



COJ (Coastal and Ocean Journal)

e-ISSN: 2549-8223

Journal home page: <http://coj.pksplipb.or.id/>;email: journal@pksplipb.or.id

DNA BARCODING UNTUK VALIDASI SPESIES PAUS SPERMA (*Physeter macrocephalus* LINNAEUS, 1758) DARI PERAIRAN LAUT SAWU, NUSA TENGGARA TIMUR, INDONESIA

DNA BARCODING FOR SPECIES VALIDATION OF SPERM WHALE (*Physeter macrocephalus* LINNAEUS, 1758) FROM SAWU SEA WATERS, EAST NUSA TENGGARA, INDONESIA

Agus Alim Hakim^{1,2*}, Endah Sri Rahayu¹, Ali Mashar¹, Nurlisa A Butet¹, Yusli Wardiatno¹,
Mohammad Mukhlis Kamal¹

¹Department of Aquatic Resources Management, Faculty of Fisheries and Marine Science, IPB University, 16680, Indonesia

²Molecular Invertebrate Systematics and Ecology Lab, Graduate School of Engineering and Science, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan

* Corresponding author: agusalim@apps.ipb.ac.id

ABSTRACT

The sperm whale (*Physeter macrocephalus*) is a protected marine biota in Indonesia. Molecular identification of sperm whales from the Sawu Sea (East Nusa Tenggara, Indonesia) was carried out using the 16S rRNA gene. This study aims to validate the species of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in Indonesia using the partial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. The specimens used were tissue specimens from laboratory collections taken from Sawu Sea waters in 2014. The three samples were validated as *Physeter macrocephalus* with 100% similarity. The base composition is dominated by the base thymine (31.7–31.8%) with a GC content of 42.7–42.8%. The genetic distance for the same species was 0.0015, while the highest genetic distance for *Orcaella brevirostris* was 0.2128. Molecular identification using the 16S rRNA gene and COI has validated the species of a sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in Indonesia so that this genetic data can be used as a basis for sperm whale resource management and conservation.

Keywords: COI, DNA barcoding, genetic, Sawu Sea, sperm whale

ABSTRAK

Paus sperma (*Physeter macrocephalus*) merupakan salah satu biota laut yang dilindungi di Indonesia. Identifikasi molekuler paus sperma dari perairan Laut Sawu (Nusa Tenggara Timur, Indonesia) telah dilakukan menggunakan gen 16S rRNA. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi spesies paus sperma (*Physeter macrocephalus*) di Indonesia menggunakan gen *cytochrome oxidase* subunit I (COI) parsial. Spesimen yang digunakan merupakan spesimen jaringan dari koleksi laboratorium yang diambil dari perairan Laut Sawu tahun 2014. Ketiga spesimen tervalidasi sebagai *Physeter macrocephalus* dengan kemiripan sebesar 100%. Komposisi basa didominasi oleh basa timin (31,7-31,8%) dengan GC konten sebesar 42,7-42,8%. Jarak genetik pada spesies yang sama didapatkan nilai sebesar 0,0015, sedangkan jarak genetik tertinggi dengan spesies *Orcaella brevirostris* sebesar 0,2128. Identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA dan COI telah memvalidasi spesies paus sperma (*Physeter macrocephalus*) di Indonesia, sehingga data genetik ini dapat digunakan sebagai dasar pengelolaan dan konservasi sumberdaya paus sperma.

Kata kunci: COI, DNA barcoding, genetik, Laut Sawu, paus sperma

Article history: Received 30/01/2023; Received in revised from 24/03/2023; Accepted 30/04/2023

1. PENDAHULUAN

Mamalia laut adalah kelompok mamalia yang seluruh siklus hidupnya berlangsung di laut, kelompok hewan ini berasal dari Ordo Sirenia dan Cetartiodactyla dengan jumlah spesies sebanyak 36 spesies (Rudolph *et al.* 1997; Kreb *et al.* 2013). Salah satu jenis mamalia laut yang ditemukan di Indonesia yaitu paus sperma. Paus sperma adalah spesies yang tersebar luas, menghuni perairan yang lebih dalam dari katulistiwa hingga daerah kutub (IJsseldijk *et al.* 2018). Selain itu, paus sperma biasanya mencari makan di perairan dalam, di mana mereka secara rutin menyelam hingga kedalaman 400–900 m, dengan kedalaman maksimum tercatat 2.250 m (Ponganis 2015). Menurut Cantor *et al.* (2019), betina dan individu muda tinggal di laut beriklim sedang dan tropis sepanjang tahun, sementara jantan sub-dewasa dan dewasa pindah ke tempat mencari makan di garis lintang yang lebih tinggi.

Setiap tahunnya, paus sperma melakukan perjalanan dari Samudera Pasifik dan Hindia melalui perairan Indonesia, khususnya melewati Laut Sawu, Nusa Tenggara Timur (NTT). Spesies ini dimanfaatkan oleh masyarakat Lamalera (Pulau Lembata, NTT) dengan menjadikan spesies target dalam tradisi berburu. Penangkapan ini dikategorikan sebagai *subsistence whaling* oleh *International Whaling Commission* (IWC) karena penangkapan dilakukan dalam skala kecil dengan tujuan untuk memenuhi kebutuhan masyarakat lokal dan tidak bertujuan mendapatkan keuntungan (Desrianti 2011).

Paus sperma dikategorikan ke dalam status vulnerable (VU) menurut *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) (Taylor *et al.* 2019). Status tersebut menunjukkan bahwa paus sperma (*Physeter macrocephalus*) merupakan spesies yang menghadapi risiko kepunahan di alam liar di waktu yang akan datang. Beberapa langkah perlindungan terhadap paus sperma telah dilakukan dalam skala internasional maupun nasional. Spesies ini dilarang untuk diperjualbelikan dalam bentuk apapun di perdagangan internasional yang secara tegas masuk dalam kategori Appendix I oleh *The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES). Selain itu, diberbagai negara telah membuat aturan perlindungan seperti di perairan Amerika Serikat, Undang-Undang Perlindungan Mamalia Laut telah diberlakukan sejak tahun 1972 (Roman *et al.* 2013). Begitu juga halnya dengan Indonesia, pemerintah telah mengeluarkan aturan dalam upaya melindungi spesies paus sperma melalui Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan. Oleh karena itu, monitoring diperlukan untuk menilai status populasi dan ancaman antropogenik terhadap populasi mamalia laut (Suarez-Bregua *et al.* 2022).

Pendekatan genetik melalui metode DNA barcoding saat ini telah dikembangkan untuk membantu identifikasi spesies dengan efisien dan cepat (DeSalle & Goldstein 2019). Teknologi barcode DNA dapat mengidentifikasi spesies hewan menggunakan urutan parsial dari mitokondria cytochrome c oxidase subunit I (COI) (Hebert *et al.* 2003). Penggunaan gen COI dengan panjang 600 hingga 800 pasangan basa ini, merupakan pendekatan unik karena menggunakan bagian gen kecil dan identik sebagai penanda spesies internal (Teletchea 2009). DNA barcoding telah diaplikasikan untuk identifikasi paus di Belanda (Keijl *et al.* 2019), Brazil (Silva *et al.* 2021), China (Ren *et al.* 2022), dan Indonesia (Kamal *et al.* 2021). Penelitian DNA barcoding paus sperma oleh Kamal *et al.* (2021) menggunakan gen 16S rRNA, sehingga penelitian ini mencoba menggunakan gen penanda lain. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi spesies paus sperma (*Physeter*

macrocephalus) dari perairan Laut Sawu, Nusa Tenggara Timur, Indonesia menggunakan gen cytochrome oxidase subunit I (COI) parsial.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Lokasi dan Waktu

Spesies contoh paus sperma berupa otot (*tissue*) merupakan koleksi spesimen di Laboratorium Biologi Molekuler Sumberdaya Akuatik yang berasal dari Laut Sawu, Nusa Tenggara Timur (Kamal *et al.* 2021). Analisis laboratorium dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Sumberdaya Akuatik (Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, FPIK-IPB) dan Laboratorium Terpadu (FPIK-IPB) mulai Oktober 2015 hingga Februari 2016.

2.2. Prosedur Penelitian

2.2.1. Ekstraksi DNA

Kondisi spesies contoh terawetkan dalam alkohol 96% sehingga perlu dilakukan pencucian dengan aquades guna menghilangkan kandungan alkohol. Tiga contoh (PM 1, PM 2, dan PM 3) dengan bobot jaringan masing-masing sebesar 40 mg dimasukkan kedalam tube 1.5 ml untuk dilakukan proses ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA menggunakan kit Gene Aid dengan prosedur sesuai protokol manual pabrik yang mengacu pada Kamal *et al.* (2021). DNA total didapatkan dari proses ini.

2.2.2. Amplifikasi gen COI dan Sekuensing

Amplifikasi gen COI dilakukan dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan komponen yang terdiri dari ddH₂O 4,5 ul, Tag (*Kapa Extra Hot Start*) 12,5 ul, masing-masing primer 1,5 ul (Hakim *et al.* 2020; 2022a), dan DNA total (cetakan) 5 ul. Proses amplifikasi dimulai dengan inisial denaturasi (94 °C; 3 menit); dilanjutkan dengan denaturasi (94 °C; 45 detik), annealing (54 °C; 1 menit), dan elongasi 72 °C selama 1 menit) sebanyak 35 siklus; serta pascaelongasi (72 °C; 5 menit) dan penyimpanan (15 °C; 10 menit) (Hakim *et al.* 2020). Produk PCR (*amplicon*) divisualisasi dengan menggunakan gel agarosa 1% pada mesin ultraviolet.

Amplicon dengan kualitas baik dilanjutkan pada proses sekuensing dengan metode Sanger *et al.* (1977) melalui jasa perusahaan pelayanan sekuensing. Hasil sekuensing berupa urutan basa nukleotida yang selanjutnya akan dianalisis.

2.3. Analisis Data

Urutan basa nukleotida dari primer forward dan reverse disejajarkan untuk didapatkan urutan basa yang utuh dari masing-masing contoh dengan metode Clustal W (Larkin *et al.* 2007) menggunakan software MEGA 11 (Tamura *et al.* 2021). Untuk mendapatkan nama spesies yang valid, sekuen nukleotida diunggah pada situs Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) pada pilihan menu BLASTn. Komposisi basa gen 16S rRNA diambil dari penelitian Kamal *et al.* (2021) dan diolah oleh penulis.

Jarak genetik dihitung menggunakan metode Kimura-2-parameter (K2P) model (Kimura 1980). Matriks jarak genetik dapat digunakan untuk menggambarkan hubungan kekerabatan melalui pohon filogenetik menggunakan metode bootstrapped Neighbour-Joining (NJ) (Saitou and Nei 1987) dengan 1000 kali ulangan (Felsenstein 1985).

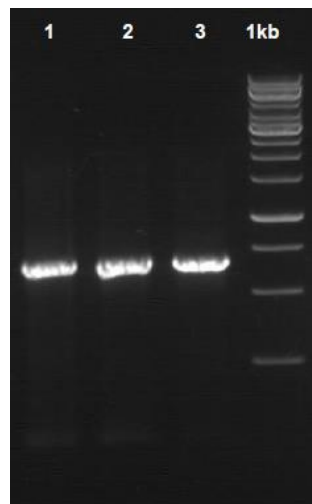
Kekerabatan tersebut dianalisis dengan menambahkan data yang berasal dari GenBank. Selain itu, dilakukan penelusuran situs nukleotida spesifik menggunakan software MEGA 11 (Tamura *et al.* 2021). Jarak genetik dan pohon filogenetik dianalisis dengan menggunakan data yang berasal dari GenBank berupa beberapa spesies paus dan lumba-lumba seperti *Physeter macrocephalus* (KU891394.1), *Eubalaena glacialis* (MF459656.1), *Balaena mysticetus* (AP006472.1), *Pseudorca crassidens* (HM060332.1), *Sousa teuszii* (NC_045404.1), *Feresa attenuata* (NC_019588.1), *Delphinus delphis* (MH000365.1), *Orcaella heinsohni* (JF339977.1), dan *Orcaella brevirostris* (MZ351458.1).

3. HASIL DAN DISKUSI

3.1. Hasil

3.1.1. Amplifikasi gen COI

Ketiga contoh berhasil diamplifikasi dan memiliki kualitas *amplicon* yang baik ditandai dengan pita tunggal dan tanpa semear (**Gambar 1**). Selain itu, panjang ukuran basa nukleotida dari ketiga contoh berada pada kisaran marka 500-750 bp (*base pair*) dimana ukuran tersebut sesuai dengan target panjang basa yaitu sebesar 650 bp.



Gambar 1. Visualisasi amplicon gen COI pada gel agarosa 1% (1: PM 1, 2: PM 2, 3: PM 3)

3.1.2. Validasi Spesies dan Komposisi Basa Nukleotida

Hasil pensejajaran basa nukleotida didapatkan ukuran basa berkisar antara 648 hingga 649 bp. Ketiga spesies contoh paus telah diidentifikasi secara morfologi sebagai spesies *Physeter macrocephalus* dan tervalidasi secara molekuler sebagai spesies yang sama dengan persen identik sebesar 100% (**Tabel 1**).

Tabel 1. Hasil validasi spesies menggunakan gen COI pada ketiga contoh paus

Kode	Hasil Identifikasi Morfologi	Panjang Basa (base pair)	Hasil Identifikasi Molekuler	Persen Identik
PM 1		649		
PM 2	<i>Physeter macrocephalus</i>	648	<i>Physeter macrocephalus</i> (GenBank: KU891394.1)	100%
PM 3		649		

Komposisi basa nukleotida dari gen COI dan 16S rRNA pada ketiga contoh paus sperma disajikan pada **Tabel 2**. Gen COI didominasi oleh basa timin (T) sebesar 31,7–31,8% sedangkan gen 16S rRNA didominasi oleh basa adenin (A) sebesar 32,8–33,0 %. GC konten dari ketiga contoh sebesar 42,7–42,8% pada gen COI dan 44,2–44,7 pada gen 16S rRNA.

Tabel 2. Komposisi basa nukleotida dari gen COI dan 16S rRNA pada ketiga contoh paus sperma

Basa	Komposisi (%)	
	COI	16S rRNA (Kamal <i>et al.</i> 2021)
T	31,7–31,8	22,6–22,8
C	25,9–26,0	24,3–24,5
A	25,4–25,5	32,8–33,0
G	16,8	19,9–20,2
GC konten	42,7–42,8	44,2–44,7

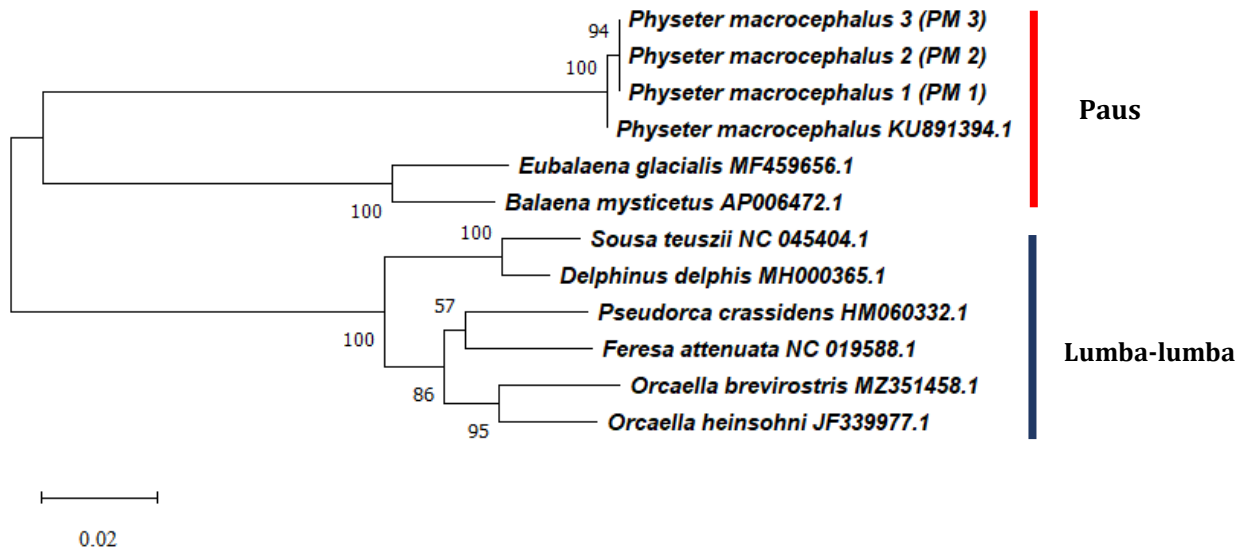
3.1.3. Jarak Genetik dan Pohon Filogeni

Tingkat kekerabatan antara *P. macrocephalus* dengan spesies paus lain dan lumba-lumba ditunjukkan dengan adanya nilai jarak genetik yang bervariasi (**Tabel 3**). Jarak genetik pada spesies yang sama (*P. macrocephalus*) antara sampel dengan referensi didapatkan nilai sebesar 0,0015. Selain itu, jarak genetik antara sampel dengan paus sikat atlantik utara (*Eubalaena glacialis*) dan paus kepala busur (*Balaena mysticetus*) sebesar 0,1693 hingga 0,1839. Adapun nilai jarak genetik antara sampel dengan lumba-lumba genus *Pseudorca*, *Sousa*, *Feresa*, *Delphinus*, dan *Orcaella* sebesar 1,995-0,2128 dengan jarak genetik tertinggi pada spesies *Orcaella brevirostris*. Matriks jarak genetik berdasarkan gen COI tersebut kemudian dijadikan sebagai data untuk mengonstruksikan pohon filogenetik dan dihasilkan hubungan kekerabatan pada **Gambar 2**.

Tabel 3. Matriks jarak genetik gen COI paus sperma (PM 1-3) dengan spesies paus lain dan lumba-lumba

No	Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	PM 1											
2	PM 2	0,0000										
3	PM 3	0,0000	0,0000									
4	<i>Physeter macrocephalus</i>	0,0015	0,0015	0,0015								
5	<i>Eubalaena glacialis</i>	0,1839	0,1839	0,1839	0,1822							
6	<i>Balaena mysticetus</i>	0,1693	0,1693	0,1693	0,1719	0,0381						
7	<i>Pseudorca crassidens</i>	0,1995	0,1995	0,1995	0,1956	0,1875	0,1834					
8	<i>Sousa teuszii</i>	0,1995	0,1995	0,1995	0,1977	0,1789	0,1877	0,0757				
9	<i>Feresa attenuata</i>	0,2019	0,2019	0,2019	0,1979	0,1770	0,1837	0,0431	0,0687			
10	<i>Delphinus delphis</i>	0,2015	0,2015	0,2015	0,1996	0,1703	0,1789	0,0703	0,0219	0,0617		
11	<i>Orcaella heinsohni</i>	0,2103	0,2103	0,2103	0,2062	0,1851	0,1853	0,0497	0,0670	0,0548	0,0599	
12	<i>Orcaella brevirostris</i>	0,2128	0,2128	0,2128	0,2086	0,1896	0,1986	0,0514	0,0724	0,0583	0,0687	0,0381

Berdasarkan **Gambar 2**, terlihat hubungan kekerabatan yang dekat antara paus sperma dengan jenis paus lain yang ditunjukkan dengan adanya clade yang sama. Selain itu, spesies lumba-lumba membentuk satu clade yang berbeda. Sedangkan paus sperma memiliki kekerabatan yang jauh dengan lumba-lumba, terlihat dari pemisahan yang jelas antara clade paus dengan lumba-lumba.



Gambar 2. Konstruksi pohon filogenetik paus sperma (PM 1-3) dengan spesies paus lain dan lumba-lumba berdasarkan gen COI menggunakan metode Neighbour-Joining (NJ) dengan bootstrap 1000 ulangan.

3.2. Pembahasan

Penelitian ini berhasil mengamplifikasi urutan basa nukleotida dari *cytochrome oxidase subunit I* (COI) parsial pada tiga spesimen paus sperma menggunakan primer universal yang mampu mendapatkan gen target tanpa adanya delesi atau insersi. Primer universal ini tidak hanya digunakan sebagai penanda untuk DNA barcoding mamalia air, tetapi sebelumnya telah digunakan pada kelompok ikan (Kamal et al. 2019, Hakim et al. 2020, Hakim et al, 2022a) crustacea (Krisanti et al. 2020; Hakim et al. 2022b), kura-kura (reptil), dan serangga air. Hasil pengeditan urutan basa diperoleh panjang basa dari COI dengan kisaran 648-649 pasangan basa (Tabel 1).

Berdasarkan gen COI, semua sampel divalidasi sebagai *Physeter macrocephalus* dengan tingkat kemiripan 100%. Menurut Herbert et al. (2003), nilai persen identik lebih dari 97% menunjukkan bahwa urutan nukleotida spesimen dapat dipastikan memiliki nama spesies mengikuti hasil dari Genbank. Hasil validasi ini memiliki kedekatan secara genetik pada genbank dengan kode akses KU891394.1 (Morin et al. 2016, unpublished). Data genetik pada genbank tersebut menyebutkan bahwa spesies yang tercatat adalah *Physeter catodon*. Spesies tersebut merupakan sinonim dari *Physeter macrocephalus*, sehingga dapat dipastikan bahwa spesimen pada penelitian merupakan *P. macrocephalus*.

Komposisi nukleotida ketiga sampel paus sperma berdasarkan urutan gen COI dan 16S rRNA ditunjukkan pada Tabel 2. Kandungan GC ketiga sampel berdasarkan gen COI sebesar 42,7–42,8% sedangkan berdasarkan gen 16S rRNA sebesar 44,2–44,7%. Menurut Jusuf (2001), kandungan GC memiliki 3 ikatan hidrogen sedangkan kandungan AT memiliki 2 ikatan hidrogen dimana paus sperma didominasi oleh kandungan AT.

Komposisi basa nukleotida paus sperma menunjukkan bahwa ikatannya mudah dipisahkan, sehingga *P. macrocephalus* memiliki kemungkinan mutasi yang lebih tinggi.

Jarak genetik sering digunakan untuk menilai taksonomi spesies dari studi taksa dan evolusi yang terkait erat (Doğan dan Doğan 2016). Peningkatan jarak genetik pada tingkat taksonomi yang lebih tinggi mendukung perubahan signifikan dalam divergensi genetik pada batas spesies (Lakra *et al.* 2011). Semakin rendah nilai jarak genetik antara dua individu yang berbeda menunjukkan hubungan kekerabatan yang sangat erat (Tallei *et al.* 2016). Pada penelitian ini, nilai jarak genetik relatif rendah pada spesies paus sperma sampel dengan paus sikat atlantik utara (*Eubalaena glacialis*) dan paus kepala busur (*Balaena mysticetus*). Sedangkan nilai jarak genetik relatif lebih tinggi antara paus sperma sampel dengan lumba-lumba genus *Pseudorca*, *Sousa*, *Feresa*, *Delphinus*, dan *Orcaella*. Pohon filogenetik juga menunjukkan hal sama dimana spesies paus sperma terpisah dengan spesies lumba-lumba. Menurut Dexter *et al.* (2017), penyebaran spesies yang intens akan mengakibatkan kurangnya struktur komunitas filogenetik karena spesies berasal dari cabang yang berbeda dan memiliki sejarah evolusi yang berbeda.

Penelitian sebelumnya mengenai barcode DNA pada paus sperma telah dilakukan di Indonesia menggunakan gen yang berbeda dari penelitian ini yaitu 16S rRNA (Kamal *et al.* 2021) dan control region (Yusmalinda *et al.* 2017). Dalam penelitian ini, COI dapat diterapkan dan berhasil mengungkap taksonomi dari paus sperma di Indonesia. Penelitian Viricel & Rosel (2012), dan Amaral *et al.* (2012) juga telah berhasil melakukan identifikasi molekuler menggunakan gen COI yang berasal dari mtDNA untuk mengidentifikasi kelompok cetacean. mtDNA umumnya diwariskan secara maternal, non-rekombinasi, dan memiliki tingkat mutasi yang lebih tinggi daripada DNA inti (DeSalle *et al.* 2017). *DNA barcoding* telah menjadi alat yang ampuh untuk memahami keanekaragaman hayati dan biologi spesies akuatik (Elías-Gutiérrez *et al.* 2021). Galimberti *et al.* (2015) juga menambahkan bahwa *DNA barcoding* adalah sistem identifikasi molekuler universal makhluk hidup yang kemanjurannya telah banyak dibuktikan dalam dekade terakhir dalam banyak konteks. Data genetik dari penelitian ini telah diunggah di situs Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sebagai data genetik gen COI paus sperma dari Indonesia. Data tersebut dapat digunakan sebagai dasar pertimbangan dalam melakukan konservasi secara genetik.

Selain DNA barcoding, saat ini telah berkembang *tool* genetik lain yaitu DNA lingkungan (eDNA) dengan sampel yang berasal dari lingkungan. Sampel lingkungan bisa berasal dari air, tanah, dan udara dengan asumsi bahwa DNA dilepaskan dari kulit, lendir, urin, air liur, feses, sekresi, telur, sperma, darah dan lain-lain (Taberlet *et al.* 2012). Pendekatan eDNA telah diaplikasikan pada beberapa penelitian mamalia laut (Foote *et al.* 2012, Suarez-Bregua *et al.* 2022, Székely *et al.* 2022).

Analisis eDNA mampu menilai keanekaragaman, distribusi, dan kelimpahan mamalia laut sangat penting untuk memahami dinamika tingkat spesies dan ekosistem, dan untuk menginformasikan strategi pengelolaan dan konservasi (Székely *et al.* 2022). Schwartz *et al.* (2007) menambahkan bahwa penggunaan penanda genetik molekuler untuk memantau keanekaragaman hayati dan mendeteksi serta mengidentifikasi spesies, individu atau mengukur parameter genetik populasi dapat memberikan informasi berharga untuk pengelolaan dan konservasi spesies dan ekosistem.

4. KESIMPULAN

Ketiga spesimen berhasil teramplifikasi urutan basa nukleotida dari gen cytochrome oxidase subunit I (COI) parsial dan tervalidasi sebagai *Physeter microcephalus* dengan kemiripan sebesar 100%. Komposisi basa didominasi oleh basa timin dan memiliki GC konten sebesar 42,7–42,8%. Identifikasi molekuler menggunakan COI telah memvalidasi spesies paus sperma di Indonesia, sehingga data genetik ini dapat digunakan sebagai dasar pengelolaan dan konservasi sumberdaya paus sperma.

PERNYATAAN KETERSEDIAAN DATA

Data yang mendukung temuan penelitian ini tersedia secara terbuka di situs Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov), dengan kode akses OR437963.1, OR437964.1, dan OR437965.1.

DAFTAR PUSTAKA

- Amaral, A.R., Jackson, J.A., Möller, L.M., Beheregaray, L.B., Coelho, M.M. 2012. Species tree of a recent radiation: The subfamily Delphininae (Cetacea, Mammalia). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 64, 243–253.
- Cantor, M., Gero, S., Whitehead, H., Rendell, L. 2019. Sperm whale: The largest toothed creature on Earth. In B. Würsig (Ed.), *Ethology and ecology of marine mammals* 261–280.
- DeSalle, R., Goldstein, P. 2019. Review and interpretation of trends in DNA barcoding. *Front. Ecol. Evol.* 7, 302.
- DeSalle, R., Schierwater, B., Hadrys, H. 2017. MtDNA: The smallworkhorse of evolutionary studies. *Front Biosci-Landmark* 22(5), 873–887.
- Desrianti, F. 2011. Perubahan sosial masyarakat nelayan Lamalera (sudut pandang sosiologi ekonomi dan ekologi) [disertasi], Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Dexter, K.G., Lavin, M., Torke, B.M., Twyford, A.D., Kursar, T.A., Coley, P.D., Drake, C., Hollands, R., Pennington, R.T. 2017. Dispersal assembly of rain forest tree communities across the Amazon basin. *Proc Nat Acad Sci* 114(10), 2645–2650.
- Doğan, İ., Doğan, N. 2016. Genetic distance measures: Review. *Turkiye Klinikleri J Biostatistics* 8, 87–93.
- Elías-Gutiérrez, M., Hubert, N., Collins, R.A., Andrade-Sossa, C. 2021. Aquatic organisms research with DNA barcodes. *Diversity* 13, 306.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Foot, A.D., Thomsen, P.F., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., et al. 2012. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS ONE* 7(8), e41781.
- Galimberti, A., Sandionigi, A., Bruno, A., Bellati, A., Casiraghi, M. 2015. DNA barcoding in mammals: what's new and where next? *Hystrix It. J. Mamm* 26(1), 13–24.
- Hakim, A.A., Kamal, M.M., Butet, N.A., Affandi, R. 2020. Taxonomic status investigation of freshwater eels (*Anguilla* spp.) based on the molecular marker in seven rivers that flow to Palabuhanratu Bay, Indonesia. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 420, 012012.

- Hakim, A.A., Dikrurahman, Muhlis, S., Astuti, R.P., Sari, D.W., Kamal, M.M. 2022a. A genetic approach for authentication on morphological differences of cultivated pompano species in Indonesia. *Biodiversitas* 23, 4561-4569.
- Hakim, A.A., Sidabutar, Y.N., Mashar, A., Zairion, Imran, Z., Wardiatno, Y. 2022b. Application of cytochrome oxidase subunit 1 partial gene for species validation of *Macrobrachium sintangense* from Lake Lido, West Java. *IOP Conf Ser Earth Environ* 1033, 012001.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* 270, 313-322.
- Ijsseldijk, L.L., van Neer, A., Deaville, R., Begeman, L., van de Bildt, M., van den Brand, J.M.A., et al. 2018. Beached bachelors: An extensive study on the largest recorded sperm whale *Physeter macrocephalus* mortality event in the North Sea. *PLoS ONE* 13(8), e0201221.
- Kamal, M.M., Butet, N.A., Rahayu, E.S., Hakim, A.A. 2021. Identifikasi karakteristik molekuler gen 16S rRNA parsial pada paus sperma (*Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758). *Habitus Aquatica* 2(1), 21-28.
- Kamal, M.M., Hakim, A.A., Butet, N.A., Fitriyaningsih, Y., Astuti, R. 2019. Autentikasi spesies ikan kerapu berdasarkan marka gen MT-COI dari perairan Peukan Bada, Aceh. *Jurnal Biologi Tropis* 19(2), 116-123.
- Keijl, G.O., Groenenberg, D.S.J., Nieman, A.M., Desjardins, R.B., Gravendeel, B. 2019. Molecular identification of sei whales (*Balaenoptera borealis*) from the Netherlands. *Lutra* 62(1), 3-11.
- Kreb, D.P., Mustika, B., Kahn, A., Yanuar, Muhajir. 2013. National reviews of status, research, catch, by-catch, conservation and legislation of marine mammals in Indonesia: A Country Report to the 3rd Southeast Asian Marine Mammal Symposium. Langkawi, 3rd Southeast Asian Marine Mammal Symposium.
- Krisanti, M., Ramadhan, B.F., Mashar, A., Butet, N.A., Hakim, A.A., Wardiatno, Y. 2020. Mole crab phylogenetics relationship analysis in Parangkusumo and Ketawang Beach Waters. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 420, 012018.
- Lakra, W.S., Verma, M.S., Goswami, M., et al. 2011. DNA barcoding Indian marine fishes. *Molecular Ecology Resources* 11, 60-71.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21), 2947-2948.
- Morin, P.A., Alexander, A., Hancock-Hanser, B.L., Foote, A.D., Mesnick, S.L., Rosel, P.E. 2016. Genomic diversity and historical demography of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*); from bottleneck to global distribution. [unpublished]
- Ponganis, P.J. 2015. Diving physiology of marine mammals and seabirds. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ren, X., Ma, X., Allen, E., Fang, Y., Wen, S. 2022. DNA barcoding technology used to successfully sub-classify a museum whale specimen as *Balaenoptera edeniedenii*. *Front. Ecol. Evol.* 10, 921106.
- Roman, J., Altman, I., Dunphy-Daly, M. M., Campbell, C., Jasny, M., Read, A.J. 2013. The Marine Mammal Protection Act at 40: status, recovery, and future of U.S. marine mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1286, 29-49.
- Rudolph, P., Smeenk, C., Leatherwood, S. 1997. Preliminary checklist of cetacea in the Indonesian Archipelago and Adjacent Waters. *Zoologische Verhandelingen* 312, 3-24.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.
- Schwartz, M.K., Luikart, G., Waples, R.S. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol Evol* 22, 25–33.
- Silva, V.S., Skueresky, N., Lopes, F. et al. 2021. Integrating morphology and DNA barcoding to assess cetacean diversity in Brazil. *Mamm Res* 66, 349–369.
- Suarez-Bregua, P., Alvarez-González, A.M., Parsons, K.M., Rotllant, J., Pierce, G.J., Saavedra, C. 2022. Environmental DNA (eDNA) for monitoring marine mammals: Challenges and opportunities. *Front. Mar. Sci.* 9, 987774.
- Székely, D., Cammen, K. M., & Tange Olsen, M. 2022. Needles in an ocean haystack: using environmental DNA to study marine mammals in the North Atlantic. NAMMCO Scientific Publications. *NAMMCO Scientific Publications* 12.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H. 2012. Environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 1789–1793.
- Tallei, T.E., Rembet, R.E., Pelealu, J.J., Kolondam, B.J. 2016. Sequence variation and phylogenetic analysis of *Sansevieria trifasciata* (asparagaceae). *Biosci Res* 13, 1-7.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 38(7), 3022-3027.
- Taylor, B.L., Baird, R., Barlow, J., Dawson, S.M., Ford, J., Mead, J.G., Notarbartolo di Sciarra, G., Wade, P. & Pitman, R.L. 2019. *Physeter macrocephalus* (amended version of 2008 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species* e.T41755A160983555.
- Teletchea, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: Reassessment and possible applications. *Rev Fish Biol Fish* 19(3), 265–293.
- Viricel, A., Rosel, P.E. 2012. Evaluating the utility of COI for cetacean species identification. *Marine Mammal Science* 28, 37–62.
- Yusmalinda, N.L.A., Anggoro, A.W., Suhendro, D.M., Ratha, I.M.J., Suprapti, D., Krebs, D., Cahyani, N.K.D. 2017. Identifikasi jenis pada kejadian cetacea terdampar di Indonesia dengan teknik molekuler. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis* 9(2), 465-474.