<i>Chitala lopsis</i>	100	97,60	AP008922.1

berkisar 97,60 – 99,15% dengan *query cover* sebesar 100% dengan nilai terendah diperoleh pada sampel yang berasal dari Kalimantan Selatan dengan nilai 97,60%. Tingkat kemiripan tertinggi didapat pada sampel yang berasal dari Lampung dengan nilai 99,15%

Karakterisasi gen *COI* pada spesies *Chitala lopsis* dengan perbandingan sekuens *Chitala lopsis* (AP008922.1) dari *Genbank* menunjukkan hasil situs konservatif sebesar 689 pb (97,45%), situs variasi 18 pb (2,54%), situs parsimoni 13 pb (1,84%), dan *singleton*

2 pb (0,28%) (Tabel 3). Komposisi basa nukleotida gen *COI* menunjukkan bahwa rata-rata tertinggi adalah Adenosin (28,4 %) dan diikuti oleh basa Sitosin (27,5%), Timin (27,2%) dan paling rendah adalah Guanin (16,8%) (Tabel 3). Pada penelitian ini diperoleh komposisi basa AT sebesar 55,7% dan komposisi basa GC 44,3%. Pada penelitian ini diperoleh hasil nilai analisis statistik frekuensi nukelotida substitusi adalah  $ii = 700$ ,  $si = 6$ ,  $sv = 1$ ,  $R = 4,7$ .

**Tabel 3** Perbandingan karakteristik nukleotida dengan gen *COI Chitala lopis* (AP008922.1)

No	Karakter	Gen <i>COI</i>
1	Sampel Individu dan GenBank	9 sampel dan 1 Genbank
2	Situs Konservatif (%)	689 (97,45)
3	Situs Variasi (%)	18 pb (2,54)
4	Situs Parsimoni* (%)	13 pb (1,84)
5	Situs Singleton** (%)	2 pb (0,28)
6	Persentase Adenin (A)	28,4
7	Persentase Guanin (G)	16,8
8	Persentase Sitosin (C)	27,5
9	Persentase Timin (T)	27,2
10	Komposisi basa AT	55,7
11	Komposisi basa GC	44,3

\* Situs parsimoni: ditemukan minimal dua jenis nukleotida, setiap jenis nukleotida dimiliki oleh minimal 2 runutan,

\*\* Situs singleton: nukleotida yang berbeda hanya ditemukan pada satu runutan.

**Tabel 4** Polimorfisme sekuen nukleotida interpopulasi *Chitala lopis* berdasarkan gen *COI*

Spesies	Kode Akses / Sampel	Situs Nukleotida ke-												
		1	1	1	2	2	3	3	4	4	5	6	6	
		6	2	2	4	0	7	0	2	7	7	2	1	4
		6	0	9	4	1	3	6	4	1	4	8	5	4
<i>Chitala lopis</i> *	AP008922.1	C	T	C	C	C	T	G	A	T	A	C	C	T
<i>C. lopis</i>	BL 1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>C. lopis</i>	BL 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>C. lopis</i>	BL 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>C. lopis</i>	BKB 1	T	.	.	.	.	C	.	.	C	.	T	.	.
<i>C. lopis</i>	BKB 2	T	.	.	.	.	C	.	.	C	.	T	.	.
<i>C. lopis</i>	BKB 3	T	.	.	.	.	C	.	.	C	.	T	.	.
<i>C. lopis</i>	BKS 1	T	C	T	T	T	C	A	C	.	G	.	T	C
<i>C. lopis</i>	BKS 2	T	C	T	T	T	C	A	C	.	G	.	T	C
<i>C. lopis</i>	BKS 3	T	C	T	T	T	C	A	C	.	G	.	T	C

\* spesies asal GenBank

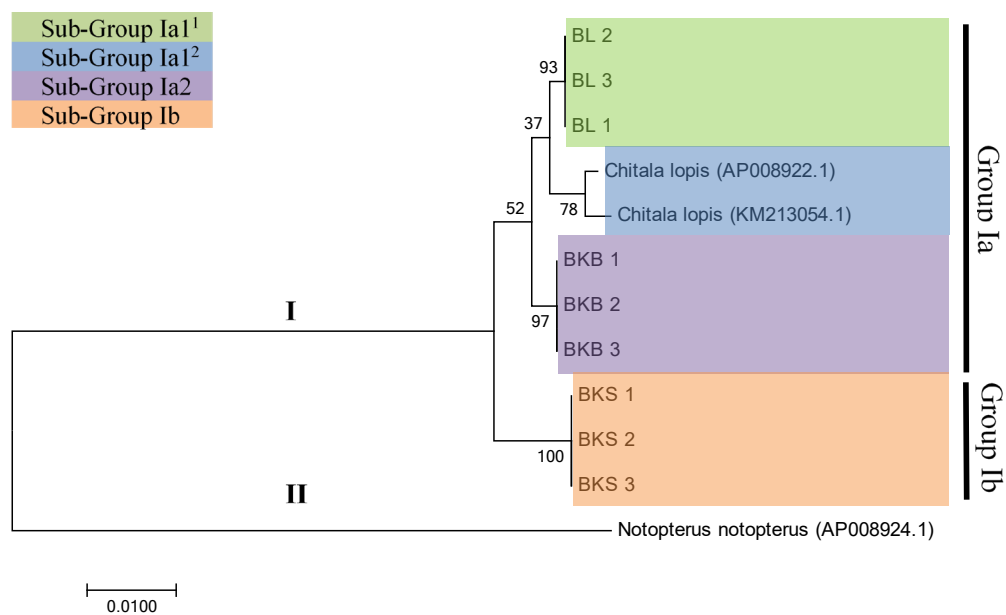
Pada hasil penelitian ini ditemukan 13 situs polimorfisme bervariasi pada populasi Lampung dan Kalimantan. Perbedaan pada

sampel Kalimantan dengan Lampung terletak pada nukleotida spesifik lokasi situs ke 66 dan 273. Nukleotida spesifik pada sampel

**Tabel 5** Rata-rata jarak genetik intra dan inter spesies berdasarkan gen *COI* (%)

Lokasi	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]
[1] BL	0,00*					
[2] BKS	1,58	0,00*				
[3] BKB	0,57	1,58	0,00*			
[4] <i>C. lopis</i> <sup>1</sup>	0,71	2,30	1,28	0,00*		
[5] <i>C. lopis</i> <sup>2</sup>	0,85	2,45	1,43	0,43	0,00*	
[6] <i>N. notopterus</i> <sup>3</sup>	13,19	12,99	12,83	12,50	12,65	0,00*

\* jarak genetik antarindividu dalam populasi (intrapopulasi). <sup>1</sup> Spesies Asal GenBank (AP008922.1). <sup>2</sup> Spesies Asal GenBank (KM213054.1). <sup>3</sup> Spesies Asal GenBank (AP008924.1). Keterangan: BL: Belida Lampung ; BKS: Belida Kalimantan Selatan ; BKB: Belida Kalimantan Barat.



**Gambar 2** Rekonstruksi pohon filogenetik *Chitala lopis* berdasarkan gen *COI*

Kalimantan dapat membedakan antarlokasi. Sampel Kalimantan Selatan menunjukkan nukleotida spesifik terdapat pada situs 120, 129, 144, 201, 306, 324, 474, 615 dan 644. Pada sampel Kalimantan Barat situs nukleotida spesifik ditunjukkan pada situs 471 dan 528. Berbeda dengan Kalimantan, pada sampel Lampung cenderung menunjukkan nukleotida yang sama dengan sampel pembanding

dari GenBank (*Chitala lopis* AP008922.1). Berdasarkan hasil yang diperoleh, variasi situs nukleotida pada populasi Kalimantan Selatan lebih tinggi dibandingkan populasi Kalimantan Barat dan populasi Lampung. Perbedaan situs nukleotida antar sampel, hal ini dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil frekuensi substitusi nukleotida terjadi pada posisi kodon ketiga sebesar 94,4% dan posisi kodon

pertama maupun kodon kedua sebesar 5,6%.

Perbedaan terlihat pada jarak genetik interpopulasi antara Kalimantan Selatan dan Kalimantan Barat dengan nilai 1,58%. Sampel Lampung dengan populasi Kalimantan memiliki jarak genetik sebesar 1,07%. Pada perbedaan jarak genetik intraspesies didapat nilai sebesar 0,006 – 0,016 dengan rata-rata 0,012 (1,24%). Persentase perbedaan jarak genetik intraspesies *Chitala lopis* dari tiga lokasi dengan *Chitala lopis* dari GenBank (AP008922.1) sebesar 0,71% - 2,30% dengan rata-rata 1,43%. Perbandingan seluruh sampel dengan data GenBank *Chitala lopis* (KM213054.1) terdapat perbedaan sebesar 0,85% - 2,45 dengan rata-rata 1,58%. Jarak genetik interspesies dengan *outgroup Notopterus notopterus* (AP008924.1) 12,83 – 13,19% (Tabel 5) dengan rata-rata 13,00%.

Rekonstruksi pohon filogenetik gen *COI* menunjukkan dua *group* utama yaitu *group* I yang terdiri dari *Chitala lopis* asal tiga lokasi dan dua data spesies pembanding *Chitala lopis* (AP008922.1; KM213054.1) (*ingroup*), *group* II berisi *outgroup Notopterus notopterus* (AP008924.1) (Gambar 2). Pada *group* I terbagi lagi menjadi dua *group*, yaitu *group* Ia terdiri dari Lampung dan Kalimantan Barat dengan nilai bootstrap 52 dan *group* Ib yang terdiri dari sampel asal Kalimantan selatan dengan nilai bootstrap 100. Pada *group* Ia terbagi menjadi beberapa *sub-group*, yaitu *sub-group* Ia1<sup>1</sup> (Lampung), *sub-group* Ia1<sup>2</sup> (*ingroup*) dan *sub-group* Ia2 (Kalimantan Barat).

## Pembahasan

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tidak terdapat nukleotida yang mengalami insersi dan delesi, namun ditemukan nukleotida yang mengalami substitusi. Pada gen *COI* sangat jarang terjadinya insersi, delesi dan variasi, dikarenakan gen ini bersifat konservatif dan digunakan sebagai standar DNA Barkoding (Hebert *et al.* 2003).

Persentase komposisi basa nukleotida GC pada ikan belida adalah 44,3%. Hal ini tidak berbeda jauh pada beberapa taksa, komposisi basa GC berada dibawah 50%, seperti pada spesies *C. chitala* 43,5% & *N. notopterus* 43,85% (Sengupta & Homechaudhuri 2013), genus *Kryptopterus* 46,40% (Jusmaldi *et al.* 2014), kelompok *Teleostei* 47,06% (Ward *et al.* 2005), kelompok *Elasmobranchs* 41,78% & kelompok *Actinopterygii* 47,12% (Ward & Holmes 2007).

Karakteristik nukleotida pada gen *COI* ikan belida, terdapat nukleotida yang mengalami substitusi transisi dan transversasi. Dilihat dari substitusi nukleotidanya, frekuensi perubahan paling sering terjadi pada posisi kodon ketiga (94,4%) dibandingkan dengan posisi kodon pertama ataupun kodon kedua (5,6%). Menurut Bofkin & Goldman (2007), substitusi nukleotida yang terjadi pada posisi kodon ketiga banyak yang bersifat sinonim, yaitu substitusi yang tidak menyebabkan perubahan aktivitas pada produk yang dikode oleh gen. Sebaliknya dengan substitusi pada kodon ketiga, substitusi pada kodon pertama dan kodon kedua bersifat non-sinonim. Hasil ini menunjukkan bahwa frekuensi substitusi sinonim



pada gen COI ikan belida lebih banyak yang bersifat sinonim, hal ini didukung juga oleh penelitian Ward & Holmes (2007) bahwa substitusi sinonim lebih tinggi dibanding substitusi non-sinonim pada gen parsial COI dengan panjang 655 pb.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, substitusi nukleotida yang terjadi pada gen parsial COI lebih banyak terjadi substitusi transisi dibandingkan transversasi. Jumlah basa nukleotida yang mengalami substitusi transisi dengan nilai  $si = 6$ ,  $sv = 1$ ,  $R = 4,7$ . Hasil ini didukung penelitian Sengupta & Homechaudhuri (2013), yaitu hasil substitusi nukleotida transisi lebih banyak terjadi dibanding substitusi nukleotida transversasi. Hasil tersebut terjadi pada famili Notopteridae, yang mana substitusi transisi yang diperoleh yaitu,  $si = 28$ , dan  $sv = 11$  dengan nilai  $R = 2,6$ .

Hasil analisis dari sampel Lampung memiliki kemiripan dengan spesies pembanding asal GenBank (AP008922.1), diduga spesies pembanding GenBank diperoleh dari Sumatera (Indonesia). Wibowo (2014) melaporkan berdasarkan gen COI bahwa *C. lopus* asal Indonesia memiliki 14 situs nukleotida spesifik lokasi, yang tiap populasinya memiliki ciri situs nukleotida spesifik lokasi tersendiri.

Berdasarkan analisis perhitungan jarak genetik, perbedaan terbesar yang diperoleh pada sampel penelitian ini dengan spesies *ingroup* tidak lebih dari 3%. Pada sistem identifikasi COI, suatu spesies dapat dibedakan jenisnya apabila perbedaan jarak genetiknya melebihi 3% (Hebert *et al.* 2003), dan 3,5% pada ikan (Ward *et al.* 2009). Perbedaan

ditunjukkan pada spesies pembanding *N. notopterus* (*outgroup*), dengan jarak sebesar 12,83% - 13,19% pada sampel asal Lampung dan Kalimantan, lalu 12,50% pada spesies *Chitala lopus* (AP008922.1) sebagai *ingroup*. Pada hasil penelitian Sengupta & Homechaudhuri (2013), spesies *C. chitala* dan *N. notopterus* memiliki jarak genetik intraspesies 0% dan interspesies 11%.

Berdasarkan hasil jarak genetik, populasi belida Kalimantan Barat memiliki perbedaan jarak genetik yang dekat dengan belida Lampung. Pada zaman Pleistocene, pulau Sumatra, Kalimantan dan Asia merupakan suatu daratan besar yang disebut paparan Sunda. Aliran sungai besar Sunda Utara mengalir ke sungai Indragiri, Musi (utara – timur Sumatra) hingga menuju sungai Kapuas (Kalimantan Barat) (Voris 2000) sehingga memiliki pengaruh pada persebaran ikan air tawar (Inger & Chin 1962). Hal ini dapat dilihat dari populasi ikan botia (*Chromobotia macracanthus*), bahwa populasi ikan botia di Kalimantan dan Sumatra memiliki keragaman genetik dan morfologi yang mirip (Sudarto & Rizal 2007, Sudarto *et al.* 2008). Begitu pula dengan sampel ikan belida dari populasi Lampung, menunjukkan jarak genetik 0%, dikarenakan beberapa sungai di Sumatra terhubung dengan sistem aliran sungai Sunda Utara (Voris 2000). Perbedaan jarak genetik ditunjukkan antara populasi Kalimantan Selatan dengan Kalimantan Barat sebesar 1,58%. Hal ini diduga bahwa aliran sungai di Kalimantan Selatan tidak terhubung dengan sungai Sunda Utara. Hasil ini diperkuat oleh

hasil penelitian Sudarto & Rizal (2007), bahwa morfologi ikan *Botia* dari Kalimantan Selatan berbeda dengan ikan *Botia* yang berasal dari Sumatra.

Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogeni ikan belida (Gambar 2) terdapat dua *group* utama. Masing-masing populasi mengelompok berdasarkan lokasi. Sampel yang berasal dari Lampung dan Kalimantan Barat mengelompok dengan spesies pembanding *Chitala lopis* (AP008922.1 dan KM213054.1) pada satu *group*. Terlihat pada *sub-group* Ib, spesies *Chitala lopis* (AP008922.1) berada satu *sub-group* dengan *Chitala lopis* (KM213054.1) yang berasal dari sungai Kampar, Riau. Berdasarkan perhitungan jarak genetik, perbedaan antara sampel yang berasal dari Lampung dengan *Chitala lopis* (AP008922.1) tidak berbeda jauh dengan nilai sebesar 0,71%. Begitu pula dengan hasil analisis jarak genetik antara *Chitala lopis* (AP008922.1) dan *Chitala lopis* (KM213054.1) yang hanya memiliki perbedaan sebesar 0,43%. Berdasarkan hasil tersebut, spesies pembanding *Chitala lopis* (AP008922.1) diduga berasal dari Indonesia, khususnya populasi Sumatra. Pada *group* Ia, populasi Kalimantan Barat memiliki kekerabatan lebih dekat dengan populasi Lampung. Hasil ini ditunjang oleh nilai Jarak genetik perbedaan populasi Kalimantan Barat dengan Lampung sebesar 0,57% dan sejarah aliran sungai Sunda besar pada zaman *Pleistocene* (Voris 2000). Pada spesies *outgroup*, terlihat memiliki *group* terpisah yang berarti spesies tersebut berbeda atau memiliki kekerabatan

yang jauh yaitu rata-rata jarak genetik sebesar 13,00%. Namun demikian pada penelitian Wibowo (2014), *C. lopis* yang berasal dari sungai Indragiri dan sungai Mahakam dalam rekonstruksi pohon filogeninya berada pada klaster yang berbeda. Berdasarkan hasil penelitian ini dan hasil penelitian lain rekonstruksi pohon filogeni berdasarkan gen COI mampu memisahkan kelompok populasi ikan belida dengan memiliki jumlah situs spesifik bervariasi. Cabang pada pohon filogenetik mewakili hubungan antar unit yang menggambarkan hubungan keturunan dengan leluhurnya, sedangkan panjang cabang menggambarkan jumlah perubahan evolusioner yang terjadi antara dua nodus (Li & Graur 2000). Menurut Kottelat *et al.* (1993) di Indonesia memiliki empat jenis ikan belida, namun demikian dari hasil penelitian ini jarak genetik antara Lampung dengan Kalimantan Barat sebesar 0,57%, sedangkan perbandingan dengan Kalimantan Selatan sebesar 1,58%. Hal ini belum memberikan bukti adanya empat spesies tersebut karena perbedaan jarak genetik tidak melebihi ambang batas sebesar >3% (Hebert *et al.* 2003, Ward *et al.* 2009).

### Simpulan

Populasi Lampung dan Kalimantan terpisahkan secara baik dan jelas dengan jarak genetik rata-rata sebesar 1,07%. Ikan belida asal Lampung dan Kalimantan memiliki 13 situs nukleotida polimorfisme sedangkan situs nukleotida spesifik lokasi hanya dua situs (66 dan 273). Sampel yang berasal dari

populasi Kalimantan Selatan memiliki sembilan situs nukleotida spesifik. Hasil ini juga ditunjang dengan data dari hasil analisis jarak genetik dan rekonstruksi pohon filogenetik. Belida Kalimantan Barat memiliki kekerabatan lebih dekat dengan belida Lampung (0,57%) dibandingkan dengan belida Kalimantan Selatan (1,58%).

### Persantunan

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Eri Setiadi M.Sc. kepala Instalasi Penelitian Lingkungan Perikanan Budidaya dan Toksikologi, Cibalagung, Bogor dan terima kasih kepada Dr. Arif Wibowo, SP., M.Si sebagai kepala Balai Riset Perikanan dan Perairan Umum, Palembang yang telah membantu dalam penelitian ini.

### Daftar pustaka

- Adjie S, Husnah, Gaffar AK. 1999. Studi biologi ikan belida (*Notopterus chitala*) di daerah aliran Sungai Batanghari. Provinsi Jambi. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 1: 38-43.
- Bofkin L, Goldman N. 2007. Variation in evolutionary processes at different codon positions. *Molecular Biology and Evolution*. 24(2): 513-521.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270: 313-322.
- Inger RF, Chin PK. 1962. The fresh-water fishes of North Borneo. *Fieldiana Zoology*, 45: 1-268.
- Jusmaldi, Solihin DD, Affandi R, Rahardjo MF, Gustiano R. 2014. Kode batang DNA ikan lais genus *Kryptopterus* asal Sungai Mahakam Kalimantan Timur. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 14(3): 191-199.
- Kottelat M, Whitten JA, Kartikasari N, Wiryatmojo S. 1993. Freshwater fishes of Western Indonesia and Sulawesi. Periplus Edition and Emdi Project Indonesia. Jakarta
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870-1874.
- Li WH, Graur D. 2000. *Fundamental of Molecular Evolution*. Second edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland (US). 481 p.
- Menteri LHK. 2018. Peraturan Lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia. Nomor: P.20/MENLHK/SETJEN/KUM.1/6/2018 tentang jenis tumbuhan dan satwa yang dilindungi.
- MUAWC. 2008. *Blood Collection Guidelines*. Monash University Animal Welfare Committee (MUAWC). 1-10.
- Nugroho E, Dewi RRSPN, Subagja J, Priono B. 2019. Keragaman genetik dan karakter biometrik ikan belida (*Chitala lopis*, Bleeker 1851) budidaya asal Sungai Kampar. Riau. *Jurnal Riset Akuakultur*, 14(1): 1-8.
- Page TJ, Hughes JM. 2010. Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. *Journal of Fish Biology*, 77(9): 2093-2122.
- Santoso L. 2009. Biologi reproduksi ikan belida (*Chitala lopis*) di Sungai Tulang Bawang. Lampung. *Berkala Perikanan Terubuk*, 31(1): 38-46.
- Sarkar UK, Negi RS, Deepak PK, Lakra WS, and Paul SK. 2008. Biological parameters of the endangered fish *Chitala chitala* (Osteoglossiformes: Notopteridae) from some Indian Rivers. *Fisheries Research*, 90(1): 170-177.

- Sengupta S, Homechaudhuri S. 2013. DNA barcodes of some threatened freshwater indigenous fishes in India. *Current Science*, 105(1): 84-90.
- Solihin DD. 1994. Peran DNA mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. *Hayati*, 1(1):1-4.
- Sudarto, Pouyaud L, Kusuma RV. 2008. Struktur populasi dan sejarah kolonisasi ikan botia (*Chromobotia macracanthus* Bleeker) asal Sumatera dan Kalimantan berdasarkan sekuen intron dari Gen Aldolase-B. *Jurnal Perikanan*, 9(2): 203-212.
- Sudarto, Rizal M. 2007. Variasi morfometri ikan botia (*Botia macracanthus* Bleeker) dari perairan Sumatera dan Kalimantan. *Jurnal Perikanan*, 9(2): 214-219.
- Sunarno MTD, Syamsunarno MB. 2015. Pengaruh naungan terhadap pematangan gonad dan pemijahan ikan belida (*Chitala lopis*) di kolam rawa. *Jurnal Ilmu Pertanian dan Perikanan*, 4(1): 71-77.
- Sunarno MTD, Wibowo A, Subagja. 2007. Identifikasi tiga kelompok ikan belida (*Chitala lopis*) di Sungai Tulang Bawang, Kampar, dan Kapuas dengan pendekatan biometrik. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 13(2): 87-94.
- Voris HK. 2000. Maps of pleistocene sea-levels in South East Asia: shorelines, river systems, time durations. *Journal of Biogeography*, 27(5): 1153-1167.
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74(2): 329-356.
- Ward RD, Holmes BH. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (*cox1*) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, 7(6): 899-907.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1887-1857.
- Wibowo A Subagja. 2014. Penilaian indeks kualitas lingkungan untuk menentukan wilayah konservasi ikan belida (*Chitala lopis*) di Sungai Kampar. Riau. *Bawal*, 6(1): 1-9.
- Wibowo A, 2014. Barcoding ikan belida (*Chitala Lopis*) berdasarkan gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* DNA mitokondria. In: Alim Isnansetyo (editor). *Prosiding Seminar Nasional Tahunan XI Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan Tahun 2014 Jilid II*. Jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta, pp. 227-235.
- Wibowo A, Affandi R, Soewardi K, Sudarto. 2010. Genetic differentiation of the kampar river's giant featherback (*Chitala lopis* Bleeker 1851) base on mitochondrial dna analysis. *Indonesian Fisheries Research Journal*, 16(2): 49-58.
- Wibowo A, Marson. 2012. Fenomena plastisitas fenotipik ikan belida (*Chitala lopis*) di Sungai Kampar. Riau. *Bawal*, 4(3): 195-204.
- Wibowo A. 2012. Struktur genetik populasi ikan belida (*Chitala lopis*. Bleeker 1851) di Waduk Kutopanjang. *Bawal*, 4(1): 53-58.