

Keragaman Morfometrik dan Genetik Gen COI Belut Sawah (*Monopterus albus*) Asal Empat Populasi di Jawa Barat

(Morphometrics and Genetic Diversity COI Gene of Swamp Eel (*Monopterus albus*) from Four Population in West Java)

Lella Herdiana^{1*}, Muhammad Mukhlis Kamal², Nurlisa Alias Butet², Ridwan Affandi²

(Diterima Juli 2016/Disetujui Oktober 2017)

ABSTRAK

Ikan belut sawah (*Monopterus albus*) merupakan spesies ikan air tawar ekonomis penting yang potensial untuk dikembangkan secara berkelanjutan. Spesies ini dianggap sebagai spesies bermasalah karena karakternya yang kompleks serta morfologinya yang mirip dengan *Monopterus cuchia* dan *Monopterus javanensis* yang sering kali menghantarkan dilema taksonomi. Kepastian taksonomi merupakan informasi dasar penting dalam pengelolaan perikanan secara berkelanjutan, studi keragaman morfometrik, dan genetik merupakan metode umum yang digunakan untuk identifikasi spesies maupun stok. Penelitian ini untuk memvalidasi, identifikasi, serta evaluasi hubungan kekerabatan spesies belut sawah asal empat populasi (Indramayu, Subang, Tasikmalaya, dan Garut) di Jawa Barat. Analisis keragaman morfometrik dilakukan berdasarkan pengukuran 19 karakter morfometrik, sedangkan analisis keragaman genetik dilakukan menggunakan metode PCR-Sekuensing mtDNA gen COI. Hasil analisis diskriminan *stepwise* menghasilkan 7 rasio karakter morfometrik yang berpengaruh terhadap pengelompokan populasi dan dua fungsi diskriminan pertama menyumbang 84,2% dari total variasi. Keragaman genetik ditunjukkan melalui penjajaran 14 sekuen gen COI yang menghasilkan 11 haplotipe spesies ingrup dari 109 situs nukleotida variasi. Hasil analisis kluster dan pohon filogenetik menunjukkan bahwa ikan belut sawah dari empat populasi penelitian mengelompok ke dalam dua kluster utama. Kluster pertama terdiri atas populasi Indramayu dan Subang, kluster kedua terdiri atas populasi Tasikmalaya dan Garut. Pengelompokan tersebut membuktikan bahwa populasi belut sawah di Jawa Barat secara morfometrik dan genetik bervariasi di antara populasi dan menghantarkan pada dugaan bahwa sedikitnya ada dua spesies kriptik dari *M. albus* di Jawa Barat.

Kata kunci: Jawa Barat, keragaman genetik, keragaman morfometrik, *Monopterus albus*

ABSTRACT

Swamp eel (*Monopterus albus*) is an economically important freshwater fish which has the potential to sustainable development. This species is considered as one of the taxonomically problematic species due to its complex characters and similar morphology to *Monopterus cuchia* and *Monopterus javanensis* that often lead to taxonomic dilemmas. Taxonomic certainty is an essential basis information in sustainable fisheries management, studies on morphometric characters, and genetic variability is a method which commonly used for species or stock identification. This study was aimed to validate the taxonomy certainty and evaluate the kinship of swamp eel from four populations (Indramayu, Subang, Tasikmalaya, and Garut district) in West Java. Morphometric analysis was conducted by measurement of 19 characters, whereas genetic analysis was conducted using PCR-Sequencing method of COI gene. The results from stepwise discriminant analysis showed that 7 morphometric characters ratio were powerful to classified the populations and the first two discriminant functions accounted 84.2% of the total variability. Genetic diversity indicated by alignment 14 sekuen of COI gene showed there were 11 haplotypes from 109 variable sites. Results of cluster and phylogenetic tree analysis indicated that swamp eel from four research populations were grouped into two major clusters. The first cluster consists of Indramayu and Subang population, the second cluster consists of Tasikmalaya and Garut population. This cluster is an evidence that swamp eel from West Java possessed morphometric and genetic diversity among populations and lead to assumption that at least there were two cryptic species from *M. albus* in West Java.

Keywords: genetic diversity, *Monopterus albus*, morphometric diversity, West Java

PENDAHULUAN

Jawa Barat menjadi salah satu provinsi di Pulau

¹ Sekolah Pascasarjana, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

² Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

* Penulis Korespondensi: Email: lella_herdiana@yahoo.com

Jawa yang memasok sekitar 4,4% (rata-rata produksi/provinsi sebesar 2,94%) produksi perikanan di Indonesia baik dari perikanan air tawar maupun laut (BPS 2015). Khusus untuk perikanan air tawar, provinsi ini terpilih sebagai salah satu sentra budi daya belut di Indonesia sejalan dengan prestasinya sebagai lumbung padi nasional dengan potensi lahan pertanian yang luas (sawah) sebagai habitat asli bagi ikan belut sawah (DJPB 2012). Kendati demikian, meningkatnya pencemaran lingkungan, penangkapan

yang berlebih, serta perubahan fungsi lahan pertanian menjadi area permukiman, perkantoran, industri, dan jalan menjadi kendala baru bagi perikanan belut sawah yang ditandai dengan penurunan laju produksi belut sawah sebagai akibat dari kelangkaan stok benih belut baik dari alam maupun budi daya. Kendala tersebut berakibat pada menurunnya minat para pembudidaya untuk membudidayakan ikan belut sawah dan lebih memilih ikan air tawar lainnya. Padahal, potensi yang dimiliki ikan belut sawah sangat besar baik sebagai komoditas ikan ekonomis penting maupun sebagai alternatif biomedis (Ikram & Ridzwan 2013; Atif *et al.* 2015), sehingga sangat disayangkan jika salah satu ikan air tawar dari famili *Sinbranchidae* ini tidak dikelola dengan baik atau bahkan diabaikan.

Ikan belut sawah (*Monopterus albus*) atau *asian swamp eel* (*common name*) merupakan satu dari 13 spesies pada genus *Monopterus* yang memiliki distribusi yang luas meliputi kawasan Asia tropis hingga sub tropis sebagai habitat aslinya (Allen 2011). Melalui alat pernafasan sekunder yang dimilikinya dan ikan ini mampu beradaptasi pada beberapa kondisi lingkungan bahkan pada lingkungan yang miskin oksigen sekalipun. Potensi tersebut telah menempatkan ikan belut sawah sebagai spesies yang memiliki kemampuan *plastisitas fenotipik* yang tinggi yang ditandai dengan munculnya pola warna tubuh, bintik hitam di sepanjang tubuh, dan bentuk ekor yang beragam (Nichols 1943). Ikan belut sawah juga memiliki visual yang sangat mirip dengan spesies *Monopterus cuchia* maupun *Monopterus javanensis*. Berdasarkan deskripsi atribut eksternal yang digambarkan oleh Miah *et al.* (2015); Ho *et al.* (2016) secara berturut-turut, yaitu keragaman fenotip dapat diekspresikan oleh genotip yang heterogen maupun homogen, sehingga memunculkan fenomena *cryptic species* maupun *complex*. Validasi spesies sering kali sulit jika berkaitan dengan fenomena tersebut (*cryptic species & complex*). Padahal validasi identifikasi merupakan informasi dasar yang harus dimiliki dalam upaya pengelolaan dan pengembangan sumber daya perikanan salah satunya ikan belut sawah. Wilayah distribusi yang luas serta kondisi habitat yang terpisah secara geografis memberikan peluang bagi genus *Monopterus* untuk muncul sebagai spesies yang memiliki keragaman genetik yang tinggi atau muncul sebagai spesies dengan varietas baru seperti halnya pada spesies *Cyprinus carpio* (Mabuchi *et al.* 2005).

Pada tahun 2016, spesies baru *Monopterus luticosus* ditemukan di wilayah Cameroon, Afrika oleh Britz *et al.* (2016). Spesies tersebut menjadi spesies ke 14 dari genus *Monopterus* setelah spesies *Monopterus ichthyophiidae* (Britz *et al.* 2011). Berdasarkan hal tersebut, maka validasi identifikasi dari spesies belut sawah merupakan tahapan yang harus dilakukan. Adapun langkahnya dengan melakukan aktualisasi identifikasi melalui beberapa pendekatan seperti studi keragaman morfologi (morfometrik) dan molekuler pada DNA mitokondria (mtDNA). Studi karakter mor-

fometrik dikenal sebagai teknik konvensional yang paling simpel dan efektif dari sisi pembiayaan untuk identifikasi dan karakterisasi stok ikan (Chaklader *et al.* 2015; Siddik *et al.* 2016), sedangkan, untuk studi molekuler mtDNA, maka gen *Cytochrome Oxidase subunit I* (COI) merupakan bagian dari mtDNA yang sering digunakan untuk studi identifikasi populasi maupun spesies (Hubert *et al.* 2008). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi, identifikasi, dan evaluasi hubungan kekerabatan ikan belut sawah di beberapa populasi di Jawa Barat melalui studi keragaman morfometrik serta genetik gen COI *M. albus*. Identifikasi yang valid selanjutnya dapat digunakan sebagai informasi dasar untuk penelusuran populasi potensial dan benih unggul maupun pemuliaan genetik dalam bidang budi daya.

METODE DAN PENELITIAN

Sampel Ikan Uji

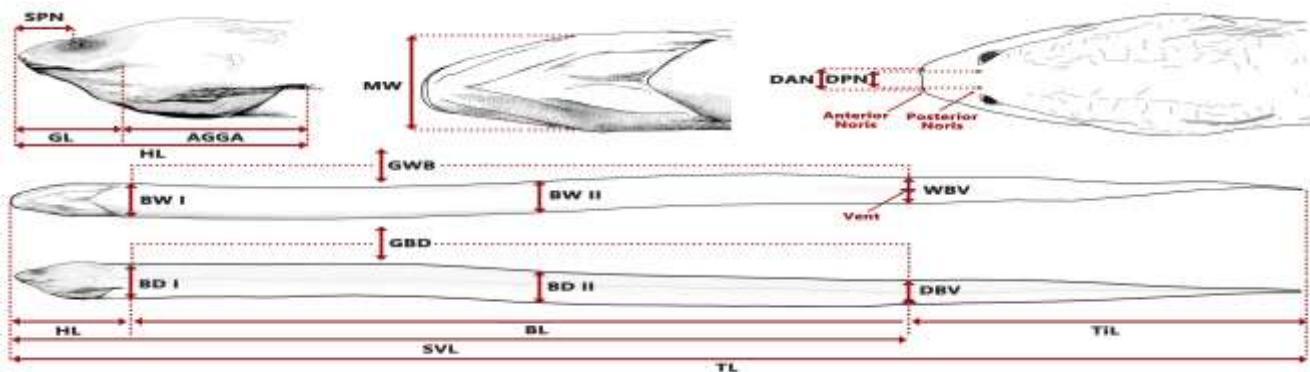
Pengambilan sampel belut sawah dilakukan pada bulan Desember 2015–Februari 2016 dari empat populasi sawah irigasi di Provinsi Jawa Barat. Empat populasi tersebut meliputi Kabupaten Indramayu dan Subang (Jawa Barat bagian utara) serta Kabupaten Tasikmalaya dan Garut (Jawa Barat bagian selatan) yang dipilih berdasarkan perwakilan wilayah bagian dari Provinsi Jawa Barat serta perbedaan posisi ketinggian dataran (*altitude*) (Gambar 1). Sampel belut sawah diambil menggunakan alat tangkap sesuai kebiasaan masyarakat setempat (posong, setrum listrik, dan pancing) selama satu hari penuh. Ikan belut sawah yang diambil sebagai sampel uji meliputi ikan semua ukuran yang dapat tertangkap dengan total tangkapan sebanyak 134 ekor belut sawah yang dikumpulkan dari 4 lokasi penelitian, yaitu Indramayu (36 ekor), Subang (48 ekor), Tasikmalaya (20 ekor), dan Garut (30 ekor). Sedangkan, analisis morfometrik sebanyak 3 sampel belut sawah dengan kondisi sehat dari masing-masing lokasi untuk analisis molekuler.

Karakterisasi Morfometrik

Identifikasi secara morfologi dilakukan melalui pengamatan visual berdasarkan penggambaran anatomi eksternal dan kunci identifikasi oleh Kottelat *et al.* (1993) serta berbagai referensi mendukung dari peneliti lainnya seperti Nicholas (1943); Liem (1967); Rosen dan Greenwood (1976), sedangkan identifikasi berdasarkan keragaman morfometrik dilakukan melalui pengukuran 19 karakter morfometrik belut sawah yang mengacu pada beberapa peneliti sebelumnya seperti Rosen dan Greenwood (1976); Bailey dan Gans (1998); Wijana (1999); Gopi (2002); Arisuryanti (2016) serta beberapa karakter morfometrik tambahan yang dihadirkan dalam studi ini selain dari acuan (Gambar 2). Karakter morfometrik diukur menggunakan penggaris (ketelitian 1 mm) dan kaliper digital (ketelitian 0,01 mm).



Gambar 1 Letak geografis pengambilan sampel *Monopterus albus*.



Keterangan: TL = panjang total, SVL = panjang moncong ke vent, HL = panjang kepala, BL = panjang badan, TiL = panjang ekor, BD I = tinggi badan bagian I, BD II = tinggi badan bagian II, DBV = tinggi bada di vent, GBD= tinggi badan maksimum, BW I = lebar badan bagian I, BW II = lebar badan bagian II, WBV = lebar badan di vent, GWB = lebar badan maksimum, SPN = Panjang moncong ke posterior nostril, GL = Panjang rahang atas, AGGA = Panjang sudut bukaan mulut-pangkal bukaan operkulum, MW = Lebar mulut, DAN = Jarak anterior nostril, DPN = Jarak posterior nostril.

Gambar 2 Karakter morfometrik *Monopterus albus* (gambar morfologi merupakan modifikasi dari Rosen & Greenwood 1976; Wijana 1999).

Karakterisasi Genetik

Profil genetik ikan belut sawah dianalisis menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *sekuensing* yang meliputi tiga tahapan, yaitu isolasi dan ekstraksi DNA, amplifikasi mtDNA menggunakan teknik PCR, dan *sekuensing* produk PCR.

Isolasi dan Ekstraksi DNA

Sampel DNA berasal dari darah belut sawah yang diawetkan dengan EtOH *absolut*, kemudian pengawetan dihilangkan dengan melakukan pencucian dengan buffer TE 2–3 kali. Sampel DNA diisolasi dan diekstraksi menggunakan Genomic DNA *Mini Kit (tissue)* (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan) dengan prosedur mengikuti manual pabrik dan beberapa modifikasi pada volume buffer, lama inkubasi di tahap *lysis* (GBT buffer 205 µl dan inkubasi 18 menit), serta tahap DNA *binding* (EtOH 205 µl).

Amplifikasi DNA mitokondria

DNA total hasil ekstraksi diamplifikasi menggunakan teknik PCR. Amplifikasi mtDNA belut sawah dilakukan dengan menggunakan sepasang primer spesifik COI *M. albus* (*Forward*: 5'-TCTCAACCAACCACAAA-GACAT TGG-3', *Reverse*: 5'-TATACTTCAGGGTGG-CCGAAGAATCA-3') dengan *reagen* PCR mix yang digunakan adalah kit komersial Q5 *Hot Start Taq DNA Polymerase* (New England Biolabs, Inc.). Amplifikasi dilakukan pada kondisi *predenaturasi* 95 °C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas *denaturasi* 94 °C selama 45 detik, *annealing* 60 °C selama 45 detik, *extension* 72 °C selama 1 menit, *post extension* 72 °C selama 6 menit, serta penyimpanan 4 °C selama 10 menit. Produk PCR divisualisasi di bawah sinar UV (100 volt) menggunakan mesin *elektroforesis* pada gel agarose 1,2% yang diwarnai dengan *Ethidium*

Bromide (EtBr) dan larutan buffer 1xTAE (40mM Tris-asetat dan 1mM EDTA).

Sekuensing

Satu produk PCR terbaik gen COI dari masing-masing lokasi penelitian dipilih untuk dianalisis lebih lanjut ke tahap *sekuensing* melalui 1st BASE DNA Sequencing Services dan Selangor-Malaysia. Muatan basa nukleotida akan didapatkan sebagai hasil dari produk *sekuensing*.

Analisa Data

Identifikasi keragaman morfometrik suatu spesies harus terbebas dari bias yang disebabkan oleh ukuran relatif (Siddik *et al.* 2016) maupun umur ikan (Qonita 2015), sehingga standarisasi data pengukuran morfometrik ikan diperlukan untuk menghilangkan efek tersebut dengan merasiokan seluruh karakter morfometrik terhadap ukuran relatif (Qonita 2015). Dalam studi ini, panjang total (TL) digunakan sebagai ukuran relatif karena sangat berkorelasi dengan karakter morfometrik lain (Hossain *et al.* 2010; Solomon *et al.* 2015). Data pengukuran karakter morfometrik yang telah dikonversi digunakan untuk mengetahui keragaman morfometrik melalui analisis koefisien keragaman (CV), univariat (ANOVA), diskriminan (DA) *stepwise*, dan klaster (CA) dengan menggunakan *software* SPSS versi 16.

Hasil *sekuensing* berupa susunan basa nukleotida dikoreksi dan disejajarkan pada perangkat lunak MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). Sekuen dari setiap sampel dianalisis kecocokan identifikasinya dengan sekuen lain di *GenBank* melalui tahapan BLASTn pada situs NCBI. Beberapa sekuen *M. albus* dari *GenBank* yang memiliki kedekatan dengan sampel serta beberapa sekuen yang menjadi perwakilan dari wilayah lainnya dipilih sebagai data sekunder (spesies *ingroup*) yang selanjutnya digunakan bersama-sama dengan sekuen sampel penelitian untuk analisis pohon filogenetik, jarak genetik, dan situs nukleotida variabel. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbour Joining Tree* (NJ Tree) dengan model *Kimura Two Parameter* (K2P) dan nilai *bootstrap* 1000 ulangan. *Accession number* sekuen *M. albus* gen COI dari *GenBank* meliputi AP002945, KU692633-KU692635, KP779622, KP729551-KP729553, KP729565, dan KP729574 (Miya *et al.* 2001; Chen *et al.* 2015; Arisuryanti 2016; Dahrudin *et al.* 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Identifikasi

Ikan belut sawah dalam studi ini memiliki bentuk tubuh silindris memanjang seperti ular, tidak memiliki sisik, menghasilkan banyak lendir yang menyelimuti tubuhnya, tidak memiliki sirip kaudal maupun pektoral, sirip dorsal dan anal tereduksi menjadi lipatan kulit yang menyatu pada bagian ekor, bukan insang bergabung menjadi satu celah sempit berbentuk-V di

bawah kepala, rahang atas sedikit lebih tebal menutupi rahang bawah, posisi posterior nares di antara mata, dan mata berukuran kecil yang tertutupi oleh lapisan kulit (Liem 1967; Rosen & Greenwood 1976; Kottelat *et al.* 1993). Berdasarkan deskripsi atribut eksternal yang terlihat, maka ikan belut sawah yang diambil dari empat populasi di Jawa Barat memiliki visual sangat mirip dengan spesies *M. albus*, walaupun pada beberapa karakter ikan ini memiliki beberapa variasi fenotipik seperti warna tubuh, bentuk ujung ekor, dan keberadaan bintik hitam di sepanjang tubuh. Validasi identifikasi secara genetik dilakukan dan hasil BLASTn menunjukkan bahwa sampel ikan belut sawah yang diambil dari empat lokasi penelitian di Jawa Barat Indonesia adalah spesies *M. albus* dengan persentase *identity* yang berkisar antara 98–100% (*Accession number* KU692633, KU692634, dan KU692635) pada *query cover* 100%.

Karakterisasi Morfometrik

Hasil analisis *univariat* (ANOVA) menunjukkan adanya perbedaan karakter morfometrik secara signifikan di antara empat populasi penelitian ($P < 0,01$). Rata-rata nilai koefisien keragaman (CV) 18 rasio karakter morfometrik ikan belut sawah disajikan pada Tabel 1. Populasi Indramayu, Subang, Tasikmalaya, dan Garut memiliki karakter dengan CV tertinggi di antara populasi (*intra*-populasi) sebanyak 4 (BD I/TL, GBD/TL, DBV/TL, MW/TL), 6 (HL/TL, BWI/TL, GWB/TL, GL/TL, AGGA/TL, DAN/TL), 4 (SVL/TL, BL/TL, TiL/TL, SPN/TL, DPN/TL), dan 3 (BDII/TL, BWII/TL, WBV/TL) karakter secara berturut-turut. Berdasarkan data tersebut, populasi Subang memiliki karakter dengan nilai CV tertinggi *intra* populasi paling banyak dibandingkan dengan tiga populasi lainnya. Adapun, kisaran rata-rata nilai CV yang dihasilkan dari empat populasi belut sawah tergolong cukup tinggi (3,01–14,65%) jika dibandingkan dengan kisaran nilai CV pada jenis ikan air tawar lainnya seperti pada ikan tengadak (2,24–12,76%), nilem (3,38–10,35%), dan gurami 10,5% (Setijaningsih *et al.* 2007; Mulyasari 2009; Kusmini *et al.* 2016). Nilai CV suatu karakter mengindikasikan tingkat variabilitas karakter yang bersangkutan pada suatu populasi (Kusmini *et al.* 2016). Semakin besar kisaran nilai CV suatu spesies maka peluang terjadinya pertukaran gen di antara populasi juga semakin tinggi (Iskandariah *et al.* 2015).

Analisis diskriminan kanonikal dengan menggunakan metode *stepwise* berhasil membedakan keragaman morfometrik ikan belut sawah yang diambil dari empat populasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 18 rasio karakter morfometrik secara signifikan berbeda nyata ($P < 0,01$) dan tujuh diantaranya (HL/TL, BDI/TL, BWI/TL, DPN/TL, SPN/TL, GL/TL, dan MW/TL) berperan efektif dalam pengelompokan empat populasi belut sawah (Tabel 2). Terdapat satu karakter berkontribusi secara dominan pada setiap fungsi diskriminan seperti karakter GL/TL, MW/TL, dan HL/TL pada DF1, DF2, dan DF3 secara berturut-turut (Tabel 2). Tiga rasio karakter (GL, MW, dan HL) tersebut menunjukkan bahwa bagian kepala belut

Tabel 1 Rata-rata nilai koefisien keragaman karakter morfometrik *Monopterus albus* (Indramayu, Subang, Tasikmalaya, dan Garut)

Rasio karakter (mm)	Koefisien keragaman (%)				Rata-rata	Sig.
	Indramayu (n = 36; 2 mdpl)	Subang (n = 48; 16 mdpl)	Tasikmalaya (n = 20; 278 mdpl)	Garut (n = 30; 691 mdpl)		
SVL/TL	2,75	2,14	3,90	3,25	3,01	,002
HL/TL	7,43	7,83	5,87	7,37	7,13	,000
BL/TL	2,59	2,22	4,22	2,96	3,00	,001
TiL/TL	6,61	5,17	8,98	7,25	7,00	,002
BD I/TL	10,13	8,73	8,87	8,84	9,14	,000
BD II/TL	8,32	7,77	7,43	9,31	8,21	,000
GBD/TL	10,05	8,66	8,51	8,11	8,83	,000
DBV/TL	9,64	8,71	6,77	8,15	8,32	,000
BW I/TL	10,51	11,54	8,14	10,13	10,08	,000
BW II/TL	8,15	10,25	7,83	10,96	9,30	,000
GWB/TL	9,24	10,82	7,62	10,09	9,44	,000
WBV/TL	10,18	10,07	9,74	11,51	10,38	,000
SPN/TL	8,39	11,42	12,97	10,78	10,89	,000
GL/TL	8,41	8,71	8,06	6,46	7,91	,000
AGGA/TL	7,86	12,36	8,21	10,55	9,75	,000
MW/TL	15,76	14,81	7,87	12,58	12,76	,000
DAN/TL	15,58	20,55	12,08	10,38	14,65	,000
DPN/TL	9,72	15,19	19,21	11,62	13,93	,000

Tabel 2 Kumpulan korelasi dalam grup antara variabel diskriminan dan fungsi diskriminan

Karakter	DF1	DF2	DF3
GL/TL	,653*	,370	,222
MW/TL	-,138	,789*	-,123
BWI/TL	-,108	,747*	,443
GWB/TL ^a	-,083	,704*	,375
GBD/TL ^a	,358	,635*	-,024
BDI/TL	,375	,633*	-,035
SPN/TL	,151	,582*	,048
BDII/TL ^a	,091	,579*	,149
DPN/TL	,326	,576*	,258
BWII/TL ^a	,031	,525*	,245
AGGA/TL ^a	-,073	,487*	,080
DAN/TL ^a	,197	,467*	,212
DBV/TL ^a	,101	,427*	,205
WBV/TL ^a	-,006	,315*	,205
SVL/TL ^a	,181	,255*	,100
TiL/TL ^a	-,181	-,255*	-,100
BL/TL ^a	,141	,223*	-,062
HL/TL	,185	,193	,491*

* , Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function

a: This variable not used in the analysis

sawah merupakan bagian yang paling penting dalam karakterisasi populasi lainnya. Hasil serupa juga ditemukan pada ikan belut sawah di beberapa wilayah lainnya di Indonesia dan ikan lele dumbo yang diambil dari enam aliran sungai di Turki (Turan *et al.* 2005; Arisuryanti 2016). Menurut Solomon *et al.* (2015), pada umumnya ikan menunjukkan variasi lebih besar pada ciri-ciri morfologi baik dalam spesies yang sama, spesies yang berbeda maupun pada beberapa hewan vertebrata lainnya di antara populasi yang berbeda.

Scatter plot dari dua fungsi diskriminan kanonikal pertama meyumbang 84,2% dari total variasi dan berhasil memberikan gambaran mengenai sebaran spesimen di antara populasi. Meskipun sebaran yang terbentuk memperlihatkan pemisahan populasi yang tidak sempurna karena masih terlihat adanya tum-

pang tindih spesimen di antara populasi. Di sisi lain, persentase nilai *sharing component intra* populasi keseluruhan populasi tergolong cukup tinggi (79,9%). Analisis kluster dilakukan untuk memperjelas pengelompokan populasi yang dihasilkan dari analisis diskriminan. Hasil analisis kluster menggunakan jarak *euclidean* menunjukkan bahwa belut sawah yang diambil dari empat populasi di Jawa Barat mengelompok ke dalam dua kluster utama. Kluster pertama terdiri atas populasi Indramayu dan Subang, sedangkan kluster kedua terdiri atas populasi Tasikmalaya dan Garut.

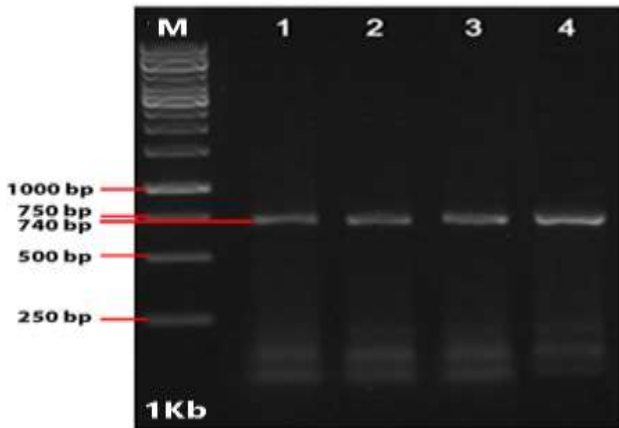
Karakterisasi Genetik

Total empat mtDNA gen COI belut sawah dari empat populasi penelitian berhasil teramplifikasi pada panjang sekuen nukleotida 740 bp (Gambar 3). Setelah dilakukan pemotongan primer dan penggabungan 4 sampel sekuen penelitian dengan 10 sekuen *M. albus* gen COI dari *GenBank* melalui proses *alignment* (pensejajaran) pada program *CrustalW*, maka hanya 538 bp sekuen yang dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut. Pensejajaran 14 sekuen belut sawah (4 sekuen dari penelitian dan 10 sekuen dari *GenBank*), menghasilkan 109 situs nukleotida yang bervariasi (20,3% dari 538 bp) yang terdiri atas 104 situs parsimoni (19,4% dari 538 bp), dan 5 situs *singleton* (0,9% dari 538 bp) di antara populasi spesies *ingroup* (Gambar 4).

Keragaman sekuen nukleotida di antara populasi cukup tinggi, hal tersebut ditunjukkan dengan ditemukannya 11 haplotipe berbeda di antara spesies *ingroup M. albus*. Hasil konstruksi pohon filogenetik berdasarkan NJ *tree* dengan model K2P menggambarkan bahwa 11 haplotipe *M. albus* gen COI dapat dikelompokkan ke dalam 3 kluster utama berdasarkan tingginya persentase nilai *bootstrap* (100%) serta perbedaan jarak genetik yang cukup jauh di antara kluster (6,9–18,9%) (Gambar 5). Kluster per-

tama (A) terdiri atas populasi *M. albus* yang berasal Provinsi Jawa Barat bagian utara (Indramayu dan Subang), Jawa Tengah (Pekalongan dan Karang Anyar), dan Jawa Timur (Ngawi) dengan jarak genetik *intra* populasi spesies *ingroup* dalam Klaster A berkisar antara 0,2–2,0%. Klaster kedua (B) terdiri

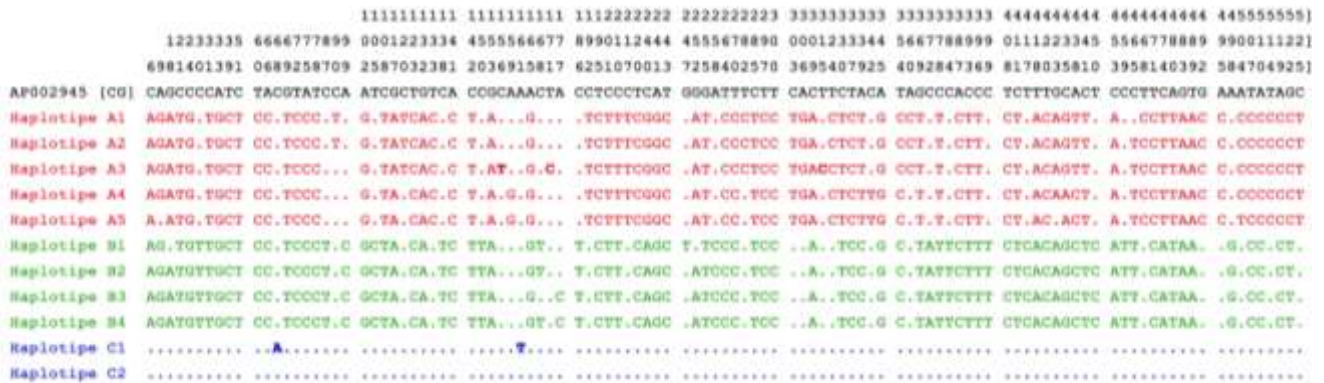
atas populasi *M. albus* yang berasal Provinsi Jawa Barat bagian selatan dan tengah (Tasikmalaya, Garut, Sukabumi, Depok, dan Bogor), Yogyakarta (Sleman), dan Jawa Timur (Ambarawa) dengan jarak genetik *intra* populasi spesies *ingroup* dalam klaster B berkisar antara 0,0–0,7%. Klaster ketiga (C) terdiri atas populasi *M. albus* yang berasal dari Negara Cina Guizhou dan Jepang dengan jarak genetik *intra* populasi spesies *ingroup* sebesar 0,4%. Osawa *et al.* (2004) menyatakan, bahwa nilai *bootstrap* digunakan untuk mengevaluasi kestabilan cabang dan terkategori stabil jika persentase nilainya lebih dari 95%, sedangkan untuk jarak genetik, Nei (1972) mendefinisikan sebagai derajat perbedaan gen (perbedaan genomik) antara spesies atau populasi yang diukur dengan beberapa metode numerik.



Gambar 3 Elektroforesis produk PCR mtDNA gen COI *Monopterus albus* (Keterangan: M = marker ukuran 1 kb; 1 = *M. albus* Indramayu; 2 = *M. albus* Subang; 3 = *M. albus* Tasikmalaya; dan 4 = *M. albus* Garut).

Hubungan Kekerabatan Ikan Belut Sawah Jawa Barat Berdasarkan Keragaman Morfometrik dan Genetik

Informasi mengenai validasi identifikasi dengan BLASTn serta keragaman fenotipik (deskripsi atribut eksternal) yang dimiliki oleh ikan belut sawah asal Jawa Barat menggambarkan bahwa *M. albus* dikategorikan sebagai spesies kompleks seperti yang diungkapkan oleh beberapa peneliti sebelumnya (Rosen & Greenwood 1976; Dahanukar 2010). Akan



Gambar 4 Polimorfisme nukleotida mtDNA gen COI pada 11 haplotipe spesies *M. albus*. [Keterangan: Hanya situs variabel yang ditampilkan; () = sama dengan sekuen AP002945 (CG) yang diambil dari *GenBank* (Miya *et al.* 2001); Angka di atas menunjukkan posisi *base pair* nukleotida].



Gambar 5 Pohon filogenetik spesies *M. albus* menggunakan metode *Neighbour Joining* dengan model Kimura 2-parameter, nilai *bootstrap* 1000 ulangan. [Keterangan: Angka pada cabang pohon filogenetik menunjukkan nilai *bootstrap* [sisi kiri] dan persentase jarak genetik *p-distance* [sisi kanan] *p-distance* [sisi kanan].

tetapi, beberapa penelitian terbaru menunjukkan perbedaan pendapat mengenai masalah tersebut, di mana spesies *M. albus* kompleks dikategorikan sebagai spesies kriptik (*cryptic species*) (Collins *et al.* 2002; Matsumoto *et al.* 2010; Kottelat 2013).

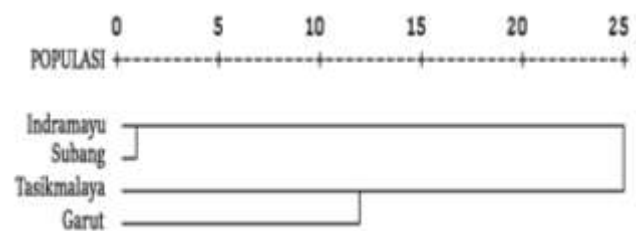
Berbeda dengan hasil sebelumnya (validasi identifikasi BLASTn serta variasi fenotipik berdasarkan atribut eksternal), maka analisis keragaman morfometrik dan genetik gen COI ikan belut sawah menunjukkan hasil yang sama dengan hasil penelitian yang ditemukan oleh Collins *et al.* (2002); Matsumoto *et al.* (2010), bahwa *M. albus* terdiri atas beberapa spesies kriptik. Hal tersebut jelas terlihat dari hasil pengelompokan ikan belut sawah asal Jawa Barat ke dalam dua klaster utama berdasarkan analisis klaster karakter morfometrik dan pohon filogenetik gen COI. Bahkan setelah penambahan beberapa spesies *ingroup* asal Jawa Barat dari *GenBank*, pengelompokan yang ditampilkan dari pohon filogenetik masih menunjukkan hasil sama, yaitu ikan belut sawah Jawa Barat mengelompok ke dalam dua klaster utama.

Pada analisis keragaman morfometrik, persentase nilai *sharing component* yang dihasilkan dari keseluruhan populasi tergolong cukup tinggi, yaitu 79,9% (75–85%). Setijaningsih *et al.* (2007) mengungkapkan, bahwa tinggi rendahnya nilai *sharing component* sangat dipengaruhi oleh sumber genetik induk atau pembentuknya. Kemudian dilihat dari analisis keragaman genetik dan persentase jarak genetik yang dihasilkan antara populasi Indramayu dan Subang (Klaster A) dengan populasi Tasikmalaya dan Garut (Klaster B) tergolong tinggi, yaitu 7,3–8,1%. Ratnasingham dan Hubert (2013) mengatakan, bahwa suatu spesies yang memiliki keragaman genetik >4% maka besar kemungkinan spesies tersebut mengalami isolasi reproduksi dan jika perbedaannya <2% maka dapat dikatakan sebagai satu spesies yang sama. Persentase Nilai *sharing component* serta perbedaan jarak genetik menjadi informasi yang dapat menguatkan pernyataan sebelumnya bahwa setidaknya spesies *M. albus* di Jawa Barat terdiri atas dua spesies kriptik dan setelah ditambahkan dengan beberapa spesies *Ingroup* di beberapa wilayah dan negara lainnya (dari *GenBank*) maka dalam studi ini sedikitnya ada tiga spesies kriptik yang ditemukan dari spesies *M. albus* yang kompleks.

Matsumoto *et al.* (2010) mengungkapkan, bahwa penggunaan analisis genetik mtDNA gen 16S rRNA memberikan gambaran mengenai spesies kriptik *M. albus* dan hasil penelitiannya mengungkapkan sedikitnya ada tiga spesies yang berbeda secara geografi dari spesies *M. albus* kompleks. Pada cakupan skala geografi yang lebih luas (khususnya di Indonesia) dengan penggunaan dua marka gen mtDNA. Menurut Arisuryanti (2016), secara keseluruhan ada 5 spesies kriptik dari spesies *M. albus* (gen 16S rRNA) dan khusus untuk spesies *M. albus* yang ditemukan di Indonesia setidaknya ada dua spesies kriptik (gen COI dan 16S rRNA) yang salah satunya muncul sebagai spesies baru dengan ciri morfologi yang serupa dengan *M. javanensis*. Munculnya spesies

baru secara genetik dapat terjadi melalui beberapa proses seperti isolasi reproduksi yang berakhir pada spesiasi maupun pembiakan buatan (*artificial propagation*) (Palumbi 1994; Hedrick 2001). Frankham *et al.* (2002) mengatakan, bahwa fragmentasi menjadi salah satu faktor yang menghantarkan terjadinya isolasi populasi secara sempurna yang ditandai dengan berhentinya aliran gen (*gene flow*) di antara populasi. Menurut Seehausen dan Wagner (2014), bahwa habitat ikan air tawar memiliki tingkat fragmentasi serta isolasi yang tinggi dan keragaman ikan air tawar dapat menjadi bukti yang kuat untuk keutamaan spesiasi *allopatric*. Spesies *M. albus* tergolong sebagai ikan air tawar yang memiliki sebaran distribusi luas serta laju fragmentasi habitat yang tinggi seiring dengan meningkatnya aktivitas pengalihan fungsi lahan (sawah irigasi) untuk peruntukan lain (seperti pembangunan jalan raya, perumahan, dan lain-lain). Berdasarkan hal tersebut maka sangat mungkin bagi spesies *M. albus* memiliki beberapa spesies kriptik seiring dengan meningkatnya laju fragmentasi serta luasnya sebaran distribusi.

Selain kepastian identifikasi, studi keragaman morfometrik dan genetik juga dapat digunakan untuk evaluasi hubungan kekerabatan suatu spesies di antara populasi. Hasil pengelompokan pohon *filogenetik* menunjukkan bahwa populasi Indramayu dan Subang memiliki kekerabatan lebih dekat (jarak genetik 0,2%) dibandingkan dengan Tasikmalaya dan Garut. Sebaliknya, populasi Tasikmalaya dan Garut (jarak genetik 0,6%) memiliki kekerabatan lebih dekat dibandingkan dengan populasi Indramayu dan Subang. Kesamaan hasil pengelompokan ikan belut sawah Jawa Barat pada analisis klaster dan pohon filogenetik menunjukkan bahwa keragaman morfometrik dipengaruhi oleh perbedaan *genetic* antara Gambar 5 dan Gambar 6. Walaupun ada studi yang mengungkapkan bahwa sebagian besar variasi fenotip antar populasi cenderung disebabkan oleh faktor lingkungan, sedangkan untuk faktor genetik memiliki pengaruh yang sedikit (Soewardi 2007). Di sisi lain hubungan kekerabatan juga memberikan gambaran terhadap kemungkinan adanya percampuran genetik di antara populasi. Percampuran genetik antara populasi disebabkan oleh beberapa faktor seperti aliran genetik (*gene flow*) (Laudien *et al.* 2003), maupun aktivitas introduksi oleh manusia



Gambar 6 Dendrogram hubungan kekerabatan empat populasi belut sawah berdasarkan keragaman morfometrik menggunakan metode klaster Hirarkis-jarak *Euclidean*.

(Collins *et al.* 2002). Proses *gene flow* sering kali dikaitkan dengan jarak geografis suatu populasi. Kenchington dan Heino (2002) mengungkapkan, bahwa kemungkinan terjadinya *gene flow* dari satu populasi ke populasi lainnya tergantung pada tingkat pemisahan geografi diantara populasi. Semakin jauh jarak geografi maka perbedaan genetik antar populasi semakin besar (Kenchington & Heino 2002; Hellberg *et al.* 2002). Menurut Hellberg *et al.* (2002), beberapa spesies laut (pemakan larva planktonik) menunjukkan kesamaan genetik yang tinggi melebihi luasnya skala geografi dan hal tersebut nampaknya disebabkan oleh *gene flow* yang berkelanjutan.

Selain *gene flow*, aktivitas introduksi juga menjadi salah satu faktor yang banyak berperan dalam hubungan kekerabatan suatu spesies di beberapa wilayah. Collins *et al.* (2002) mengungkapkan, bahwa *M. albus* yang ditemukan di Amerika Serikat memiliki komposisi genetik (berdasarkan analisis pohon filogenetik) yang sama dengan *M. albus* yang ditemukan di wilayah Asia Tenggara sebagai akibat dari aktivitas introduksi. Arisuryanti (2016) juga mengungkapkan, bahwa mengelompoknya spesies *M. albus* dari Papua ke dalam satu klaster yang sama dengan *M. albus* dari pulau Jawa, Bali, dan Lombok, kemungkinan besar disebabkan oleh aktivitas translokasi spesies oleh manusia. Berdasarkan jarak geografi di antara populasi serta meningkatnya aktivitas introduksi ikan belut sawah (sebagai ikan ekonomis penting), maka kemiripan genetik yang dimiliki populasi Indramayu dengan Subang serta populasi Tasikmalaya dengan Garut mungkin disebabkan oleh percampuran genetik melalui *gene flow* atau aktivitas introduksi. Walaupun sumber pasti yang penyebabnya masih belum dapat dipastikan karena ketiadaan informasi mengenai aktivitas intoduksi maupun proses *gene flow* di antara populasi.

Selain faktor genetik, keragaman morfometrik juga bisa disebabkan oleh beberapa faktor, seperti perbedaan kondisi lingkungan, posisi geografi, serta habitat yang berbeda (Hossain *et al.* 2010; Mohaddasi *et al.* 2013; Solomon *et al.* 2015; Siddik *et al.* 2016; Abdurahman *et al.* 2016). Posisi geografi yang berbeda, biasanya memiliki ketinggian tempat (*altitude*) yang berbeda pula. Empat populasi belut sawah penelitian dipilih sebagai perwakilan dari wilayah utara dan selatan Jawa Barat dan empat populasi tersebut memiliki *altitude* yang berbeda-beda. Populasi Indramayu dan Subang (klaster pertama) termasuk ke dalam populasi dataran rendah (>200 mdpl), sedangkan populasi Tasikmalaya dan Garut (klaster kedua) termasuk ke dalam populasi dataran sedang (200–600 mdpl) dan tinggi (> 600 mdpl) secara berturut-turut (Gambar 1). Perbedaan tipe ketinggian (*altitude*) populasi penelitian nampaknya tidak berpengaruh secara spesifik terhadap variasi morfometrik belut sawah. Hal tersebut terlihat dari jumlah pengelompokan yang dihasilkan dari analisis klaster empat populasi belut sawah tidak sama dengan jumlah tipe ketinggian empat populasi penelitian

(Gambar 1 & 3). Hasil serupa juga ditemukan pada belut sawah yang dilakukan oleh Arisuryanti (2016), bahwa dalam satu klaster utama terdiri atas beberapa populasi dengan ketinggian berbeda.

Kendati demikian, bahwa *altitude* memengaruhi kondisi lingkungan sekitar termasuk lingkungan perairan telah banyak dibuktikan. Affandi *et al.* (2003) mengungkapkan, bahwa ketinggian tempat (*altitude*) akan memengaruhi parameter fisik air, kimia air, tekstur substrat, serta biologi perikanan, dan pada akhirnya beberapa parameter tersebut akan berpengaruh terhadap distribusi kelimpahan, komposisi makanan, persentase jenis kelamin betina, TKG, serta fekunditas ikan belut sawah. Oleh sebab itu, dugaan tersebut masih memerlukan pembuktian dan pengkajian lebih lanjut mengenai kondisi lingkungan perairan dari empat populasi penelitian khususnya pada populasi Tasikmalaya dan Garut, sehingga dari pengkajian tersebut dapat diketahui, apakah dua populasi tersebut (berbeda tipe ketinggian) memiliki kondisi lingkungan perairan yang sangat berbeda atau tidak jauh berbeda. Karena kondisi lingkungan dengan perbedaan yang sangat *extrem* bisa menjadi salah satu faktor yang menyebabkan variasi morfometrik pada ikan. Siddik *et al.* (2016) mengungkapkan, bahwa perbedaan kondisi lingkungan seperti salinitas perairan yang *extrem* di tiga sungai Bangladesh, diduga menjadi salah satu faktor yang memengaruhi variasi morfometrik pada spesies *Sillaginopsis panijus*. Selain salinitas, parameter perairan lainnya seperti suhu, kekeruhan, arus, dan kedalaman air serta biologi perairan seperti ketersediaan makanan yang menyebabkan perbedaan habitat juga mungkin dapat dihubungkan dengan perbedaan morfologi suatu spesies diantara populasi (Allendorf 1988; Swain *et al.* 1991; Wimberger 1992).

KESIMPULAN

Analisis karakter morfologi dan genetik dengan menggunakan marka gen COI membuktikan bahwa belut sawah yang diambil dari empat populasi di Jawa Barat (Indramayu, Subang, Tasikmalaya, dan Garut) mengelompok ke dalam dua klaster berbeda. Klaster pertama terdiri atas populasi Indramayu dan Subang, klaster kedua terdiri atas populasi Tasikmalaya dan Garut. Pengelompokan tersebut menghantarkan pada dugaan bahwa sedikitnya ada dua spesies kriptik dari *M. albus* di Jawa Barat.

DAFTAR PUSTAKA

Abdurahman SW, Ambak MA, Sheriff SM, Mohamed SYAA, Chowdhury AJK. 2016. Morphological variations of plicofollis species (Siluriformes: Ariidae) in Peninsular Malaysia: An insight into truss network approach. *Sains Malaysiana*. 45(1): 1–7.

- Affandi R, Ernawati Y, Wahyudi S. 2003. Studi bioekologi belut sawah (*Monopterus albus*) pada berbagai ketinggian tempat di Kabupaten Subang, Jawa Barat. *Jurnal Iktiologi Indonesia*. 2(3): 49–55.
- Allendorf FW. 1988. Conservation biology of fishes. *Conservation Biology*. 2(2): 145–148. <http://doi.org/d7m7bc>
- Allen US. 2011. *Monopterus albus*. Invasive species compendium. CAB International, Wallingford Oxon (UK): OX10 8DE.
- Atif AB, Zahri MK, Esa AR, Zilfalil BA, Rao USM, Nordin S. 2015. Comparative analysis of the antibacterial, antifungal, antiproliferative and cyclic response element (CRE) induced expression of downstream luc gene activities of *Monopterus albus* and *Channa striatus* extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(1): 42–47.
- Arisuryanti T. 2016. Molecular genetic and taxonomic studies of the swamp eel (*Monopterus albus* Zuiw 1793). [Thesis]. Research Institute for the Environment and Livelihoods Charles. Australia (AU): Darwin University.
- [BPS] Badan Pusat Statistika. 2015. Produksi Perikanan Tangkap Indonesia menurut Provinsi dan subsektor (ton), 2000–2015. [Internet] [diunduh 2016 Juli 4]. Tersedia pada <https://www.bps.go.id/linkTabelStatis/view/id/1705>
- Bailey RM, Gans C. 1998. Two new Synbranchid fishes *Monopterus roseni* from Peninsular India and *Monopterus desilvai* from Sri Lanka. *Occasional Papers of the Museum of Zoology The University of Michigan*. 726: 1–18.
- Britz R, Lalremsanga HT, Lalrotluanga, Lalramliana. 2011. *Monopterus ichthyophoides*, a new species of scaled swamp eel (Teleostei: Synbranchiformes: Synbranchidae) from Mizoram, India. *Zootaxa*. 2936: 51–58.
- Britz R, Doherty-Bone TM, Kouete MT, Sykes D, Gower DJ. 2016. *Monopterus luticolus*, a new species of swamp eel from Cameroon (Teleostei: Synbranchidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 27(4): 309–323.
- Chaklader MR, Siddik MAB, Nahar A. 2015. Taxonomic diversity of paradise threadfin *Polynemus paradiseus* (Linnaeus, 1758) inhabiting southern coastal rivers in Bangladesh. *Sains Malaysia*. 44(9): 1241–1248. <http://doi.org/cgxh>
- Chen D, Chu W, He Y, Liang XF, Mai K. 2015. Characteristics and phylogenetic studies of complete mitochondrial DNA based on ricefield eel (*Monopterus albus*) from four different areas. *Journal Mitochondrial DNA Part A*. 27(4): 2419–2420. <http://doi.org/cgxj>
- Collins MT, Trexler JC, Nico LG, Rawlings TA. 2002. Genetic Diversity in a morphologically conservative invasive taxon: Multiple introductions of swamp eels to the Southeastern United States. *Conservation Biology*. 16(4): 1024–1035. <http://doi.org/chf8sd>
- Dahanukar N. 2010. *Monopterus cuchia*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015. 2. [Internet]. [diunduh 23 Agustus 2016]. Tersedia pada: <http://www.iucnredlist.org>
- Dahrudin H, Hutama A, Busson F, Sauri S, Hanner R, Keith P, Hadiaty R, Hubert N. 2016. Revisiting the ichthyodiversity of Java and Bali through DNA barcodes: Taxonomic coverage, identification accuracy, cryptic diversity and identification of exotic species. *Molecular Ecology Resources*. 17(2): 288–299. <http://doi.org/f9x5sx>
- [DJPB] Ditjen Perikanan Budi Daya. 2012. Belut, komoditas ekspor yang sudah dapat dibudidayakan. [diunduh 2012 Mei 13]. Tersedia pada <http://www.kkp.go.id>.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to conservation genetics*. England (UK): Cambridge University Press. <http://doi.org/cgxk>
- Gopi KC. 2002. A new synbranchid fish, *Monopterus digressus* from Kerala, Peninsular India. *Records of the Zoological Survey of India*. 100: 137–143.
- Hedrick PW. 2001. Conservation genetics: Where are we now?. *Trends in Ecology & Evolution*. 16(11): 629–636. <http://doi.org/dmkxmm>
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel, Palumbi SR. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*. 70(1): 273–290.
- Hossain MAR, Nahiduzzaman M, Saha D, Khanam MUH, Alam MS. 2010. Landmark-based morphometric and meristic variations of the endangered carp, *Kalibaus Labeo calbasu*, from stocks of two isolated rivers, the Jamuna and Halda, and a Hatchery. *Zoological Studies*. 49(4): 556–563.
- Hubert N, Hanner R, Holm E. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *Plos One*. 3: 1–8. <http://doi.org/c6sdhq>
- Ikram NMMN, Ridzwan BH. 2013. A preliminary screening of antifungal activities from skin mucus extract of Malaysian local swamp eel (*Monopterus albus*). *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 3(1): 1–8.
- Ho JKI, Ramchunder SJ, Memory A, Theng M, Tianjiao Li. 2016. *A guide to the freshwater fauna of nee soon swamp forest*. Singapore (SG): Tropical Marine Science Institute, National University of Singapore.
- Iskandariah, Soelistyowati DT, Gustiano R, Kusmini II, Huwoyon GH. 2015. Ragam genetik tiga populasi sepat siam (*Trichopodus pectoralis* Regan;

- Osphronemidae*) asal Kalimantan menggunakan analisis RAPD dan pengukuran morphometric truss. *Berita Biologi*. 14(1): 57–68.
- Kenchington E, Heino M. 2002. Maintenance of genetic diversity: challenges for management of marine resources. *International Council for the Exploration of the Sea*. Y: 13.
- Kottelat M. 2013. The fishes of inland waters of Southeast Asia: A catalogue and core bibliography of fishes known to occur in freshwaters, mangroves and estuaries. *The Raffles Bulletin of Zoology*. Supplement 27: 1–663.
- Kottelat M, Whitten AJ, Kartikasari SN, Wirjoatmojo S. 1993. *Freshwater fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. Hong Kong (HK): Periplus Editions Limited.
- Kusmini II, Gustiano R, Radona D, Prakoso VA, Putri FP, Prihadi TH. 2016. Karakterisasi fenotipe dan genotipe tiga populasi ikan tengadak, *Barbonymus schwanenfeldii*. *Jurnal Riset Akuakultur*. 11(3): 207–216. <http://doi.org/cgxm>
- Laudien J, Flint NS, Van Der Bank FH, Brey T. 2003. Genetic and morphological variation in four populations of the surf clam *Donax serra* (Röding) from southern African sandy beaches. *Biochemical Systematics, and Ecology*. 31(7): 751–772. <http://doi.org/c9dgd7>
- Liem KF. 1967. Functional morphology of the integumentary, respiratory, and digestive systems of the synbranchoid fish *Monopterus albus*. *Copeia*. 1967(2): 375–388. <http://doi.org/b7km24>
- Mabuchi K, Seno H, Suzuki T, Nishida M. 2005. Discovery of an ancient lineage of *Cyprinus carpio* from Lake Biwa, Central Japan, based on mtDNA sequence data, with reference to possible multipleorigins of koi. *Journal of Fish Biology*. 66(6): 1516–1528. <http://doi.org/bbq5vk>
- Matsumoto S, Kon T, Yamaguchi M, Takeshima H, Yamazaki Y, Mukai T, Kuriwa K, Kohda M, Nishida M. 2010. Cryptic diversification of the swamp eel *Monopterus albus* in East and Southeast Asia, with special reference to the Ryukyuan populations. *Ichthyological Research*. 57(1): 71–77. <http://doi.org/b8mgsv>
- Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. 2001. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: A case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 18(11): 1993–2009. <http://doi.org/fzhtjt>
- Miah MF, Ali H, Zannath E, Shuvra TM, Naser MN, Ahmed MK. 2015. Breeding biology and induced breeding status of freshwater mud eel, *Monopterusuchia*. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*. 9(6): 633–637.
- Mulyasari. 2009. Karakteristik fenotipe morfometrik dan keragaman genotipe RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) di Jawa Barat. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Mohaddasi M, Shabanipour N, Abdolmaleki S. 2013. Morphometric variation among four populations of Shemaya (*Alburnus chalcoides*) in the south of Caspian Sea using truss network. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 66(2): 87–92. <http://doi.org/cgxn>
- Nei M. 1972. Genetic Distance between populations. *The American Naturalist*. 106(949): 283–292. <http://doi.org/btq9xj>
- Nichols JT. 1943. *The freshwater fishes of China*. New York (US): The American Museum of Natural History.
- Osawa S, Su Z-H, Imura Y. 2004. *Molecular phylogeny and evolution of carabid ground beetles*. Tokyo (JP): Springer Japan. <http://doi.org/cpb47x>
- Palumbi SR. 1994. Genetic Divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 25: 547–572. <http://doi.org/cdjh25>
- Qonita Y. 2015. Keragaman morfometrik kerang gelatik (*Anadara pilula* Reeve 1843) di Pesisir Pulau Jawa. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Ratnasingham S, Hebert PDN. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the barcode index number (BIN) system. *Plos One*. 8(8): 66–213. <http://doi.org/f4966r>
- Rosen DE, Greenwood PH. 1976. A fourth neotropical species of synbranchid eel and the phylogeny and systematics of synbranchiform fishes. *American Museum of Natural History*. 157: 1–70.
- Seehausen O, Wagner CE. 2014. Speciation in Freshwater Fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. (45): 621–651. <http://doi.org/cgxp>
- Setijaningsih L, Arifin OZ, Gustiano R. 2007. Karakterisasi tiga strain ikan gurami (*Osphronemus gouramy* Lac.) berdasarkan metode truss morfomeriks. *Jurnal Ikhtologi Indonesia*. 7(1): 23–30.
- Siddik MAB, Hanif MA, Chaklader MR, Nahar A, Fotedar R. 2016. A multivariate morphometric investigation to delineate stock structure of gangetic whiting, *Sillaginopsis panijus* (Teleostei: Sillaginidae). *Springer Plus*. 5: 520. <http://doi.org/cgqx>
- Soewardi K. 2007. *Pengelolaan keragaman genetik sumber daya perikanan dan kelautan*. Departemen

- Manajemen Sumberdaya Perairan. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Solomon SG, Okomoda VT, Ogbenyikwu AI. 2015. Intraspecific morphological variation between cultured and wild *Clarias gariepinus* (Burchell) (Clariidae, Siluriformes). *Archives of Polish Fisheries*. 23(1): 53–61. <http://doi.org/cgxr>
- Swain DP, Riddell B, Murray C. 1991. Morphological differences between hatchery and wild populations of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Environmental versus genetic origin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 48(9): 1783–1791. <http://doi.org/fsqsjd>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Journal Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725–2729. <http://doi.org/5v5>
- Turan C, Yalcin S, Turan F, Okur E, Akyurt I. 2005. Morphometric comparisons of African catfish, *Clarias gariepinus* populations in Turkey. *Folia Zoologica*. 54: 165–172.
- Wijana IMS. 1999. Keragaman enzim dan morfologi belut, *Monopterus albus* Zuiew (Synbranchidea: Synbranchidae). [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Wimberger PH. 1992. Plasticity of fish body shape, the effects of diet, development, family and age in two species of *Geophagus* (Pisces: Cichlidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 45: 197–218. <http://doi.org/bz69r9>