

**Analisis sekuen mtDNA COI Pari Total Biru yang didaratkan
di Tempat Pendaratan Ikan Kota Tarakan**

Syamsidar Gaffar¹, Sumarlin^{*2}

¹Prodi Manajemen Sumberdaya Perikanan, FPIK Universitas Borneo Tarakan

²Prodi Teknologi Hasil Perikanan, FPIK Universitas Borneo Tarakan

*email: sumarlin@borneo.ac.id

ABSTRAK

Identifikasi spesies berbasis sekuen mtDNA COI telah diaplikasikan ke berbagai tujuan, termasuk untuk melindungi biodiversitas dan eksploitasi sumberdaya ikan yang berlebihan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis kualitas sekuen gen mtDNA COI pari total biru yang diperoleh dari tempat pendaratan ikan di Kota Tarakan. Hasil PCR mtDNA sampel diperoleh 456.1 ng/ μ L dengan rasio $A_{260/280}$ yaitu 1.93 dan pita tunggal dengan ukuran sekitar 700 bp. Proses sekuensing dilakukan dengan metode *bi-directional sequencing*. Hasil sekuensing tersebut dianalisis dengan menggunakan aplikasi *sequence scanner v.2.0* dan diperoleh data persentase *pure base* kategori rendah (low) dan sedang (medium) melebihi 10% yang menjelaskan sekuen konsensus berkualitas rendah. Hasil ini berkorelasi dengan analisis BLAST yang menunjukkan perolehan parameter *query cover* hanya sebesar 23% saja. Meskipun nilai kemiripan sekuen sampel dengan *Neotrygon kuhlii* voucher BW-A2578 sebesar 98.28%, hasil ini memiliki validitas yang rendah karena tidak didukung dengan nilai *query cover* yang memadai.

Kata Kunci: pari total biru, Neotrygon kuhlii, sekuen mtDNA COI, query cover, BLAST

ABSTRACT

Species identification based on mtDNA COI sequences has been applied for various purposes, including protecting biodiversity and over-exploitation of fish resources. This study aimed to analyze the quality of the mtDNA COI gene sequence of blue-spotted stingray obtained from fish landing site in Tarakan City. The PCR mtDNA samples obtained 456.1 ng/ μ L with an $A_{260/280}$ ratio of 1.93 and a single band with a size of about 700 bp. The sequencing process was carried out using the bi-directional sequencing method, and the results were analyzed using the sequence scanner v.2.0 program. The pure base percentage was 10% for low and medium indicators explains the consensus sequence has poor quality. This result correlates with the BLAST analysis, which shows that the query cover is only 23%. Although the sample sequence's similarity value with *Neotrygon kuhlii* voucher BW-A2578 is 98.28%, this result has low validity due to the mediocre query cover value.

Keywords: blue-spotted stingray, Neotrygon kuhlii, mtDNA COI sequence, query cover, BLAST

PENDAHULUAN

Jumlah spesies yang punah dari alam dalam beberapa dekade terakhir mengalami peningkatan yang semakin mengkhawatirkan, baik pengaruh dari perubahan iklim global, rusaknya habitat, ataupun eksploitasi yang berlebihan. Tercatat, terjadi peningkatan rata-rata tahunan kepunahan spesies dari satu spesies/satu juta hingga 1000 spesies/satu juta dari perkiraan dua juta spesies tumbuhan dan hewan yang teridentifikasi, sementara perkiraan total taksa hewan berkisar dari 5 sampai 50 juta, di luar dari sepuluh juta mikroorganisme (Hebert et al. 2003). Banyaknya spesies yang punah sebelum diidentifikasi dari habitat alaminya mendorong para peneliti untuk terus berupaya melestarikan keanekaragaman spesies, salah satunya melalui pengidentifikasian spesies secara akurat.

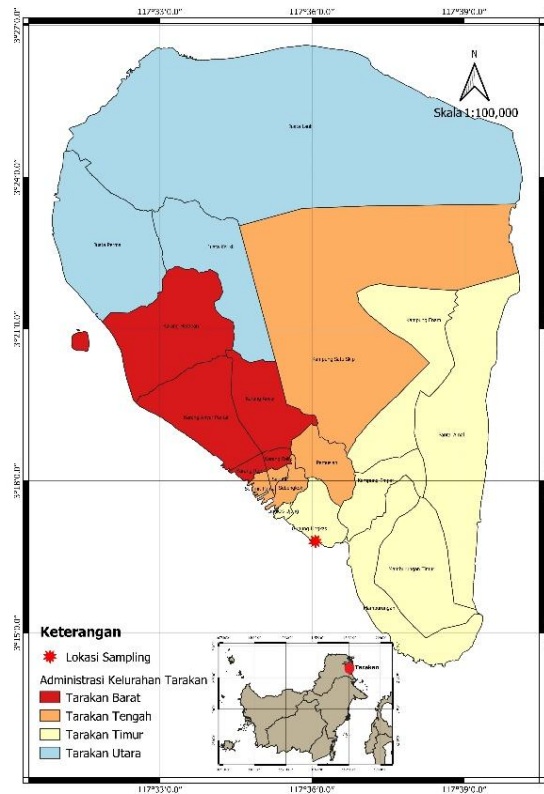
Spesies perairan yang berkerabat dekat banyak yang memiliki kesamaan dan karakter morfologi yang saling tumpang tindih dan sulit untuk dibedakan, terlebih jika identifikasi dilakukan oleh bukan ahli taksonomi. Tantangan yang biasa ditemukan pada Elasmobranchii, seperti karakter morfologi *cryptic* yang tumpang tindih dan kompleksitas spesies, misal dari pola warna ontogenetik atau variasi yang dimiliki bersama di antara taksa yang berkerabat dekat (Cerutti-Pereyra et al. 2012). Kesulitan-kesulitan tersebut menyebabkan sering terjadi kesalahan identifikasi dan akhirnya berimplikasi pada konservasi dan pengelolaan perikanan yang kurang tepat. Oleh karena itu, identifikasi spesies berbasis DNA ditawarkan sebagai solusi akurat penyelesaian hal tersebut.

Identifikasi secara molekuler, misalnya menggunakan penanda molekuler untuk otentikasi spesies, saat ini telah banyak digunakan. Awalnya, pendekatan ini menggunakan penanda protein, tetapi sekarang lebih bergantung pada DNA mitokondria (mtDNA). Kevalidan metode DNA barcoding menggunakan analisis sekuen mtDNA COI (Cytochrome c Oxidase subunit I) pada spesies pari telah ditunjukkan melalui penelitian dari Taiwan (Chang et al. 2017), Indonesia (Madduppa et al. 2016; Borsa et al. 2018), Australia (Ward et al. 2008), India (Bineesh et al. 2017), dan dari lokasi lainnya (Cerutti-Pereyra et al. 2012; Toffoli et al. 2008). Meskipun penelitian identifikasi berbasis sekuen mtDNA COI pari totol biru juga telah dilakukan di beberapa perairan di Indonesia, hingga saat ini belum ada laporan dari perairan Kalimantan Utara (Tarakan). Padahal, terdapat lokasi pendaratan ikan di Kota Tarakan yang masih memperjualbelikan pari totol biru secara bebas tanpa diidentifikasi secara akurat sehingga belum diketahui pasti apakah pari yang diperdagangkan tersebut masuk kategori dilindungi atau masih bebas untuk ditangkap.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama tiga bulan, pada Mei hingga November 2020 di Tarakan, Kalimantan Utara. Lokasi pengambilan sampel ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Lokasi Penelitian

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vortex, mikrosentrifus, *Biofuge Primo R Centrifuge*, *heating block*, forceps, mikropipet, tip pipet, *thermo cycler*, horizontal elektroforesis (Power Pac Basic™, USA), Spektrofotometer UV- Vis (Pharmacia Biotech), kalkulator, alat tulis, timbangan, alat-alat gelas, serta perangkat lunak Mega X, Seq Scanner 2 dan Bio Edit.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel jaringan otot ikan pari total biru, alkohol 70%, kloroform, aseton, kit *ZR Tissue & Insect DNA miniprep™*, MyTaq HS Red Mix (Bioline), primer, Agarosa, buffer Tris-EDTA (TE) pH 8, Tris-Borat-EDTA (TBE) 1x, marker 100 pb (Invitrogen), etidium bromide, *loading dye*, serta *low mass leader*.

Metode

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA

Ekstraksi DNA berasal dari potongan kecil tubuh ikan pari total biru. Proses pencucian alkohol pengawet dilakukan dengan merendam sekitar 10 gr potongan otot dalam etanol 70%. Proses ekstraksi DNA sampel mengikut petunjuk *ZR Tissue & Insect DNA miniprep™* (Zymo Research, D6016). Proses amplifikasi PCR menggunakan kit MyTaq HS Red Mix (Bioline) dengan komposisi: ddH₂O 9.5 µL, MyTaq Red Mix 2x 12.5 µL, dan primer masing-masing 10 µM menggunakan 4 primer cocktail berdasarkan *Canadian Center for DNA Barcoding* (CCDB), 2006 (Tabel 1).

Tabel 1. Primer cocktail rekomendasi Canadian Center for DNA Barcoding (CCDB), 2006

	Primer	Sekuen
Forward	VF2_t1	TGTAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
	FishF2_t1	TGTAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Reverse	FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA
	FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAAYCARAA

Amplifikasi mtDNA COI menggunakan mesin PCR *Agilent Surecycler* 8800 dengan pengaturan suhu sebagai berikut: predenaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 detik dilakukan sebanyak 35 siklus, annealing pada suhu 52 °C selama 15 detik dan dilakua sebanyak 35 siklus, elongasi pada suhu 72 °C selama 45 detik sebanyak 35 siklus dan satu siklus perpanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 2 menit kemudian didiamkan pada suhu 4 °C selama 5 menit. Produk PCR dianalisis menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1% b/v dengan mengambil 3 µL sampel hasil PCR dan 3 µL DNA ladder 100 pb dimasukkan ke dalam sumur yang terbentuk dari sisir yang dijalankan dalam buffer TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) 1x pada tegangan 120 V selama 20 menit yang dilanjutkan dengan visualisasi pada alat UV Transiluminator (Gel Doc) (Sulistiowati et al. 2020)

Penentuan urutan sekuen dan analisis mtDNA COI sampel

Sampel yang telah diamplifikasi dengan metode PCR, disekuensing untuk memperoleh urutan nukleotidanya. Proses

sekuensing menggunakan jasa perusahaan genetic yaitu 1st Singapore. Data DNA hasil sekuen gen *COI* pari dalam bentuk kromatogram divisualisasikan menggunakan aplikasi *SeqScanner* v.2.0 untuk mengetahui kualitas sekuen dan dianalisis menggunakan MEGA versi X (Tamura et al. 2018). Selanjutnya sekuen konsensus yang diperoleh dianalisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yaitu membandingkan sekuen mtDNA COI sampel dengan database sekuen DNA yang terdapat Bank gen NCBI dengan mengakses www.blast.ncbi.nlm.nih.gov

Sekuen yang paling mirip dicirikan dengan nilai *Max Score* dan *Total Score* sama, *Query Coverage* mendekati 100%, *E-value* mendekati 0, dan *Ident* mendekati 100% pada setiap database (Tindi et al. 2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel penelitian ini adalah pari totol biru (Gambar 2.A), jaringan otot diambil dan dihancurkan untuk proses ekstraksi DNA. Hasil kuantifikasi ekstrak DNA sampel ditunjukkan pada Tabel 2.

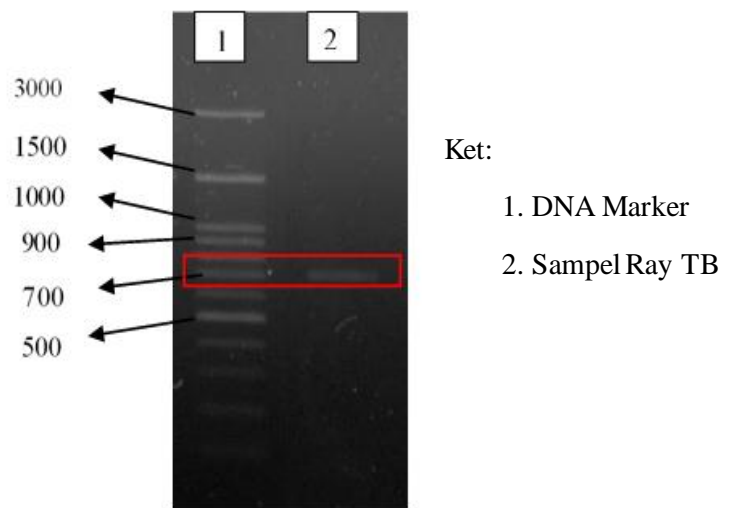
Tabel 2. Kuantifikasi ekstrak DNA sampel

Nama Sampel	Konsentrasi (ng/µL)	A _{260/280}	A _{260/230}
Ray-TB	456.1	1.93	2.26

Tingkat kemurnian ekstrak DNA dapat dijelaskan dari nilai rasio $A_{260/280}$ pada rentang 1.8 – 2.0. Tabel 2 menunjukkan bahwa rasio $A_{260/280}$ sampel sebesar 1.93. Nilai ini menunjukkan bahwa ekstrak DNA sampel yang diperoleh memiliki kemurnian yang tinggi. Dengan nilai konsentrasi ekstrak DNA yang diperoleh $\geq 5\text{ng}/\mu\text{L}$ maka ekstrak DNA sampel telah memenuhi standar untuk reaksi PCR agar dapat berlangsung dengan baik.

Hasil amplifikasi PCR gen mtDNA COI sampel diperoleh pita tunggal (Gambar

2.B). Pita tunggal yang terlihat pada gel elektroforesis ini mengonfirmasi bahwa primer yang digunakan telah spesifik menempel pada target gen mtDNA COI yang diharapkan. Dengan membandingkan pita DNA sampel dengan DNA acuan (marker) dapat diketahui panjang sekuen gen mtDNA sampel yang teramplifikasi PCR yaitu berkisar 700 pasang basa/base pair (bp). Hasil ini juga pernah dilaporkan oleh Ward et al (2008) dan Setiati et al (2018) bahwa produk PCR berkisar 600 hingga 700 bp tergantung pada kombinasi primernya.



Gambar 2. **A** *ikan* Pari totol biru (A), dan Hasil amplifikasi gen mtDNA sampel (**B**)

Gen mtDNA COI sampel yang telah diperbanyak dengan PCR kemudian ditentukan urutan nukleotida penyusunnya dengan metode *bi-directional sequencing*. Selanjutnya, hasil sekuensing dianalisis dengan aplikasi *seq scanner v.2.0* untuk melihat kualitas sekuen yang diperoleh (Gambar 3). Terdapat dua parameter yang diperhatikan dalam pembacaan aplikasi ini; yaitu puncak intensitas basa-basa DNA

(ATGC), dan *Pure & mixed base QV* (Quality Value). *Pure base QV* adalah ukuran nilai untuk basa-basa DNA yang terbaca secara jelas dalam bentuk A, T, G, C, sedangkan *mixed base QV* adalah ukuran pembacaan aplikasi yang tidak dapat dibedakan apakah termasuk A, T, G, atau C, sehingga disimbolkan sebagai ‘N’. Range QV untuk *pure* dan *mixed base* ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rentang QV basa-basa DNA

Parameter	Rendah	Sedang	Tinggi
<i>Pure base</i>	≤ 15 (merah muda)	15 – 19 (kuning)	≥ 20 (biru)
<i>Mixed base</i>	≤ 5 (merah bata)	5 – 9 (cokelat)	≥ 10 (nila)

QV berkorelasi terhadap peluang kesalahan pembacaan sekuen (Probability error (Pe)). Semakin kecil nilai QV semakin besar pula nilai Pe-nya (City et al. 2008). Hubungan antara QV dan Pe dapat diperoleh dari persamaan:

$$QV = -10 \log_{10} Pe \dots\dots\dots(1)$$

Sehingga, dari persamaan (1) dapat ditentukan untuk Pe sebesar 1% memiliki nilai QV 20, artinya nucleotida hasil sekuensing dengan QV 20 memiliki peluang kesalahan sebesar 1%. Untuk lebih jelasnya, hubungan QV dan Pe ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Korelasi QV dan Pe

QV	Pe	QV	Pe
1	79%	30	0.10%
5	31%	35	0.031%
10	10%	40	0.010%
15	3.1%	45	0.0031%
20	1%	50	0.001%
25	0.31%	60	0.0001%

Tabel 5. Komposisi QV sekuen

Parameter	Jumlah basa		
	Low	Medium	High
<i>Pure base</i>	172	112	446
<i>Mixed base</i>	18	-	-



Gambar 3. Sekuen mtDNA COI sampel yang ditampilkan pada aplikasi *sequence scanner* V.2.0

Berdasarkan hasil analisis sekuen mt DNA COI sampel Ray TB diperoleh data panjang sekuen DNA yaitu 748 basa dengan jumlah *pure base* yang memiliki QV ≥ 20 (QV20+) sebanyak 446 basa (60%) dicirikan dengan warna biru, 112 basa (15%) dengan QV 15-19 dicirikan dengan warna kuning, dan terdapat 172 basa (23%) dengan QV ≤ 15, dicirikan dengan warna

merah muda. Adapun *mixed base* hanya terdapat 18 basa (2.4%) dengan QV ≤ 5 dicirikan dengan warna merah bata (Tabel 5) (Applied Biosystem, 2012). Hasil analisis ini menjelaskan bahwa sekuen yang diperoleh dari hasil sekuensing masih tidak cukup baik karena total untuk persentase *pure base* low dan medium melebihi 10%.

Basa DNA yang berstatus ambigu (N) diedit sesuai dengan tendensi basa terkuat dengan merujuk kualitas puncak kromatogram menggunakan fitur *edit trace data from sequences* pada aplikasi Mega X (Kumar et al 2018). Hasil edit sekuen konsensus ditampilkan pada Tabel 6. Kedua

hasil sekuen konsensus, sebelum (konsensus A) dan setelah pengeditan (konsensus B), selanjutnya dianalisis dengan fasilitas BLAST untuk menentukan kemiripan sekuen sampel dengan database Bank Gen.

Tabel. 6. Konsensus sekuen mtDNA COI yang di edit dengan aplikasi MegaX

Nama Sampel	Konsensus Sekuens
Ray-TB	GTTGGTAAAGAATGGGATCTCCTCCTCCAGCTGGGTCAAAGAAAGTTGTA 50
	TTAAGATTTTCGGTCTGTGAGGAGTATAGTAATGCCAGCTGCTAGGACTGG 100
	TAGGGATAACAGGAGAAGTACAGTTGTAACAAGAATGGATCAGACGAATA 150
	ATGGGGTTTTGATATGGGAGATTGTCTGGGGTACCTATTAATTGACCTA 200
	ACTCACGTTTATTGCATTACGCTCACTGCCCGCTTCCCTCAACAATCC 250
	TCTCGTGCCATCTGCTTTAATGAATCGGCCAACACGCGGTCAGAGGCAGT 300
	TTGCGTATTGTTCACTCTTCCACTTCTCGCTCACTGACTCACTGCTCTC 350
	TTTCGTTCTGCTGCAGCGAGCACTATCAACTCACTCCATGGCTGTGATAC 400
	CGTTATCCACCGAATCTCGCCATAACGCTCTAAAGAACATGTGAACTAAA 450
	TGCCACCTTGAGCCCTTGATCCCTGTAAAGTCCACTTGTCTGGCGTTTTT 500
	CCATAGGCTCCCCCCCCCTGACAATCATCTCTAAAAATCCACCTCAACTC 550
	CCAACTTACAAAACCCGACCAGGACTATCAACATACCCATGCCTTTTCC 600
	CCCCTGGAAGCTCCCCCTCATGCCCTCTCCCTGTTCCCGACCCCTGCCCC 650
	CTTACCCGGATACCTGTCCCCCTTTTCTCCCCCTTCCAAGAAAACCG 700
	TCAGCCGCCTTTTCTTCATTAGTCTCCACCCCTTATTAAGTGTAT 748

Berdasarkan hasil analisis BLAST sampel dengan 3 data teratas pada Bank Gen (Tabel 7) diperoleh kemiripan 98.28% dengan *Neotrygon kuhlii* untuk konsensus A dan pada konsensus B tersisa 1 data yang tidak mirip dengan *Neotrygon kuhlii* namun mirip dengan *Neotrygon caeruleopunctata*. Pengambilan keputusan dalam menentukan tingkat kesesuaian sampel *query* dengan hasil BLAST dilihat dari 3 aspek yaitu *Query cover(coverage)*, *e(expected)-value*, dan *ident(identity)*. Hasil paling mirip dicirikan apabila nilai *Query Coverage* mendekati 100%, *e-value* mendekati 0, dan

Ident mendekati 100% pada setiap database. *Query cover* memberikan arti tingkat keselarasan (persentasi kesamaan) antara panjang nukleotida *query* (sampel) dengan database pada Bank Gen. *Ident* adalah tingkat kecocokan sekuen *query* yang disejajarkan dengan sekuen database Bank Gen. sedangkan *e-value* memberikan indikasi signifikansi statistik hasil *pairwise alignment* dan menunjukkan ukuran database sistem *scoring* yang digunakan. Semakin rendah angka *e-value*, semakin signifikan hasil perhitungannya (Madden 2013; Kasi et al. 2019). Berdasarkan hasil

BLAST diperoleh kemiripan tertinggi kedua sekuen konsensus sebesar 98.28% dengan sekuen *Neotrygon kuhlii* voucher BW-A2578. Namun, disisi lain nilai *query cover* sangat rendah yaitu hanya sebesar 23% saja. Perolehan nilai *query cover* ini sejalan dengan hasil sekuensing yang

kurang baik. Hal ini sangat berbeda dengan apa yang diperoleh dari penelitian Tindi et al (2017) pada *barcoding Atrina vexillum* dan Sulistiowati et al (2020) pada *barcoding Scatophagus argus* dimana *query cover* sekuen yang dianalisis masing-masing sebesar 93% dan 95%.

Tabel 7. Hasil analisis BLAST dari kedua konsensus sekuen

Konsensus sekuen	Deskripsi	Max score	Total score	Query Cover	E-value	Ident	Accession
A	<i>Neotrygon kuhlii</i> voucher BW-A2578	309	309	23%	2e-79	98.28%	EU398738.1
	<i>Neotrygon kuhlii</i> isolate gr45	307	307	23%	7e-79	98.28%	MH085753.1
	<i>Neotrygon kuhlii</i> isolate KNS-WSS5-30	307	307	23%	7e-79	98.28%	KU498017.1
B	<i>Neotrygon kuhlii</i> voucher BW-A2578	307	307	23%	7e-79	98.28%	EU398738.1
	<i>Neotrygon kuhlii</i> isolate gr45	305	305	23%	2e-78	98.28%	MH085753.1
	<i>Neotrygon caeruleopunctata</i> voucher USNM:444104	305	305	23%	2e-78	98.28%	MH235682.1

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil sekuensing diperoleh panjang sekuen mtDNA sampel 748 bp dengan dengan jumlah *pure base* yang memiliki $QV \geq 20$ ($QV20+$) sebanyak 446 basa. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa sekuen yang diperoleh dari hasil sekuensing masih tidak cukup baik karena total untuk persentase *pure base* low dan medium melebihi 10%. Hasil ini berkorelasi dengan analisis BLAST yang mendapatkan nilai *query cover* sangat rendah yaitu hanya sebesar 23%. Meskipun nilai kemiripan sekuen sampel dengan *Neotrygon kuhlii* voucher BW-A2578 sebesar 98.28%, hasil ini memiliki validitas yang rendah karena tidak didukung dengan nilai *query cover* yang memadai.

Saran

Biodiversitas sumberdaya pari di perairan Kalimantan Utara masih belum banyak diungkap dari sisi molekulernya, padahal pari sudah banyak diperdagangkan ke berbagai daerah, termasuk diekspor ke negara tetangga. Oleh karena itu, pengidentifikasian secara molekuler perlu ditingkatkan sehingga spesies pari yang diperjualbelikan tersebut dapat diketahui secara pasti sebelum jumlahnya semakin berkurang di alam.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih diucapkan kepada M. Gandri Haryono, M.Si. dan Dr. Firdaus, M.Si. atas diskusinya mengenai lokasi pendaratan pari di Kota Tarakan, Aswar

Amiruddin, M.T. atas bantuan pembuatan peta, dan Universitas Borneo Tarakan atas bantuannya melalui bantuan dana penelitian DIPA universitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Bineesh, K.K. et al. 2017. DNA barcoding reveals species composition of sharks and rays in the Indian commercial fishery. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis* 28(4): p.458–472.
- Borsa, P., Arlyza, I., Borsa, P., & Phylogeography, I.A. 2018. Phylogeography and taxonomy of the blue-spotted maskray (ex-Neotrygon kuhlii; ikan pari totol biru): the intricate story of a widespread species complex . Seminar , LIPI Research Center on Oceanography , Ancol on 19 October 2018. 2018. ird-01916984v2f.
- Cerutti-Pereyra, F. et al. 2012. Identification of rays through DNA barcoding: An application for ecologists. *PLoS ONE* 7(6).
- Chang, C.H. et al. 2017. DNA barcodes of the native ray-finned fishes in Taiwan. *Molecular Ecology Resources* 17(4): p.796–805.
- City, F., Data, R.U.S.A., Examiner, P., & Clow, L.A. 2008. (12) United States Patent. 9(12): p.868–877.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., & DeWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1512): p.313–321.
- Kasi, P.D., Ariandi, & Tenriawaru, E.P. 2019. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Sagu dengan Gen 16S rRNA. *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera* 36(1): p.35–40.
- 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.
- Madden, T. 2013. NCBI_blast information.pdf. *The NCBI Handbook*: p.1–15.
- Madduppa, H., Ayuningtyas, R.U., Subhan, B., Arafat, D., & . P. 2016. Exploited but Unevaluated: DNA Barcoding Reveals Skates and Stingrays (Chordata, Chondrichthyes) Species Landed in the Indonesian Fish Market. *ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences* 21(2): p.77.
- Setiati, N., Peniati, E., & Maharani, R.I. 2018. Status Konservasi Jenis Ikan Pari Yang Diperdagangkan di TPI Di Kota Semarang Berdasarkan Gen Coi Mitokondria. *Seminar Nasional Biologi dan Pendidikan Biologi UKSW*: p.233–239. Available at: <https://repository.uksw.edu/handle/123456789/15329>.
- Sulistiowati, S., & Madduppa, H. 2020. Identifikasi Scatophagus argus yang dipasarkan di Jakarta berdasarkan Analisis Morfologi dan DNA Barcoding. *Jurnal Kelautan Tropis* 23(3): p.373–380.
- Tindi, M. et al. 2017. The DNA Barcode and molecular phylogenetic analysis several Bivalve species from North Sulawesi Waters based on COI gene. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis* 1(2): p.32–38. Available at: www.qiagen.com.
- Toffoli, D. et al. 2008. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus Potamotrygon (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology* 31(1 SUPPL. 1): p.324–336.

Ward, R.D., Holmes, B.H., White, W.T., & Last, P.R. 2008. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: Results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59(1): p.57-71.