

IDENTIFIKASI MOLEKULER SIRIP IKAN HIU MENGGUNAKAN GEN MITOKONDRIA *CYTOCHROME C OXYDASE SUBUNIT I (COI)* YANG DIDARATKAN DI PESISIR KABUPATEN BANGKA SELATAN

Siti Aisyah¹, Thania¹, Okto Supratman¹, Ahmad Fahrul Syarif² dan
Anggraeni³

¹Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Pertanian
Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung

²Jurusan Akuakultur, Fakultas Pertanian Perikanan dan Biologi,
Universitas Bangka Belitung

³Jurusan Biologi, Fakultas Pertanian Perikanan dan Biologi, Universitas
Bangka Belitung

Email: sitiaisyahsa057@gmail.com

ABSTRAK

Usaha perikanan hiu yang menjanjikan di negara Indonesia ini menjadikan nilai produksi hiu terus meningkat dari tahun ke tahun. Menurut catatan FAO, Indonesia berada diposisi teratas yang banyak memproduksi hiu setiap tahunnya. Tingginya aktivitas penangkapan hiu berpengaruh besar terhadap populasi yang memengaruhi keseimbangan ekosistem laut, khususnya di perairan Kepulauan Bangka Belitung. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengidentifikasi sirip ikan hiu secara molekuler dengan menggunakan gen mitokondria *cytochrome c oxydase subunit I (COI)* yang didaratkan di pesisir Kabupaten Bangka Selatan. Metode penelitian terdiri dari empat tahap: pengumpulan sampel sirip ikan hiu, identifikasi molekuler (mtDNA gen *Cytochrome Oxidase Subunit I/COI*), analisis filogenetik dan status konservasi ikan hiu. Hasil pencocokan karakter nukleotida gen COI dilakukan dengan menggunakan program BLAST yang terintegrasi pada laman GenBank dan menunjukkan bahwa kode sampel MSPUBB_HC_01 memiliki tingkat kemiripan 100% dengan spesies *Chiloscyllium punctatum*, MSPUBB_HK_02 dan MSPUBB_HS_03 masing-masing memiliki tingkat kemiripan 99.80% dan 99.69% dengan spesies *Carcharhinus sealei*. Jika ditinjau dari data IUCN Red List, spesies *Chiloscyllium punctatum* dan *Carcharhinus sealei* masuk dalam kategori *Near threatened* (Hampir Terancam).

Kata Kunci: Bangka Selatan, COI, Identifikasi Molekuler, Ikan Hiu

ABSTRACT

This valuable shark fishery business in Indonesia means the value of shark production continues to increase from year to year. According to FAO records, Indonesia is in the top position which produces a lot of sharks every year. The high activity of sharks has a major effect on the population which affects the balance of the sea, especially in the waters of the Bangka

*Belitung Islands. The purpose of this study was to molecularly identify shark fins using the mitochondrial cytochrome c oxydase subunit I (COI) gene landed on the coast of South Bangka Regency. The research method consisted of four stages: shark fin samples, molecular channels (mtDNA gene Cytochrome Oxidase Subunit 1 / COI), phylogenetic analysis and conservation status of sharks. The results of the COI gene nucleotide character codes were carried out using the integrated BLAST program on the GenBank page and showed that the MSPUBB_HC_01 sample code had a 100% similarity level with the *Chiloscyllium punctatum*, MSPUBB_HK_02 and MSPUBB_HS_03 species each having a 99.80% and 99.69% similarity level to the *Carcharhinus* species. When viewed from the IUCN Red List data, the species *Chiloscyllium punctatum* and *Carcharhinus sealei* are in the Near Threatened category.*

Keywords: South Bangka, COI, Molecular Identification, Shark

PENDAHULUAN

Ikan hiu sebagai salah satu jenis ikan bertulang rawan (*Elasmobranchii*), telah menjadi salah satu isu yang sedang hangat dibicarakan di dunia internasional. Kelompok ikan ini merupakan makhluk hidup yang unik, karena termasuk dalam salah satu jenis hewan purba yang masih hidup dan juga memiliki karakteristik yang berbeda dengan ikan-ikan bertulang sejati (Stevens *et al.*, 2000). Usaha perikanan hiu yang menjanjikan di negara Indonesia ini menjadikan nilai produksi hiu terus meningkat dari tahun ke tahun. Menurut catatan FAO, Indonesia berada diposisi teratas yang banyak memproduksi hiu setiap tahunnya (Stevens *et al.*, 2000; Traffic, 2002). Tingginya aktivitas penangkapan hiu berpengaruh besar terhadap populasi secara lokal maupun nasional, yang memengaruhi keseimbangan ekosistem laut. Hal tersebut didukung dengan siklus hidup hiu yang panjang serta kemampuan reproduksi hiu yang rendah mengakibatkan over eksploitasi sumberdaya ikan hiu dan rawan terhadap ancaman kepunahan (Fahmi dan Dharmadi, 2005). Saat ini, jumlah populasi hiu di Indonesia tengah mengalami penurunan. Menurut data Kementerian Kelautan dan Perikanan tahun 2016, Indonesia merupakan negara produsen hiu terbesar di dunia, dengan kontribusi sebesar 16,8% dari total tangkapan dunia. Selain itu, penurunan populasi hiu juga terjadi akibat eksploitasi berlebihan yang didorong oleh tingginya permintaan akan produk-produk satwa tersebut seperti sirip dan daging yang diolah menjadi menu makanan. Pada tahun 2014-2016, WWF-Indonesia menemukan fakta bahwa beberapa restoran dan hotel di Jakarta dapat menghidangkan sekitar 12.622 kg sirip hiu dalam kurun waktu satu tahun (WWF, 2018).

Terbatasnya informasi basis data yang berhubungan dengan ikan hiu menurunkan pengawasan ataupun peraturan yang mengatur jumlah tangkapan produksi dan ukuran layak tangkap. Sehingga kondisi ini dikhawatirkan berdampak terhadap kelangsungan hidup hiu di Indonesia khususnya di Perairan Kabupaten Bangka Selatan. Salah satu basis data penting yang harus dilakukan yaitu identifikasi akurat untuk spesies ikan hiu

yang didaratkan di Kabupaten Bangka Selatan sebagai acuan dalam penentuan status konservasi dan hal tersebut menjadi langkah dasar yang dapat diambil untuk meningkatkan efektivitas manajemen strategi konservasi dan pengelolaan hiu di Kepulauan Bangka Belitung.

Identifikasi konvensional umumnya sulit dilakukan pada sampel sirip ikan hiu karena tidak dapat diamati secara utuh pada morfologinya, sehingga metode identifikasi molekuler dapat membantu proses identifikasi karena hanya membutuhkan sedikit jaringan tubuh dari ikan hiu tersebut. Gen pengkode protein yang digunakan untuk identifikasi spesies adalah gen *Cytochrome c oxidase subunit I* (COI). COI merupakan sekuen gen pendek yang dipilih diantara banyaknya gen yang digunakan sebagai gen standar identifikasi khusus untuk spesies hewan berbasis DNA *barcode* (Zein, 2007). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi sirip ikan hiu secara molekuler dengan menggunakan gen mitokondria COI dan penentuan status konservasinya untuk keberlanjutan pengelolaan hiu terutama di Kepulauan Bangka Belitung.

MATERI DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli – November 2020. Pengambilan sampel sirip ikan hiu diambil dari sumber pendaratan yang potensial di pesisir Kabupaten Bangka Selatan. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil sebagian kecil potongan organ tubuh sirip hiu tersebut untuk selanjutnya dilakukan proses identifikasi dan analisis molekuler di laboratorium.

Identifikasi Molekuler

Identifikasi molekuler dimulai pada proses destruksi jaringan dan purifikasi DNA sirip hiu. Ekstraksi dan purifikasi DNA menggunakan kolom silika yang terdiri dari 4 tahap, diantaranya *lysis*, *binding*, *washing* dan *elution* dengan mengikuti prosedur *DNeasy Blood and Tissue Kit*. Bagian dari tubuh ikan yang akan diekstraksi, yaitu potongan daging dengan berat 5-10 mg. Amplifikasi gen COI (*Cytochrome c Oxidase Subunit I*) menggunakan primer forward FishF2_t1 dan primer reverse FishR2_t1 (Ward *et al.*, 2005). DNA amplifikasi melalui perlakuan temperatur denaturasi awal pada suhu 95°C selama 1 menit, denaturasi pada 95°C selama 15 detik, *annealing* pada 48-54°C selama 15 detik, dan *extension* pada 72°C selama 10 detik (35 siklus), dan *final extension* pada 72°C selama 10 menit (Eugene *et al.*, 2009).

Campuran bahan yang digunakan adalah GoTaq®Green Master Mix (25-50 µl), primer forward (0,5-5 µl), primer reverse (0,5-5 µl), ekstrak DNA (1-5 µl), dan *Nuclease-Free Water* (50 µl). Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam *ependorf* kemudian di *running* sesuai dengan perlakuan suhu di atas. Selanjutnya proses elektroforesis yang merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik yang

digunakan untuk pemisahan makromolekul (seperti protein dan asam nukleat) (Fatchiyah *et al.*, 2011) menggunakan gel agarose 1 %. Proses sekuensing DNA dilakukan untuk analisis sekuens DNA ampikon hasil PCR dengan *automated DNA sequencer* setelah dilakukan purifikasi terlebih dahulu dan dilakukan tahap *cycle sequencing* menggunakan *kit* Big Dye Terminator^R v3.1 (*Applied Biosystem*). Hasil dari sekuensing dilakukan homologi BLAST dengan memasukkan kode genetik ke dalam GenBank.

Penyusunan DNA Consensus

Penyusunan DNA *consensus* menggunakan *software* MEGA X, yang meliputi; proses *trimming*, *reverse compliment* dan *alignment*. Proses *alignment* dilakukan dengan bantuan *software* MEGA X (Tamura *et al.*, 2013). Sekuens yang telah melalui proses *alignment*, selanjutnya dicocokkan ke database nukleotida yang terdapat pada situs database nukleotida secara online, yaitu situs GenBank *National Center for Biotechnology Information*. Sekuens DNA *consensus* dicocokkan ke database genbank dengan menggunakan fasilitas *nucleotida blast* yang terintegrasi di laman GenBank (Claveire dan Notredame, 2003).

Analisis Filogenetik

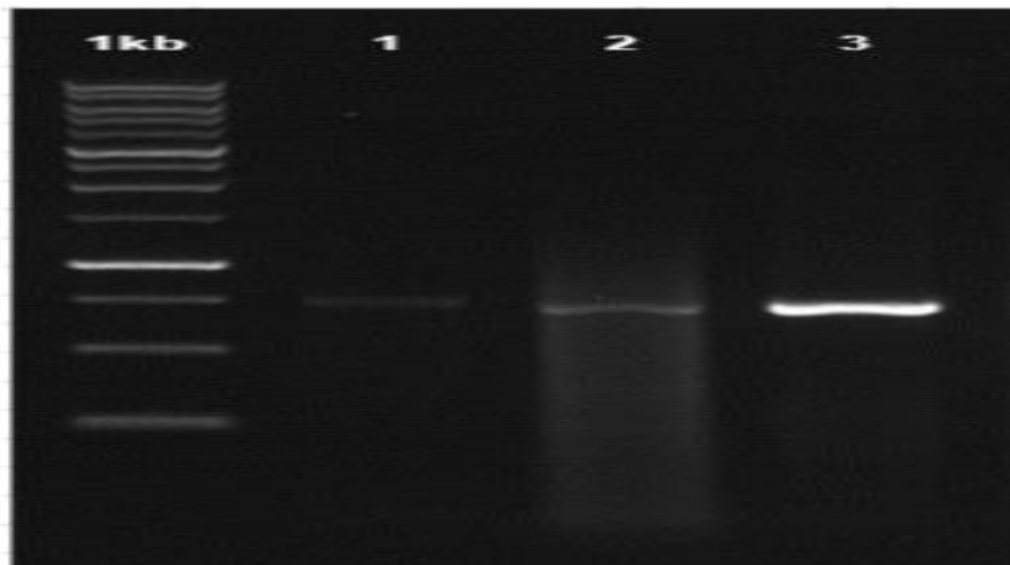
Filogenetik molekuler merupakan studi hubungan evolusioner antar organisme dengan menggunakan data molekuler berupa urutan nukleotida atau asam amino (Gaur and Li, 2000). Studi filogenetik bertujuan untuk rekonstruksi hubungan kekerabatan antara organisme (Aprilyanto dan Sembiring, 2016). Berdasarkan analisis, sekuen yang mempunyai kedekatan dapat diidentifikasi dengan menempati cabang yang bertetangga pada pohon. Ketika keluarga gen ditemukan dalam organisme atau kelompok organisme, hubungan filogenetika diantara gen dapat memprediksikan kemungkinan yang satu mempunyai fungsi yang ekuivalen (Mcdonald dan Kreitman, 1991; Nielsen dan Yang, 1998).

Penentuan Status Konservasi

Hasil yang diperoleh dari identifikasi molekuler dianalisis status konservasinya dengan menggunakan IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*). Tujuan didirikannya IUCN adalah untuk membantu komunitas di seluruh dunia dalam konservasi alam. Kategori status IUCN *Red List* merupakan kategori yang digunakan oleh IUCN dalam melakukan klasifikasi terhadap spesies-spesies berbagai makhluk hidup yang terancam kepunahan. Penentuan status konservasi ikan Pari Hiu yang didapatkan pada penelitian ini adalah mengacu pada Pedoman Daftar Merah (*Red List*) IUCN.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel sirip hiu didapatkan dari sumber pendaratan ikan yang potensial di pesisir Kabupaten Bangka Selatan. Sampel sirip ikan hiu yang diambil hanya sebagian kecil potongan organ sirip hiu tersebut, kemudian sampel yang diperoleh dibawa ke laboratorium untuk diidentifikasi secara molekuler. Hasil PCR dan elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA pada masing-masing lintasan sampel DNA ikan hiu yang teramati pada posisi panjang ampikon sekitar 600-700 bp dengan menggunakan ukuran 1 kb DNA *ladder* sebagai pembanding (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil visualisasi amplifikasi gen COI sampel sirip hiu dengan gel agarose 1%

Keterangan:

- 1 = Kode sampel MSPUBB_HC_01
- 2 = Kode sampel MSPUBB_HK_02
- 3 = Kode sampel MSPUBB_HS_03

Hasil Sekuensing DNA Ikan Hiu

Hasil sekuensing tiga sampel sirip ikan hiu diperoleh susunan basa 649 - 681 (Tabel 1).

Tabel 1. Susunan Basa Ikan Hiu

Kode sampel: MSPUBB_HC_01 = 681 susunan basa
CCTCATTATCTTTGGTGCATGAGCAGGAATAGTAGGTATAGCTCTTAGCCTT
TTAATCCGCGCTGAATTAAGTCAACCTGGATCCCTTCTAGGTGATGATCAGA
TTTATAATGTAATCGTAACAGCCCATGCTTTTGTAAATAATTTCTTTATAGTAA
TGCCTGTAATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTAGTACCCCTAATAATTGG

TGCGCCTGATATAGCCTTTCTCGAATAAATAATATAAGCTTTTGATTACTTC
CTCCTTCATTCTATTACTTTTAGCCTCTGCAGGAGTTGAAGCCGGAGCAG
GAACAGGGTGAACCTGTTTACCCACCTTTAGCAGGTAATTTAGCCACGCAG
GAGCATCAGTTGATTAACTATTTTCTCCTTACACTTAGCAGGAATTTTCATCA
ATCCTAGCCTCTATCAATTTTCATCACAACCATTATCAATATAAAACCACCAGC
CATTTCTCAATATCAAACACCCTTATTTGTATGATCAATTCTTGTAACCTACCA
TCCTTCTACTTCTTTCATTACCAGTTCTAGCAGCAGGTATTACTATATTACTT
ACAGATCGAAACCTAAATACAACATTCTTTGATCCAGCAGGAGGAGGCGAT
CCTATTTTATATCAACACCTATTCTGATTCTTTGGCCACCAAGAAAGTCTAAA

Kode sampel: MSPUBB_HK_02 = 649 susunan basa

CTCGTGAACGCACTCACCTCTATATTCGAGCTGCCATTGACCCATCAGGA
TATCTGTTACGAGATGGTGAAAATTGTCAGGATCTTTGCAAGAACCATGCAT
TGATTCTTTGGCCACCCATAATTCTAACAATCATAATTGGTGGTTTCGGAAA
CTGATTAATTCCTTTAATAATTGGTGCACCAGATATAGCCTTCCCACGAATA
AATAACATAAGCTTCTGACTTCTCCCACCATCATTTCTTCTTCTCCTTGCTC
TGCTGGAGTAGAAGCTGGAGCAGGTACTGGTTGAACAGTCTACCCTCCACT
AGCTAGCAATCTAGCACATGCCGACCCTGTTGATTAGCTATTTTCTCC
CTTCATTTAGCCGGTGTTTCATCAATTTTAGCTTCAATTAATTTTATTACAAC
CATTATTAACATAAAACCACCAGCTATCTCCAATACCAAACACCATTATTTG
TTTGATCTATTCTTGTAACCACTATTCTTCTTCTCCTCTCACTTCCAGTTCTT
GCAGCAGGGATTACAATATTACTTACAGATCGTAACCTTAATACTACATTCT
TTGATCCTGCAGGTGGAGGAGACCCAATCCTTTACCAACATTTATTTTGATT
CTTTGGCCACCCAGAAAGTCTAA

Kode sampel: MSPUBB_HS_03 = 680 susunan basa

CCTTTCTGATTTTGGTGCATGAGCAGGTATAGTCGGAACAGCCCTAAGTCT
CCTAATTCGAGCTGAACTTGGACAACCTGGATCACTGTTAGGAGATGATCA
GATTTATAATGTAATCGTAACCGCCCATGCTTTCGTAATAATCTTTTTCATGG
TCATACCAATCATAATTGGTGGTTTCGGAAACTGATTAATTCCTTTAATAATT
GGTGCACCAGATATAGCCTTCCCACGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTC
TCCCACCATCATTTCTTCTTCTCCTTGCTGCTGGAGTAGAAGCTGGAG
CAGGTACTGGTTGAACAGTCTACCCTCCACTAGCTAGCAATCTAGCACATG
CCGGACCATCTGTTGATTAGCTATTTTCTCCCTTCATTTAGCCGGTGTTTC
ATCAATTTTAGCTTCAATTAATTTTATTACAACCATTATTAACATAAAACCACC
AGCTATCTCCAATACCAAACACCATTATTTGTTTGATCTATTCTTGTAACCA
CTATTCTTCTTCTCCTCTCACTTCCAGTTCTTGCAGCAGGGATTACAATATTA
CTTACAGATCGTAACCTTAATACTACATTCTTTGATCCTGCAGGTGGAGGAG
ACCAATCCTTTACCAACATTTATTTTGATTCTTTGGCCACCAGAAAGTCTAA
A

Hasil sekuensing berupa urutan basa dianalisis menggunakan database GenBank yang berada di bawah NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Database tersebut merupakan database primer yang menampung semua urutan DNA yang didepositkan oleh para peneliti dari seluruh dunia. Teknik pencarian berdasarkan kekerabatan antar data menggunakan program pencari yang terdapat dalam database tersebut. Dua program yang banyak digunakan adalah *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dan FASTA. Dari program tersebut diperoleh bahwa sekuensing sampel sirip ikan hiu dengan kode sampel MSPUBB_HC_01 memiliki tingkat kemiripan 100% dengan spesies *Chiloscyllium punctatum*,

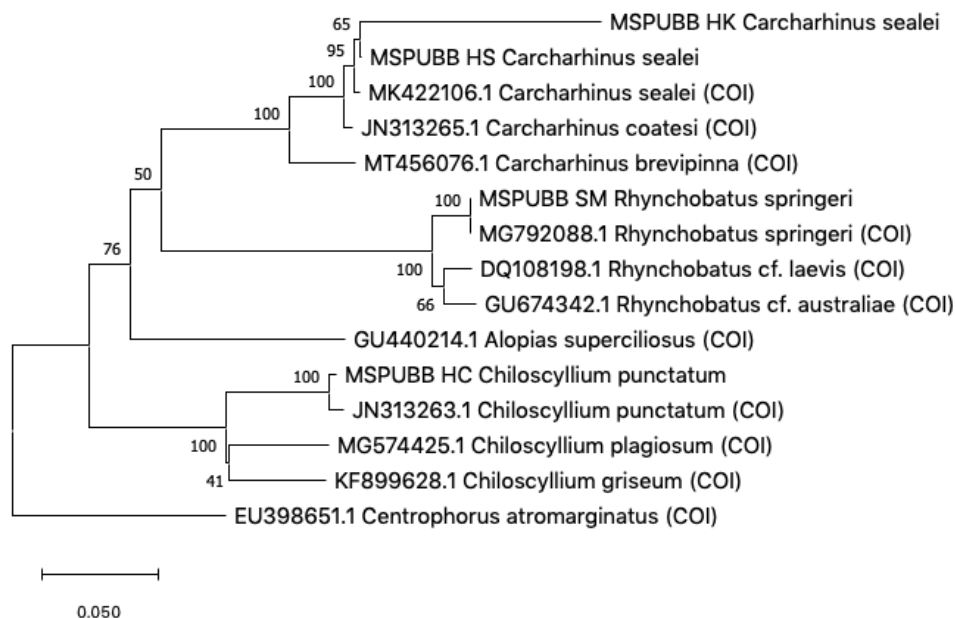
MSPUBB_HK_02 dan MSPUBB_HS_03 masing-masing memiliki tingkat kemiripan 99.80% dan 99.69% dengan spesies *Carcharhinus sealei* (Tabel 2).

Tabel 2. Nama Spesies dan Persentase *similarity*

Kode Sampel	Spesies	% Query Cover	% Per Ident
MSPUBB_HC_01	<i>Chiloscyllium punctatum</i>	94	100
MSPUBB_HK_02	<i>Carcharhinus sealei</i>	76	99.80
MSPUBB_HS_03	<i>Carcharhinus sealei</i>	95	99.69

Analisis Filogenetik

Hasil analisis pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbour-joining tree*. Rekonstruksi tersebut menunjukkan bahwa hiu yang didaratkan di Kepulauan Bangka Belitung terbagi ke dalam 2 famili yaitu Hemiscylliidae dan Carcharhinidae sehingga membentuk 2 kelompok (*Cluster*) sesuai dengan familinya. Pohon filogenetik memperlihatkan bahwa hasil analisis BLAST sesuai dengan karakteristik cabang yang dibentuk oleh pohon filogenetik. Semakin banyak urutan nukleotida (sekuen) yang sama maka nilai similaritasnya akan semakin tinggi sehingga posisinya di dalam percabangan pohon filogenetik akan semakin berdekatan (Rahmad, 2013).



Gambar 2. Pohon filogenetik sampel ikan hiu yang didaratkan di Kabupaten Bangka Selatan

Konstruksi pohon filogenetik ikan hiu menunjukkan bahwa kelompok pertama ditempati oleh famili Carcharhinidae dengan spesies *Carcharhinus sealei*. Hiu jenis *Carcharhinus sealei* terletak pada satu cabang pohon sehingga memiliki hubungan kekerabatan yang tinggi dengan nomor kode akses pada *GenBank* MK422106.1 dan kelompok kedua yaitu family Hemiscyllidae yaitu hiu dengan jenis *Chiloscyllium punctatum*. Hiu jenis *Chiloscyllium punctatum* terletak pada satu cabang pohon karena memiliki sekuen yang sama sehingga memiliki hubungan kekerabatan yang tinggi dengan nomor kode akses pada *GenBank* JN313263.1.

The evolutionary relationships of taxa dianalisis dengan menggunakan metode *Neighbour-joining* (Saitou dan Nei, 1987). Pohon optimal dengan panjang cabang yang ditampilkan = 0.83346556. Persentase pohon replikasi dimana setiap taksa yang terkait akan berkelompok (*cluster*) dalam tes bootstrap 1000 ulangan yang ditampilkan di sebelah cabang (Felsenstein, 1985). Jarak evolusi dihitung dengan menggunakan metode Kimura 2-parameter (Kimura M. 1980) dan berada dalam unit jumlah substitusi dasar per-site. Ada sekitar 635 posisi dalam dataset terakhir. Analisis evolusi ini dilakukan dengan menggunakan MEGA X (Kumar, et al., 2018; Stecher, et al., 2020).

Status Konservasi

Berdasarkan status konservasinya, spesies *Chiloscyllium punctatum* masuk dalam kategori *Near threatened* (Hampir Terancam) (Dudgeon et al., 2016), begitu pula dengan spesies *Carcharhinus sealei* yang masuk dalam kategori *Near threatened* (Hampir Terancam) (White, 2003). Status konservasi tersebut ditentukan oleh badan internasional IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) yang fokus pada usaha konservasi hiu dan pari (Elasmobranchii). Kategori Hampir Terancam (*Near threatened*) diberikan kepada jenis yang diyakini akan terancam keberadaannya di masa mendatang, dan apabila tidak ada usaha pengelolaan terhadap jenis tersebut.

Melihat peningkatan status konservasi untuk ikan hiu, maka perlu dilakukannya konservasi dan pengelolaan yang spesifik. Pengelolaan tersebut tidak dapat dilakukan oleh satu institusi saja melainkan kerjasama dengan berbagai pihak menggunakan pendekatan *co-management*. Pendekatan *co-management* mewajibkan pemerintah membuat regulasi yang lebih ketat dalam teknis pengelolannya. Disisi lain, perlu adanya sosialisasi terhadap pihak swasta agar mengurangi tingkat permintaan konsumsi sirip ikan hiu atau sosialisasi dengan melarang menjual sup sirip ikan hiu. Sedangkan masyarakat perlu secara bertahap ditingkatkan kesadarannya untuk tidak menangkap ikan hiu ataupun siripnya, tetapi tetap didorong untuk meningkatkan konsumsi jenis ikan lainnya yang tetap tergolong ekonomis penting. Semua upaya ini harapannya dapat memberikan kontribusi dalam mempertahankan keberlangsungan populasi Ikan hiu di perairan.

KESIMPULAN

Hasil pencocokan karakter nukleotida gen COI dilakukan dengan menggunakan program BLAST yang terintegrasi pada laman GenBank dan menunjukkan bahwa sampel sirip ikan hiu dengan kode sampel MSPUBB_HC_01 memiliki tingkat kemiripan 100% dengan spesies *Chiloscyllium punctatum*, MSPUBB_HK_02 dan MSPUBB_HS_03 masing-masing memiliki tingkat kemiripan 99.80% dan 99.69% dengan spesies *Carcharhinus sealei*. Berdasarkan status konservasinya, spesies *Chiloscyllium punctatum* dan *Carcharhinus sealei* masuk dalam kategori *Near threatened* (Hampir Terancam).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Hibah Penelitian Dosen Pemula Tahun 2020, Kementerian Riset dan Teknologi BRIN Republik Indonesia. Ucapan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) dan Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan Universitas Bangka Belitung.

DAFTAR PUSTAKA

- Aprilyanto V dan Sembiring L. 2016. Filogenetika Molekuler: Teori dan aplikasi. Innosain, Yogyakarta. 212 hlm.
- Claveire J.M., and C. Notredame. 2003. *Bioinformatics for Dummies*. Wiley Publishing, Indianapolis.
- Dudgeon C.L., Bennett, M.B. & Kyne, P.M. 2016. *Chiloscyllium punctatum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T41872A68616745. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T41872A68616745.en>.
- Eugene, H.K.W., Mahmood, S.S., and Robert, H. H. 2009. Identifying Sharks with DNA Barcodes: Assessing the Utility of a Nucleotide Diagnostic Approach. *Molecular Ecology Resources* (Suppl. 1), doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02653.x. 243–256.
- Fahmi dan Dharmadi. 2005. Status perikanan hiu dan aspek pengelolaannya. *Oseana*, xxx (1):1-8.
- Fatchiyah, Estri, L. A., Sri, W., dan Sri, R. 2011. *Biologi Molekular – Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga, Jakarta. 8-48.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Graur D and Li W. H. 1991. *Fundamentals of molecular evolution* 2nd

Edition. USA, Sinauer Associates Publication.

- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.
- McDonald J.H., and M. Kreitman. 1991. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature*. 351: 652 – 654.
- Nielsen R., and Z. Yang. 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and application to the HIV-1 envelope gene. *Genetics*. 148: 929 – 936.
- Rahmad. 2013. Taksonomi Molekuler DNA Barcoding dan Analisis Filogenetik Ikan Hiu di Pelabuhan Perikanan Palabuhanratu Berdasarkan Marka Mitokondria. [Skripsi]. Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- Stecher G., Tamura K., and Kumar S. 2020. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution* (<https://doi.org/10.1093/molbev/msz312>).
- Stevens, J.D., Bonfil, R., Dulvy, N.K., and Walker, P.A. 2000. The Effects of Fishing on Sharks, Rays and Chimaeras (Chondrichthyans), and the Implications for Marine Ecosystem. *ICES Journal of Marine Science*, 57:476-494.
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. [Computer software]. *Molecular Biology and Evolution*. 30:2725-2729.
- Traffic. 2002. A CITES Priorities: Sharks and the Twelfth Meeting of the Conference of the Parties to CITES, Santiago Chile. IUCN and TRAFFIC Briefing document, page 2. (Online) Available at: <http://www.traffic.org/news/SharksCoP12>.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., and Hebert P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*.

White, W.T. (SSG Australia & Oceania Regional Workshop, March 2003).2003.*Carcharhinus sealei*. *The IUCN Red List of Threatened Species*2003:e.T41738A10551361.<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2003.RLTS.T41738A10551361.en>.

World Wild Life. 2018. Shark Species. <https://www.worldwildlife.org/species/shark>.

Zein, M.S.A. 2007. *DNA barcode keragaman genetic, dan konservasi fauna Indonesia*. Laboratorium genetika bidang zoology pusat peneliti biologi LIPI. 70 hal.