



Analisis Bioinformatika $NADH_2$ sebagai Penanda Seleksi Adaptif Pesut Perairan Tawar dan Pesisir

A Bioinformatics Analysis of the $NADH_2$ Gene as Adaptive Selection Marker of Riverine and Coastal Irrawaddy Dolphins

Trifan Budi^{1,2,3,*}, Gabriella Chandrakirana Krisnamurti⁴, Nelsiani To'bungan⁵

¹*Interdisciplinary Graduate Program in Bioscience, Faculty of Science, Kasetsart University*

²*Animal Genomic and Bioresources Research Center, Faculty of Science, Kasetsart University*

³*Laboratory of Animal Cytogenetics & Comparative Genomics (ACCG), Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand*

50 Ngam Wong Wan Rd, Lat Yao, Chatuchak Bangkok 10900, Thailand

⁴*Biotechnology Program, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thailand*

49 Soi Thian Thale 25, Bangkhuntian- Chai Thale Rd., Tha Kham, Bangkhuntian, Bangkok 10150, Thailand

⁵*Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta*

Jl. Babarsari No.44 Yogyakarta 55281, Indonesia

Email: trifanbudi26@gmail.com

**Penulis Korespondensi*

Abstract

The Irrawaddy dolphin is an aquatic facultative mammal that can be found throughout Southeast Asia. The population of the Irrawaddy dolphins, especially freshwater populations, undergo many challenges to survive; therefore, this makes these population categorized as critically endangered in the IUCN Redlist. The knowledge of evolutionary history and factors facilitating its freshwater adaptation is still lacking. Full freshwater adaptation in several dolphin species shows positive selection of the Mitochondrial DNA $NADH$ subunit 2 gene, which is related to the proton translocation channel for energy efficiency during freshwater colonization. Therefore, this study aims to investigate the role of amino acid substitution in $NADH$ subunit 2 in facilitating freshwater colonization of the Irrawaddy dolphins. Through simple bioinformatics analysis, we found no adaptive selection caused by the substitution of amino acid Threonine to Alanine on the amino acid No. 297 $NADH$ subunit 2 gene of the freshwater and coastal population of the Irrawaddy dolphins. This finding might be the result of a shallow divergence time that caused unfixed substitution within the $NADH$ subunit 2 gene in the population.

Keywords: Adaptation, Coastal, Freshwater, Irrawaddy dolphin, $NADH_2$

Abstrak

Pesut merupakan mamalia perairan bersifat fakultatif yang dapat ditemui di wilayah Asia Tenggara. Populasi pesut, terutama pada perairan tawar menghadapi berbagai tekanan untuk dapat bertahan hidup sehingga digolongkan sebagai *Critically Endangered* pada daftar merah IUCN. Pemahaman mengenai sejarah evolusi dan aspek apa yang memfasilitasi adaptasi pesut pada perairan tawar belum banyak diketahui. Adaptasi penuh terhadap perairan tawar pada beberapa spesies lumba-lumba menunjukkan adanya seleksi positif pada gen $NADH$ subunit 2 ($NADH_2$) di DNA mitokondria yang diperkirakan berkaitan dengan mekanisme translokasi jalur proton untuk efisiensi energi yang diperlukan dalam kolonisasi perairan tawar. Oleh sebab itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah gen $NADH$ subunit 2 ($NADH_2$) pada DNA mitokondria memfasilitasi kolonisasi pesut pada perairan tawar seperti dijumpai pada Cetacea perairan tawar lain. Melalui pendekatan bioinformatika sederhana, hasil dari penelitian ini menunjukkan tidak adanya substitusi basa yang merubah susunan asam amino Threonin menjadi Alanin pada urutan asam amino ke 297 gen $NADH_2$ pada populasi pesut yang mendiami perairan tawar dan pesisir. Hal ini menunjukkan tidak adanya seleksi adaptif pada gen $NADH_2$ yang diperkirakan terjadi akibat kolonisasi perairan tawar yang relatif baru, sehingga perubahan asam amino belum teramati pada populasi pesut.

Kata kunci: Adaptasi, $NADH_2$, Perairan tawar, Pesisir, Pesut

Diterima: 24 Februari 2022, direvisi: 2 Oktober 2022, disetujui: 15 Oktober 2022

Pendahuluan

Pesut merupakan *Cetacean* fakultatif yang mendiami habitat perairan tawar dan pesisir, mulai dari Teluk Bengal di India, Indonesia bagian tengah sampai Filipina (Minton *et al.*, 2018; Smith & Jefferson, 2002). Meskipun memiliki fleksibilitas habitat dan wilayah penyebaran yang luas, kelestarian pesut telah menjadi prioritas konservasi karena kerusakan habitat, pencemaran oleh bahan kimia, tingkat reproduksi yang rendah, serta tingkat mortalitas yang relatif tinggi terutama berkaitan dengan kejadian terjebak jaring nelayan (Kreb, 2004; Minton *et al.*, 2018). Secara umum, pesut dikategorikan sebagai *Endangered* pada daftar merah *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). Berdasarkan penurunan populasi yang cepat serta tekanan bertahan hidup yang tinggi beberapa populasi pesut yang kecil dan terisolasi pada habitat perairan tawar di Sungai Mahakam, Sungai Mekong, dan Sungai Ayeyarwady, populasi pesisir di Filipina (Selat Malampaya dan Iloilo-Guimaras), serta perairan payau di Danau Songkhla dikategorikan sebagai *Critically Endangered* pada daftar merah IUCN (Minton *et al.*, 2018) (Kreb *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004).

Perspektif konservasi memandang daerah penyebaran pesut sebagian besar berada pada daerah dengan aktivitas antropogenik yang tinggi. Hal ini memberikan pengaruh besar pada populasi pesut secara alami untuk dapat bertahan. Selagi aktivitas antropogenik secara intens merupakan faktor pendorong hilangnya biodiversitas, studi terkait aspek evolusi dinilai dapat membantu dalam penentuan kebijakan konservasi yang tepat, khususnya pada populasi pesut yang terisolasi dengan ukuran populasi yang kecil. Aspek evolusi bermanfaat dalam mengevaluasi dinamika populasi, mengidentifikasi *evolutionary significant unit* (ESU), fragmentasi masa lalu terkait dengan aspek lingkungan, mempelajari kecenderungan demografik populasi, dan memberikan gambaran bagaimana strategi yang tepat untuk mengurangi dan mencegah kemungkinan kepunahan pada suatu spesies (Dufresnes *et al.*, 2013; Malaney & Cook, 2013; Moritz & Potter, 2013).

Populasi pesut yang mendiami Sungai Mekong di Kamboja-Laos dan Sungai

Mahakam di Indonesia diprediksi merupakan populasi pesut air tawar sepenuhnya, karena seluruh fase hidupnya terjadi di air tawar (Jefferson *et al.*, 2008; Kreb, 2004; Ryan *et al.*, 2011). Kreb (2004) menyatakan bahwa populasi pesut di Sungai Mahakam memiliki kecenderungan bentuk tubuh, vokalisasi, frekuensi suara, dan sistem sosial yang berbeda dari pesut yang berada di pesisir. Hal ini memungkinkan bahwa populasi kecil dan terisolasi pada pesut yang mendiami perairan tawar telah beradaptasi secara terpisah dari populasi pesut yang berada di pesisir. Namun, kajian terkait aspek genetik berdasarkan sekuens *control region* pada mitokondria populasi pesut di Sungai Mekong dan pesisir Thailand (Caballero *et al.*, 2019), Sungai Mahakam dan pesisir Kalimantan Timur (Budi, 2018) menunjukkan differensiasi yang kecil.

Untuk menginvestigasi lebih lanjut mengenai adaptasi pesut pada perairan tawar, diperlukan kajian menggunakan penanda genetik lain yang dapat membedakan populasi air tawar dan pesisir. Salah satu penanda yang dapat digunakan adalah *NADH subunit 2* pada DNA Mitokondria. Gen *NADH subunit 2* berkaitan dengan efisiensi produksi ATP dan translokasi proton pada organisme perairan tawar yang memerlukan energi lebih besar untuk proses osmoregulasinya (Ortiz, 2001) sehingga sekuens DNA *NADH subunit 2* dapat memberikan gambaran mengenai adaptasi selektif Cetacea pada perairan tawar dan pesisir (Caballero *et al.*, 2015). Hal ini penting untuk memberikan gambaran terkait proses evolusinya. Berdasarkan penjabaran di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk menginvestigasi adaptasi selektif populasi pesut yang mendiami perairan tawar dan pesisir di Indonesia dan Thailand, berdasarkan sekuens DNA mitokondria *NADH subunit 2*. Hasil dari penelitian ini dapat memberikan informasi untuk deliniasi taksonomi, penentuan ESU, dan Unit manajemen sehingga penyusunan strategi konservasi pesut yang dilakukan akan lebih efektif dan tepat.

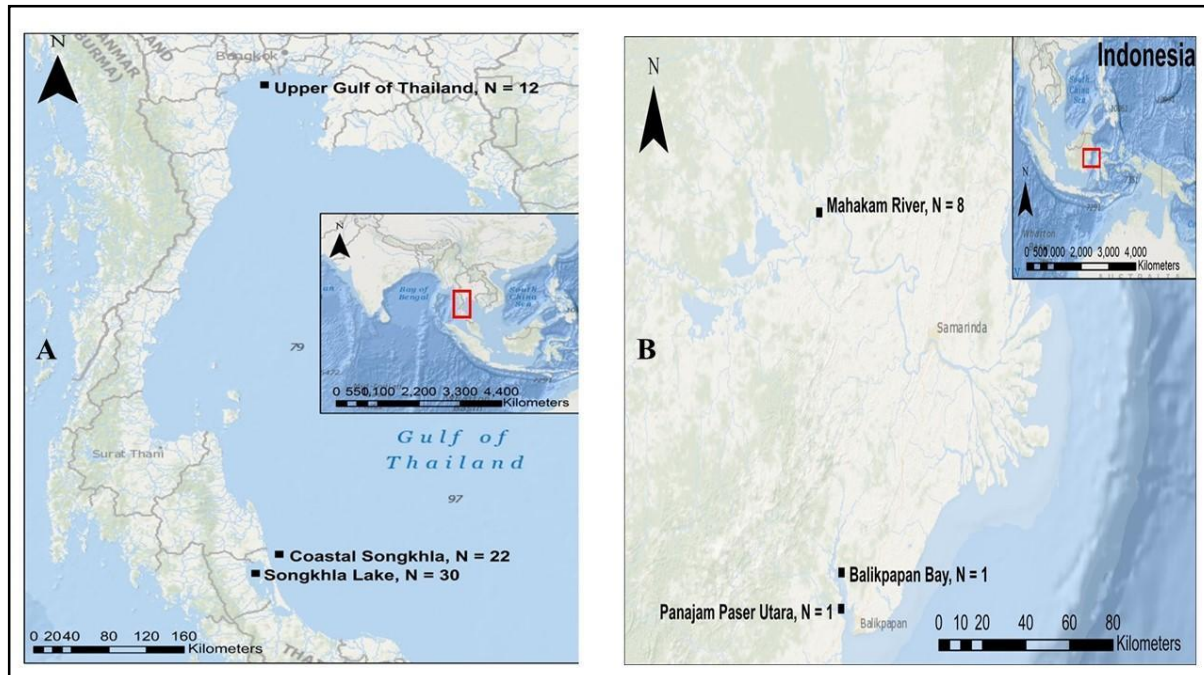
Metode Penelitian

Pengumpulan data

Penelitian ini menggunakan data sekuens DNA mitokondria Pesut (*Orcaella brevirostris*) yang diunduh dari National Center for

Biotechnology Information (NCBI) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Accession number MZ351448- MZ351458 berasal dari 6 lokasi Danau Songkhla, Teluk Thailand bagian bawah, Teluk Thailand bagian atas, Sungai

Mahakam, Teluk Balikpapan, dan pesisir Panajam Paser Utara (Gambar 1). Sekuens DNA $NADH$ subunit 2 dari beberapa spesies Cetacea juga turut diunduh dan digunakan untuk melengkapi analisis (Lampiran 1).



Gambar 1. Lokasi asal sekuens DNA yang digunakan dalam penelitian ini: (A) Sekuens berasal dari negara Thailand yang meliputi populasi Danau Songkhla, Teluk Thailand bagian bawah, dan Teluk Thailand bagian atas. (B) Sekuens berasal dari Indonesia yang meliputi Sungai Mahakam, Teluk Balikpapan, dan Pesisir Panajam Paser Utara.

Analisis data

Data sekuens DNA yang telah diunduh kemudian diperiksa secara manual, disejajarkan, diekstrak *complete coding sequences NADH subunit 2*, dan diterjemahkan menjadi sekuens asam amino menggunakan BioEdit (Hall, 1999). Model substitusi basa terbaik ditentukan secara otomatis menggunakan ModelFinder (Kalyanamoorthy *et al.*, 2017) dan pohon filogenetik dibuat berdasarkan metode maximum likelihood dengan 10000 *ultrafast bootstrap replicates* pada website IQ-Tree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>; Trifinopoulos *et al.*, 2016). Pohon filogenetik divisualisasi menggunakan FigTree (Rambaut, 2012).

Permodelan Protein

Sekuens asam amino $NADH$ subunit 2 digunakan untuk melakukan permodelan struktur protein menggunakan program online SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Hasil

permodelan berupa pdb dianalisis menggunakan program Discovery Studio v.3.5 untuk melihat perubahan folding dari masing-masing protein.

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan 11 sekuens lengkap gen $NADH$ subunit 2 mitokondria yang berasal dari 3 lokasi di Indonesia: 1) Mahakam (MHK), 2) Teluk Balikpapan (BBY), dan 3) Pesisir Panajam Pasir Utara (PPU) serta 3 lokasi di Thailand: 1) Danau Songkhla (SKL), (2) Teluk Thailand bagian bawah (LGT), dan (3) Teluk Thailand bagian atas (UGT). Sekuens $NADH$ subunit 2 dengan kode MHK dan SKL merepresentasikan habitat perairan tawar sedangkan sampel UGT, LGT, BBY, dan PPU merepresentasikan habitat pesisir. Sekuens lengkap gen $NADH$ subunit 2 terdiri atas 1044 pasang basa (bp) dengan kodon *start* ATT dan kodon *stop* TAG.

Berdasarkan data yang digunakan, diperoleh hasil penyejajaran sekuens asam amino dari gen *NADH subunit 2* pesut seperti pada Gambar 2. Hasil penyejajaran mengindikasikan terjadinya perubahan asam amino pada urutan ke 18, 69, 71, 77, 80, 95, dan 242. Substitusi asam amino yang terjadi terlihat acak dan tidak berkorelasi dengan sifat adaptif. Hal ini ditunjukkan dengan substitusi asam amino yang tidak konsisten dan tidak representatif sesuai dengan habitat dimana sekuens tersebut diperoleh.

Cetacea yang telah beradaptasi penuh dengan perairan tawar seperti *Inia geoffrensis* dan *Lipoters vexilifer* (Tabel 1) konsisten memiliki asam amino Alanin yang dikode oleh basa nitrogen GCT/GCC pada urutan sekuens ke 889, 890, dan 891 sedangkan pada spesies pesisir memiliki asam amino Threonin pada asam amino ke 297 gen *NADH subunit 2* nya dikode oleh base nitrogen ACC (Caballero et al., 2015). Perbedaan asam amino terkait perbedaan habitat ini diperkirakan memiliki fungsi yang signifikan pada proses kolonisasi pada habitat yang berbeda. Substitusi asam amino Threonin menjadi Alanin pada urutan asam amino ke 247 *NADH subunit 2* ini mungkin memberikan “kemudahan” dalam kolonisasi habitat perairan tawar. Substitusi ini diperkirakan berkaitan dengan adaptasi terhadap peningkatan kebutuhan energi yang diperlukan untuk dapat mendiami perairan tawar sebagaimana dijumpai pada golongan ikan Euryhaline. Peningkatan kebutuhan energi untuk kolonisasi perairan tawar berkaitan dengan perbedaan salinitas yang membutuhkan net energi renang yang berbeda serta perbedaan kebutuhan energi untuk mempertahankan osmoregulasi (Whitehead et al. 2011; Caballero et al. 2015).

Pada penelitian ini seluruh sekuens memiliki asam amino Threonin pada urutan asam amino ke 297. Hal ini menunjukkan bahwa spesies pesut yang mendiami perairan tawar seperti di Sungai Mahakam dan Danau Songkhla belum beradaptasi penuh terhadap perairan tawar. Hasil serupa juga ditemukan pada sekuens pesut yang berasal dari Sungai Mekong. Terdapat satu sekuens dari keseluruhan 5 sekuens yang dianalisis, yang menunjukkan basa Alanin pada urutan ke 297. Sementara 4 sekuens lain memiliki basa Threonin (Caballero et al., 2015). Meskipun pesut di Sungai Mekong dan Sungai Mahakam

dihipotesiskan sebagai populasi yang beradaptasi penuh pada habitat perairan tawar, namun dari perspektif evolusi, adaptasi pada pesut ini kemungkinan terjadi pada kurun waktu yang relatif baru yang menyebabkan perubahan asam amino belum konsisten pada populasi pesut di perairan tawar (Caballero et al., 2015).

Lebih lanjut, jika ditinjau dari waktu divergensi, Cetacea yang telah beradaptasi penuh dengan perairan tawar seperti *Inia geoffrensis*, *Pantoporia bleinvillei* dan *Lipoters vexilifer* memiliki waktu divergensi yang jauh lebih lama yaitu pada akhir Oligocene (± 23 Juta tahun lalu) (McGowen et al., 2020). Sementara itu, waktu divergensi genus *Sotalia* diprediksi terjadi pada awal Pleistocene (± 2 Juta tahun lalu), sedangkan divergensi pada pesut di Sungai Mahakam diperkirakan terjadi pada pertengahan Pleistocene (<500 ribu tahun lalu) (Budi et al., 2022). Perbandingan rentang waktu divergensi yang relative baru pada pesut dibandingkan dengan Cetacea air tawar lainnya ini, memungkinkan substitusi Threonin menjadi Alanin belum terjadi secara konsisten pada pesut.

Pohon filogenetik yang dihasilkan berdasarkan sekuens lengkap gen *NADH subunit 2* dapat diamati pada Gambar 3. Pada pohon filogenetik, tidak teramati adanya kecenderungan pengelompokan *Cetacean* berdasarkan habitat perairan tawar ataupun pesisir. Hal ini memberikan gambaran bahwa substitusi basa pada *NADH subunit 2* kemungkinan tidak berpengaruh signifikan dalam memfasilitasi kolonisasi perairan tawar (Caballero et al., 2015). Jika ditinjau secara luas, proses seleksi adaptif dan kolonisasi pada habitat baru merupakan proses yang panjang dan kompleks yang dipengaruhi oleh variasi sumber daya, fleksibilitas tingkah laku dan bioekologi dari suatu spesies (Hoelzel, 1998; Louis et al., 2014).

Hal menarik ditunjukkan oleh sekuens OBID03_PPU seperti pada Gambar 2. Penyejajaran sekuens asam amino menunjukkan sekuens ini mengalami substitusi asam amino yang lebih tinggi dibandingkan sekuens lain. Substitusi asam amino dapat menyebabkan perubahan konformasi protein yang mungkin akan mempengaruhi fungsinya (Reece et al., 2011). Secara social-ekologi, pesut yang mendiami Sungai Mahakam menunjukkan perbedaan pada distribusi spasial, periode kawin, strategi kawin, dan interaksi grup.

Demikian juga secara morfologi pesut yang mendiami Sungai Mahakam memiliki ukuran tubuh yang lebih besar dan dimorfisme seksual yang lebih nyata dibandingkan pesut pesisir seperti pada populasi Pesisir Panajam Paser Utara. (Kreb, 2004).

Perbedaan ukuran tubuh seharusnya berkaitan dengan strategi alokasi dan efisiensi energi dan seharusnya menunjukkan adanya variasi asam amino penyusun gen-gen yang berkaitan dengan proses tersebut. Namun, substitusi asam amino serupa tidak teramati pada pesut yang berasal dari populasi pesisir lain. Substitusi asam amino yang teramati pada sampel pesut yang berasal dari Pesisir Panajam Paser Utara (OBID03_PPU) mungkin merupakan fenomena mutasi acak yang tidak berpengaruh terhadap fungsi dari protein yang dihasilkan. Pernyataan ini sesuai dengan hasil permodelan struktur protein yang dilakukan (data tidak ditampilkan). Pada permodelan struktur protein tidak teramati adanya perbedaan struktur protein yang signifikan. Oleh sebab itu, substitusi asam amino yang terjadi pada sekuens ini cenderung tidak berpengaruh terhadap fungsi dari *NADH subunit 2* yang dikode oleh sekuens asam amino ini. Lebih lanjut, substitusi asam amino pada sekuens OBID03_PPU ini tidak terjadi pada asam amino ke-297 yang diprediksi berperan dalam memfasilitasi kolonisasi perairan tawar (Caballero *et al.*, 2015).

Sekuens yang digunakan dalam penelitian ini, belum merepresentasikan semua daerah penyebaran pesut. Akan tetapi, telah mencakup populasi dengan habitat yang berbeda. Penelitian ini menunjukkan bahwa pesut masih dikategorikan sebagai cetacea fakultatif berdasarkan sekuens gen *NADH subunit 2*. Hal ini disebabkan belum adanya

substitusi asam amino para urutan ke 297 yang konsisten antara pesut yang mendiami perairan tawar dan pesisir. Populasi pesut yang mendiami perairan tawar seperti pada Sungai Mahakam memiliki kecenderungan bentuk tubuh, vokalisasi dan frekuensi suara, serta sistem sosial yang berbeda dari pesut yang berada di pesisir (Kreb, 2004). *NADH subunit 2* yang terletak pada DNA mitokondrial berkaitan dengan pengelolaan energi pada organisme.

Studi menunjukkan bahwa perbedaan asam amino penyusun *NADH subunit 2* mungkin tidak memberikan efek signifikan pada pesut, mengingat belum adanya substitusi konsisten yang dapat membedakan populasi perairan tawar dan pesisir (Caballero *et al.*, 2015), sehingga pesut masih bisa mendiami kedua tipe habitat. Pemilihan penanda genetik yang berkaitan langsung dengan variasi morfologi seperti MC1R, RAG1, dan AMBN yang disertai dengan peningkatan jumlah sampel dengan cakupan geografik yang lebih luas dapat memberikan gambaran lebih baik mengenai mekanisme adaptasi pesut pada habitat perairan tawar. Penggunaan teknologi yang lebih modern melalui pendekatan genomik akan meningkatkan pemahaman yang lebih menyeluruh terhadap divergensi pesut.

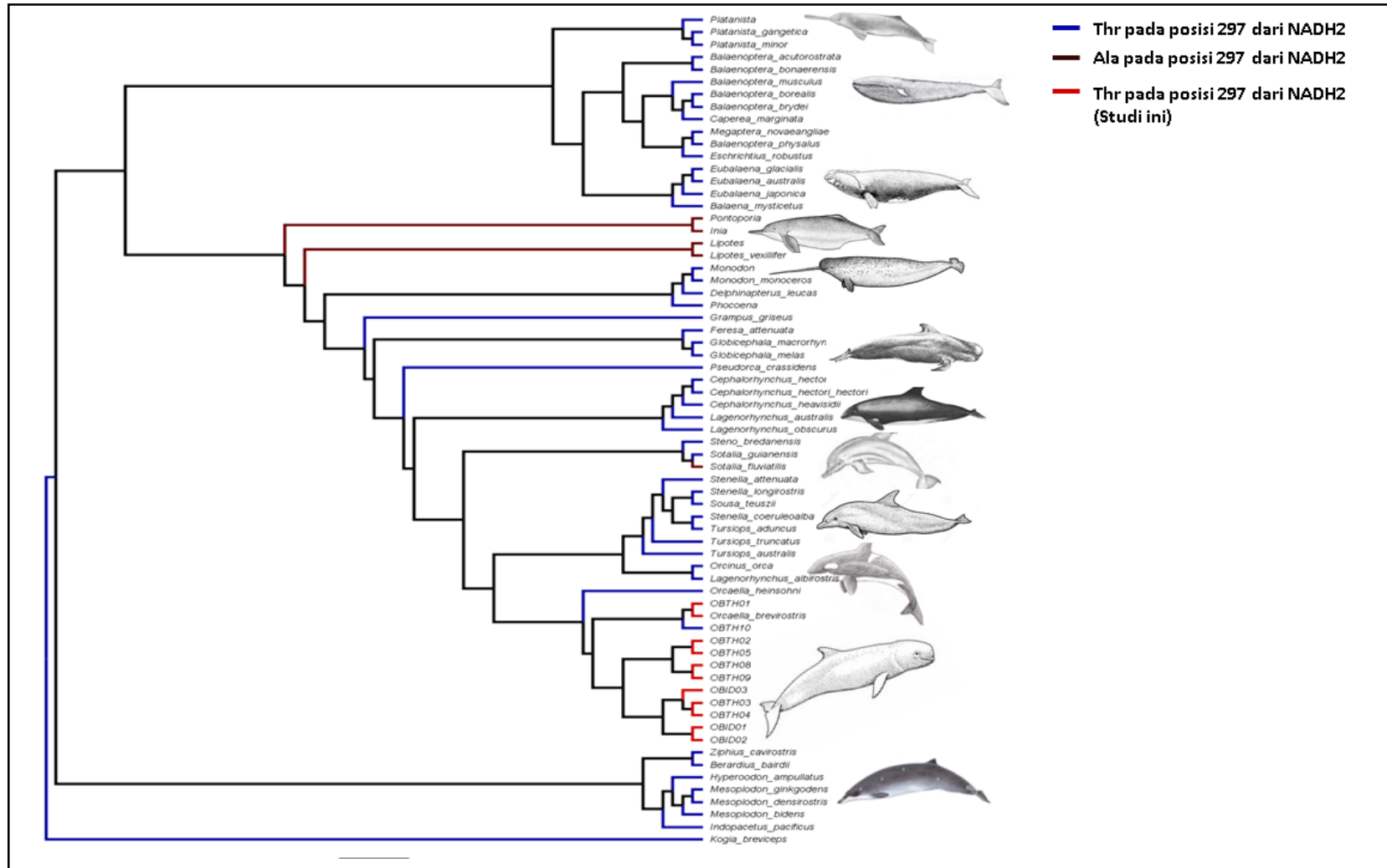
Meskipun hasil penelitian ini tidak menunjukkan adanya seleksi adaptif pada gen *NADH subunit 2* yang mungkin mendorong terjadinya spesiasi, prioritas perhatian dan fokus konservasi harus tetap diprioritaskan pada spesies ini. Aktivitas manusia terbukti menjadi ancaman nyata dalam kelestarian pesut. Terlebih pada populasi yang kecil dan terisolasi seperti pada Sungai Mahakam, Danau Songkhla, dan Sungai Mekong.



Gambar 2. Penyejajaran sekuens asam amino gen *NADH2* pesut (*Orcaella brevirostris*) yang berasal dari Indonesia dan Thailand. Populasi perairan tawar Indonesia terdiri atas populasi Sungai Mahakam (MHK), populasi perairan Pesisir Indonesia direpresentasikan oleh populasi Teluk Balikpapan (BBY) dan Pesisir Panajam Paser Utara (PPU). Populasi perairan tawar Thailand direpresentasikan oleh populasi Danau Songkhla (SKL) sedangkan populasi perairan Pesisir Thailand direpresentasikan oleh populasi Teluk Thailand bagian bawah (LGT) dan Teluk Thailand bagian atas (UGT).

Tabel 1. Komposisi asam amino urutan ke 297 pada gen NADH₂ dan basa nitrogen penyusunnya

Habitat	Spesies	Lokasi	Asam amino urutan ke 297 NADH ₂	Basa nitrogen ke 889	Basa nitrogen ke 890	Basa nitrogen ke 891
Perairan tawar	<i>Inia geoffrensis</i>	Sungai Amazon, Brazil	Alanin	G	C	T
	<i>Inia geoffrensis</i>	Sungai Amazon, Peru		G	C	T
	<i>Inia geoffrensis</i>	Sungai Amazon, Kolombia		G	C	T
	<i>Lipoptes vexilifer</i>	-		G	C	C
	<i>Pantoporia bleinvillei</i>	-		G	C	C
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	Sungai Amazon, Kolombia		G	C	C
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	Sungai Amazon, Brazil		G	C	C
Pesisir	<i>Sousa chinensis</i>	-	Threonin	A	C	C
	<i>Tursiops truncatus</i>	-		A	C	C
	<i>Orcinus orca</i>	-		A	C	C
	<i>Sotalia guianensis</i>	-		A	C	C
	<i>Stenella attenuata</i>	-		A	C	C
	<i>Delphinus delphis</i>	-		A	C	C
Perairan tawar/pesisir	<i>Orcaella brevirostris</i>	Sungai Mahakam	Threonin	A	C	C
	<i>Orcaella brevirostris</i>	Teluk Balikpapan		A	C	C
	<i>Orcaella brevirostris</i>	Pesisir Panajam Paser Utara		A	C	C
	<i>Orcaella brevirostris</i>	Danau Songkhla		A	C	C
	<i>Orcaella brevirostris</i>	Teluk Thailand bawah		A	C	C
	<i>Orcaella brevirostris</i>	Teluk Thailand atas		A	C	C



Gambar 3. Pohon filogenetik *Cetacean* berdasarkan metode *maximum likelihood* dari sekuens komplit *NADH subunit 2* dengan 10000 *ultrafast bootstraps*. Warna biru merepresentasikan spesies yang mendiami habitat pesisir, warna coklat merepresentasikan spesies yang mendiami wilayah perairan tawar, dan warna merah merepresentasikan spesies yang dapat ditemukan di kedua tipe habitat

Simpulan dan Saran

Seleksi adaptif pada gen *NADH subunit 2* pada populasi pesut perairan tawar dan pesisir tidak dijumpai. Tidak adanya seleksi adaptif pada gen ini disebabkan tidak adanya substitusi asam amino konsisten yang berkorelasi dengan perbedaan habitat. Selain itu, waktu divergensi yang relatif baru pada populasi Pesut perairan tawar menyebabkan perubahan substitusi asam amino yang belum konsisten pada keseluruhan populasi pesut.

Penelitian lebih lanjut menggunakan gen-gen yang berkaitan langsung dengan morfologi dan vokalisasi perlu dilakukan untuk memberikan pemahaman mengenai adaptasi pesut pada habitat perairan tawar. Teknik molekuler yang lebih canggih dengan pendekatan *Next Generation Sequencing* juga dapat dilakukan untuk meningkatkan pemahaman yang lebih komprehensif terkait evolusi pesut.

Daftar Pustaka

- Budi, T. (2018). *Diferensiasi Genetik Populasi Pesut (Orcaella brevirostris GRAY, 1866) di Indonesia berdasarkan Penanda Genetik Mitochondrial DNA Control region [Bachelor's thesis]*. Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Budi, T., Piyapattanakorn, S., Krebs, D., Yuda, I. P., Ninwat, S., Hardwises, P., Prachamkhai, P., Senanan, W., Thongsukdee, S., Phavaphutanon, J. dan Klinsawat, W. (2022). Mitogenomes provide insight into complex evolutionary history of freshwater and coastal Irrawaddy Dolphin (*Orcaella brevirostris* GRAY, 1866) in Thailand and Indonesia. *Agriculture and Natural Resources* 56(2022): 583-596.
- Caballero, S., Dove, V., Jackson-Ricketts, J., Junchompoo, C., Cohen, S. dan Hines, E. (2019). Mitochondrial DNA diversity and population structure in the Irrawaddy dolphin (*Orcaella brevirostris*) from the Gulf of Thailand and the Mekong River. *Marine Mammal Science* 35(1): 300–310.
- Caballero, S., Duchêne, S., Garavito, M. F., Slikas, B. dan Baker, C. S. (2015). Initial evidence for adaptive selection on the NADH subunit two of freshwater dolphins by analyses of mitochondrial genomes. *PLoS ONE* 10(5): 1–17.
- Dufresnes, C., Wassef, J., Ghali, K., Breilsford, A., Stöck, M., Lymberakis, P., Crnobrnja-Isailovic, J. dan Perrin, N. (2013). Conservation phylogeography: Does historical diversity contribute to regional vulnerability in European tree frogs (*Hyla arborea*)?. *Molecular Ecology* 22(22): 5669–5684.
- Hall, T. (1999). BioEdit: A User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucl.Acids.Symp.Ser* 41: 95–98.
- Hoelzel, A. R. (1998). Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: Implications for conservation policy. *Journal of Heredity* 89(5): 451–458.
- Jefferson, T. A., Karczmarski, L., Krebs, D., Laidre, K., O’Corry-Crowe, G., Reeves, R., Rojas-Bracho, L., Secchi, E., Slooten, E., Smith, B.D., Wang, J.Y. dan Zhou, K. (2008). *Orcaella brevirostris* (Mahakam River subpopulation). The IUCN Red List of Threatened Species website: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RL.TS.T39428A10237530.en>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A. dan Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14(6): 587–589.
- Krebs, D. (2004). *Facultative River Dolphins Conservation and Social Ecology of Freshwater and Coastal Irrawaddy Dolphins in Indonesia [PhD thesis]*. University of Amsterdam.
- Krebs, D. dan Budiono. (2005). Conservation management of small core areas: key to survival of a critically endangered population of Irrawaddy river dolphins *Orcaella brevirostris* in Indonesia. *Oryx* 39(2):178-188.
- Louis, M., Fontaine, M. C., Spitz, J., Schlund, E., Dabin, W., Deaville, R., Caurant, F., Chereil, Y., Guinet, C. dan Simon-Bouhet, B. (2014). Ecological opportunities and specializations shaped genetic divergence in a highly mobile marine top predator. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281(1795): 1-9.
- Malaney, J. L. dan Cook, J. A. (2013). Using biogeographical history to inform conservation: The case of Preble’s meadow jumping mouse. *Molecular Ecology* 22(24): 6000–6017.
- McGowen, M. R., Tsagkogeorga, G., Álvarez-Carretero, S., Dos Reis, M., Struebig, M., Deaville, R., Jepson, P.D., Jarman, S., Polanowski, A., Morin, P. A. dan Rossiter, S. J. (2020). Phylogenomic Resolution of the Cetacean Tree of Life Using Target Sequence Capture. *Systematic Biology* 63(3): 479–501.
- Minton, G., Smith, B. D., Braluk, G. T., Krebs, D., Sutaria, D. dan Reeves, R. R. (2018). *Orcaella brevirostris*, Irrawaddy Dolphin. The IUCN

- Red List of Threatened Species website: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T20010A22247615.en>
- Moritz, C. C. dan Potter, S. (2013). The importance of an evolutionary perspective in conservation policy planning. *Molecular Ecology* 22(24): 5969–5971.
- Ortiz, R.M. (2001). Osmoregulation in Marine Mammals. *Journal of Experimental Biology* 204(11): 1831-1844.
- Rambaut, A. (2012). *FigTree v1.4.4*. Retrieved from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Reece, J. B., Taylor, M. R., Simon, E. J. dan Dickey, J. L. (2011). *Campbell Biology: Concepts & Connections*. Benjamin Cumming. California.
- Ryan, G. E., Dove, V., Trujillo, F. dan Doherty, P. F. (2011). Irrawaddy dolphin demography in the Mekong river: An application of mark-resight models. *Ecosphere* 2(5): 1-15
- Smith, B. D. dan Jefferson, T. A. (2002). Status and conservation of facultative freshwater cetaceans in Asia. *Raffles Bulletin of Zoology* 10: 173–187.
- Smith, B. D., Sutaria, D., Piwpong, N. dan Koedpoem., S. C. W. (2004). Can Irrawaddy dolphins *Orcaella brevirostris* survive in Songkhla Lake, Thailand? *Natural History Bulletin of the Siam Society* 52(2):181-193.
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A. dan Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44(1): 232–235.
- Whitehead, A., Galvez, F., Zhang, S., Williams, L. M. dan Oleksiak, M. F. (2011). Functional genomics of physiological plasticity and local adaptation in killifish. *Journal of Heredity* 102(5): 499–511.