



KEKERABATAN *Zeylanicobdella arugamensis* PADA IKAN KERAPU CANTANG DENGAN PENDEKATAN MOLEKULER DI JAWA TIMUR DAN LOMBOK

Sherly Ochtavia¹, Gunanti Mahasri^{2*}, & Mufasirin³

¹Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jalan Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur 60115, Indonesia

²Departemen Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jalan Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur 60115, Indonesia

³Departemen Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Jalan Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur 60115, Indonesia

*Email: gunanti.m@fpk.unair.ac.id

Submit: 21-01-2024; Revised: 26-01-2024; Accepted: 16-02-2024; Published: 30-06-2024

ABSTRAK: Ikan kerapu cantang merupakan ikan budidaya yang banyak diminati di Indonesia dan memiliki nilai jual tinggi. Kendala budidaya ikan kerapu salah satunya adalah serangan ektoparasit lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis*. Nilai prevalensi infestasi ektoparasit mencapai 100%. Cara efektif untuk menangani infestasi ektoparasit adalah dengan melihat profil molekuler untuk menjadi informasi kajian pustaka awal dalam pengembangan biologi molekuler sebagai upaya dalam mengatasi kendala budidaya pada ikan kerapu cantang. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari homologi dan kekerabatan *Zeylanicobdella arugamensis* pada ikan kerapu cantang di Jawa Timur yaitu Lamongan, Mandangin, Situbondo, dan Lombok. Metode yang digunakan adalah RT-PCR dengan primer gen *mtDNA COI*. Lalu dilakukan pengumpulan data sekuens molekuler dari sampel dan dibandingkan dengan data di NCBI *GenBank* serta dianalisis pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-joining* dan analisis data homologi pada BLAST. Hasil penelitian menunjukkan gejala klinis pada ikan kerapu cantang terjadi pembengkakan, lesi/luka, kulit berwarna pucat, nafsu makan menurun, dan sirip geripis. Hasil elektroforesis produk PCR menunjukkan *band* tunggal pada 750bp untuk sampel dari Lamongan, Situbondo, Mandangin, dan Lombok. Hasil sekuensing DNA di BLAST pada situs NCBI dan dianalisis homologi terhadap gen *reference*. Hasil analisis homologi antara sampel dari Situbondo dan Lamongan menunjukkan angka paling tinggi yaitu sebesar 98,28%, sedangkan hasil paling rendah antara sampel dari Mandangin dan Situbondo yaitu sebesar 88,51%. Berdasarkan hasil analisis *phylogenetic tree* menunjukkan sampel asal perairan Lamongan dengan Situbondo memiliki tingkat kekerabatan yang dekat karena jarak genetiknya sebesar 0,009272.

Kata Kunci: *COI*, Ikan Kerapu Cantang, Kekerabatan, Molekuler, *Zeylanicobdella arugamensis*.

ABSTRACT: Giant grouper is a highly sought-after cultivated fish in Indonesia due to its high market value. One of the challenges in grouper aquaculture is the infestation of the sea leech ektoparasite *Zeylanicobdella arugamensis*. The prevalence rate of ektoparasite infestation reaches up to 100%. An effective method to manage ektoparasite infestation is through molecular profiling, serving as preliminary literature in the development of molecular biology efforts to overcome cultivation challenges in giant grouper. This research aims to study the homology and relationship of *Zeylanicobdella arugamensis* on giant grouper in East Java, specifically in Lamongan, Mandangin, Situbondo, and Lombok. The method used is RT-PCR with *mtDNA COI* gene primers. Molecular sequence data were collected from samples and compared with data from NCBI *GenBank*, and analyzed using *Neighbor-joining* phylogenetic tree method and homology data analysis on BLAST. The research results indicate clinical symptoms in giant grouper including swelling, lesions/wounds, pale skin, decreased appetite, and fin erosion. Electrophoresis results from PCR products show a single band at 750bp for samples from Lamongan, Situbondo, Mandangin, and Lombok. DNA sequencing results on NCBI BLAST and homology analysis against the reference gene were conducted. Homology analysis results between samples from Situbondo and Lamongan show the highest similarity at 98.28%, whereas the lowest similarity is between samples from Mandangin and Situbondo at 88.51%. Based on phylogenetic tree analysis, samples from Uniform Resource Locator: <https://e-journal.undikma.ac.id/index.php/bioscientist>



Lamongan and Situbondo waters show a close relationship with a genetic distance of 0.009272.

Keywords: COI, Giant Grouper, Relationship, Molecular, *Zeylanicobdella arugamensis*.

How to Cite: Ochtavia, S., Mahasri, G., & Mufasirin, M. (2024). Kekerabatan *Zeylanicobdella arugamensis* pada Ikan Kerapu Cantang dengan Pendekatan Molekuler di Jawa Timur dan Lombok. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*, 12(1), 1043-1056. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v12i1.10627>



Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi is Licensed Under a CC BY-SA [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

PENDAHULUAN

Ikan kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Ephinephelus lanceolatus*) adalah ikan yang banyak diminati di Indonesia sehingga ikan kerapu banyak dibudidayakan dan memiliki nilai jual yang tinggi. Kegiatan ekspor terhadap kerapu di Indonesia tercatat terbesar kedua di dunia setelah Filipina. Volume ekspor kerapu mencapai 97,37% atau rata-rata tumbuh 3,50% pertahun. Tingkat peminatan kerapu diperkirakan mencapai 35.000 ton per tahun dengan negara pengimpor utama yaitu Hongkong, Taiwan, China, Jepang, Korea Selatan, Vietnam, Thailand, Filipina, Amerika Serikat, Australia, Singapura, Malaysia, dan Perancis.

Permasalahan mengenai budidaya ikan kerapu sangat beragam, salah satunya adalah faktor lingkungan seperti pencemaran air dari pembuangan limbah industri dan rumah tangga yang menjadi pemicu terjadinya stres bagi inang sehingga daya tahan tubuh menurun dan menjadi rentan terserang penyakit dari berbagai parasit lintah yang menempel pada ikan kerapu (Irianto, 2017). Budidaya ikan kerapu memiliki kendala yaitu faktor penyakit yang menyebabkan kerugian terhadap hasil budidaya. Budidaya ikan kerapu juga bergantung pada kesehatan dan penerapan manajemen pemantauan kualitas air yang baik. Jika dalam budidaya tidak menerapkan manajemen kualitas air dengan baik maka ikan akan terpapar stres dari patogen terus-menerus dan menyebabkan kematian pada ikan kerapu. Pengaruh limbah industri juga mengakibatkan keramba jaring apung menjadi kotor, sehingga sisa pakan yang tidak terkonsumsi oleh ikan dan hasil dari kegiatan metabolisme ikan (feses dan urin) tidak dapat terurai yang berakibat munculnya berbagai penyakit pada ikan, khususnya penyakit yang diakibatkan oleh parasit (Anrosana & Gemaputri, 2017; Sofiana *et al.*, 2023).

Salah satu kendala utama dalam budidaya yang prevalensinya masih tinggi adalah adanya serangan penyakit parasiter yang disebabkan oleh cacing lintah *Zeylanicobdella arugamensis*. Hasil observasi yang dilakukan di pertambakan menunjukkan terdapat beberapa lokasi tambak dan karamba jaring apung yang diperiksa, ditemukan rata-rata nilai prevalensi sebanyak 6 kali pengambilan mencapai 11 – 90% dari total sampel yang diperiksa (50 – 225 ekor), dengan intensitas (rata-rata jumlah *Zeylanicobdella arugamensis* yang ditemukan pada tiap ekor ikan kerapu sebesar 4 – 17 individu/ekor ikan. Beberapa penelitian diantaranya Mahardika *et al.* (2018), Mahardika *et al.* (2019), dan Mahasri *et al.* (2020)



menunjukkan prevalensi *Zeylanicobdella arugamensis* pada ikan kerapu cantang mencapai 100%. Patogenisitas dari lintah ini rendah, tetapi infestasi berat dapat menimbulkan luka pada kulit sehingga memberi peluang infeksi sekunder oleh bakteri atau parasit lainnya. Area melekatnya *Zeylanicobdella arugamensis* akan mengalami hemoragi dan pembengkakan kulit, sedangkan sirip akan menjadi gripis. Infestasi ektoparasit pada ikan dapat menimbulkan kerugian, meskipun kerugian yang ditimbulkan tidak sebesar kerugian akibat infeksi bakteri atau virus, namun tingkat infestasi ektoparasit pada ikan kerapu yang tinggi dapat mengakibatkan kematian akut, yaitu terjadinya mortalitas tanpa menunjukkan gejala terlebih dahulu. Berbagai upaya penanggulangan sudah dilakukan baik dengan menggunakan bahan kimia maupun direndam di dalam air tawar, salah satunya dengan menggunakan imunostimulan untuk meningkatkan pertumbuhan dan tingkat kelangsungan hidup, namun hasil yang dicapai belum memenuhi target, prevalensi dan intensitas di beberapa lokasi masih menunjukkan angka tinggi (Wang *et al.*, 2016).

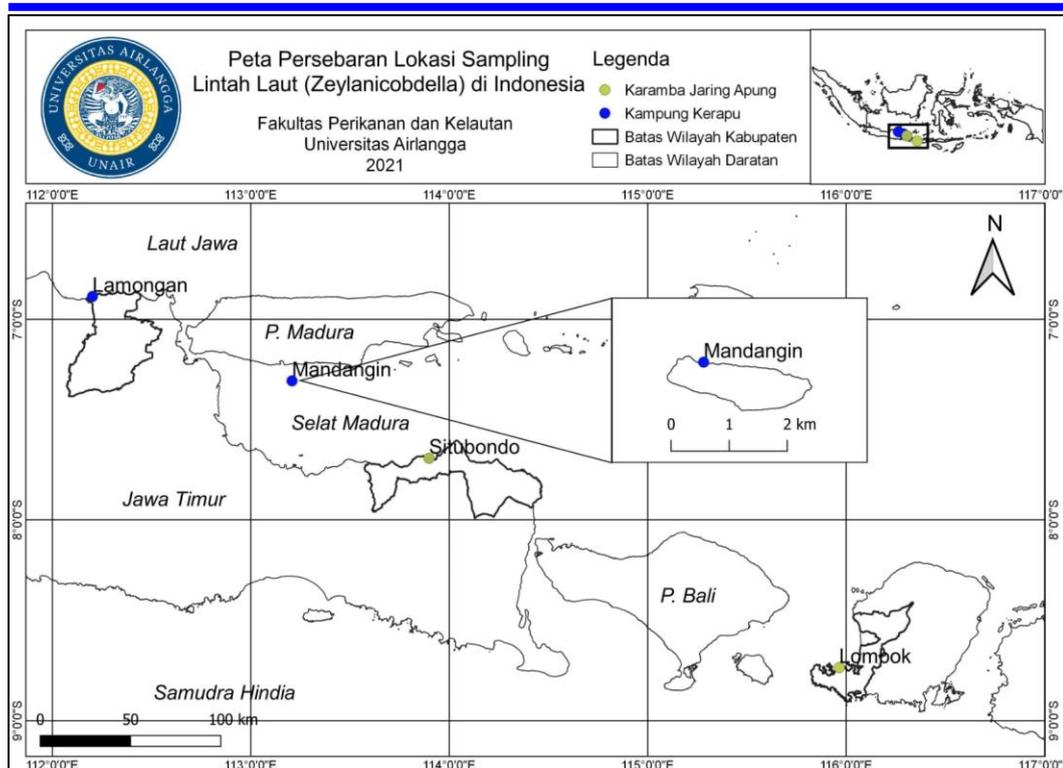
Salah satu cara yang dianggap cukup efektif untuk mengetahui infestasi ektoparasit adalah dengan melihat profil morfologis dengan bantuan kunci identifikasi. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengamati molekul DNA parasit dalam menentukan validitas dan hubungan spesies berdasarkan rekonstruksi pohon filogenetik. Data molekuler untuk diferensiasi spesies parasit digunakan dalam membedakan spesies tingkat kesamaan morfologis yang tinggi. Selain itu, menggunakan urutan DNA untuk menyimpulkan hubungan kekerabatan antar spesies parasit (Wang *et al.*, 2016). Pendekatan molekuler sangat penting untuk mengetahui sejarah evolusi dan dapat digunakan sebagai informasi perkembangan biologi, fisiologi, biokimia, dan biologi molekuler sehingga dapat menambah, mengkonfirmasi, dan mengurangi berdasarkan fitur morfologis suatu organisme jika terdapat mutasi genetik atau pergeseran DNA melalui sekuensing DNA.

Berdasarkan permasalahan tersebut, diperlukan penelitian untuk mempelajari homologi dan hubungan kekerabatan spesies lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang menginfestasi ikan kerapu dari perairan Jawa Timur dan Lombok serta dibandingkan dengan data yang ada pada *GenBank*, yang nantinya dapat dijadikan sebagai sumber informasi dalam upaya pencegahan dan pengendalian serangan lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis*.

METODE

Tempat dan Waktu

Pengambilan sampel dilakukan di tiga wilayah di perairan Jawa Timur yaitu Lamongan, Mandangin, Situbondo, dan satu wilayah di perairan Lombok pada Bulan Mei 2021-Oktobre 2022. Kemudian sampel dilakukan pengujian analisa PCR dan sekuensing di Laboratorium Prof. Nidom *Foundation*. Peta lokasi pengambilan sampel terdapat pada Gambar 1.



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel.

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan untuk pemeriksaan molekuler lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* menggunakan metode PCR adalah MJ *research thermal cycler* (model-PTC-200), *micro centrifuge*, *freezer*, *transilluminator*, mikropipet, tabung 15 ml, tabung 1,5 ml, ZymoBIOMICS DNA Extraction Kit (ZR Bashingbead Lysis tube, Zymo-spin III-F Filter, collection tube, PCR tube, electrophoresis system, Zymo-spin IICR column, Zymo-spin III-HRC Filter), inkubator, *tissue rupture*, UV box, timbangan analitik, gelas ukur, pinset, pengukur waktu, dan komputer dengan program NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis*).

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kerapu cantang berukuran 13-20 cm yang terinfeksi lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang diperoleh dari hasil tangkapan di KJA (Keramba Jaring Apung) dan Kampung Kerapu nelayan di Lamongan, Mandangin Madura, Situbondo, dan Lombok. Jumlah sampel di setiap lokasi yang digunakan untuk uji genetik adalah 50 ekor ikan kerapu cantang. Setelah itu lintah laut yang menginfeksi ikan kerapu tersebut diambil.

Bahan yang digunakan untuk isolasi *mtDNA* antara lain primer PBS steril, ZymoBIOMICS DNA Extraction reagen (ZymoBIOMICS Lysis Solution, ZymoBIOMICS DNA Binding buffer, ZymoBIOMICS DNA wash buffer 1, ZymoBIOMICS DNA wash buffer 2, ZymoBIOMICS DNase/RNase Free water, ZymoBIOMICS HRC Prep Solution), KOD One PCR Master mix, PCR grade water, primer COI_F, dan COI_R, agarose S, TBE.



Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis eksplorasi observasi dengan pengambilan sampel pada lokasi secara langsung dengan pendekatan secara molekuler. Rancangan penelitian ini adalah *cross sectional study* yaitu pengukuran variabel sampel pada waktu yang sama dalam kurun waktu yang ditentukan.

Prosedur Kerja

Sampling

Sampel ikan kerapu yang diambil merupakan sampel dari tangkapan yang berada di beberapa daerah Jawa Timur dan Lombok. Lokasi pengambilan sampel berada di 4 lokasi yaitu Mandangin Madura, Situbondo, Lamongan, dan Lombok. Jumlah masing-masing lokasi adalah 50 ekor ikan kerapu. Lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang telah diambil dari sampel ikan kerapu dimasukkan dalam tabung 15 ml dan ditambahkan PBS steril. Lintah laut tersebut digerus menggunakan *tissue rupture* hingga tergerus dengan baik. Sampel disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan dalam tabung 1,5 ml untuk dilakukan ekstraksi DNA.

Ekstraksi DNA, Amplifikasi mtDNA, Elektroforesis, dan Visualisasi PCR

Tahap ekstraksi DNA menggunakan prosedur ekstraksi ZymoBIOMICS DNA solution (Ariyanti & Sianturi, 2019). Sebanyak 250 µL sampel lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* dimasukkan dalam ZR *Bashingbead Lysis tube* dan ditambahkan 750 µL ZymoBIOMICS *Lysis Solution*. Sampel diletakkan dalam *bead beater* dan dijalankan dengan kecepatan maksimal selama 5 menit. ZR *Bashingbead Lysis tube* disentrifus dengan kecepatan 10000 g selama 1 menit. Supernatan sebanyak 400 µL dipindahkan ke dalam Zymo-spin III-F *Filter* yg telah diberi *collection tube* dan disentrifus selama 8000 g selama 1 menit. Filtrat dalam *collection tube* ditambahkan 1200 µl ZymoBIOMICS DNA *Binding buffer*. Sebanyak 800 µL campuran tersebut dipindahkan dalam Zymo-spin IICR *column* yang telah diberi *collection tube* dan sentrifus 10000 g selama 1 menit. Filtrat dalam *collection tube* dibuang dan ditambahkan 800 µL campuran ZymoBIOMICS DNA *Binding buffer* dan supernatan. Sebanyak 400 µl ZymoBIOMICS DNA *wash buffer* 1 ditambahkan dalam Zymo-spin IICR *column* dan disentrifus 10000 g selama 1 menit. Sebanyak 700 µl ZymoBIOMICS DNA *wash buffer* 2 ditambahkan dalam Zymo-spin IICR *column* dan disentrifus 10000 g selama 1 menit. Sebanyak 200 µl ZymoBIOMICS DNA *wash buffer* 2 ditambahkan dalam Zymo-spin IICR *column* dan disentrifus 10000g selama 1 menit. Zymo-spin IICR *column* dipindahkan ke tabung 1,5 ml lalu ditambahkan 100 µl (min 50 µl) ZymoBIOMICS DNase/RNase *Free water*, diinkubasi selama 1 menit dan disentrifus 10000 g selama 1 menit. Zymo-spin III-HRC *Filter* beserta *collection tube* disiapkan dan ditambahkan 600 µl ZymoBIOMICS HRC *Prep Solution*, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 8000 g selama 3 menit. DNA yang telah terelusi pada tahap 11 dipindahkan ke dalam Zymo-spin III-HRC *Filter* dengan tabung 1,5 ml yang baru dan sentrifus dengan kecepatan 16000 g selama 3 menit. DNA sampel dilanjutkan untuk proses PCR.

DNA Mitokondria diamplifikasikan menggunakan primer COI-F dan COI-R. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi KOD one PCR master mix 25 µL, primer FP 1,5 µL, primer RP



1,5 μ L, PCR *grade water* 12 μ L, dan *template* DNA 10 μ L. Amplifikasi dilakukan dengan program *initial* pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 46°C selama 45 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, dan *final extension* pada suhu 72°C selama 5 menit.

Elektroforesis hasil PCR dan hasil pemotongan DNA dilakukan dalam gel agarose 0,8% dengan dengan 1 X buffer TBE (89 mM tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) dan ditambahkan 0,5 μ g/ml *ethidium bromide*. *Running* pada 100V selama 30 menit dan dilakukan visualisasi dilakukan menggunakan UV transiluminator (Bio-rad).

Pengumpulan Data Sekuens Molekuler

Data yang diambil adalah data molekuler dalam bentuk sekuens DNA dari lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* untuk melihat urutan basa DNA, homologi, dan hubungan kekerabatan di beberapa perairan Jawa Timur dan Lombok.

Sisa 50 μ L masing-masing dari amplifikasi PCR dimurnikan menggunakan kit pemurnian DNA (*Qiagen*) dan dilakukan sekuensing DNA gen *COI* dari empat lokasi yang berbeda yaitu Mandangin, Lamongan, Situbondo, dan Lombok di Laboratorium Prof. Nidom *Foundation* menggunakan mesin ABI 3130 *Genetic Analyzer* dengan primer yang sama pada saat amplifikasi PCR.

Dilakukan survei untuk mengidentifikasi urutan gen *COI mtDNA* dari spesies *Zeylanicobdella arugamensis* yang terdapat di NCBI *GenBank* sebanyak 10 spesies yang dikumpulkan dalam penelitian ini untuk analisis pohon filogenetik.

Analisis Filogenetik Menggunakan Metode Neighbor-joining

Hubungan kekerabatan lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* dibangun menggunakan metode *Neighbor-joining* (NJ), berbasis pada urutan *mtDNA* gen *COI*. Metode *Neighbor-joining* (NJ) merupakan model dan parameter paling cocok yang dipilih oleh Modeltest 3.7. Prosedur *bootstrap* (untuk analisis *Neighbor-joining* (NJ) dilakukan untuk menilai kekokohan hubungan yang disimpulkan untuk lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis*.

Pohon-pohon hubungan yang dihasilkan untuk lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* digunakan untuk menguji apakah hubungan lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* dari beberapa perairan di berbagai daerah di Jawa Timur dan Lombok memiliki kekerabatan yang dekat. Semua pohon hubungan ditampilkan dan diedit menggunakan *Genetyx*.

Data molekuler dari monogenea yang diperoleh dalam penelitian ini dan *GenBank*, kemudian dianalisis menggunakan *Software Genetyx* di Laptop (PC). Karena banyaknya data molekuler di mana total dari 10 spesies parasit yang memiliki gen *COI* dianalisis.

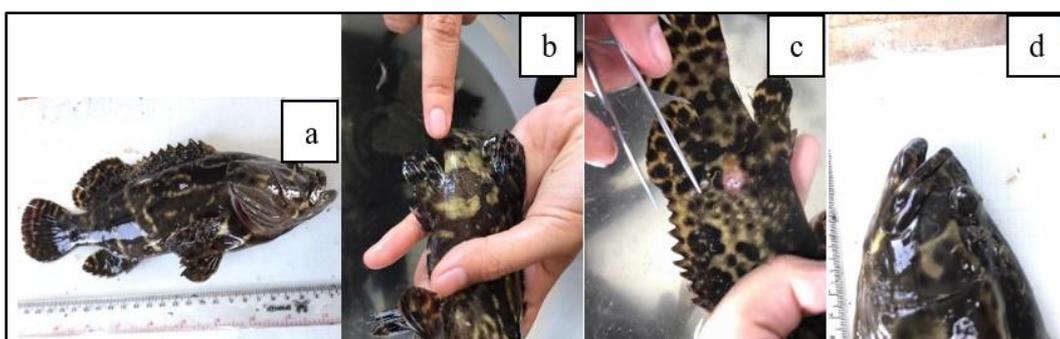
Analisis Data

Data dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk gambar berupa hasil elektroforesis PCR, kemudian dilakukan analisis sekuensing, dan disejajarkan dengan gen pembanding dari *GenBank*. Setelah itu dilakukan analisis data homologi dalam program *Basic Local Aligment Search Tool* (BLAST) dan dilakukan pembuatan pohon filogenetik dan dijelaskan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengambilan Sampel

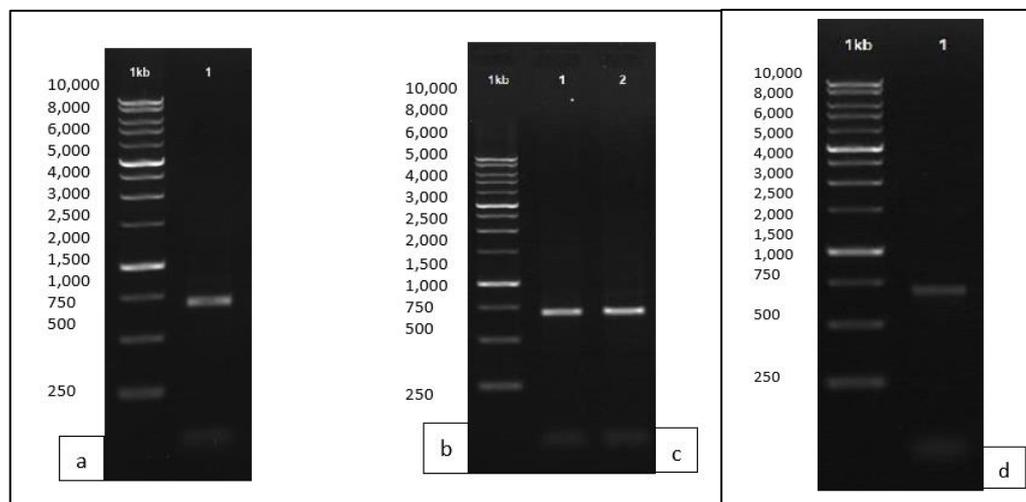
Sampel ikan kerapu cantang diambil sebanyak 50 ekor dari empat lokasi yang berbeda, yaitu dari Brondong Lamongan, Mandangin Madura, Situbondo, dan Lombok. Hasil pemeriksaan menunjukkan dari 50 ekor yang diambil, 30 ekor diantaranya terinfestasi parasit lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang menempel pada bagian sirip (punggung, belakang, dan perut), ekor, *operculum* insang, rongga mulut, dan perut bagian bawah. Berikut Gambar 2 yang menunjukkan ikan kerapu cantang yang terinfestasi parasit lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis*.



Gambar 2. Ikan Kerapu Cantang yang Terinfestasi *Zeylanicobdella arugamensis*. a) Bagian Perut; b) Ekor; c) Sirip; dan d) *Operculum* Insang.

Ekstraksi dan Amplifikasi mtDNA dengan PCR

Lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang menginfestasi ikan kerapu cantang kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi PBS Steril lalu disimpan dalam *freezer* untuk selanjutnya diekstraksi dan diproses PCR. Hasil dari elektroforesis produk PCR lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang teramplifikasi menggunakan primer COI-F dan COI-R dengan target *mtDNA* menunjukkan *band* tunggal pada 750bp untuk lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* dari Lamongan, Situbondo, Mandangin, dan Lombok. Berikut Gambar 3 menunjukkan hasil elektroforesis produk PCR dengan gel agarose 0,8%.





Gambar 3. Hasil Elektroforesis Produk PCR dengan Gel Agarose 0,8%. Gen *mtDNA* Ditunjukkan dengan Adanya Pita Tunggal 750 bp. M = Marker 1 kb. a) Mandangin; b) Lombok; c) Situbondo; dan d) Lamongan.

Sekuens mtDNA Zeylanicobdella arugamensis

Sekuens *mtDNA* lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* diketahui setelah proses sekuensing. Sekuens *mtDNA COI* diterjemahkan dengan bantuan mesin sekuensing dan *software sequence scanner*. Penyatuan kedua sekuen/urutan nukleotida dari kedua sekuen *forward* dan *reverse*. Sekuen/urutan nukleotida asal perairan Mandangin ditampilkan pada Gambar 4, asal perairan Lombok pada Gambar 5, asal perairan Situbondo pada Gambar 6, dan asal perairan Lamongan pada Gambar 7.

1) Sampel *Zeylanicobdella arugamensis* Asal Mandangin.

```
GGAAC TAGTATAAGGTTTGTAAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATA
GGCACTCAGATAATTCACAGACACATGTCGGTTAATTGATAATTTTTCTTTTATAGTTATATACCAATTCATTAATTG
GTGGTTTTGAGTAACTGGCTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAG
ATTTTGATTATTACCACCATCATAATTCTTCTTATTATCATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTTGA
ACAGTCTACCCACCATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGGACCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTACATTT
AGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGTGCATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAAATGGGTTAAAA
TTAGATACGTATCATCATTATTTGTTGTGAGCAGTATAAATACTGTGTGATTATTACTTTTATCTTTACCTGTATT
AGCAGCTGCTATTACAATATTACTTACAGATCGTAATTTTAAATACATCATTCTTCGATCCAGTTGGTGGTGGAGATC
CAATTTTACTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCTGGAAGAAGAATAAA
```

Gambar 4. Sekuen Lengkap Gen *COI* *Zeylanicobdella arugamensis* Asal Mandangin.

2) Sampel *Zeylanicobdella arugamensis* Asal Lombok.

```
TGGTGGTCAACAAAATCATAAAGATATTGGAACATTATATTTTATATTTGGAGCATGAAGCTGGAATATGTGGGAA
CTTGATAAGAATTATAATTCGAGCAGAATTAACACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAACTCC
ATAATTACAGCACATGGGTTTATTATAATTTTTTATAGTTATACCTATTATAATGGGTGGTTTCGGTAATTTGGCTA
GTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGATATAGCTTTCCACGACTTAATAATATTAGATTTTGATTATTACCTCCATCA
TTAATTTCTAGTTTATCATGTAGATTAGTTGAAAGTGGGGTTGGTACAGGTTGAACAGTCTACCTCCATTATCA
GCTAATATAGCTCATTCTGGACCTTCAGTAGATATAGCTATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATTTTCATCAATTTTA
GGTGCATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAACTGGGTTAAATTTGAAACGGTATATCATTATTTGT
TTGAGCTGTTTTAATTACTGTTGTTTTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGCTGCTATTACAATTTTTAACA
GATCGTAATTTAATACATCATTCTTCGATCCAGTATGGTGGTGGAGACCCAAATTTTATCCAACATTTATTTGAT
TTTTTGGTCACCTG
```

Gambar 5. Sekuen Lengkap Gen *COI* *Zeylanicobdella arugamensis* Asal Lombok.

3) Sampel *Zeylanicobdella arugamensis* Asal Situbondo.

```
AAGATTTGTAATTCGAGCAGAATTATCACAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAATTCATAATTA
CAGCACATGGTTAATTATAATTTTTTATAGTAATACCTATTTTAAATGGTGGGTTGGTAATTTGATTAGTACCTT
TAATAATTTGGTGCTCCAGACATAGCTTTCCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATTACCACCATCATAATTC
TTCTTCTATCATCTGCATTAATTGAAAGTGGAGTATGGTACAGGTTGAACTGTTACCCGCCATTATCAGCTAATA
TAGCTCATTCTGGACCATCAGTAGATTTAGCAATTTTTCTTTACATTTAGCGGGAATTTATCTATTTTAGGTGCAT
TAAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGATGAAATGGATTGAAATTAGAACGTATATCATTATTTGTTGAGCA
GTTCTAATTACTGCAGTTCTTTACTGTTATCATTACCAGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTAACAGATCGA
AATTTAATACTTCTTTGACCCGGCCTGGGGGAGGAGACCCAAATTTTATATCAACTTTTTTTGATTTTTTG
GTCACCTGAAATTTAAAAAG
```

Gambar 6. Sekuen Lengkap Gen *COI* *Zeylanicobdella arugamensis* Asal Situbondo.

4) Sampel *Zeylanicobdella arugamensis* Asal Lamongan.

```
TTATATTTTATATTCGGAGCTTGAAGCTGGAATAAGTGGGAACCTCTTAAGATTTGTAATTCGAGCAGAATTATCA
CAACCAGGTAGATTTATAGAAAATGATCAAATTTATAATTCAATAATTACAGCACATGGTTTAATTATAATTTTTTTT
ATAGTTATACCTATTTAATTGGTGGGTTTGGTAATTGATTAGTACCTTTAATAATTGGTGCTCCAGACATAGCTTTT
CCACGACTTAATAATCTTAGATTTTGATTATTACCACCATCATAAATCTTCTTCTTATCATCTGCATTAATTGAAAGT
GGAGTTGGTACAGGTTGAACTGTTTACCCGCCATTATCAGCTAATATAGCTCATTCTGGACCATCAGTAGATTTAGC
AATTTTTCTTTACATTTAGCGGGAATTTTCATCTATTTAGGTGCATTAATTTTATTACAACAATTTTAAATATACGA
TGAAATGGATTGAAATTAGAACGTATATCATTATTTGTTGAGCAGTTCTAATTACTGCAGTTCTTTTACTGTTATCA
TTACCAGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGATCGAAATTTAATACTTCTTTCTTTGACCCGGCCTGG
GGGAGGAGACCCCAATTTATCCACCTTTTATTTTGGATTTTTGGCCACCCAGAAGTTAAAA
```

Gambar 7. Sekuen Lengkap Gen *COI Zeylanicobdella arugamensis* Asal Lamongan.

Analisis Homologi Sekuen Nukleotida *Zeylanicobdella arugamensis*

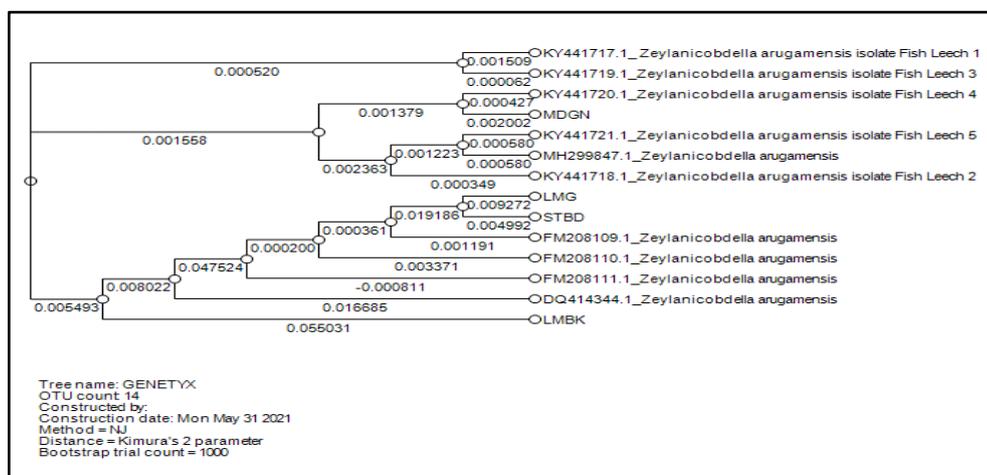
Analisis homologi sekuen nukleotida dilakukan dengan cara memasukkan data sekuen nukleotida lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* dari perairan Lamongan, Situbondo, Mandangin, dan Lombok dengan sekuen yang berasal dari data *Genbank*, kemudian dilakukan BLAST di NCBI secara *online*. Tingkat homologi dari keempat sampel menunjukkan nilai sebesar 88% - 98% (Tabel 1). Sekuen yang diperoleh kemudian dilakukan *multiple alignment* dengan sekuen lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* dari antar sampel dan dari data *Genbank*. Hasil *multiple alignment* menunjukkan data urutan keberapa sekuen antar isolat tetap dan berbeda ditunjukkan adanya huruf basa DNA yang timbul. Berikut tabel homologi antar sampel dan data dari *Genbank* yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai Homologi Sekuen Nukleotida *Zeylanicobdella arugamensis* dan *Gen Reference* dari *Genbank*.

| Sekuen Nukleotida | Nilai Homolog (%) | | | |
|-------------------|-------------------|--------|--------|--------|
| | LMG | STBD | MDGN | LMBK |
| LMG | | 98,28% | 87,92% | 89,38% |
| STBD | 98,28% | | 88,51% | 89,08% |
| MDGN | 87,92% | 88,51% | | 90,20% |
| LMBK | 89,38% | 89,08% | 90,20% | |
| KY441717.1 | 90,90% | 91,27% | 95,91% | 93,46% |
| KY441718.1 | 90,72% | 91,39% | 96,07% | 93,27% |
| KY441719.1 | 91,05% | 91,43% | 96,06% | 93,61% |
| KY441720.1 | 91,04% | 91,39% | 96,08% | 93,58% |
| KY441721.1 | 90,72% | 91,39% | 96,08% | 93,27% |
| MH299847.1 | 90,32% | 91,05% | 96,10% | 92,48% |
| DQ414344.1 | 90,69% | 91,60% | 93,25% | 90,77% |
| FM208109.1 | 97,20% | 97,42% | 89,92% | 89,66% |
| FM208110.1 | 97,20% | 97,42% | 89,92% | 89,66% |
| FM208111.1 | 97,41% | 97,63% | 89,92% | 89,87% |

Analisis Phylogenetic Tree *Zeylanicobdella arugamensis*

Identifikasi berdasarkan *Phylogenetic tree* dengan metode *Neighbor Joining* dari sekuen nukleotida lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* dengan 10 data dari berbagai spesies *Zeylanicobdella arugamensis* pembandingan di *Genbank*, maka diperoleh kekerabatan yang dekat antara *Zeylanicobdella arugamensis* dari Lamongan, Situbondo, Mandangin, dan Lombok. Sampel yang memiliki kekerabatan paling dekat yaitu sampel dari wilayah perairan Lamongan dan Situbondo, sedangkan sampel yang memiliki hubungan kekerabatan yang cukup jauh yaitu sampel dari wilayah Mandangin dan Lombok yang ditunjukkan dari Gambar 8.



Gambar 8. Phylogenetic Tree dari Antar Sampel *Zeylanicobdella arugamensis* dan Gen Reference.

Pembahasan

Penelitian ini dilakukan pada lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang menginfeksi ikan kerapu cantang dari berbagai perairan yaitu Brondong Lamongan, Situbondo, Mandangin Madura, dan Lombok. Pada penelitian ini menggunakan 50 ekor ikan kerapu cantang dan diantaranya ada 30 ekor ikan kerapu cantang yang terinfeksi parasit lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* tersebut dengan nilai prevalensi sebesar 85-100%. Dari hasil pengamatan terlihat insang dan kulit yang terinfeksi *Zeylanicobdella arugamensis* berada pada area perlekatan sehingga terjadi pembengkakan, lesi/luka, berwarna pucat, hemoragi, dan inflamasi kemudian berpotensi terjadi infeksi sekunder oleh bakteri atau jamur pada area bekas perlekatan (Mahasri *et al.*, 2019).

Ciri morfologi *Zeylanicobdella arugamensis* yang ditemukan di ikan kerapu cantang berwarna cokelat gelap yang pucat, hitam (dewasa), berbentuk panjang silindris dan menyempit pada kedua ujungnya. Pemeriksaan mikroskopis menunjukkan bahwa ukuran *sucker caudal* lebih besar daripada oral. Ukuran diameter *oral sucker* (oval) mencapai 1,0 mm dengan diameter *caudal sucker* lebih lebar dibanding *oral sucker* yaitu berkisar 1,8 mm (Mahardika *et al.*, 2020).

Zeylanicobdella arugamensis mempunyai 2 *sucker* yang terletak di bagian *oral* dan *caudal* yang digunakan untuk menempel ikan kerapu cantang kemudian menginjeksikan histamine ke pembuluh darah sehingga aliran darah pada area Uniform Resource Locator: <https://e-journal.undikma.ac.id/index.php/bioscientist>



perlekatan meningkat (Mahardika *et al.*, 2018). *Probocyst Zeylanicobdella arugamensis* akan menghisap nutrisi dan menggunakan rahang untuk mendapatkan akses darah. Pembekuan darah pada area perlekatan dapat dihambat dengan menginjeksikan air liur sehingga enzim pembekuan darah inang (*thrombin*) dapat terhambat. Perubahan histopatologis kulit ikan kerapu cantang terinfeksi *Zeylanicobdella arugamensis* dengan derajat infestasi yang berbeda yaitu inflamasi, hemoragi, dan kongestipada. Ikan yang terinfeksi biasanya dalam keadaan stres karena beberapa faktor dan menunjukkan warna kulit yang gelap dengan hemoragik ireguler yang luas pada permukaan tubuh dan pangkal sirip.

Hasil PCR pada penelitian ini menunjukkan adanya *band* tunggal gen *mtDNA* COI hasil amplifikasi menggunakan primer COI-F dan COI-R pada fragmen 750 bp pada *Zeylanicobdella arugamensis* yang berasal dari sampel dari perairan di Lamongan, Lombok, Mandangin, dan Madura. Adanya kesamaan *band* tunggal ini menunjukkan bahwa sampel yang diperoleh merupakan satu spesies dan tidak ada perbedaan meskipun berasal dari lokasi yang berbeda.

Sampel yang positif pada metode PCR dilakukan identifikasi dengan menggunakan metode sekuensing. Hasil sekuensing DNA di BLAST pada situs NCBI, kemudian dilakukan analisis homologi terhadap gen *reference* yang didapat dari *GenBank* COI *Zeylanicobdella arugamensis*. Hasil analisis homologi sekuen nukleotida dari gen COI *Zeylanicobdella arugamensis* berkisar antara 88,51%-98,28% (Tabel 1). Hasil homologi antara sampel dari Situbondo dan Lamongan menunjukkan angka paling tinggi yaitu sebesar 98,28%, lalu sampel yang berasal dari *GenBank* FM208111.1 dan sampel dari Lamongan sebesar 97,41%, kemudian sampel yang berasal dari *GenBank* KY441717.1 dan sampel dari Mandangin sebesar 95,91%, sedangkan hasil paling rendah antara sampel dari Mandangin dan Situbondo yaitu sebesar 88,51%. Hal ini menunjukkan bahwa letak ekologis juga mempengaruhi perbedaan persentase sekuen nukleotida dan asam amino dari lokasi yang berbeda dapat mempunyai homologi yang tinggi atau yang rendah. Jika letak ekologis masih berada di wilayah perairan yang sama seperti Situbondo dan Lamongan yang berada di perairan pantai utara dan jaraknya berdekatan maka nilai analisis homologinya memiliki persentase yang tinggi, sedangkan sampel yang memiliki nilai homologis yang rendah seperti Mandangin dan Situbondo juga dikarenakan letak ekologis yang relatif jauh karena berada di perairan yang berbeda. Tingkat homologi antar sampel dapat dikatakan homolog apabila nilai persentase homologi lebih dari 60% (Chuda *et al.*, 2018).

Homologi yang tinggi dapat dijadikan sebagai referensi dasar untuk digunakan kandidat vaksin dan kit diagnostik. Perbedaan 1% pada tingkat homologi ini dikarenakan adanya perubahan gen disebabkan oleh adanya mutasi, delesi, dan insersi (Tindi *et al.*, 2017). Mutasi adalah perubahan urutan genetik dan penyebab utama keragaman di antara organisme. Mutasi terkecil adalah mutasi titik, jika hanya sepasang basa tunggal yang diubah menjadi pasangan basa lainnya. Mutasi juga bisa berupa insersi atau delesi. Insersi adalah mutasi dimana satu atau beberapa basa nitrogen yang ditambahkan ke urutan DNA, sedangkan delesi adalah mutasi dimana satu atau beberapa basa terhapus pada urutan DNA (Low, 2014).

Sekuen yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dicirikan dengan nilai *Max Score* dan *Total Score* sama, *Query Coverage* mendekati 100%, *E-value*



mendekati 0, dan *Max Ident* mendekati 100%. *Query Coverage* adalah menilai dalam persen sekuen dalam *database* menutupi *query*, sehingga memastikan apakah sampel tertutup semuanya oleh sekuen. Nilai persentase yang dapat diterima minimal 95%, kecuali untuk sekuen yang bacaannya jika lebih rendah minimal 75%. Nilai *E-Value* bernilai 0 (nol) menunjukkan bahwa kedua sekuen tersebut identik. Nilai *E-Value* semakin mendekati nol, hasilnya akan lebih terpercaya dan bila nilainya 1, maka tidak boleh digunakan. *Max Ident* merupakan sejauh mana kedua sekuen (nukleotida atau asam amino) mempunyai residu yang sama pada posisi yang sama dalam sebuah penyejajaran, sering dinyatakan sebagai persentase. Hasil dari proses ini diperoleh dengan nilai *max score* 1186, *total score* 1186, *query coverage* 98%, *E-value* 0,0. *Query coverage* tinggi dan *E-value* rendah tidak menutup kemungkinan bahwa spesimen penelitian merupakan *Benedenia epinepheli* tetapi juga tidak boleh mengesampingkan nilai *identity*. Hal ini sesuai dengan Low (2014) bahwa individu dari spesies yang sama akan memiliki urutan basa DNA sama, yaitu nilai identitas kesamaan paling sedikit sebesar 98% serta didukung Tindi *et al.* (2017) bahwa spesies dapat diidentifikasi melalui *barcoding gap* antara jarak intraspesifik dan interspesifik menggunakan nilai *threshold* antara 2-3%. Apabila nilai beda maksimal 3%, maka nilai *identity* hasil penyejajaran sebesar 97%. Apabila dihubungkan dengan hal seperti di atas dengan nilai *identity* sebesar 96%, maka nilai bedanya sebesar 1% yang berarti melewati nilai *threshold*. Dari hasil data tersebut maka hal ini menunjukkan bahwa kesamaan identitas *Zeylanicobdella arugamensis* asal perairan Lamongan dengan Situbondo hampir sama. Kemungkinan hal ini dikarenakan adanya kesamaan benih dari kedua daerah tersebut karena letak geografis yang berdekatan.

Berdasarkan hasil analisis *phylogenetic tree* menunjukkan *Zeylanicobdella arugamensis* asal perairan Lamongan dengan Situbondo memiliki tingkat kekerabatan yang dekat karena jarak genetiknya sebesar 0,009272. Kedua sampel tersebut juga memiliki tingkat kekerabatan dengan *gen reference* FM208109.1 dengan jarak genetik sebesar 0,004992. Sampel dari Mandangin juga memiliki jarak genetik yang dekat dengan *gen reference* KY441720.1 sebesar 0,000427. Hasil yang didapatkan serupa dengan penelitian dari Agustiya *et al.* (2023) yang menyampaikan bahwa identifikasi lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang berasal dari Lamongan dan Mandangin memiliki morfometrik yang sama. Untuk menganalisis *phylogenetic tree* digunakan prosedur *bootstrap* (analisis *Neighbor-Joining* (NJ)) yang dilakukan untuk menilai kekokohan hubungan yang disimpulkan pada lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis*. Pohon-pohon hubungan tersebut dihasilkan dan bisa terlihat lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* memiliki hubungan kekerabatan dekat dengan sampel atau *gen reference*.

Berdasarkan data studi genetik, *Zeylanicobdella arugamensis* tersebar pada daerah temperatur hangat dan perairan tropis. *Zeylanicobdella arugamensis* termasuk dalam golongan ektoparasit yang sering menginfeksi ikan kerapu cantang dan berpotensi menyebabkan kematian pada ikan. *Zeylanicobdella arugamensis* dapat menyebabkan kematian, kehilangan berat badan, menurunkan fekunditas ikan, dan mempengaruhi tingkat penetasan telur karena energi metabolisme yang seharusnya digunakan untuk pertumbuhan dan reproduksi menjadi digunakan untuk proses pertahanan dalam tubuhnya serta menimbulkan



kerugian akibat infestasi *Zeylanicobdella arugamensis*. Kerugian *nonlethal* lain dapat berupa kerusakan kulit, serta pertumbuhan lambat sehingga menurunkan nilai jual (Mahardika *et al.*, 2018).

Dari hasil pengamatan hingga tingkat molekuler menggunakan gen *COI* tersebut dapat digunakan sebagai informasi data karakterisasi molekuler parasit lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* di Perairan Jawa Timur dan Lombok, serta dapat digunakan sebagai kajian pustaka awal untuk menanggulangi dampak dari infestasi parasit *Zeylanicobdella arugamensis* pada ikan kerapu cantang hingga dapat dijadikan bahan imunostimulan yang bisa memperbaiki budidaya ikan kerapu di Indonesia (Mahasri *et al.*, 2019) dan (Mahasri *et al.*, 2020).

SIMPULAN

Urutan basa DNA berdasarkan gen *COI* pada lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang menginfeksi ikan kerapu dari perairan Jawa Timur dan Lombok adalah sebesar 750 bp. Hubungan kekerabatan diantara lintah laut *Zeylanicobdella arugamensis* yang menginfeksi ikan kerapu dari perairan Jawa Timur dan Lombok yang paling dekat adalah antara perairan Lamongan dan Situbondo dengan nilai homologi sebesar 98,28%, dan hubungan kekerabatan yang paling jauh adalah antara perairan Situbondo dan Mandangin dengan nilai homologi sebesar 88,51%.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disarankan agar dilakukan penelitian lanjutan mengenai purifikasi, ekspresi, dan antigenitas serta kemampuannya dalam menginduksi titer antibodi sebagai kandidat imunostimulan serta karakterisasi molekuler menggunakan primer *cyt-b*.

DAFTAR RUJUKAN

- Agustiya, R., Mahasri, G., & Subekti, S. (2023). Identifikasi Morfometrik dan Intensitas Lintah Laut *Zeylanicobdella* yang Menginfestasi Ikan Kerapu Cantang Asal Kecamatan Brondong, Lamongan dan Pulau Mandangin, Madura. *Journal of Marine and Coastal Science*, 12(1), 34-42. <https://doi.org/10.20473/jmcs.v12i1.38273>
- Anrosana, I. A., & Gemaputri, A. A. (2017). Kajian Daya Dukung (*Carrying Capacity*) Lingkungan Perairan Pantai Pasir Putih Situbondo bagi Pengembangan Usaha Keramba Jaring Apung. *Jurnal Ilmiah Inovasi*, 17(2), 73-79. <https://doi.org/10.25047/jii.v17i2>
- Ariyanti, Y., & Sianturi, S. (2019). Ekstraksi DNA Total dari Sumber Jaringan Hewan (Ikan Kerapu) Menggunakan Metode *Kit for Animal Tissue*. *Journal of Science and Applicative Technology*, 3(1), 40-45. <https://doi.org/10.35472/jsat.v3i1.111>
- Chuda, H., Ieda, K., Shirakashi, S., & Masuma, S. (2018). Differences in Susceptibility to the Skin Fluke *Benedenia epinepheli* between *Epinephelus bruneus*, *E. septemfasciatus*, and a New Hybrid Grouper *Kue-Tama*, *E. bruneus* × *E. lanceolatus*. *Aquaculture*, 308(3), 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.027>
- Irianto, K. (2017). *Biologi Molekuler*. Bandung. CV. Alfabeta.



- Low, V. L. (2014). Mitochondrial DNA Markers Reveal High Genetic Diversity but Low Genetic Differentiation in the Black Fly *Simulium Tani* Takaoka & Davies along an Elevational Gradient in Malaysia. *PLoS One*, 18(6), 10-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100512>
- Mahardika, K., Mastutia, I., & Zafrana, Z. (2018). Respon Lintah Laut (*Zeylanicobdella arugamensis*) terhadap Salinitas Berbeda secara Laboratorium. *Journal of Fisheries and Marine Research*, 2(3), 208-214. <https://doi.org/10.21776/ub.jfmr.2018.002.03.9>
- _____. (2020). Sintasan dan Perkembangan Cocoon Lintah Laut (*Zeylanicobdella arugamensis*) pada Suhu yang Berbeda. *Journal of Fisheries and Research*, 4(1), 102-108. <https://doi.org/10.21776/ub.jfmr.2020.004.01.15>
- Mahasri, G., Hafidloh, U., Pratama, F. P., Rahmawan, D., Subekti, S., Wulansari, P. D., & Amin, M. (2020). Prevalence, Intensity and Histopathology of *Zeylanicobdella arugamensis* Infestation on Groupers Reared on Different Aquaculture Systems. *Journal of Fish Diseases*, 43(1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/jfd.13219>
- Mahasri, G., Wulansari, P. D., & Imani, I. H. (2019). Intensitas Ektoparasit Ikan Kerapu Tikus *Cromnileptes activelis* pada Keramba Jaring Apung di Perairan Situbondo Jawa Timur. *Jurnal Kelautan Tropis*, 22(2), 135-140. <https://doi.org/10.14710/jkt.v22i2.5295>
- Sofiana, L., Nofisulastri, N., & Safnowandi, S. (2023). Pola Distribusi Siput Air (Gastropoda) sebagai Bioindikator Pencemaran Air di Sungai Unus Kota Mataram dalam Upaya Pengembangan Modul Ekologi. *Biocaster : Jurnal Kajian Biologi*, 3(3), 133-158. <https://doi.org/10.36312/biocaster.v3i3.191>
- Tindi, M., Gustaf, N., Mamangkey, F., & Wullur, W. (2017). DNA Barcode dan Analisis Filogenetik Molekuler Beberapa Jenis Bivalvia Asal Perairan Sulawesi Utara Berdasarkan Gen COI. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 1(2), 32-38. <https://doi.org/10.35800/jplt.5.2.2017.15050>
- Wang, Y., Huang, M., Wang, R., & Lanyu, F. (2016). Complete Mitochondrial Genome of the Fish Leech *Zeylanicobdella arugamensis*. *Mitochondrial Part B*, 3(2), 659-660. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1372699>