

**Karakter morfologis dan molekular udang air tawar anggota
Macrobrachium pilimanus species group di Sungai Opak, Winongo dan Sempor,
Daerah Istimewa Yogyakarta**

Morphological and molecular characters of freshwater shrimp of *Macrobrachium pilimanus* species group in Opak, Winongo and Sempor Rivers, Yogyakarta

Rury Eprilurahman¹, Malya Adzillina Silmi^{2,*}, Lukman Hakim², Trijoko¹

¹Laboratorium Sistematika Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Indonesia
Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia 55281

²Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Indonesia

Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia 55281

*E-mail: malya.adzillina.silmi@mail.ugm.ac.id

Diterima 15 Oktober 2020 Disetujui 15 Pebruari 2021

INTISARI

Macrobrachium merupakan genus dari subfilum Crustacea dengan keanekaragaman tertinggi. Identifikasi morfologi dari genus *Macrobrachium* sebagian besar sulit dilakukan karena karakter untuk identifikasi tingkat spesies yang rumit, sedangkan banyak karakter umum untuk semua spesies anggota *Macrobrachium*. Sulitnya identifikasi morfologi juga disebabkan oleh pengaruh dominansi sosial pada jantan. Diperlukan pendekatan lain untuk mengidentifikasi *Macrobrachium* secara akurat, salah satunya dengan *DNA barcoding* menggunakan gen mitokondria *16S*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter morfologi dan molekuler kelompok spesies *Macrobrachium pilimanus* berdasarkan gen mitokondria *16S* dari sungai Opak, Winongo, dan Sempor di Daerah Istimewa Yogyakarta. Sampel udang diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi, meristik, dan morfometri. Analisis molekuler menggunakan primer *16Sar* sebagai primer *forward* dan *16Sbr* sebagai primer *reverse*. Berdasarkan hasil identifikasi morfologi, sampel udang yang diperoleh hanya dapat teridentifikasi hingga tingkat genus *Macrobrachium*. Sampel udang juga dapat dimasukkan ke dalam kelompok spesies *Macrobrachium pilimanus* berdasarkan karakter umum kelompok spesies tersebut. Sampel udang pada penelitian ini memiliki kemiripan karakter paling tinggi dengan spesies *M. pilimanus* dan *M. empulipke* yang tersebar di Jawa. Berdasarkan analisis molekuler, sampel dari Sungai Winongo (WNM1) memiliki similaritas 87,63% dengan *M. forcipatum* (JQ362454.1) dan 87,02% dengan *M. dienbienphuense* (JQ390474.1), yang berarti merupakan spesies yang berbeda dari spesies di *GenBank*. *Macrobrachium forcipatum* dan *M. dienbienphuense* merupakan anggota kelompok spesies *M. pilimanus*. Kesimpulan dari penelitian ini adalah semua sampel merupakan anggota kelompok spesies *M. pilimanus*.

Kata kunci: *16S*, Daerah Istimewa Yogyakarta, karakter morfologi, kelompok spesies *Macrobrachium pilimanus*

ABSTRACT

Macrobrachium is a genus of the Crustacea subphylum with the highest diversity. Identification of the morphology of the genus *Macrobrachium* is mostly challenging due to the characters for species level identification are complicated, whereas many characters are common to all *Macrobrachium* species. In addition, it is difficult to identify morphology because of the influence of social dominance in males.

Therefore, another approach is needed to identify *Macrobrachium* accurately, one of which is by barcoding DNA using the 16S mitochondrial gene. This study was aimed to determine the morphological and molecular characters of *Macrobrachium pilimanus* species group based on the 16S mitochondrial gene from the Opak, Winongo, and Sempor rivers, in Daerah Istimewa Yogyakarta. Furthermore, shrimp samples were identified based on morphological, meristic, and morphometric characters. Meanwhile, molecular analysis uses *16Sar* as forward primer and *16Sbr* as reverse primer. Based on the morphological identification results, the shrimp samples obtained could only be identified up to the level of the *Macrobrachium* genus. In addition, the shrimp samples can also be included in the *Macrobrachium pilimanus* species group based on the general characteristics of the species group. The shrimp samples in this study have highest similarities in character with the species *M. pilimanus* and *M. empulipke* distributed in Java. Based on molecular analysis, sample from Winongo River (WNM1) has a similarity of 87.63% with *Macrobrachium forcipatum* (JQ362454.1) and 87,02% with *M. dienbienphuense* (JQ390474.1), which means that it is a different species from the species in the GenBank. *Macrobrachium forcipatum* and *M. dienbienphuense* are members of *M. pilimanus* species group. The conclusion of this research is that all the samples are member of *M. pilimanus* species group.

Keywords: *Macrobrachium pilimanus species group, Daerah Istimewa Yogyakarta, morphological characters, 16S*

PENDAHULUAN

Macrobrachium merupakan genus dari subfilum Crustacea dengan keanekaragaman tertinggi. Terdapat sekitar 240 spesies yang telah terdeskripsi dengan lebih dari 100 spesies dari genus ini ditemukan di Asia Timur dan Tenggara (Wowor et al., 2004; Wowor et al., 2009). *Macrobrachium pilimanus species group* adalah suatu kelompok spesies yang memiliki beberapa anggota spesies di dalamnya yang didasarkan atas karakter morfologi umum yang sama. Anggota kelompok spesies *M. pilimanus* dicirikan dengan karakter morfologi berupa rostrum yang tidak melebihi scaphocerite, carpus pereopod kedua berbentuk cangkir pendek, dan adanya pubescence lebat pada chela pereopod kedua (Ng, 1995).

Seiring berjalannya waktu dan banyaknya penelitian baru yang dilakukan, saat ini terdapat 16 spesies yang termasuk ke dalam anggota kelompok spesies *M. pilimanus*. Spesies-spesies tersebut adalah *M. pilimanus* (De Man, 1879), *M. leptodactylus* (De Man, 1892), *M. hirsutimanus* (Tiwari, 1952), *M. dienbienphuense* Dang and Nguyen, 1972, *M. eriocheirum* Dai, 1984, *M. ahkowi* Chong and Khoo, 1987, *M. gua* Chong, 1989, *M. forcipatum* Ng, 1995, *M. platycheles* Ou and Yeo, 1995, *M. poeti* Holthuis 1984, *M. amplimanus* Cai and Dai, 1999, *M. sirindhorn*,

Naiyanetr, 2001, *M. pilosum* Cai and Dai, 1999, *M. kelianense* Wowor and Short, 2007, *M. empulipke* Wowor, 2010, dan *M. spelaesus* Cai and Vidthayanon, 2016 (Cai & Vidthayanon, 2016).

Identifikasi morfologis untuk genus *Macrobrachium* tergolong sulit, karena sangat bergantung pada perbedaan karakter morfologis yang unik untuk setiap spesies. Karakter yang digunakan untuk identifikasi berjumlah terbatas, sedangkan banyak karakter umum untuk semua spesies *Macrobrachium*, maka identifikasi morfologis genus ini cukup sulit dilakukan (Holthuis, 1952). Faktor lain yang menyebabkan sulitnya identifikasi pada genus ini adalah adanya pengaruh dominansi sosial pada morfologi jantan (Short, 2004). Anggota *M. pilimanus species group* memiliki variabilitas karakter yang luar biasa, sehingga menjadikan taksonomi kelompok spesies ini sangat kompleks. Kemungkinan hanya studi secara ekstensif dari berbagai lokasi di seluruh wilayah jelajahnya dan studi spesimen hidup di habitat aslinya, yang dapat memecahkan masalah ini (Fransen et al., 2010).

Sulitnya karakterisasi genus *Macrobrachium* secara morfologi, menuntut dilakukannya metode identifikasi lain yang lebih akurat, yaitu secara molekuler. Penggunaan DNA mitokondria dalam analisis filogenetik telah banyak dilakukan. Genom mitokondria diturunkan secara maternal

melalui sitoplasma telur tanpa rekombinasi. Genom ini dianggap memiliki kecepatan evolusioner yang lebih tinggi dari genom nukleus dan dianggap cocok untuk studi sistematika dan genetika molekuler (Chen et al., 2009; Yang et al., 2014). Gen *16S* telah menjadi salah satu segmen genom mitokondria yang digunakan dalam analisis filogenetik. Penelitian analisis filogenetik dengan gen *16S* pada Crustacea telah banyak dilakukan, salah satunya pada udang air tawar *Macrobrachium* Bate, 1868 (Murphy & Austin, 2002). Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian mengenai karakterisasi morfologis dan molekuler dengan gen *16S* pada udang air tawar anggota kelompok spesies *M. pilimanus* di perairan sungai di Yogyakarta.

MATERI DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Tabel 1. Data lokasi sampling

	Opak	Winongo	Sempor
Titik sampling	Hulu TS 2 S 07°39'41.51" E 110°27'16.14"	Hulu TS 1 Titik Awal: S 07°39'48.3" E 110°22'51.6" , Titik Akhir: S 07°40'01.1" E 110°22'41.1"	Hulu TS 1 S 07°38'02"E110°23'15"
	Hulu TS 3 S 07°41'20.28" E 110°27'56.33"		
Lokasi	Dusun Panggung, Desa Argomulyo, Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman (TS 2) Dusun Tambakan, Desa Sindumartani, Kecamatan Ngemplak, Kabupaten Sleman (TS3)	Dukuh Gabungan, Desa Donokerto, Kecamatan Turi, Kabupaten Sleman	Dukuh Somohitan, Desa Girikerto, Kecamatan Turi, Kabupaten Sleman
Ketinggian (m dpl)	413-440 (TS 2) 282-296 (TS 3)	389-407	513
Arus Substrat	Deras (TS 2 dan TS 3) Batuan dan kerikil (TS 2) Batuan, kerikil, dan pasir (TS 3)	Deras Batuan	Deras Pasir dan batuan

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel udang yang telah dikoleksi dan

Pengambilan sampel udang *Macrobrachium* dilakukan di beberapa sungai di Daerah Istimewa Yogyakarta, yaitu Sungai Opak, Winongo, dan Sempor. Pengambilan sampel di Sungai Opak dilaksanakan di dua titik sampling pada tahun 2013. Pengambilan sampel di Sungai Winongo dilaksanakan di satu titik sampling pada tanggal 8-11 Agustus 2015. Pengambilan sampel di Sungai Sempor dilaksanakan di satu titik sampling pula pada tanggal 27 Februari 2020. Data masing-masing lokasi pengambilan sampel ditunjukkan pada Tabel 1. Pengambilan data morfologis dilakukan di Laboratorium Sistematika Hewan, sedangkan data molekuler dilakukan di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan, Fakultas Biologi UGM. Penelitian tersebut dilakukan pada bulan Maret-Agustus 2020.

ethanol 96% yang digunakan untuk preservasi sampel. Bahan yang digunakan dalam identifikasi molekuler antara lain daging dari abdomen

spesimen, ethanol 70%, 180 μ L buffer ATL, QIAGEN *DNeasy Blood & Tissue Kits*, Tris-EDTA (TE), DNA ladder, agarose, pewarna *FluorSAFE DNA Stain*, akuades, akuabides, *Bioline MyTaq Red Mix*, primer *16 Sar* (5'CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') sebagai primer *forward* dan *16 Sbr* (5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') sebagai primer *reverse*.

Alat yang digunakan untuk pengambilan data morfologis antara lain jaring untuk sampling spesimen udang, mikroskop digital untuk mengamati bagian tubuh sampel yang berukuran kecil, caliper untuk mengukur morfometri spesimen, dan pinset untuk mengambil dan memegang sampel. Alat yang digunakan dalam identifikasi molekuler antara lain gunting, *microcentrifuge tube* (1,5-2 mL), *DNeasy Mini spin collection tube*, mikropipet (Biohi, Germany) ukuran 0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L, *freezer*, *microwave* (LG, Korea Selatan), pipet tip, *vortex mixer* (Germany, Taiwan), *electrophoresis chamber* (GE-100, China), *centrifuge* (GyroZen, Korea Selatan), timbangan digital (Ohaus Scout Pro, USA), *UV lamp transilluminator* dengan *Gel-Doc* (Daihan, Korea), dan *thermocycler* (Open PCR).

Metode

Karakter morfologis yang diamati pada penelitian ini meliputi karakter morfologi, meristik, dan morfometri. Karakter morfologis yang digunakan untuk identifikasi berupa bentuk, ada tidaknya struktur khusus, jumlah suatu struktur tubuh, dan ukuran suatu bagian tubuh. Karakter yang digunakan ini berdasarkan referensi dari jurnal Chace & Bruce, 1993; Ou & Yeo, 1995; Wowor & Choy, 2001; dan Wowor et al., 2004.

Pengambilan data molekuler dibagi menjadi beberapa tahap. Pada tahap persiapan, dilakukan sterilisasi terhadap alat yang digunakan. Tahap isolasi DNA kemudian dilakukan dengan mengikuti protokol dari QIAGEN *DNeasy Blood & Tissues Kits*. Isolat DNA diamplifikasi menggunakan primer *16Sar* (*forward*) dan *16Sbr* (*reverse*) dengan *Bioline MyTaqTM HS Mix*. PCR

dilakukan menggunakan *thermocycler* dengan siklus amplifikasi DNA, yaitu *predenaturation* 95° selama 1 menit, *denaturation* 95° selama 15 detik, *annealing* 50° selama 30 detik, *extension* 72° selama 30 detik, *final extension* 72° selama 5 menit, dan *hold* 4°. Elektroforesis dilakukan menggunakan agarose 1%, tegangan 100 V, dengan *buffer* TAE 1x. Setelah proses *running* selesai, gel agarose diangkat dan didokumentasikan dengan kamera pada *UV illuminator*. Tahap *sequencing* dilakukan dengan mengirimkan sampel hasil amplifikasi ke 1st Base.

Analisis data

Karakter morfologis dianalisis secara deskriptif dengan mengamati ciri morfologi, meristik, dan morfometri dari udang *Macrobrachium*. Karakter-karakter yang diamati tersebut kemudian dibandingkan dengan karakter yang dimiliki oleh anggota kelompok spesies *M. pilimanus*. Perbandingan karakter tersebut kemudian lebih difokuskan antara sampel yang diteliti dengan spesies anggota *M. pilimanus* yang memiliki distribusi di Pulau Jawa, untuk mengetahui kemiripan karakter di antara keduanya.

Analisis karakter molekuler dibagi menjadi beberapa tahap. Pertama, pengolahan hasil *sequencing* sampel dengan program *Gene Studio*. Analisis similaritas kemudian dilakukan dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang dapat diakses melalui website NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Konversi data *GenBank* ke dalam bentuk FASTA dilakukan dengan menggunakan program MESQUITE. *Alignment* dilakukan dengan menggunakan program MEGA7. Program MEGA7 juga dapat digunakan untuk analisis jarak genetik dengan *Bootstrap* 1000 dan *Kimura 2 parameter model*, serta rekonstruksi pohon filogenetik dengan model yang sama dan metode *Neighbor-Joining*. Analisis variasi genetik dilakukan dengan menggunakan program DnaSP v.5.10.01 dan NoteTab Light.

HASIL

Karakterisasi Morfologis

Pada penelitian ini diperoleh 11 sampel udang yang terdiri dari 7 sampel dari sungai Opak, 2 sampel dari sungai Winongo, dan 2 sampel dari sungai Sempor. Sampel yang diperoleh di sungai Opak menunjukkan jumlah tertinggi karena dilakukan di dua titik sampling, sedangkan sungai Winongo dan Sempor hanya dilakukan di satu titik sampling. Berdasarkan hasil identifikasi morfologis yang meliputi karakter morfologi,

meristik, dan morfometri dari 11 sampel udang tersebut, semuanya hanya dapat diidentifikasi hingga tingkat genus yaitu *Macrobrachium* sp. Sampel udang tersebut juga dapat dimasukkan ke dalam satu kelompok spesies luas yaitu *Macrobrachium pilimanus species group* (Tabel 2). Pada Tabel 2 juga menunjukkan bahwa sampel OP5 dan OP6 berjenis kelamin betina, sedangkan sampel OP-OP4, WNM1, SM, dan SM1 masih tergolong juvenile. Sampel WNM tidak dapat diidentifikasi karena pleopod kedua mengalami kerusakan.

Tabel 2. Hasil identifikasi sampel udang dalam penelitian

No.	Titik Sampling	Singkatan	Jenis Kelamin	Spesies	Species Group
1.	Hulu TS 2 Opak	OP	Juvenile	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
2.	Hulu TS 2 Opak	OP1	Juvenile	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
3.	Hulu TS 2 Opak	OP2	Juvenile	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
4.	Hulu TS 2 Opak	OP3	Juvenile	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
5.	Hulu TS 2 Opak	OP4	Juvenile	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
6.	Hulu TS 2 Opak	OP5	Betina	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
7.	Hulu TS 3 Opak	OP6	Betina	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
8.	Hulu TS 1 Winongo	WNM	-	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
9.	Hulu TS 1 Winongo	WNM1	Juvenile	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
10.	Hulu TS1 Sempor	SM	Juvenile	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>
11.	Hulu TS1 Sempor	SM1	Juvenile	<i>Macrobrachium</i> sp.	<i>Macrobrachium pilimanus</i>

Tabel 3. Karakter meristik dan morfometri sampel udang OP-SM1

No.	Karakter	Keterangan
1.	Rumus rostrum	$(4-5)+(6-8)/2-3$
2.	Jumlah gigi chela pereopod kedua	8-13
3.	Chela: carpus pereopod pertama	0,64-0,75
4.	Panjang jari: palma pereopod pertama	0,8-1,2
5.	Panjang jari: palma pereopod kedua	0,68-0,93
6.	ch (<i>chela height</i>): pl (<i>propodus length</i>)	0,22-0,31
7.	cw (<i>chela width</i>): pl (<i>propodus length</i>)	0,17-0,23
8.	dl (<i>dactylus length</i>): pl (<i>propodus length</i>)	0,44-0,59
9.	Chela: carpus pereopod mayor kedua	3,1-4,5
10.	Palma: carpus pereopod mayor kedua	1,86-2,7
11.	Carpus: merus pereopod mayor kedua	0,5-0,67
12.	Panjang: lebar carpus pereopod kedua	1,33-1,73
13.	Propodus: dactylus pereopod ketiga	2,3-2,96
14.	Panjang rostrum: panjang karapas	0,35-0,45

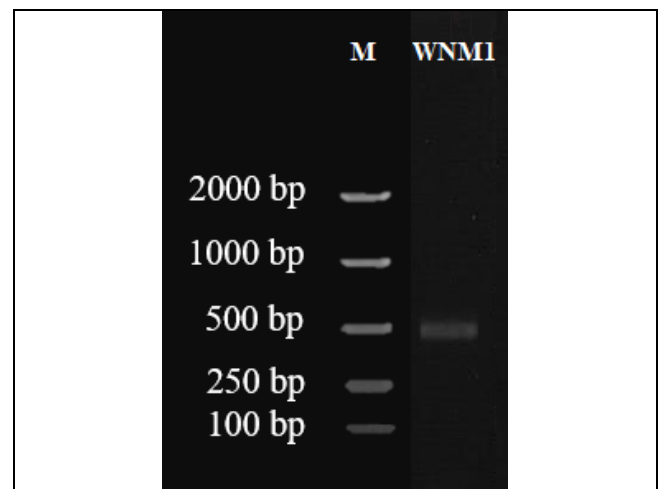
Dalam penelitian ini, karakter meristik yang diamati adalah jumlah gigi rostum dan jumlah gigi chela pereopod kedua. Karakter morfometri yang diamati merupakan rasio atau perbandingan bagian tubuh satu dengan bagian tubuh lainnya. Hal ini dilakukan karena setiap sampel yang diamati memiliki umur dan perkembangan bagian tubuh yang berbeda-beda, sehingga perhitungan rasio tersebut diharapkan dapat menghasilkan nilai yang relatif lebih stabil. Tabel 3 menunjukkan hasil pengamatan karakter meristik dan morfometri pada sampel udang *Macrobrachium* sp.

Karakterisasi Molekular

Berdasarkan hasil analisis molekular dengan gen mitokondria *16S*, diperoleh beberapa hasil berupa amplifikasi DNA, analisis similaritas dengan BLAST, jarak genetik, rekonstruksi pohon filogenetik, dan variasi genetik. Berdasarkan hasil amplifikasi, diperoleh panjang fragmen gen mitokondria *16S* pada udang *Macrobrachium* dengan kode sampel WNM1 adalah 493 bp.

Sampel WNM1 kemudian dianalisis similaritas menggunakan program *Nucleotide BLAST*. Berdasarkan analisis similaritas, didapatkan hasil bahwa sampel WNM1 memiliki similaritas tertinggi dengan spesies *M. forcipatum* sebesar 87,63%, kemudian diikuti dengan spesies *M.*

dienbienphuense sebesar 87,02%. Nilai *query cover* dengan kedua spesies tersebut sebesar 99% (Tabel 4). Analisis dilanjutkan dengan program MEGA untuk mengetahui jarak genetik dan merekonstruksi pohon filogenetik. Berdasarkan Tabel 5, didapatkan hasil bahwa sampel WNM1 memiliki jarak genetik sebesar 13% dengan spesies *M. forcipatum* dan 14% dengan *M. dienbienphuense* dari *database GenBank*. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik, menunjukkan bahwa sampel WNM1 memiliki hubungan paling dekat atau *ancestor* terdekat dengan spesies *M. forcipatum* dan *M. dienbienphuense* dengan nilai *bootstrap* sebesar 69% (Gambar 2).



Gambar 1. Elektroforegram hasil PCR dari ekstraksi DNA sampel udang WNM1 berdasarkan gen mitokondria *16S* (M= Marker, WNM1= udang *Macrobrachium* Sungai Winongo)

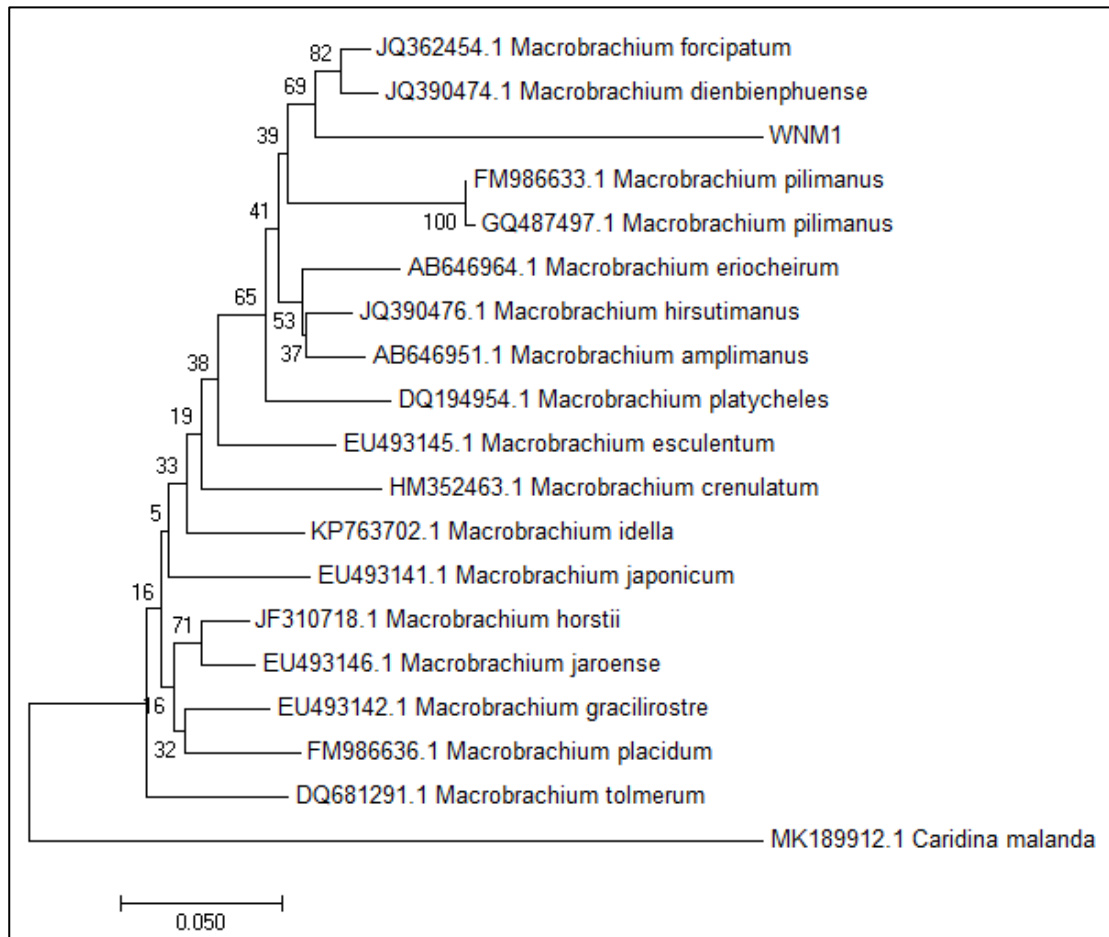
Tabel 4. Persentase (%) similaritas antara sampel WNM1 dengan sampel dari *database GenBank*

No.	Sampel NCBI		Spesimen WNM1
1.	JQ362454.1 <i>Macrobrachium forcipatum</i>	Identity	87,63%
		Query cover	99%
2.	JQ390474.1 <i>Macrobrachium dienbienphuense</i>	Identity	87,02%
		Query cover	99%

Tabel 5. Jarak genetik (%) sampel udang WNM1 dengan sampel udang dari *GenBank*

	WNM1	<i>M. forcipatum</i> JQ362454.1	<i>M. dienbienphuense</i> JQ390474.1
WNM1		2**	2**
<i>M. forcipatum</i> JQ362454.1	13*		1**
<i>M. dienbienphuense</i> JQ390474.1	14*	2*	

Keterangan : *) jarak genetik; **) *standard error*



Gambar 2. Rekonstruksi pohon filogenetik *Neighbour-Joining* 18 sekuen gen mitokondria 16S anggota *Macrobrachium* menggunakan model *Kimura 2-Parameter* pada program MEGA 7

Analisis variasi genetik dilakukan dengan menggunakan program DNAsp dan NoteTab Light. Analisis ini digunakan untuk mengetahui *variable sites*, *parsimony sites*, *nucleotide diversity*, dan *haplotype diversity*. Berdasarkan hasil analisis variasi genetik (Tabel 6) antara sampel WNM1 dengan sampel *M. forcipatum* dan *M. dienbienphuense* dari *GenBank*, didapatkan tiga haplotipe dari tiga sekuen yang dianalisis. Berdasarkan tabel tersebut, diketahui juga bahwa

dari 494 bp sekuen gen mitokondria 16S yang diteliti, terdapat 67 *variable site* dan 0 *parsimony site*. Nilai keragaman haplotipe (*Haplotype Diversity*) diperoleh sebesar $1,000 \pm 0,272$. Nilai keragaman nukleotida (*Nucleotide Diversity*) dalam penelitian ini didapatkan sebesar $0,09079 \pm 0,03614$. Pada Tabel 7 menunjukkan situs polimorfik yang terdiri dari 2 indel, 39 transisi, dan 28 transversasi.

Tabel 6. Variasi genetik antara sampel udang *Macrobrachium* sp. WNM1 dengan *M. forcipatum* dan *M. dienbienphuense* berdasarkan gen 16S mitokondria

Spesies	Bp	Jumlah Individu	Jumlah Haplotype	Variable Sites	Parsimony Sites	Haplotype Diversity (Hd)	Nucleotide Diversity (π)
<i>Macrobrachium</i> sp. (WNM1)	494	3	3	67	0	$1,000 \pm 0,272$	$0,09079 \pm 0,03614$

Tabel 7. Hasil analisis situs polimorfik sampel WNM1 dari penelitian dan sekuen *M. forcipatum* dari GenBank

Sampel	Haplotipe	Situs Polimorfik																																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28					
JQ362454.1	HT1	A	C	A	A	T	T	G	C	T	G	T	T	A	G	A	C	A	G	T	G	A	T	T	T	G	G	T	G	T	G			
JQ390474.1	HT2	.	.	G	.	.	C	A	T	.	.	G	.	.	.	A	G	.	.	A	.	A			
WNM1	HT3	T	-	.	G	G	C	.	T	C	A	.	C	C	G	A	.	T	G	.	C	.	G	A	G	A	A	A	T	A	A	C	G	A

Sampel	Haplotipe	Situs Polimorfik																																		
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32					
JQ362454.1	HT1	G	G	T	T	G	G	G	T	G	G	T	G	T	G	T	G	T	G	C	T	T	T	G	C	T	G	T	A	T	T	T	T	G	C	
JQ390474.1	HT2	T	T
WNM1	HT3	A	T	C	A	A	A	T	A	T	C	A	C	A	G	A	T	C	C	.	A	G	A	C	T	A	C	G	G	G	C	G	C	A	T	

Keterangan:



PEMBAHASAN

Karakterisasi Morfologis

Berdasarkan hasil pengamatan secara morfologis yang meliputi karakter morfologi, morfometri, dan meristik, seluruh sampel udang yang diperoleh dari Sungai Winongo, Opak, dan Sempor termasuk ke dalam Infraordo Caridea. Anggota infraordo ini dicirikan dengan pleura segmen abdominal kedua berbentuk buah pear dan melebar menutupi segmen pertama dan ketiga. Pada tingkat familia, sampel udang tersebut dimasukkan ke dalam familia Palaemonidae, yang dicirikan dengan bentuk karapas yang silindris dengan rostrum menonjol yang terkompresi lateral dan memiliki gigi pada bagian dorsal dan ventral, pasangan pereopod pertama dan kedua memiliki *pincer* dengan pereopod pertama lebih pendek dan ramping dari pereopod kedua, tiga pereopod terakhir tanpa *pincer*, dan individu jantan memiliki *appendix masculina* dan *appendix interna* pada endopod pleopod kedua (Fischer & Bianchi, 1984; Chace & Bruce, 1993). Pada tingkat genus, seluruh sampel udang ini dikelompokkan ke dalam genus *Macrobrachium* karena memiliki karakter antara lain karapas dengan spina hepatica, tetapi tanpa spina branchiostegal. *Dactylus* tiga pereopod terakhir sederhana (non bifida), pereopod kedua panjang dan kuat, dan pleopod pertama individu jantan dicirikan dengan tidak adanya *appendix interna* pada bagian endopodnya (Fischer &

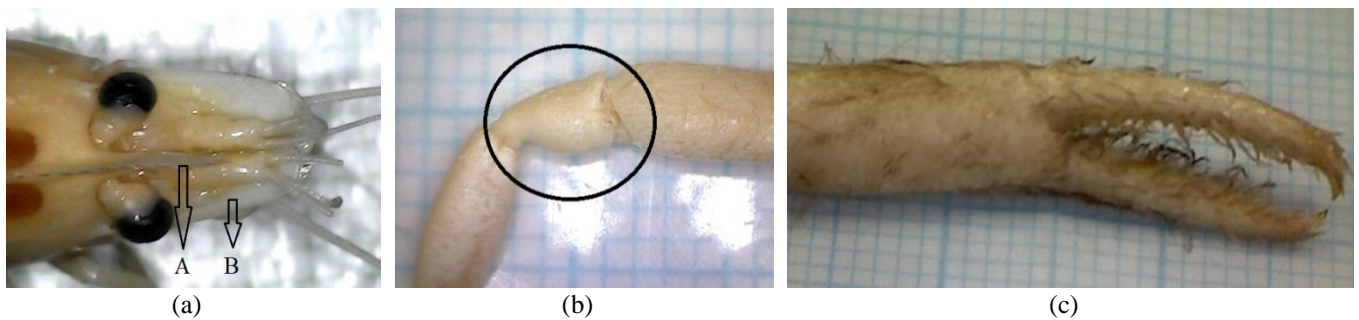
Bianchi, 1984; Chace & Bruce, 1993; Short, 2004).

Identifikasi udang *Macrobrachium* hingga tingkat spesies memerlukan individu jantan dewasa. Dari 11 sampel udang yang diidentifikasi, dua di antaranya (OP5 dan OP6) berjenis kelamin betina karena tidak adanya *appendix masculina* pada endopod pleopod kedua, serta didukung dengan ditemukannya telur pada bagian abdomen. Sampel OP-OP4, WNM1, SM, dan SM1 masih dalam tahap juvenile karena *appendix masculina* tidak ada atau belum berkembang. Oleh karena itu, seluruh sampel udang yang diteliti tidak dapat diidentifikasi secara morfologi hingga tingkat spesies. Sampel udang tersebut dapat dimasukkan ke dalam satu kelompok spesies luas, yaitu kelompok spesies *Macrobrachium pilimanus* berdasarkan kesamaan karakter yang dimilikinya, antara lain memiliki rostrum yang tidak melebihi scaphocerite, carpus pereopod kedua berbentuk cangkir pendek, dan adanya *pubescence* lebat pada chela pereopod kedua (Gambar 3) (Ng, 1995).

Selain karakter-karakter yang dimiliki oleh semua anggota kelompok spesies *M. pilimanus*, diamati pula karakter morfologi lainnya. Seluruh sampel yang diteliti memiliki rostrum pendek yang tidak mencapai akhir segmen ketiga *antennular peduncle* dan memiliki epistome yang berbentuk trilobus dengan dua lekukan. Pada bagian telson, memiliki preanal carina pada *inter-uro-podal sclerite*, terdapat *mobile mesial spine*

yang lebih pendek dari *distolateral tooth*, dan apeks posterior telson tidak melebihi spina posterolateral. Karakter meristik dan morfometri dari sampel udang dapat dilihat pada Tabel 3. Karakter morfologi, meristik, dan morfometri yang telah diamati dari sampel penelitian kemudian dibandingkan dengan seluruh spesies

anggota *M. pilimanus species group*, dan lebih difokuskan pada spesies yang terdistribusi di Pulau Jawa. Spesies anggota *M. pilimanus species group* yang terdistribusi di Pulau Jawa, antara lain *M. pilimanus*, *M. empulipke*, *M. leptodactylus*, dan *M. poeti* (Wowor et al., 2004; Cai et al., 2004; Wowor, 2010; Cai & Vidthayanon, 2016).



Gambar 3. Rostum (A) tidak melebihi scaphocerite (B) sampel WNM1 (a), Carpus pereopod kedua sampel WNM1 (b), Pubescence chela pereopod kedua sampel WNM (c)

Sampel udang dalam penelitian ini memiliki banyak kesamaan dengan spesies *M. pilimanus* dan *M. empulipke*, antara lain memiliki rostrum pendek dan tidak mencapai akhir segmen ketiga *antennular peduncle*, memiliki preanal carina, dan memiliki *mobile mesial spine* yang lebih pendek dari *distolateral tooth*. (Cai et al., 2004; Wowor, 2010). Karakter meristik dari sampel penelitian, *M. pilimanus*, dan *M. empulipke*, yaitu masing-masing memiliki rumus rostrum $(4-5)+(6-8)/2-3$ vs $(3-5)+(6-10)/1-3$ vs $(3-5)+(6-10)/2-3$, serta memiliki gigi pada chela pereopod kedua sebanyak 8-13 vs 14-17 vs 12-15. Berdasarkan hal tersebut, *M. pilimanus* memiliki perbedaan karakter jumlah gigi pada chela pereopod kedua (Cai et al., 2004; Wowor, 2010).

Karakter morfometri antara sampel dengan *M. pilimanus* dan *M. empulipke* memiliki beberapa kesamaan dan perbedaan. Persamaan karakter morfometri antara sampel dengan *M. pilimanus* antara lain pada bagian pereopod pertama, yaitu rasio panjang chela terhadap carpus (0,64-0,75 vs 0,67), serta pada bagian pereopod kedua yaitu rasio jari terhadap palma (0,68-0,93 vs 0,83-1,12), rasio *chela height* terhadap *propodus length* (0,22-0,31 vs 0,17-0,31), rasio *chela width* terhadap *propodus length* (0,17-0,23 vs 0,15-0,2), rasio *dactylus length* terhadap *propodus length*

(0,44-0,59 vs 0,51-0,59), rasio palma terhadap carpus (1,86-2,7 vs 1,25 sampai lebih dari 2), dan rasio carpus terhadap merus (0,5-0,67 vs 0,5-0,67). Persamaan karakter ini memiliki arti yaitu beberapa karakter *M. pilimanus* masih masuk dalam rentang hasil pengukuran pada sampel. Perbedaan karakter antara sampel dengan *M. pilimanus* antara lain rasio chela terhadap carpus pereopod kedua sebesar 3,1-4,5 vs 5, rasio propodus terhadap dactylus pereopod kedua sebesar 2,3-2,96 vs 3,2, dan rasio rostrum terhadap karapas sebesar 0,35-0,45 vs 0,14-0,2 (Chace & Bruce, 1993; Ou & Yeo, 1995; Cai et al., 2004; Wowor, 2010).

Kesamaan karakter morfometri antara sampel dengan *M. empulipke* antara lain pada bagian pereopod pertama, yaitu rasio panjang chela terhadap carpus (0,64-0,75 vs 0,62-0,67) dan rasio panjang jari terhadap palma (0,8-1,2 vs jari sepanjang palma), serta pada bagian pereopod kedua yaitu rasio panjang chela terhadap carpus (3,1-4,5 vs 3,4-3,8) dan rasio panjang carpus terhadap merus (0,5-0,67 vs 0,62-0,73). Selain itu, rasio panjang rostrum terhadap karapas juga masih dalam rentang rasio pengukuran sampel (0,35-0,45 vs 0,35-0,47). Perbedaan antara sampel dengan *M. empulipke* yaitu pada rasio panjang jari terhadap palma pereopod kedua

sebesar 0,68-0,9 vs 1,4-2, rasio panjang palma terhadap carpus pereopod kedua sebesar 1,86-2,7 vs 1,59, dan rasio panjang carpus pereopod kedua terhadap lebarnya sebesar 1,33-1,73 vs 1,68-2,03 (Wowor, 2010).

Perbandingan antara sampel dengan *M. leptodactylus* dan *M. poeti* lebih banyak memiliki perbedaan daripada kesamaan karakter. Kesamaan karakter antara sampel dan *M. leptodactylus* yaitu memiliki rostrum pendek

yang tidak melebihi akhir segmen ketiga *antennular peduncle* dan bentuk epistome yang mirip (Gambar 4). Perbedaan antara sampel dengan spesies tersebut antara lain rumus gigi rostrum yaitu $(4-5)+(6-8)/2-3$ vs $7+7/2$, gigi pada chela pereopod kedua sebanyak 8-13 vs 15, rasio carpus terhadap merus pereopod kedua sebesar 0,5-0,67 vs 0,78-0,9, dan rasio panjang carpus pereopod kedua terhadap lebarnya sebesar 1,33-1,73 vs 2,18-2,68 (Cai et al., 2004; Wowor, 2010).



Gambar 4. Bentuk epistome sampel WNM1 (a), OP1 (b), SM (c) (Doc Pribadi, 2020), spesies *M. leptodactylus* (d) (Cai et al., 2004)

Sampel penelitian *Macrobrachium* sp. dibandingkan dengan spesies *M. poeti*, lebih banyak menunjukkan perbedaan. Spesies *M. poeti* hanya memiliki 1 gigi ventral pada rostrumnya, sedangkan dalam penelitian ini jumlah gigi rostrum ventral yang terhitung berkisar antara 2-3. Jumlah gigi pada cheliped pereopod kedua hanya beberapa, sedangkan pada sampel berkisar antara 8-13 buah. Karakter lain yang dimiliki oleh spesies *M. poeti* adalah memiliki merus pereopod kedua yang secara nyata lebih panjang dari palma, dan propodus pereopod ketiga tiga kali dactylus (Cai & Vidthayanon, 2016).

Sampel dalam penelitian ini juga memiliki beberapa kesamaan dengan spesies *M. forcipatum*, yaitu memiliki *mobile mesial spine* lebih pendek dari *distolateral tooth*, jumlah gigi rostrum $((4-5)+(6-8)/2-3$ vs $(3-5)+(6-10)/2-3$), jumlah gigi pada chela pereopod kedua (8-13 vs 7-10), rasio jari dengan palma pereopod pertama (0,8-1,2 vs jari lebih pendek dari palma), dan rasio panjang propodus dengan dactylus pereopod ketiga (2,3-2,96 vs 2,6-3). Pada bagian pereopod kedua, terdapat kesamaan pada rasio panjang carpus terhadap merus (0,5-0,67 vs 0,5) dan rasio panjang carpus dengan lebarnya (1,33-1,73 vs 1,4) (Cai et al., 2004). Sampel WNM1 juga

memiliki beberapa kesamaan dengan spesies *M. dienbienphuense*, antara lain memiliki preanal carina, *mobile mesial spine* lebih pendek dari *distolateral tooth*, jumlah gigi rostrum $((4-5)+(6-8)/2-3$ vs $(3-5)+(5-9)/1-3$), rasio jari terhadap palma pereopod pertama (0,8-1,2 vs jari sepanjang palma), rasio chela terhadap carpus pereopod kedua (3,1-4,5 vs 3,3), rasio palma terhadap carpus pereopod kedua (1,86-2,7 vs lebih dari 2), dan rasio propodus terhadap dactylus pereopod ketiga (2,3-2,96 vs 2,8).

Berdasarkan pengamatan morfologis, baik karakter morfologi, meristik, maupun morfometri spesies *Macrobrachium* sp. yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan adanya variasi karakter yang merujuk ke beberapa spesies anggota *M. pilimanus species group*. Perbandingan karakter sampel dengan *M. pilimanus species group* yang terdistribusi di Pulau Jawa, menunjukkan bahwa sampel penelitian memiliki kesamaan karakter yang lebih besar dengan spesies *M. pilimanus* dan *M. empulipke*. Hal ini diperkuat dengan kondisi habitat ditemukannya sampel udang tersebut, yaitu di daerah hulu sungai yang memiliki substrat berupa batu dan pasir dengan arus yang cukup deras. Menurut literatur, spesies *M.*

pilimanus dapat ditemukan di aliran sungai yang deras dengan substrat pasir dan batu dengan serasah daun di sepanjang tepian, tetapi tanpa vegetasi lebat (Ou & Yeo, 1995). Spesies *M. empulipke* dapat ditemukan di bentangan sungai bagian tengah dan atas dengan campuran substrat bongkahan batu besar dan kecil, serta aliran air yang sedang hingga deras. Kadang-kadang juga mendiami badan air yang dalam (Wowor, 2010). Kondisi habitat antara sampel dengan *M. pilimanus* dan *M. empulipke* ini menunjukkan adanya kemiripan. Sampel udang dalam penelitian lebih banyak menunjukkan perbedaan dengan spesies *M. poeti*, salah satunya karena perbedaan karakter habitat antara keduanya. *Macrobrachium poeti* ditemukan di sungai di beberapa gua di Gunung Sewu (Cai & Vidthayanon, 2016).

Adanya variasi karakter pada sampel udang dalam penelitian ini diakibatkan karena sampel udang yang diamati belum mencapai tingkat jantan dewasa, sehingga karakter yang diamati bersifat kurang konsisten. Taksonomi dari kelompok spesies ini juga sangat rumit. Variabilitas spesies dalam kelompok spesies *M. pilimanus* juga sangat luar biasa. Kemungkinan hanya studi secara ekstensif dari berbagai lokasi di seluruh wilayah jelajahnya dan studi spesimen hidup di habitat aslinya, yang dapat memecahkan masalah ini (Fransen et al., 2010).

Karakterisasi Molekuler

Dalam analisis molekuler, hanya satu sampel saja yang dapat dianalisis, yaitu sampel WNM1 yang merupakan sampel udang dari Sungai Winongo, DIY. Hal ini dikarenakan beberapa sampel lainnya tidak dapat diidentifikasi secara molekuler akibat kerusakan jaringan yang disebabkan preservasi pada suhu ruang. Berdasarkan hasil amplifikasi DNA, diperoleh panjang fragmen gen mitokondria *16S* pada udang *Macrobrachium* sp. sampel WNM1 sebesar 493 bp (Gambar 1). Langkah selanjutnya adalah analisis similaritas dengan *Nucleotide BLAST*. Gen mitokondria *16S* yang akan dianalisis di BLAST sebaiknya memiliki panjang 500 bp, atau terburuknya adalah sepanjang 400 bp (Yang et al.,

2014). Oleh karena itu, panjang fragmen gen *16S* pada sampel memenuhi syarat untuk dilakukan analisis similaritas pada BLAST. Berdasarkan analisis similaritas sampel WNM1 (Tabel 4) diketahui bahwa sampel udang memiliki similaritas tertinggi dengan spesies *M. forcipatum* sebesar 87,63% dan diikuti dengan spesies *M. dienbienphuense* sebesar 87,02%. Menurut literatur, persentase similaritas gen *16S* rRNA kurang dari 97% dianggap sebagai spesies baru (Pangastuti, 2006). Oleh karena itu, sampel WNM1 dianggap sebagai spesies baru yang belum terdaftar dalam *database GenBank*. Spesies *M. forcipatum* dan *M. dienbienphuense* merupakan anggota kelompok spesies *M. pilimanus*. Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa spesimen WNM1 memiliki kedekatan dengan anggota spesies *M. pilimanus*. Sampel WNM1 menunjukkan nilai *query cover* sebesar 99% dengan kedua spesies, yang menunjukkan bahwa 99% dari total urutan nukleotida sampel WNM1 dapat dibandingkan dengan sekuen *M. forcipatum* dan *M. dienbienphuense*.

Analisis jarak genetik dan rekonstruksi pohon filogenetik kemudian dilakukan dengan menggunakan program MEGA. Jarak genetik adalah tingkat perbedaan gen (genom) di antara spesies atau antara populasi dalam satu spesies, berupa proporsi situs nukleotida yang memiliki perbedaan antara dua sekuen yang dibandingkan (Nei, 1987). Jarak genetik yang kecil menunjukkan bahwa populasi tersebut memiliki banyak alel yang serupa, berhubungan dekat, dan memiliki nenek moyang yang sama (Nei & Roychoudhury, 1974). Berdasarkan Tabel 5, diketahui bahwa sampel WNM1 memiliki jarak genetik terdekat dengan spesies *M. forcipatum* yaitu sebesar 13%, dan diikuti dengan *M. dienbienphuense* sebesar 14%. Besarnya nilai jarak genetik ini menunjukkan sampel WNM1 memiliki perbedaan gen yang cukup besar dan hubungan kekerabatan yang kurang dekat dengan kedua spesies tersebut. Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik (Gambar 2), sampel WNM1 memiliki *ancestor* terdekat dengan spesies *M. forcipatum* dan *M.*

dienbienphuense dengan nilai *bootstrap* sebesar 69%. Kedekatan sampel WNM1 dengan *M. forcipatum* dan *M. dienbienphuense* ini didukung oleh jarak genetik yang paling dekat dibandingkan spesies lain, yaitu masing-masing sebesar 13% dan 14%. Pohon filogenetik ini juga menunjukkan bahwa sampel WNM1 membentuk takson monofiletik dengan spesies lain dari anggota genus *Macrobrachium*, yang artinya sampel tersebut memiliki nenek moyang yang sama yaitu genus *Macrobrachium*, familia Palaemonidae. Spesies *Caridina malanda* berada pada cabang batang *out group* karena berasal dari familia Atyidae.

Analisis variasi genetik interspesies, diperoleh hasil berupa *variable sites*, *parsimony sites*, *nucleotide diversity*, dan *haplotype diversity*. Berdasarkan Tabel 6, didapatkan tiga haplotipe dari tiga sekuen yang dianalisis. Haplotipe adalah sekelompok alel dalam suatu organisme yang diturunkan bersama dari satu induk (Cox et al., 2016). Diketahui pulabahnya dari 494 bp sekuen gen mitokondria *16S* yang diteliti, terdapat 67 *variable site* dan 0 *parsimony site*. Oleh karena itu, 67 situs nukleotida yang berbeda tersebut adalah *singleton site*. Nilai keragaman haplotipe (*Haplotype Diversity*) diperoleh sebesar $1,000 \pm 0,272$. *Haplotype diversity* adalah frekuensi dan jumlah haplotipe antara individu. Nilai *haplotype diversity* dikatakan tinggi apabila nilai $H_d > 0,5$ (Grant dan Bowen, 1998). Nilai haplotipe sebesar 1 ini menunjukkan bahwa seluruh sampel yang dianalisis adalah haplotipe yang berbeda. Oleh karena itu, tiga sekuen sampel yang dianalisis ini memiliki tiga haplotipe yang berbeda.

Nilai keragaman nukleotida (*Nucleotide Diversity*) dalam penelitian ini didapatkan sebesar $0,09079 \pm 0,03614$. *Nucleotide diversity* (π) adalah jumlah rata-rata perbedaan nukleotida per situs antara dua sekuen DNA yang dipilih secara acak dalam populasi (Nei & Li, 1979). Nilai *nucleotide diversity* dikatakan rendah jika nilai $\pi < 0,005$ atau 0,5% (Grant and Bowen, 1998). Oleh karena itu, keragaman nukleotida dalam penelitian dapat dikatakan cukup tinggi, yang artinya ada banyak situs nukleotida yang mengalami mutasi, yaitu pada 67 situs.

Berdasarkan Tabel 7, dari 67 situs polimorfik terdapat 2 indel, 39 transisi, dan 28 transversi. Indel adalah peristiwa evolusi spesifik yang dapat berupa penambahan (insersi) maupun penghapusan (delesi) pasangan nukleotida dalam suatu sekuen. Indel bertanggung jawab atas terbentuknya *gap* saat *alignment* sekuen (Cartwright, 2009). Transisi adalah mutasi DNA berupa pertukaran basa pirimidin dengan basa pirimidin lain, maupun pertukaran basa pirin dengan basa pirin lainnya. Transversi adalah mutasi DNA berupa pertukaran basa nukleotida dari purin ke pirimidin, dan sebaliknya (Guo et al., 2017).

SIMPULAN

Berdasarkan analisis morfologis, seluruh sampel udang dalam penelitian teridentifikasi sebagai *Macrobrachium* sp. dan dimasukkan ke dalam *M. pilimanus species group*. Berdasarkan analisis molekular, sampel WNM1 dengan *M. forcipatum* dan *M. dienbienphuense* memiliki similaritas masing-masing 87,63% dan 87,02%, serta jarak genetik masing-masing 13% dan 14%. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa sampel yang diteliti berbeda dengan *M. forcipatum* dan *M. dienbienphuense*, tetapi masih masuk ke dalam anggota *M. pilimanus species group*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas bantuan dari Fakultas Biologi UGM yang telah memberikan dana penelitian atas nama Rury Eprilurahman, S.Si., M.Sc. melalui program Penelitian Kolaborasi Dosen dan Mahasiswa Tahun 2019 dengan nomor kontrak UGM/BI/1703/M/02/05. Penulis menyampaikan terima kasih kepada: Kepala Laboratorium Genetika & Pemuliaan dan Sistemika Hewan Fakultas Biologi UGM yang telah memberikan ijin menggunakan fasilitas laboratorium; Tim *Macrobrachium* DIY 2019 dan Bapak Susilo Irwanjasmoro yang telah memberikan waktu dan tenaga selama proses pengerjaan penelitian ini dari awal sampai akhir baik di lapangan maupun di laboratorium.

KEPUSTAKAAN

- Cai Y, Vidthayanon C. 2016. *Macrobrachium spelaeus*, a new species of stygobitic freshwater prawn from Thailand (Decapoda: Palaemonidae). *Raffles Bulletin of Zoology* **64**: 117-122
- Cai Y, Naiyanetr P, Ng PKL. 2004. The freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868, of Thailand (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Natural History* **38(5)**: 581-649
- Cartwright RA. 2009. Problems and Solutions for Estimating Indel Rates and Length Distributions. *Molecular Biology and Evolution* **26(2)**: 473-480
- Chace FA, Bruce AJ. 1993. The Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda) of the Albatross Philippine Expedition, 1907–1910, Part 6: Superfamily Palaemonoidea. *Smithsonian Contributions to Zoology* **543**: 1–152
- Chen RT, Tsai CF, Tzeng WN. 2009. 16S and 28S rDNA Sequences in Phylogenetic Analyses of Freshwater Prawns (*Macrobrachium* Bate, 1868) from Taiwan. *Journal of Crustacean Biology* **29(3)**: 400-412
- Cox CB, Moore PD, Ladle R. 2016. *Biogeography: An Ecological and Evolutional Approach*. Ninth Edition. John Wiley & Sons, Inc., Oxford. p. 34, 106.
- Fischer W, Bianchi G (eds). 1984. *FAO species identification sheets for fishery purposes: Western Indian Ocean; (Fishing Area 51)*. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome.
- Fransen C, de Grave S, Ng P. 2010. *Studies on Malacostraca: Lipke Bijdeley Holthuis Memorial Volume*. Koninklijke Brill NV. Leiden, p. 716.
- Grant WS, Bowen BW. 1998. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights from Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. *The American Genetic Association* **89**: 415-426
- Guo C, McDowell IC, Nodzinski M, Scholtens DM, Allen AS, Lowe WL, Reddy TE. 2017. Transversions have Larger Regulatory Effects than Transitions. *BMC Genomics* **18(394)**: 1-9
- Holthuis LB. 1952. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation* **12**: 1–396
- Muphy NP, Austin CM. 2002. A Preliminary Study of 16S rRNA Sequence Variation in Australian *Macrobrachium* Shrimps (Palaemonidae: Decapoda) Reveals Inconsistencies in Their Current Classification. *Invertebrate Systematics* **16**: 697-701
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Nei M, Roychoudhury AK. 1974. Genic variation within and between the three major races of man, Caucasoids, Negroids, and Mongoloids. *The American Journal of Human Genetics*, **26**: 421–443.
- Nei M, Li W. 1979. Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76(10)**: 5269–5273.
- Ng PKL. 1995. Freshwater Decapod Crustaceans (Potamidae, Palaemonidae) of Temengor Forest Reserve, Hulu Perak, Malaysia. *Malayan Nature Journal* **48**: 249-257
- Ou ACT, Yeo DCJ. 1995. A New Species of Freshwater Prawn, *Macrobrachium platycheles* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) from Singapore and Peninsular Malaysia. *The Raffles Bulletin of Zoology* **43(2)**: 299-308
- Pangastuti A. 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiveristas* **7(3)**: 292-296
- Short JW. 2004. A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Hydrobiologia* **525**: 1-100
- Wowor D, Choy SC. 2001. The Freshwater Prawns of The Genus *Macrobrachium* BATE, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from Brunei Darussalam. *The Raffles Bulletin of Zoology* **49(2)**: 269-289
- Wowor D, Cai Y, Ng PKL. 2004. *Crustacea: Decapoda, Caridea*. In: Yule, C.M., Sen, Y.H. (Eds.), *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region*. Academy of Sciences. Malaysia, Kuala Lumpur.

- Wowor D, Muthu V, Meier R, Balke M, Cai Y, Ng PKL. 2009. Evolution of Life History Traits in Asian Freshwater Prawns of The Genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on Multilocus Molecular Phylogenetic Analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52(2)**: 340-350
- Wowor D. 2010. *Macrobrachium empulipke*, a New Freshwater Prawn Species (Decapoda, Palaemonidae) from Indonesia. Dalam: CRM 014 – Fransen et al., (eds), Lipke Bijdeley Holthuis Memorial. Leiden: Koninklijke Brill NV. pp. 715-726
- Yang L, Tan Z, Wang D, Xue L, Guan M, Huang T, Li R. 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific Reports* **4(4089)**: 1-11