



Keanekaragaman Jenis Ikan di Hulu Sungai Opak menggunakan *Environmental DNA (eDNA) Metabarcoding*

Fish Diversity in The Upstream of Opak River using Environmental DNA (eDNA) Metabarcoding

Donan Satria Yudha^{1*}, Sophia Salsabila¹, Dwi Sendi Priyono¹

¹*Laboratorium Sistematika Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada
Jl. Teknik Selatan Sekip Utara, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia
Email : donan_satria@ugm.ac.id*

**Penulis Korespondensi*

Abstract

Research on the diversity of fish species in the upstream of Opak River was previously carried out in 2010 and 2013 using conventional methods. However, it has some limitations. Monitoring using eDNA metabarcoding is needed to obtain more detailed and accurate data. In this study, 250 bp 16S Vertebrate primer was used. This research aims to determine the diversity of fish species in the upstream of Opak River in 2022 using an eDNA metabarcoding; determine the differences in diversity of fish species in 2010, 2013, and 2022; and testing the effectiveness of monitoring using eDNA metabarcoding in rivers in the Special Region of Yogyakarta. The methods are water sampling, DNA filtration and preservation, DNA extraction, PCR and electrophoresis, sequencing, and bioinformatic analysis. The results showed that 11 fish species were identified with a minimum percentage of identical matches of 97%. There are more fish species identified in 2022 than in 2010 and 2013. The effectiveness of identifying the diversity of fish species in rivers using eDNA metabarcoding can be done quickly but is less accurate. It is caused by eDNA contamination, lack of target sequence and primer specificity for fish monitoring, and incomplete reference databases for freshwater fish in Indonesia.

Keywords: environmental DNA, upstream of Opak River, fish, diversity, metabarcoding

Abstrak

Penelitian mengenai keanekaragaman jenis ikan di Hulu Sungai Opak DIY sebelumnya telah dilakukan pada tahun 2010 dan 2013 dengan metode konvensional. Akan tetapi, metode tersebut memiliki beberapa keterbatasan. Monitoring menggunakan eDNA *metabarcoding* diperlukan untuk memperoleh data yang lebih detail dan akurat. Pada penelitian ini, digunakan primer 250 bp 16S Vertebrate. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman jenis ikan di hulu Sungai Opak pada tahun 2022 dengan pendekatan eDNA *metabarcoding*; mengetahui perbedaan keanekaragaman jenis ikan di hulu Sungai Opak pada tahun 2010, 2013, dan 2022; dan menguji efektivitas identifikasi keanekaragaman jenis ikan menggunakan eDNA *metabarcoding* di sungai-sungai di Daerah Istimewa Yogyakarta. Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampling air, filtrasi dan preservasi DNA, ekstraksi DNA, PCR dan elektroforesis, sequencing, dan analisis bioinformatik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teridentifikasi 11 spesies ikan dengan nilai minimum *percentage of identical matches* sebesar 97%. Jenis ikan yang teridentifikasi pada tahun 2022 lebih banyak dibandingkan pada tahun 2010 dan 2013. Efektivitas penggunaan eDNA *metabarcoding* dalam identifikasi keanekaragaman jenis ikan di sungai dapat dilakukan secara cepat namun kurang akurat. Ketidakkuratan tersebut disebabkan oleh kontaminasi eDNA, kurangnya spesifitas target sekuens dan primer untuk monitoring ikan, serta database referensi yang belum lengkap untuk ikan air tawar di Indonesia.

Kata kunci: *environmental DNA*, hulu Sungai Opak, ikan, keanekaragaman, *metabarcoding*

Disubmit : 12 September 2023 ; Direvisi : 2 Desember 2023 ; Diterima 17 April 2024



Pendahuluan

Monitoring keberadaan spesies ikan dapat dilakukan dengan pengamatan langsung dan pengamatan tak langsung. Metode monitoring ikan dengan pengamatan langsung seringkali mengalami hambatan karena masih bergantung pada pengambilan sampel biota dengan alat perangkap, jaring, atau *electrofishing*. Selain itu, masalah yang dihadapi dengan teknik ini adalah efisiensi waktu, tenaga, hewan yang sukar ditangkap, serta kerusakan lingkungan akibat teknik sampling secara konvensional. Hal ini juga dapat membatasi keakuratan dalam monitoring kekayaan spesies di perairan. Saat ini metode monitoring keanekaragaman hayati semakin berkembang dengan pengamatan tak langsung menggunakan *environmental DNA* (eDNA) (Andriyono, et al, 2021; Yudha, et al., 2021; Rishan et al., 2023).

Penelitian mengenai monitoring keanekaragaman ikan di Hulu Sungai Opak DIY sebelumnya telah dilakukan oleh Yudha et al. (2020). Hasil yang diperoleh dalam penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada tahun 2013 dijumpai 5 jenis ikan di Hulu Sungai Opak yang belum pernah dijumpai pada penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Djumanto dan Probosunu (2011) di bagian hulu Sungai Opak. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Djumanto dan Probosunu (2011) didapatkan 10 jenis ikan di bagian hulu Sungai Opak. Meskipun demikian, penelitian mengenai monitoring keanekaragaman ikan di hulu Sungai Opak menggunakan eDNA belum pernah dilakukan. Menurut Zhang et al. (2018) dibandingkan dengan taksonomi berbasis morfologi tradisional, eDNA *metabarcoding* dapat mengidentifikasi lebih banyak spesies dan memberikan informasi tambahan untuk memahami keanekaragaman hayati di perairan.

Penelitian mengenai keanekaragaman ikan menggunakan eDNA pernah dilakukan di Sungai Code pada tahun 2021 (Yudha, et al., 2021). Penelitian menggunakan eDNA pada tahun 2021 tersebut menggunakan primer yang menargetkan 313 bp COI metazoan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa identifikasi menggunakan eDNA dengan primer tersebut pada hewan kelompok ikan cukup baik, teridentifikasi beberapa spesies ikan yang memiliki persebaran alami di wilayah Yogyakarta, walaupun didapatkan beberapa

jenis ikan laut dan jenis ikan air tawar yang persebaran alaminya tidak di wilayah Yogyakarta bahkan tidak di Indonesia. Akan tetapi, hasil penelitian tersebut menunjukkan hasil yang kurang baik dalam determinasi hewan kelompok amfibi dan reptil. Pada penelitian kali ini, digunakan primer yang lebih spesifik yaitu 250 bp 16S *Vertebrate*. Oleh karena itu, diharapkan melalui penelitian ini diperoleh data keanekaragaman ikan yang lebih detail dan akurat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman jenis ikan di hulu Sungai Opak pada tahun 2022 dengan pendekatan eDNA *metabarcoding*; mengetahui perbedaan keanekaragaman jenis ikan di hulu Sungai Opak pada tahun 2010, 2013, dan 2022; dan menguji efektivitas identifikasi keanekaragaman jenis ikan air tawar menggunakan eDNA di sungai-sungai di Daerah Istimewa Yogyakarta.

Metode Penelitian

Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan selama 4 bulan pada bulan September hingga Desember 2022 di hulu Sungai Opak dan Laboratorium Sistematika Hewan Fakultas Biologi UGM.

Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu 2 liter sampel air dari hulu Sungai Opak, Zymobiomics DNA *shield* 150 µL, Qiagen DNEASY Blood and Tissue Kit, *pall membrane* 0,45 µm, *bleach* 10%, alcohol 96%, *fluorosafe*, 0.6 µl dari 10 µM pada setiap forward dan reverse primer, 0.2 µl *Biolase taq polymerase* (Bioline) 5 U.µl-1, 0.8 µl of 50 mM Mg^{2+} , 1 µl dari 10 µM dNTP dan 1 µl genomic DNA. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu pompa vakum, *nalgene rapid flow*, *gloves*, gunting, *tweezer*, *silicone tubing*, bunsen, *coolbox*, 2 mL *cycrotube*, botol sampel, pipet tip, *micropipet*, *thermo cycler*, *electrophoresis set*, dan UV *transilluminator*.

Cara Kerja

Observasi dilakukan di hulu Sungai Opak untuk penentuan lokasi pengambilan sampel air. Lokasi pengambilan sampel yang dipilih yaitu berarus dan tidak terlalu dangkal. Daerah yang berarus dipilih karena transport DNA dari tempat asal hewan mengeluarkan DNA dapat

lebih optimal sehingga diperoleh jangkauan deteksi spesies yang lebih luas dari satu titik pengambilan sampel. Adapun daerah yang tidak terlalu dangkal dipilih untuk menghindari kemungkinan rusaknya DNA akibat paparan sinar UV.

Alat dan bahan yang dipersiapkan untuk pengambilan sampel telah disterilisasi dengan alkohol terlebih dahulu. Sebelum dilakukan pengambilan sampel, botol sampel dibilas menggunakan air sungai untuk menghindari kontaminasi. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan sarung tangan bersih. DNA dikoleksi langsung dari kolom air di sungai. Sampel air diambil menggunakan botol sampel sebanyak 2 Liter pada kedalaman 0,2 – 0,3 m. Dikarenakan sensitivitas sampel eDNA, botol sampel disimpan dalam ice box untuk dibawa ke laboratorium (Priyono *et al.* 2022).

Sampel air difiltrasi dengan filter *pall membrane* dengan pori berukuran 0,45 µm menggunakan *vacuum pump* untuk memperoleh materi genetik. Filter membran yang berisi materi genetik dari sampel air dipotong menjadi dua bagian dan dilipat dengan pinset yang telah disterilisasi. Filter yang telah terlipat ditempatkan ke dalam 2 mL *cyrotube* yang berisi Zymobiomics DNA *shield* 150 µL untuk dilakukan penyimpanan (Yudha *et al.* 2021).

Ekstraksi DNA dan Analisis Data

Ekstraksi DNA merupakan prosedur umum dalam memisahkan dan mengumpulkan DNA untuk analisis molekuler. Ekstraksi DNA bertujuan untuk menghancurkan dinding sel sampel jaringan, melepaskan DNA, menghasilkan ekstrak murni, dan melindungi DNA dari degradasi. DNA pada kertas saring diekstraksi dengan menggunakan Qiagen DNEASY Blood and Tissue Kit sesuai protokol pabrik (Leray *et al.*, 2013).

Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan menggunakan gen mitokondria 16S rRNA dan mengapit wilayah *loop* hipervariabel dari gen 16s rRNA dengan ukuran 250 bp. Sekuens diamplifikasi dari dua arah memakai sepasang primer (*pared-end*). Primer yang digunakan adalah Vert-16S-eDNA F1 (AGACGAGAAGACCCYdTGGAGCTT), Vert-16S eDNA-R1 (GATCCAACATCGAGGTCGTAA) (Vences *et al.*, 2016).

Amplifikasi PCR dilakukan dalam volume total 20 µl dengan 0,6 µl dari 10 µM dari setiap primer universal forward dan reverse, 0,2 µl Biolase taq polimerase (Bioline) 5 U.µl-1, 0,8 µl dari 50 mM Mg²⁺, 1 µl dari 10 µM dNTP dan 1 µl DNA genomik. PCR dilakukan dengan 16 siklus awal, yang terdiri dari denaturasi selama 10 detik pada 95°C, anil selama 30 detik pada 60°C (–1°C per siklus) dan ekstensi selama 60 detik pada 72°C, diikuti dengan 25 siklus pada suhu anil 46°C. Keberhasilan amplifikasi PCR diperiksa pada gel agarosa 1,5% dan dengan pewarnaan fluoresafe (Leray *et al.*, 2013). Sekuensing dilakukan dengan *Next-Generation Sequencing* (NGS) dengan Illumina platform.

Data dianalisis dengan pendekatan bioinformatika menggunakan QIIME2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology version 2*) pipeline. Database mitokondria ikan dipreparasi dari website *mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp*. Data reads NGS diimport dan sekuens non-biologis, seperti sekuens primer dibuang sebelum langkah QC dan denoising. QC dan denoising dilakukan untuk memfilter bacaan dengan menghapus sekuens kualitas rendah (Estaki *et al.*, 2020). Klasifikasi taksonomi dilakukan dengan BLAST untuk membandingkan data sekuen yang dimiliki dengan database sekuen yang tersedia untuk mendapatkan taxonomy yang mendekati. Keanekaragaman ikan dianalisis dan divisualisasikan ke dalam tabel (Cahyani & Anggoro, 2020).

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, monitoring menggunakan eDNA *metabarcoding* berhasil mendeteksi spesies ikan dari sampel air di hulu Sungai Opak pada tahun 2022. Keanekaragaman ikan yang terdeteksi ialah sebagai berikut :

Tabel 1. Keanekaragaman ikan yang terdeteksi di hulu Sungai Opak tahun 2022 dengan pendekatan eDNA metabarcoding

No	Spesies	Genus	Famili	Ordo	percentage of identical matches (Pident)
1	<i>Anabas testudineus</i>	<i>Anabas</i>	Anabantidae	Anabantiformes	100%
2	<i>Puntigrus partipentazona</i>	<i>Puntigrus</i>	Cyprinidae	Cypriniformes	100%
3	<i>Oreochromis</i> sp. KM-2006	<i>Oreochromis</i>	Cichlidae	Cichiliformes	98%
4	<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>Oreochromis aureus</i>				98%
5	<i>Trichopodus microlepis</i>	<i>Trichopodus</i>	Osphronemidae	Anabantiformes	98%
6	<i>Rasbora trifasciata</i>	<i>Rasbora</i>	Danionidae	Cypriniformes	98%
7	<i>Pectenocypris balaena</i>	<i>Pectenocypris</i>			98%
8	<i>Poecilia reticulata</i>	<i>Poecilia</i>	Poeciliidae	Cyprinodontiformes	98%
9	<i>Cobitis hankugensis</i>	<i>Cobitis</i>	Cobitidae	Cypriniformes	97%
10	<i>Cobitis matsubarae</i>				97%
11	<i>Mystacoleucus marginatus</i>	<i>Mystacoleucus</i>	Cyprinidae	Cypriniformes	97%

Hasil tersebut menunjukkan bahwa teridentifikasi 11 spesies yang terdiri dari 9 genus, 7 famili, dan 4 ordo dengan nilai minimum *percentage of identical matches* sebesar 97%. Threshold sebesar 97% digunakan karena rata-rata *minimum dissimilarity* antara spesies berdasarkan marker yang umum dipakai pada primer *metabarcoding* (misal: COI, 16S) adalah sekitar 3% (Hebert *et al.*, 2003).

Ikan anggota famili Cichlidae, Danionidae, Cobitidae, dan Cyprinidae masing-masing terdeteksi 2 spesies diantara ke-11 spesies yang teridentifikasi. Sedangkan ikan anggota famili Anabantidae, Osphronemidae, dan Poeciliidae yang terdeteksi hanya diwakili oleh satu spesies saja. *Anabas testudineus* merupakan salah satu spesies ikan air tawar yang teridentifikasi di hulu Sungai Opak dengan *percent identity* sebesar 100%. Keberadaan *Anabas testudineus* di hulu Sungai Opak mungkin terjadi karena ikan ini merupakan jenis ikan air tawar asli Indonesia. Ikan betok terdistribusi luas di Jawa, Bali dan Kepulauan Sumbawa, Sumatra, Kalimantan, dan Sulawesi hingga Papua. Selain itu, ikan ini umumnya juga hidup di sungai, sawah, parit, atau kolam dengan air yang terhubung saluran air terbuka (Akbar, 2017; Juliaha *et al.*, 2020; Wibowo *et al.*, 2022).

Oreochromis niloticus merupakan spesies asli Afrika yang terdeteksi keberadaannya di hulu Sungai Opak. Hal ini dikarenakan ikan ini telah diintroduksi di banyak negara, termasuk Indonesia. Namun, peningkatan pesat populasi *Oreochromis niloticus* menjadikannya spesies invasif (Roesma *et al.*, 2021). Penelitian monitoring keanekaragaman ikan secara konvensional yang dilakukan oleh Yudha *et al.*, (2020) dan Djumanto & Probosunu (2011) membuktikan bahwa spesies ikan introduksi tersebut telah tersebar luas di Sungai Opak dari hulu hingga bagian tengah. Masuknya spesies *Oreochromis niloticus* ke hulu Sungai Opak kemungkinan besar karena dilepas secara sengaja, baik karena bosan, atau untuk kegiatan memancing dan dikonsumsi.

Ikan *Rasbora* merupakan salah satu genus ikan air tawar dengan spesies terbanyak dari famili Cyprinidae. Ikan tersebut terdistribusi luas di daerah Semenanjung Malaysia, Borneo, dan Sumatera. Penelitian yang dilakukan oleh Prakoso (2014) menunjukkan bahwa *Rasbora trifasciata*

merupakan salah satu spesies yang banyak ditemukan di beberapa titik di DAS bagian tenggara Pulau Kalimantan. Penelitian serupa yang dilakukan Rais *et al.*, (2018) juga menunjukkan bahwa *Rasbora trifasciata* ditemukan di DAS Barito. Terdeteksinya ikan *Rasbora trifasciata* di hulu Sungai Opak juga dapat disebabkan karena introduksi. Ikan ini umumnya juga dipelihara sebagai ikan hias (Yeliana, 2017).

Pectenocypris balaena ialah salah satu spesies dari genus *Pectenocypris* yang endemik Indonesia. *Pectenocypris balaena* berasal dari Borneo bagian barat (Provinsi Kalimantan Barat) (Anhelt *et al.*, 2020; Dalu & Wasserman, 2022). Penelitian yang dilakukan Inocencia *et al.*, (2023) membuktikan bahwa *Pectenocypris balaena* merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang ditemukan di kawasan perairan rawa gambut Universitas Palangka Raya, Kalimantan Tengah. Terdeteksinya ikan ini di hulu Sungai Opak juga dapat disebabkan karena false positive atau deteksi palsu dimana DNA yang ditemukan bukan target atau tidak hadir dalam sistem. Hal ini dapat disebabkan oleh deteksi yang kurang tepat pada eDNA non-target, kontaminasi DNA, dan aktivitas transpor eDNA dari lokasi yang jauh (Yudha *et al.*, 2023). Selain itu, dalam penelitian ini digunakan sekuens dengan ukuran pasangan basa yang cukup pendek yaitu 250 bp. Fragmen pendek 16S masih dapat berguna untuk identifikasi spesies dengan cepat, namun fragmen panjang 16s memiliki kinerja yang lebih baik untuk identifikasi (Chan *et al.*, 2022).

Poecilia reticulata atau yang biasa dikenal ikan guppy merupakan salah satu jenis ikan hias air tawar yang banyak digemari karena mudah dipelihara dan memiliki variasi warna yang indah (Saputra *et al.*, 2018). Ikan guppy adalah salah satu ikan air tawar yang berasal dari bagian timur laut Amerika Selatan dan terdistribusi ke banyak negara di setiap benua termasuk Asia. Keberadaan ikan guppy di hulu Sungai Opak juga dapat disebabkan karena ikan ini populer dipelihara oleh masyarakat sebagai ikan hias akuarium maupun digunakan untuk mengendalikan beberapa jenis nyamuk penyebab penyakit (Singh *et al.*, 2010; Saleeza *et al.*, 2014).

Ikan spesies *Mystacoleucus marginatus* teridentifikasi oleh eDNA di hulu Sungai Opak pada penelitian ini. Keberadaan ikan ini di hulu Sungai Opak adalah tepat, karena persebaran

alami ikan ini berada di wilayah Propinsi DIY. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Julaeha (2020) bahwa spesies tersebut memiliki persebaran yang luas di Pulau Jawa. Penelitian serupa yang dilakukan oleh Masykuri (2015), membuktikan bahwa *Mystacoleucus marginatus* merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang ditemukan di Sungai Progo, Yogyakarta. Selain itu, *Mystacoleucus marginatus* atau umumnya disebut wader eco, merupakan sumber protein dan bernilai komersial yang relatif tinggi bagi banyak masyarakat di Indonesia (Kaban & Wibowo, 2018).

Ikan spesies *Punctigrus partipentazona*, *Trichopodus microlepis*, *Cobitis hankugensis*, dan *Cobitis matsubarae* tidak memiliki persebaran di Indonesia. *Punctigrus partipentazona* dan *Trichopodus microlepis* merupakan spesies ikan yang tersebar luas di Asia, khususnya di sungai Mekong dan Chao Phraya. *Punctigrus partipentazona* dikenal luas masyarakat sebagai ikan yang dipelihara di akuarium (FishBase; Kottelat, 2001). Genus *Trichopodus* tersebar di sebagian besar Asia Tenggara, dari Cina selatan, melalui Indochina dan Myanmar, menyusuri Semenanjung Melayu hingga Kalimantan, Sumatera dan Jawa, dan pulau-pulau yang berdekatan (Low et al., 2012). *Cobitis hankugensis* ialah spesies ikan endemik di semenanjung Korea, terutama mendiami Sungai Nakdong dan Sungai Hyongsan serta anak-anak sungainya (Lee et al., 2022). Terdeteksinya spesies-spesies dengan persebaran di luar negeri dapat disebabkan oleh keterbatasan database yang lengkap untuk identifikasi spesies ikan air tawar lokal dengan persebaran di Indonesia. Pada penelitian ini, amplikon dibandingkan dengan database publik MitoFish (mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp). Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Xiong et al (2022), basis data publik dapat memberikan cakupan taksonomi yang lebih tinggi, tetapi resolusi taksonomi yang lebih rendah untuk barcode eDNA pendek, meningkatkan identifikasi spesies yang tidak jelas atau positif palsu. Sementara itu, basis data lokal dapat meningkatkan efisiensi identifikasi spesies dan memastikan identifikasi spesies pada tingkat spesies, meskipun hanya mencakup urutan genetik spesies lokal.

Monitoring keanekaragaman ikan yang dilakukan di Hulu Sungai Opak telah dilakukan

pada tahun 2010, 2012, dan 2022. Penelitian monitoring keanekaragaman ikan pada tahun 2010 dan 2012 dilakukan secara konvensional. Sedangkan penelitian monitoring keanekaragaman ikan pada tahun 2022 dilakukan dengan pendekatan eDNA *metabarcoding*. Berdasarkan monitoring yang dilakukan di Hulu Sungai Opak pada tahun 2010, 2012, dan 2022 diperoleh hasil keanekaragaman ikan sebagai berikut.

Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa hanya spesies *Oreochromis niloticus* dan *Poecilia reticulata* yang terdeteksi pada monitoring keanekaragaman ikan di tahun 2010, 2013, dan 2022. Penelitian ini mendeteksi beberapa spesies ikan yang belum pernah dilaporkan dalam pemantauan sebelumnya dengan cara konvensional.

Metode eDNA merupakan alat yang paling efisien untuk monitoring spesies yang ada di ekosistem perairan, termasuk ikan (Xion et al., 2022). Penelitian ini berhasil mendeteksi 11 spesies ikan air tawar di Hulu Sungai Opak. Adapun pada penelitian yang dilakukan di tahun 2010 ditemukan 10 spesies ikan dan di tahun 2013 didapatkan 9 spesies ikan. Namun, dalam penelitian ini digunakan primer 16s vertebrate yang mengamplifikasi sekuens gen 16s berbagai taksa dari kelompok vertebrata. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa primer yang menargetkan fragmen gen 12s mitokondria telah terbukti mendeteksi keragaman ikan yang lebih besar dibandingkan primer yang menargetkan penanda 16s atau COI. Penggunaan primer yang tidak spesifik juga dapat menghasilkan identifikasi ikan dengan persentase kecocokan yang rendah dengan database referensi (Xiong et al., 2022).

Penelitian ini mengkonfirmasi kemampuan metode eDNA dengan teknik NGS sebagai alat pemantauan keanekaragaman hayati secara cepat. Studi *metabarcoding* eDNA dalam sistem perairan sebelumnya telah menunjukkan bahwa keefektifannya ditandai dengan tidak adanya positif palsu dan negatif palsu. *False-positive* adalah deteksi palsu dimana DNA yang ditemukan bukan target/tidak hadir dalam sistem. Sebaliknya, negatif palsu adalah kondisi di mana terdapat DNA target di dalam sistem, tetapi tidak terdeteksi selama pemantauan.

Tabel 2. Perbandingan keanekaragaman ikan di hulu Sungai Opak tahun 2022, 2013, dan 2010

No.	Spesies	Tahun Penelitian		
		Penelitian tahun 2010 oleh Djumanto & Probosunu (2011)	Penelitian tahun 2013 oleh Yudha et al., (2020)	Penelitian tahun 2022
1	<i>Anabas testudineus</i>	-	-	✓
2	<i>Puntigrus partipentazona</i>	-	-	✓
3	<i>Oreochromis niloticus</i>	✓	✓	✓
4	<i>Trichopodus microlepis</i>	-	-	✓
5	<i>Rasbora trifasciata</i>	-	-	✓
6	<i>Pectenocypris balaena</i>	-	-	✓
7	<i>Poecilia reticulata</i>	✓	✓	✓
8	<i>Cobitis hankugensis</i>	-	-	✓
9	<i>Cobitis matsubarae</i>	-	-	✓
10	<i>Mystacoleucus marginatus</i>	-	-	✓
11	<i>Barbodes binotatus</i>	✓	✓	-
12	<i>Barbonymus gonionotus</i>	✓	-	-
13	<i>Rasbora argyrotaenia</i>	-	✓	-
14	<i>Nemacheilus fasciatus</i>	✓	✓	-
15	<i>Lepidocephalichthys hasseltii</i>	-	✓	-
16	<i>Poecilia latipinna</i>	✓	-	-
17	<i>Xiphophorus hellerii</i>	✓	-	-
18	<i>Dermogenys pusilla</i>	-	✓	-
19	<i>Channa gachua</i>	-	✓	-
20	<i>Channa striata</i>	✓	-	-
21	<i>Trichopodus trichopterus</i>	-	✓	-
22	<i>Clarias batrachus</i>	✓	-	-
23	<i>Monopterus albus</i>	✓	-	-

Dalam penelitian ini, *false-positive* dapat terjadi karena beberapa hal, diantaranya adalah kontaminasi eDNA pada sampel air dan spesifitas primer yang rendah (Roesma *et al.*, 2021). Adanya negatif palsu dalam penelitian ini dapat dikarenakan kemungkinan DNA dari spesies ikan di hulu Sungai Opak belum terdaftar dalam database referensi sehingga hasil identifikasi menunjukkan spesies ikan yang berkerabat dekat dan sekuens DNA-nya tersedia dalam database (Yudha *et al.*, 2023).

Simpulan dan Saran

Monitoring keanekaragaman jenis ikan di hulu Sungai Opak dengan eDNA *metabarcoding* pada tahun 2022 berhasil mengidentifikasi 11 spesies yang terdiri dari 9 genus, 7 famili, dan 4 ordo dengan nilai *minimum percentage of identical matches* sebesar 97%. Monitoring keanekaragaman jenis ikan di hulu Sungai Opak dengan eDNA pada tahun 2022 mengidentifikasi lebih banyak spesies ikan dibandingkan pada tahun 2010 dan 2013. Efektivitas penggunaan eDNA *metabarcoding* dalam identifikasi keanekaragaman jenis ikan air tawar di sungai-sungai di Daerah Istimewa Yogyakarta dapat dilakukan secara cepat namun kurang akurat. Ketidakkuratan tersebut disebabkan oleh kontaminasi eDNA, kurangnya spesifitas target sekuens dan primer untuk monitoring ikan, serta database referensi yang belum lengkap untuk ikan air tawar di Indonesia.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang mengkaji pemanfaatan metode eDNA *metabarcoding* untuk monitoring keanekaragaman jenis ikan di sungai-sungai di Daerah Istimewa Yogyakarta dengan menambahkan pengulangan sampel untuk meningkatkan efektivitas penangkapan DNA dan kemungkinan deteksi eDNA yang diinginkan. Selain itu, perlu digunakan primer dengan target yang spesifik untuk spesies-spesies ikan.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Fakultas Biologi UGM yang telah memfasilitasi, Kepala Laboratorium Sistematika Hewan dan staf laboran yang telah

memberikan izin kerja dan peminjaman alat di laboratorium, serta teman seperjuangan yang telah banyak membantu identifikasi dan diskusi.

Daftar Pustaka

- Akbar, H. (2017). Ekobiologi, habitat, dan potensi budidaya ikan betok (*Anabas testudineus* BLOCH) di Indonesia. *Jurnal Ilmiah Samudra Akuatika* 1(1): 1.
- Andriyono, S., Alam, J., & Kim, H. W. 2021. Marine fish detection by environmental DNA (eDNA) metabarcoding approach in the Pelabuhan Ratu Bay, Indonesia. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology* 11(2): 729-737.
- Amin, M. H. F. (2021). *Pemetaan Genom Mitokondria Ikan Air Tawar Indonesia sebagai Fondasi Assessment Biodiversitas non-Invasif*. <https://news.unair.ac.id/2021/01/07/pemetaan-genom-mitokondria-ikan-air-tawar-indonesia-sebagai-fondasi-assessment-biodiversitas-non-invasif/>. Diakses tanggal 5 September 2022, jam 18.12.
- Anhelt, H., Wibowo, A., Prianto, E. (2020). A new species of *Pectenocypris* (Teleostei: Cyprinidae) from peat. *Vertebrate Zoology* 70(1): 1-8.
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M.T.P., Carvalho, G.R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D.W., de Bryn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(6): 358-367.
- Cahyani, N. K. D. & Anggoro, A. W. (2020). QIIME2 tutorial untuk data DNA *metabarcoding*. *Bionesia*. 1- 10.
- Calderón-Sanou, I., Münkemüller, T., Boyer, F., Zinger, L., Thuiller, W. (2019). From environmental DNA sequences to ecological conclusions: How strong is the influence of methodological choices?. *Journal of Biogeography* 47(1): 193-206.
- Chan, K. O., Hertwig, S. T., Neokleous, D. N., Flury, J. M., & Brown, R. M. (2022). Widely used, short 16S rRNA mitochondrial gene fragments yield poor and erratic results in phylogenetic estimation and species delimitation of amphibians. *BMC ecology and evolution* 22(1): 37.

- Cristescu, M.E., Hebert, P.D.N. (2018). Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49(1): 209-230.
- Djumanto & Probosunu, N. (2011). Biodiversitas sumber daya ikan di hulu Sungai Opak. *Jurnal Ikhtologi Indonesia*. 11(1): 1-10.
- Djumanto, Gustiana, M., Setyobudi, E. (2015). Dinamika Populasi Ikan Belanak, *Chelon Subviridis* (Valenciennes, 1836) di Muara Sungai Opak. *Jurnal Iktiologi Indonesia* 15(1): 13-24.
- Estaki, M., Jiang, L., Bokulich, N. A., McDonald, D., González, A., Kosciolk, T., Martino, C., Zhu, Q., Birmingham, A., Vázquez-Baeza, Y., Dillon, M. R., Bolyen, E., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2020). QIIME 2 enables comprehensive end-to-end analysis of diverse microbiome data and comparative studies with publicly available data. *Current protocols in bioinformatics* 70(1): 100.
- Freeland, J. R. (2017). The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA. *Genome* 60(4): 358–374.
- Froese, R. & Pauly, D. (2023). FishBase [Daring]. Tersedia: <https://www.fishbase.se/> versi (02/2023). Diakses tanggal 20 Juni 2023, jam 18.00 WIB
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., Waard, J. R. De, B, P. R. S. L., & Jeremy, R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*.
- Inocencia, A., Gonggoli, A. D., Rangin, A. R., Dendie, Putra, E. D., Lorensi, M., Nareyasa, W. A., Kadafi, A. M. (2021). Inventarisasi Jenis Ikan Air Tawar di Kawasan Kampus Universitas Palangka Raya, Kalimantan Tengah. *Jurnal Ilmu Hayat* 5(1): 35-42.
- Jackson, M.C., Wely, O.L.F., Altermatt, F., Durance, I., Friberg, N., Drumbrell, A.J., Piggott, J.J., Tiegs, S.D., Tockner, K., Krug, C.B., Leadley, P.W., Woodward, G. (2016). Recommendations of the next generation of global freshwater biological monitoring tools. *Advances in Ecological Research* 55: 615-636.
- Julaeha, A. S. (2020). *Karakterisasi genetik ikan betok (Anabas testudineus Bloch, 1792) dari Danau Lebo Taliwang, Sumbawa Barat, Nusa Tenggara Barat berdasarkan gen mitokondria 16S [Skripsi]*. Universitas Gadjah Mada.
- Kaban, S. & Wibowo, A. (2018). Genetic diagnosis and reproductive biology of introduced *Mystacoleucus marginatus* in the Toba Lake, North Sumatra. *Indonesian Fisheries Research Journal* 24(1): 1.
- Kamiswara, R., Herawati, T., Yustiati, A., Nurhayati, A., Pamungkas, W., Lili, W. (2022). Growth Pattern of *Mystacoleucus marginatus* (Valenciennes 1842) in Cimanuk and Cipeles River, West Java. *Jurnal Perikanan* 24(1): 63-70.
- Kottelat, M., Whitten, A. J., Kartikasari, S. N., & Wirjoatmodjo, S. (1993). *Freshwater Fishes of Western Indonesia dan Sulawesi*. 1st Edition. Periplus Editions (HK) Ltd. Jakarta.
- Lee, S. R., Kim, E., Go, Y., Kang, Y., Alam, M. J., Kim, K. S., Andriyono, S. & Kim, H. (2022). The complete mitochondrial genome of the Korean endemic species *Cobitis hankugensis* (Kim, Park, Son & Nalbant, 2003). *Mitochondrial DNA Part B* 7(1): 21-22.
- Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V. Boehm, J. T., Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10(34): 1-14.
- Low, B. W., & Lim, K. K. P. (2012). Gouramies of the genus *Trichopodus* in Singapore (Actinopterygii: Perciformes: Osphronemidae). *Nature in Singapore* 5: 83-93.
- Masykuri, M. F. (2015). *Keanekaragaman morfologi ikan wader (famili cyprinidae) di Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta [Skripsi]*. Universitas Sebelas Maret.
- Prakoso, R. D. (2014). *Deskripsi dan distribusi ikan genus Rasbora pada kelompok spesies Rasbora sumatrana dan kelompok spesies Rasbora trifasciata di tenggara Kalimantan, Indonesia [Skripsi]*. Universitas Indonesia.

- Rais, A. H., Wulandari, T. N. M., Dharyati, E. (2019). Aktivitas penangkapan dan produksi ikan di Kabupaten Hulu Sungai Utara Kalimantan Selatan. *J.Lit.Perikan.Ind* 24(4): 227-238.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., Gough, K. C. (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5): 1450-1459.
- Rishan, S. T., Kline, R. J., Rahman, M. S. (2023). Applications of environmental DNA (eDNA) to detect subterranean and aquatic invasive species: A critical review on the challenges and limitations of eDNA metabarcoding. *Environmental Advances* 12(100370): 1-12.
- Roesma, D. I., Tjong, D. H., & Janra, M. N., Aidil, D. R. (2021). Freshwater vertebrates monitoring in Maninjau Lake, West Sumatra, Indonesia using environmental DNA. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 22.
- Saleeza, S. N., Norma-Rashid, Y. & Sofian-Azirun, M. (2014). Guppies as predators of common mosquito larvae in Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 45(2): 299-308.
- Salsabila, S. (2015). *Monitoring keanekaragaman jenis ikan di hulu Sungai Opak Daerah Istimewa Yogyakarta menggunakan environmental DNA (eDNA) metabarcoding [Skripsi]*. Universitas Gadjah Mada.
- Saputra, A., Wulandari, A., Ernawati, Yusuf, M. A., Eriswandy, I., Hidayani, A. A. (2018). Penjantanan ikan gapi, *Poecilia reticulata* Peters, 1859 dengan pemberian ekstrak jeroan teripang pasir (*Holothuria scabra*). *Jurna. Ikhtiologi Indonesia* 18(2):127-137.
- Schallenberg, L., Wood, S.A., Pochon, X., Pearman, J.K. (2020). *What Can DNA in the Environment Tell Us About an Ecosystem?*. <https://kids.frontiersin.org/article/10.3388>. Diakses tanggal 5 September 2022, jam 10.30.
- Shu, L., Ludwig, A., Peng, Z. (2020). Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. *Genes MDPI AG* 11(3): 296.
- Singh, A. S., Mandal, S.C. & Barman, A.D. (2010). Selective breeding in ornamental fishes – a step toward development in production of new variety. *Aquaculture Europe* 35(4): 14-16.
- Syafei, L. S. (2017). Keanekaragaman Hayati Dan Konservasi Ikan Air Tawar. *Jurnal Penyuluhan Perikanan dan Kelautan* 11(1): 4862.
- Vences, M., Lyra, M. L., Perl, R. G. B., Bletz, M. C., Stankovic, D., Lopes, C. M., Jarek, M., Bhuj, S., Geffers, R., Haddad, C. F. B., Steinfartz, S. (2016). Freshwater vertebrate metabarcoding on Illumina platforms using double-indexed primers of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Conservation Genet Resour* 8: 323-327.
- Wardhana. P. N. (2015). Analisis transpor sedimen sungai opak dengan menggunakan program hec-ras 4.1.0. *Jurnal Teknisia* 11(1): 22-31.
- Wibowo, A., Kurniawan, K., Atminarso, D., Prihadi, T. H., Baumgartner, L. J., Rourke, M. L., Nagai, S., Hubert, N., Vasemagi, A. (2022). Assessing freshwater fish biodiversity of Kumbe River, Papua (Indonesia) through environmental DNA metabarcoding. *Pacific Conservation Biology* 29(4): 340-350.
- Xiong, F., Shu, L., Zeng, H., Gan, X., He, S., Peng, Z. (2022). Methodology for fish biodiversity monitoring with environmental DNA metabarcoding: The primers, databases and bioinformatic pipelines. *Water Biology and Security* 1(1): 1-7.
- Yeliana. (2017). Potensi dan status konservasi iktiofauna di sungai serkap areal restorasi ekosistem Riau, Provinsi Riau [Artikel Ilmiah]. Universitas Jambi.
- Yudha, D.S., Trijoko, R. Eprilurahaman, R. Nugraha, R.D.P. Suranto, F.U. Abida, V.F. Tobing, R.F. Fathiya, S. Nopitasari. 2020. Keanekaragaman Jenis Ikan di Sepanjang Sungai Opak Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati* 5(2): 81-91
- Yudha, D. S., Priyono, D. S., Izzati, R., Ardianto, A. S., Puradi, A., Nainggolan. (2021). Comparising DNA extraction from environmental DNA samples to reveal the diversity of freshwater metazoans. *Biogenesis* 9(2): 206-212.
- Yudha, D. S., Trijoko, Eprilurahaman, R., Nugraha, R., Suranto, R. D. P., Abida, F. U., Tobing, V. F., Fathiya, R. F., Nopitasari, S. (2020). Keanekaragaman Jenis Ikan di Sepanjang Sungai Opak Propinsi Daerah Istimewa

Yogyakarta, Indonesia. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati* 5(2): 81-91.

Zhang, X, Xia, P, Wang, P, Yang, J, Baird, D.J. (2018). Omics Advances in Ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*, 52(7): 3842-3851.