

Karakter morfologis dan molekuler udang regang (*Macrobrachium sintangense* De Man, 1898) dari Daerah Istimewa Yogyakarta

Morphologicals and molecular characteristics of regang prawn (*Macrobrachium sintangense* De Man, 1898) from Special Region of Yogyakarta

Rury Eprilurahman, Rini Rahmawati*, Lukman Hakim, Tuty Arisuryanti, Zuliyati Rohmah, Trijoko

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

*Email: rini.rahmawati@mail.ugm.ac.id

Diterima 18 Oktober 2020

Disetujui 25 Januari 2021

INTISARI

Genus *Macrobrachium* memiliki anggota spesies yang banyak dan terdistribusi di berbagai negara diantaranya Indonesia, Malaysia, Thailand, Laos dan Vietnam. Salah satu spesies anggota genus *Macrobrachium* yang dapat ditemukan di Indonesia adalah *Macrobrachium sintangense* atau lebih dikenal sebagai udang regang. Identifikasi terhadap spesies ini penting dilakukan sebagai upaya untuk memperluas kajian mengenai udang regang di Daerah Istimewa Yogyakarta. Identifikasi terhadap spesies ini dilakukan secara morfologis maupun molekuler dengan gen 16S. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter morfologis dan molekuler dari *M. sintangense*. Identifikasi morfologis dilakukan dengan mengidentifikasi karakter morfologi, morfometri, dan meristik sesuai kunci identifikasi. Analisis secara molekuler dilakukan dengan isolasi, amplifikasi, elektroforesis, dan visualisasi DNA dengan UV illuminator, DNA di sekuensing oleh 1st Base. Hasil penelitian ini menunjukkan karakter morfologis berupa rostrum sedikit melengkung ke atas atau seperti pisau, post antennular carapace yang membulat, preanal carina tidak ada, terdapat pubescence pada setengah proksimal hingga dua per tiga chela. Secara morfologis semua sampel teridentifikasi sebagai anggota genus *Macrobrachium*. Ada delapan (8) spesimen dapat diidentifikasi sampai tingkat spesies, sebagai *M. sintangense*. Hasil identifikasi dua (2) spesimen secara molekuler menunjukkan nilai similaritas tinggi dan hubungan kekerabatan yang dekat terhadap *M. sintangense* dari sampel GenBank serta hubungan kekerabatan yang dekat dengan *M. sintangense* dari Tukad Panti, Bali, Indonesia. Kesimpulan pada penelitian ini secara morfologis dan molekuler adalah sampel yang ditemukan pada sungai Winongo, Tambakbayan, Code dan Opak di DIY adalah *M. sintangense*.

Kata kunci: Identifikasi, *Macrobrachium*, morfologi, morfologis, sungai DIY

ABSTRACT

Macrobrachium genus has many species members and distributed in various countries including Indonesia. One of the species belonging to the *Macrobrachium* genus that can be found in Indonesia was *Macrobrachium sintangense* or known as Sunda River Prawn. Identification of this species is important as an effort to expand studies on Sunda River Prawn in the Region of Yogyakarta. Identification of this species was carried out morphologically and molecularly with the 16S gene. The purpose of this study was to

determine the morphological and molecular characters of *M. sintangense*. Morphological identification is done by identifying morphological, morphometric, and meristic characters according to the identification key. Molecular analysis was carried out by isolation, amplification, electrophoresis, and DNA visualization with UV illuminators, DNA sequencing by 1st Base. The results of this study indicate the morphological character of the rostrum slightly curved upwards or like a knife, rounded post antennular carapace, absent preanal carina, pubescence in the proximal half to two thirds of the chela. Morphologically, all samples were identified as members of the genus *Macrobrachium*. There are eight (8) specimens identifiable to the species level, as *M. sintangense*. The results of molecular identification of two (2) specimens showed a high similarity value and a close relationship with *M. sintangense* from GenBank samples and also close relationship with *M. sintangense* from Tukad Panti, Bali, Indonesia. The conclusion of this research is that morphologically and molecularly, the samples found in the Winongo.

Keywords: Identification, *Macrobrachium*, morphology, morphology, DIY river

PENDAHULUAN

Udang regang atau yang lebih dikenal sebagai *Macrobrachium sintangense* merupakan salah satu spesies udang dari genus *Macrobrachium* yang umum ditemukan di Indonesia (Putranto, 2014). Udang ini dapat ditemukan di kolam, waduk, danau, saluran irigasi, sungai dan estuari (Putranto, 2014). Udang regang memiliki kandungan protein yang tinggi yaitu 60% dari berat kering tubuhnya, kadar lemak yaitu 7-12% dan kadar karbohidrat kurang dari 10% (Said *et al.*, 2014). Udang ini biasa digunakan sebagai pakan hidup untuk hewan budidaya seperti ikan dan juga dikonsumsi oleh masyarakat (Putranto, 2014).

M. Sintangense tersebar luas di Thailand, Malaysia, Kalimantan, Sumatera dan Jawa (Sabar, 1979). Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Trijoko *et al.* (2015) diketahui bahwa udang ini ditemukan di Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) yaitu di aliran sungai Opak. DIY memiliki beberapa aliran sungai diantaranya adalah sungai Opak, Code, Winongo, dan Tambakbayan yang belum dilakukan kajian terhadap *M. Sintangense*. Sehingga penting dilakukan kajian terhadap spesies ini di berbagai sungai yang ada di DIY sebagai upaya untuk memperluas kajian terhadap udang regang di DIY.

Identifikasi terhadap *M. sintangense* dapat dilakukan secara morfologis maupun molekuler.

Identifikasi secara morfologis memerlukan karakter identifikasi berupa karakter morfologi, morfometri, dan meristik. Namun, karakter morfologis utama pada udang *Macrobrachium* bergantung pada keadaan lingkungan, perubahan dalam siklus hidup, jenis kelamin, dan dominansi sosial (Page & Hughes, 2011). Sehingga diperlukan cara identifikasi yang lebih akurat untuk mendukung hasil identifikasi morfologi *M. sintangense* yaitu melalui identifikasi molekuler. Salah satu metode molekuler yang dikembangkan adalah menggunakan DNA *barcoding* dari gen mitokondria 16S rRNA (Munasinghe, 2010; Sharma *et al.*, 2014). Gen 16S sering digunakan untuk studi di pertengahan yaitu pada tingkat kategori seperti familia atau genera (Arif & Khan, 2009). Gen pengkode RNA ribosomal 16S adalah gen yang lestari (*conserved*).

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi bagi kelengkapan database mengenai karakterisasi genetik pada udang regang (*M. sintangense*) serta sebagai sumber informasi ilmiah yang dapat digunakan dalam budidaya dan konservasi udang regang. Selain itu, penelitian ini diharapkan dapat melengkapi data keanekaragaman spesies *Macrobrachium* di Yogyakarta.

MATERI DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan pengambilan sampel udang di empat sungai di Daerah Istimewa

Yogyakarta dengan rentang waktu dari tahun 2012 hingga 2016. Sampel diambil dari sungai Opak, Code, Winongo, serta Tambakbayan. Selanjutnya dilakukan pengambilan data morfologi dilakukan di Laboratorium Sistematika Hewan Fakultas Biologi UGM pada bulan November 2019 dan dilanjutkan pada bulan Februari hingga Agustus 2020. Pengambilan data molekuler dilakukan pada bulan Februari hingga Agustus 2020 di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Fakultas Biologi UGM.

Bahan dan alat

Bahan untuk preservasi udang hasil *sampling* menggunakan alkohol 96%. Bahan untuk isolasi DNA adalah jaringan dari abdomen udang regang

Metode

Identifikasi morfologis dilakukan dengan cara mengamati bagian tubuh udang secara langsung maupun menggunakan bantuan mikroskop digital. Identifikasi ini dilakukan dengan mengamati karakter morfologi, meristik, dan morfometri sesuai dengan jurnal kunci identifikasi. Pada penelitian ini, kunci identifikasi mengacu pada jurnal Chace & Bruce (1993) dan Wowor *et. al*, (2004) mengenai udang *Macrobrachium sintangense*. Pengamatan karakter morfologi berupa ada tidaknya bagian tubuh tertentu pada udang sesuai kunci identifikasi. Pengamatan karakter meristik dilakukan dengan cara menghitung jumlah bagian tubuh tertentu pada udang sesuai kunci identifikasi. Sementara pengamatan terhadap karakter morfometri dilakukan dengan cara mengukur bagian tubuh udang sesuai kunci identifikasi.

Identifikasi molekuler dilakukan dengan melakukan isolasi, amplifikasi, elektroforesis, dan dokumentasi pita DNA hasil elektroforesis. Isolasi DNA lobster dilakukan mengikuti petunjuk *QIAGEN DNEasy Blood & Tissue Kits*. Amplifikasi DNA menggunakan primer 16 *Sar* dan 16 *Sbr* dilakukan berdasarkan Protokol *Bioline MyTaq Red Mix*. Amplifikasi DNA dilakukan dengan mesin PCR menggunakan lima

sebanyak 50 mg, 180 µl buffer ATL, 20 µl proteinase-K, 200 µl buffer AL, 200 µl ethanol absolut 100%, 500 µl buffer AW-1, 500 µl buffer AW-2, 250 µl buffer AE. Komponen bahan untuk PCR yaitu DNA template (5,5 µl), ddH₂O (3 µl), MgCl₂ (1 µl), primer 16S rRNA. Primer yang digunakan adalah primer 16 *Sar* (5'CCTG TTTANCAAAAACAT-3') sebagai primer *forward* dan 16 *Sbr* (5'AGATAGAAACCAACCTGG-3') sebagai primer *reverse*. Bahan untuk elektroforesis yaitu gel agarose 1% dan pewarna Florosafe DNA Stain (2 µl). Alat yang digunakan untuk identifikasi morfologis adalah kamera mikroskop digital, pinset, jangka sorong, dan jurnal kunci identifikasi *Macrobrachium sintangense*.

Tahapan yaitu *predenaturation* pada suhu 95°C, *denaturation* pada suhu 95°C, *annealing* pada suhu 50°C, *extention* pada suhu 72°C, dan *final extention* pada suhu 72°C. Hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 1% tegangan 100 volt dalam buffer TBE (*Tris Borat EDTA*) dan digunakan DNA *ladder* sebagai *marker*. Pita DNA kemudian di dokumentasikan dengan *UV illuminator*. Apabila pita DNA terlihat jelas dan memenuhi standar yaitu memiliki panjang basepair ±500 bp maka DNA dapat di lanjutkan ke proses sekuensing di PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta, Indonesia.

Analisis data

Analisis data meliputi analisis data morfologis dan molekuler. Analisis morfologi dilakukan dengan cara mengkonversi data karakter morfologis yang diperoleh menjadi matriks biner (0-1). Sifat yang tidak dimiliki oleh suatu individu ditulis dengan angka 0. Pada karakter morfometri, nilai yang berada dalam kisaran deviasi ditulis dengan angka 1 dan yang berada di luar kisaran deviasi ditulis dengan angka 0. Matriks data dibuat dengan program Ms. Excel 2007. Analisis *clustering* menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group with Arithmetic Average*) dengan program MVSP 3.1 (*Multi Variate Statistical Package*). Analisis data

molekuler dilakukan dengan mengolah hasil sekuensing DNA sampel. Sekuen DNA yang diperoleh diedit menggunakan *software* Genestudio kemudian di BLAST di NCBI untuk mencocokkan sampel dengan sekuens di *GenBank*. Sekuen yang sudah terverifikasi sebagai *Macrobrachium sintangense* kemudian dilakukan analisis jarak genetik, pohon filogenetik, variasi genetik, dan situs polimorfik.

HASIL

Berdasarkan *sampling* yang telah dilakukan pada sungai Code, Winongo, Opak, dan Tambakbayan maka didapatkan hasil seperti pada Tabel 1. Pada penelitian ini didapatkan 15 individu hasil *sampling* yang ditemukan baik pada bagian tengah maupun hilir sungai. Hasil *sampling* kemudian diidentifikasi secara morfologis dan molekuler untuk mengetahui karakter molekuler dan morfologis dari sampel *M. sintangense* yang didapat.

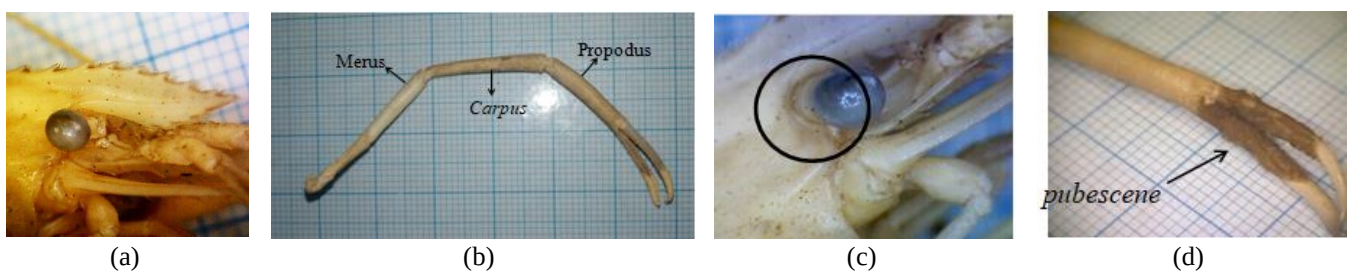
Tabel 1. Hasil *sampling* udang di Sungai Opak, Winongo, Code, dan Tambakbayan

No	Sungai	Bagian Sungai	Keterangan	Singkatan Identifikasi Morfologis	Singkatan Identifikasi Molekuler
1	Opak	Tengah	3 individu	OT1	MS1
2				OT2	
3				OT3	
4		Hilir	4 individu	OH1	MS2
5				OH2	
6				OH3	
7				OH4	
8	Winongo	Tengah	2 individu	WT1	MS3
9				WT2	
10	Code	Tengah	3 individu	CT1	MS4
11				CT2	
12				CT3	
13	Tambakbayan	Hilir	3 individu	TH1	MS5
14				TH2	
15				TH3	

Identifikasi Morfologis

Identifikasi secara morfologis dilakukan dengan melakukan pengamatan karakter morfologi, meristik, dan morfometri. Hasil pengamatan mengacu pada ciri karakter morfologis yang dimiliki oleh *Macrobrachium sintangense* menurut jurnal Chace & Bruce (1993) dan Wowor *et. al.* (2004). Berikut ini merupakan karakter *M. sintangense* yang ditemukan pada sampel yang diteliti (Gambar 1).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka didapatkan hasil seperti pada Tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dalam penelitian didapat 15 sampel yang semuanya teridentifikasi sebagai udang anggota genus *Macrobrachium*. Hanya sampel OT1, OT2, OH2, WT2, CT1, CT2, CT3 dan TH1 yang dapat teridentifikasi hingga tingkat spesies sebagai *Macrobrachium sintangense*.



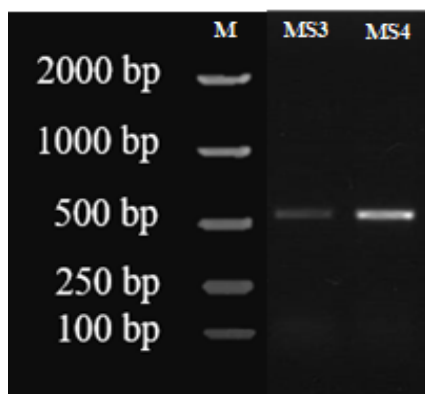
Gambar 1. Karakter *M. sintangense* pada sampel yang diteliti

Tabel 2. Hasil analisis morfologis udang dari Sungai Code, Opak, Winongo, dan Tambakbayan

No	Sungai	Bagian Sungai	Keterangan	Singkatan Identifikasi Morfologis	Hasil Identifikasi Morfologi
1	Opak	Tengah	Jantan	OT1	<i>M. sintangense</i>
2			Jantan	OT2	<i>M. sintangense</i>
3			Juvenile	OT3	<i>Macrobrachium</i>
4	Opak	Hilir	Pleopod kedua hilang	OH1	<i>Macrobrachium</i>
5			Jantan	OH2	<i>M. sintangense</i>
6			Juvenil	OH3	<i>Macrobrachium</i>
7			Juvenil	OH4	<i>Macrobrachium</i>
8	Winongo	Tengah	Juvenil	WT1	<i>Macrobrachium</i>
9			Jantan	WT2	<i>M. sintangense</i>
10	Code	Tengah	Jantan	CT1	<i>M. sintangense</i>
11			Jantan	CT2	<i>M. sintangense</i>
12			Jantan	CT3	<i>M. sintangense</i>
13	Tambakbayan	Hilir	Jantan	TH1	<i>M. sintangense</i>
14			Juvenil	TH2	<i>Macrobrachium</i>
15			Juvenil	TH3	<i>Macrobrachium</i>

Identifikasi Molekuler

Pada penelitian ini, identifikasi secara molekuler dilakukan dengan gen mitokondria 16S. DNA yang telah diisolasi, diamplifikasi dan dielektroforesis kemudian dilihat pita DNA nya melalui *UV illuminator* seperti pada gambar 1. Identifikasi secara molekuler hanya dilakukan terhadap sampel MS1, MS3, MS4, dan MS5. Sampel MS1 dan MS5 tidak dapat diidentifikasi secara molekuler dikarenakan terjadinya kontaminasi dan rusaknya jaringan tubuh. Rusaknya jaringan tubuh ini dapat dikarenakan waktu preservasi yang lama pada suhu ruangan. Pada penelitian ini, sampel MS3 dan MS4 memiliki panjang fragmen gen mitokondria 16S sebesar ± 500 bp (Gambar 2).



Gambar 2. Pita DNA Individu MS3 dan MS4 hasil amplifikasi PCR dan M merupakan *marker* DNA.

Sampel yang telah memenuhi standar panjang fragmen DNA kemudian di sekuensing. Sekuen DNA yang diperoleh diedit menggunakan *software* Genestudio kemudian di BLAST di NCBI untuk mencocokkan sampel dengan sekuens di *GenBank*. Hasil BLAST terlihat pada Tabel 3. Hasil BLAST menunjukkan bahwa sampel MS3 memiliki nilai Identity tertinggi dengan sampel JQ362451.1 *M. sintangense* dan JQ362450.1 *M. sintangense* dari sampel *GenBank*. Nilai *Query cover* tertinggi hasil BLAST terhadap sampel MS3 dan MS4 adalah sebesar 99%.

Setelah dilakukan BLAST, selanjutnya dilakukan analisis jarak genetik menggunakan *software* Mega 7.0.21 dan hasilnya seperti yang terlihat pada Tabel 4. Jarak genetik terkecil sampel MS3 dan MS4 terhadap sampel *GenBank* adalah sebesar 0,60% dan 1% terhadap sampel U1 *Macrobrachium sintangense* Tukad Panti dari Bali, Indonesia penelitian sebelumnya. Jarak genetik terkecil kedua adalah antara sampel MS3 dan MS4 terhadap sampel sampel JQ362451.1 *M. sintangense* dan JQ362450.1 *M. sintangense* dari *GenBank* yaitu sebesar 1,40% dan 1,8%.

Berdasarkan nilai jarak genetik yang didapat, kemudian direkonstruksi pohon filogenetik seperti yang terlihat pada Gambar 3. Pada pohon

filogenetik yang terbentuk terlihat bahwa sampel MS3 dan MS4 memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan sampel U1 *M. sintangense* Tukad Panti, Bali, Indonesia dan juga hubungan kekerabatan yang dekat dengan sampel *GenBank M. sintangense* JQ362451.1 dan *M. sintangense* JQ362450.1. Pohon filogenetik kemudian dianalisis lebih lanjut pada variasi genetik yang terjadi antara sampel MS3 dan MS4 terhadap

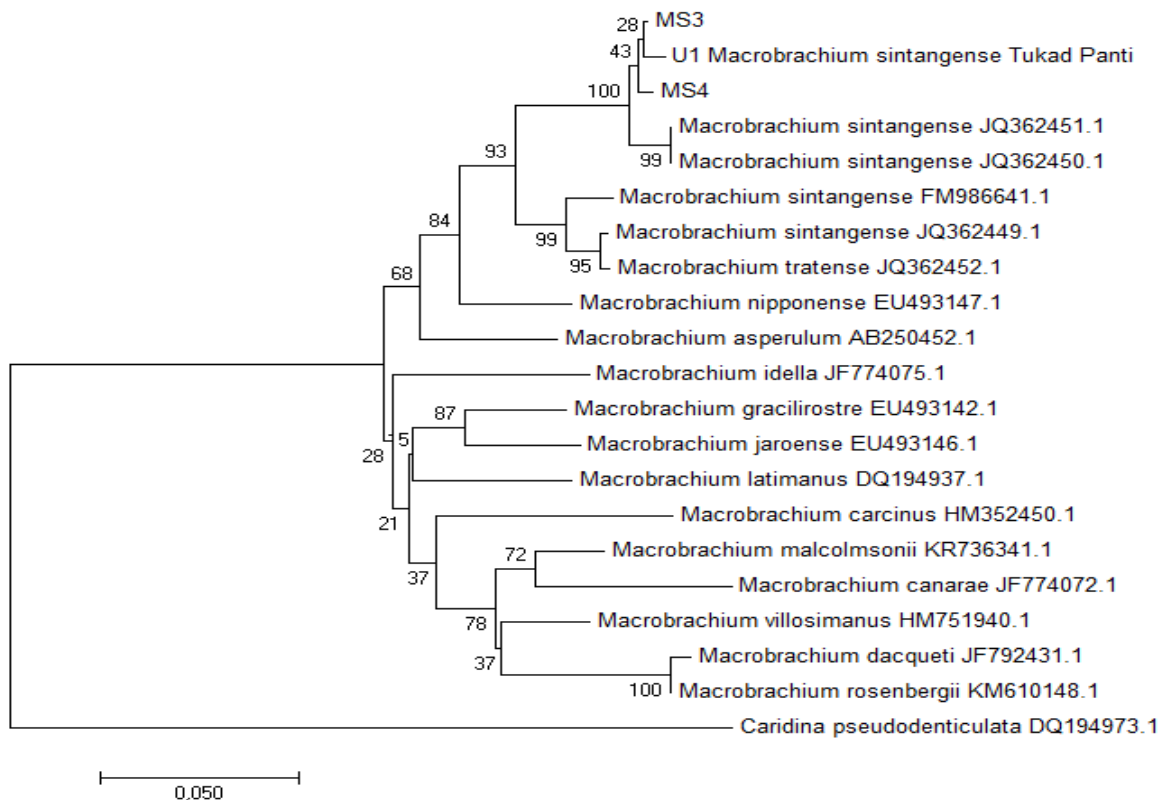
sampel *GenBank M. sintangense* JQ362451.1 seperti pada Tabel 5. Berdasarkan data variasi genetik diketahui bahwa panjang fragmen DNA sampel adalah 558 bp, jumlah *variable site* sebanyak 14 *site* dengan 0 *parsimony site* dan 14 *polymorphic site*. *Nucleotide diversity* (π) sebesar $0,01691 \pm 0,00693$ dan *haplotype diversity* sebesar $1 \pm 0,272$.

Tabel 3. Hasil Similaritas dengan BLAST

No	Sampel NCBI		Spesimen	
			MS3	MS4
1	JQ362451.1 <i>M. sintangense</i>	Identity	97.30%	97.48%
		Query cover	99%	99%
2	JQ362449.1 <i>M. sintangense</i>	Identity	93.33%	93.51%
		Query cover	99%	99%
3	JQ362450.1 <i>M. sintangense</i>	Identity	97.30%	97.48%
		Query cover	99%	99%
4	FM986641.1 <i>M. sintangense</i>	Identity	93.81%	93.60%
		Query cover	92%	92%
5	JQ362452.1 <i>M. tratense</i>	Identity	93.33%	93.51%
		Query cover	99%	99%
6	EU493147.1 <i>M. nipponense</i>	Identity	92.45%	92.62%
		Query cover	97%	97%

Tabel 4. Jarak Genetik (%) Udang *Macrobrachium sintangense*. Setiap satu sampel model dibandingkan dengan sampel dari GenBank NCBI. Angka dengan warna biru merupakan Standard Error (SE), sedangkan warna hitam adalah jarak genetik.

	MS4	MS3	JQ362451.1 <i>M. sintangense</i>	JQ362449.1 <i>M. sintangense</i>	JQ362450.1 <i>M. sintangense</i>	FM986641.1 <i>M. sintangense</i>	U1 <i>Macrobrachium sintangense</i> Tukad Panti
MS4		0,30%	0,60%	1,10%	0,60%	1,20%	0,40%
MS3	0,40%		0,50%	1,10%	0,50%	1,10%	0,30%
JQ362451.1 <i>M. sintangense</i>	1,80%	1,40%		1,10%	0%	1,20%	0,50%
JQ362449.1 <i>M. sintangense</i>	6,40%	5,90%	6,20%		1,10%	0,70%	1,10%
JQ362450.1 <i>M. sintangense</i>	1,80%	1,40%	0%	6,20%		1,20%	0,50%
FM986641.1 <i>M. sintangense</i>	6,60%	6,10%	6,40%	2,50%	6,40%		1,20%
U1 <i>Macrobrachium sintangense</i> Tukad Panti	1%	0,60%	1,20%	6,20%	1,20%	6,40%	



Gambar 3. Pohon filogeni Neighbor-Joining dari sampel penelitian, beberapa spesies dari genus *Macrobrachium* ditambah dengan satu spesimen outgroup dari genus *Caridina*

Tabel 5. Variasi Genetik Udang Jenis *Macrobrachium sintangense*. Sampel yang diteliti (2 sekuen) dan *GenBank* (1 sekuen) berdasarkan gen *rRNA* mitokondria

Spesies	bp	Jumlah Individu	Jumlah Haplotype	Parsimony Sites	Variable Sites	Monomorphicsites	Nucleotide Diversity (π)	Haplotype Diversity (H_d)
<i>M. sintangense</i>	517	4	4	2	11	501	0,01139 ± 0,00333	1,00 ± 0,177

Berdasarkan data variasi genetik, diketahui terdapat 4 haplotipe dari sample yang diteliti yaitu MS3, *M. sintangense* Tukad Panti, MS4 dan sampel *GenBank M. sintangense* JQ362451.1

yang berasal dari Thailand (Tabel 6). Berdasarkan hasil situs polimorfik pada Tabel 7 terdapat 9 transisi dan 2 transversi.

Tabel 6. Data Haplotype Udang *Macrobrachium sintangense*. Udang dalam penelitian (MS3 dan MS4) dan dari *Genbank* (JQ362451.1).

Haplotype	Jumlah Sampel	GenBank Accession Number	Asal	Author
1	1	JQ362451.1	Thailand	Pinpart et al., 2012- Unpublished
2	1	MS4	Yogyakarta, Indonesia	Dalam penelitian
3	1	MS3	Yogyakarta, Indonesia	Dalam penelitian
4	1	<i>M. sintangense</i> Tukad Panti	Tukad Panti, Bali, Indonesia	Unpublished

Tabel 7. Situs Polimorfik antara sampel yang diteliti (MS3 dan MS4) dengan sampel *GenBank*.

Sampel	Situs Polimorfik										
	1	6	8	1	2	2	2	2	4	4	5
	1	7	8	1	8	8	6	7	1	2	7
JQ362451.1	C	G	T	G	A	C	A	A	T	T	T
MS4	T	A	G	A	G	T	G	G	G	C	.
MS3	T	A	.	.	G	T	G	G	G	C	.
<i>M. sintangense</i> Tukad Panti	T	.	.	.	G	.	G	G	G	C	C
	Transisi	Transisi	Transversi	Transisi	Transisi	Transisi	Transisi	Transisi	Transversi	Transisi	Transisi

Transisi
Transversi

PEMBAHASAN

Hasil *sampling* berupa 15 sampel udang yang didapat dari Sungai Opak, Code, Winongo, dan Tambakbayan. Pada Tabel 1 diketahui bahwa sampel yang didapat berjumlah 15 sampel yang seluruhnya dianalisis secara morfologis. Sementara analisis secara molekuler hanya dilakukan terhadap sampel MS1, MS3, MS4, dan MS5. Sampel tersebut dianggap telah mewakili hasil *sampling* secara keseluruhan dari keempat sungai tersebut. Pemilihan sampel ini didasari pada perwakilan sampel pada setiap sungai. Sampel MS1 dan MS5 tidak dapat diidentifikasi secara molekuler dikarenakan terjadinya kontaminasi dan rusaknya jaringan tubuh. Rusaknya jaringan tubuh ini dapat dikarenakan waktu preservasi yang lama pada suhu ruangan. Sampel MS3 merupakan sampel yang berasal dari Sungai Code dan sampel MS4 merupakan sampel yang berasal dari Sungai Winongo.

Analisis morfologis dilakukan terhadap semua sampel yang didapat pada saat *sampling*. Karakter yang digunakan dalam analisis morfologis meliputi tiga karakter yaitu karakter morfologi, meristik, dan morfometri. Karakter morfologi berupa ada tidaknya bagian tubuh tertentu. Karakter morfometri berupa ukuran suatu bagian

tubuh. Sementara karakter meristik berupa jumlah dari bagian tubuh yang dapat dihitung. Berdasarkan hasil analisis yang diperoleh pada Tabel 1 diketahui bahwa semua sampel teridentifikasi dalam genus *Macrobrachium*. Karakteristik dari genus *Macrobrachium* adalah karapas tidak memiliki *branchiostegal spine* namun memiliki *hepatic spine*, *Dactylus* pada tiga pasang pereopod terakhir genus *Macrobrachium* bersifat non bifida atau sederhana. Selain itu, tidak terdapat appendix pada endopod pleopod pertama individu jantan (Chace & Bruce, 1993). Menurut Holthuis (1950) ciri lain yang dapat digunakan untuk mengetahui anggota genus *Macrobrachium* adalah pleura pada segmen kedua membulat menutupi pleura pada segmen pertama dan ketiga. Dari keseluruhan sampel, hanya beberapa sampel saja yang teridentifikasi sebagai sampel *Macrobrachium* jantan dewasa sehingga dapat dianalisis lebih lanjut untuk menentukan spesies. *Macrobrachium* jantan dewasa dapat diketahui dengan adanya *spina masculina*.

Sampel *Macrobrachium* jantan dewasa yang teridentifikasi sebagai *M. Sintangense* adalah sampel OT1, OT2, OH2, WT2, CT1, CT2, CT3 dan TH1. Identifikasi ini dilakukan berdasarkan hasil identifikasi morfologis pada Gambar 1. Ciri morfologi dari *M. sintangense* diantaranya berupa

rostrum sedikit melengkung ke atas atau seperti pisau, *post antennular* carapace yang membulat, *preanal carina* tidak ada, terdapat *pubescence* pada setengah proksimal hingga dua per tiga capit (Wowor *et. al*, 2004). Ciri meristik dari *M. sintangense* menurut Wowor *et. al*, (2004) dan Chace & Bruce (1993) jumlah gigi pada dorsal rostrum berkisar antara 9 dan 13, sementara jumlah gigi rostrum bagian ventral kurang dari 7 gigi. Sementara ciri morfometri dapat dilihat dari pereopod kedua dengan carpus lebih panjang daripada. Namun, ukuran carpus yang lebih panjang dari merus tidak dapat menjadi patokan utama, hal tersebut dikarenakan ukuran tubuh udang dapat berubah ukuran sepanjang hidupnya. Pada penelitian ini, sampel OT1, OT2, OH2, WT2, CT1, CT2, CT3 dan TH1 memiliki karakter yang sesuai dengan kunci identifikasi *M. sintangense* sehingga teridentifikasi sebagai sampel *M. sintangense*.

Analisis molekuler meliputi isolasi DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis, hingga dokumentasi pita DNA. Berdasarkan analisis tersebut diketahui bahwa pita DNA gen mitokondria 16S pada individu MS3 dan MS4 memiliki panjang fragmen ± 500 bp (Gambar 2). Gen mitokondria 16S sebaiknya sepanjang 500 bp untuk dapat dianalisis pada BLAST, atau terburuknya adalah sepanjang 400 bp (Yang *et al.*, 2014). Berdasarkan pernyataan tersebut, maka panjang gen mitokondria ini telah memenuhi persyaratan untuk dapat dilakukan analisis similaritas dengan menggunakan BLAST. Sehingga sampel MS3 dan MS4 tersebut kemudian di sekuensing.

Hasil sekuensing sampel MS3 dan MS4 kemudian dianalisis menggunakan BLSTN untuk mencocokkan dengan sampel yang ada di GenBank. Berdasarkan hasil BLAST pada Tabel 3 diketahui bahwa sampel MS3 memiliki nilai *identity* tertinggi dengan sampel dengan sampel JQ362451.1 *M. sintangense* dan JQ362450.1 *M. sintangense* dari sampel GenBank yaitu sebesar 97,30%. sampel MS3 memiliki nilai *identity* tertinggi dengan sampel dengan sampel

JQ362451.1 *M. sintangense* dan JQ362450.1 *M. sintangense* dari sampel GenBank yaitu sebesar 97,48%. Nilai *identity* diatas 97% menunjukkan bahwa sampel yang diteliti signifikan satu spesies dengan sampel *M. sintangense* dari GenBank (Hadiprata *et al*, 2015). Nilai *Query cover* tertinggi hasil BLAST terhadap sampel MS3 dan MS4 adalah sebesar 99%. *Query cover* adalah nilai yang menjelaskan seberapa banyak sekuen query yang tertutup oleh sekuen target. Jika sekuen target dalam database membentang seluruh sekuen yang ditarget, lalu nilai *query cover* adalah 100%. Hal ini menunjukkan seberapa kuat hubungan antar sekuen (Fassler *et al.*, 2011).

Setelah dilakukan BLAST kemudian sampel dianalisis jarak genetiknya. Hasil analisis jarak genetik ditunjukkan pada Tabel 4. Jarak genetik terkecil sampel MS3 dan MS4 terhadap sampel GenBank adalah sebesar 0,60% dan 1% terhadap sampel U1 *Macrobrachium sintangense* Tukad Panti dari Bali, Indonesia penelitian sebelumnya. Jarak genetik terkecil kedua adalah antara sampel MS3 dan MS4 terhadap sampel sampel JQ362451.1 *M. sintangense* dan JQ362450.1 *M. sintangense* dari GenBank yaitu sebesar 1,40% dan 1,8%. 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). Suatu individu dikatakan mengalami spesiasi apabila memiliki jarak genetik di atas 3% (Jose *et al.*, 2015). Berdasarkan nilai jarak genetik tersebut maka sampel MS3 maupun MS4 merupakan satu spesies dengan *M. sintangense* sampel *M. sintangense* dari Tukad Panti, Bali, Indonesia dan *M. sintangense* dari Thailand. Nilai jarak genetik didukung dengan pohon filogenetik yang terbentuk seperti pada gambar 2. Pohon filogenetik ini akan menunjukkan hubungan kekerabatan yang terjadi.

Berdasarkan Tabel 5 dan 6 diketahui bahwa dari sampel MS3 dan MS4 yang diteliti dibandingkan dengan sampel JQ362451.1 *M. sintangense* dari GenBank memiliki variasi

genetik. Berdasarkan analisis variasi genetik tersebut menunjukkan bahwa dari 517 bp seluruh sekuens gen mitokondria 16S sampel terdapat 11 *variable site* dan 2 *parsimony*. Berdasarkan Tabel 5 diketahui bahwa nilai *haplotype diversity* (Hd) yang diperoleh sebesar $1,00 \pm 0,177$. Keragaman *haplotype* (*Haplotype diversity*/Hd) menunjukkan banyaknya variasi *haplotype* yang ada didalam suatu populasi yang menunjukkan dua alel sampel acak yang berbeda (Nei dan Li, 1979). Nilai *haplotype diversity* sebesar 1 menunjukkan bahwa keseluruhan sampel yang diuji adalah *haplotype* yang berbeda, seperti yang ditunjukkan jumlah *haplotype* yaitu 4 (Tabel 6). Berdasarkan Tabel 5 diketahui bahwa nilai *nucleotide diversity* (π) $0,01139 \pm 0,00333$. *Nucleotide diversity* adalah rata-rata variasi nukleotida dalam satu bagian sekuens yang sama antar individu (De Jong *et al.*, 2011). Nilai *nucleotide diversity* tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nukleotida yaitu 11 situs. Perbedaan yang terjadi terdapat pada fragmen DNA ke- 1, 67, 88, 161, 258, 288, 296, 297, 451, 482, 517 seperti yang ditunjukkan pada tabel situs polimorfik (Tabel 7).

Situs polimorfik menunjukkan letak terjadinya mutasi basa nitrogen pada sekuens sehingga menghasilkan variasi nukleotida. Berdasarkan hasil situs polimorfik pada Tabel 7 terdapat 9 transisi, dan 2 transversi. Indel dapat berupa mutasi gen yaitu insersi atau delesi (Chen *et al.*, 2009). Transisi adalah perubahan basa purin menjadi basa purin lainnya atau pirimidin menjadi pirimidin lainnya. Transisi terjadi pada urutan basepair ke- 1, 67, 161, 258, 288, 296, 297, 482, 517 (Tabel 6). Transversi adalah perubahan basa purin menjadi pirimidin atau pirimidin menjadi purin (Lyons dan Luring, 2017). Transversi terjadi pada urutan basepair ke-88 dan 451 (Tabel 7).

SIMPULAN

Sampel yang ditemukan pada sungai Winongo, Tambakbayan, Code dan Opak di DIY adalah *M. sintangense* dengan karakter morfologis berupa rostrum sedikit melengkung ke

atas atau seperti pisau, *post antennular carapace* yang membulat, *preanal carinal* tidak ada, terdapat *pubescence* pada setengah proksimal hingga dua per tiga capit, sementara karakter molekuler berupa nilai similaritas 97.30% dan 97.48% dengan spesies *Macrobracium sintangense* dari GenBank (JQ362450.1 dan JQ362451.1) saat dilakukan BLAST serta memiliki hubungan kekerabatan yang dekat terhadap *M. sintangense* dari Tukad Panti Bali, Indonesia yaitu dengan nilai jarak genetik 0,6% dan 1% sehingga sampel diketahui sebagai *Macrobracium sintangense*.

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 Sistematis Hewan Fakultas Biologi UGM yang telah memberikan izin menggunakan fasilitas laboratorium; Tim *Macrobrachium* DIY 2019 dan Bapak Susilo Irwanjasromo yang telah memberikan waktu dan tenaga selama proses pengerjaan penelitian ini dari awal sampai akhir baik di lapangan maupun di laboratorium.

KEPUSTAKAAN

- Arif IA, Khan HA. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation* **32(1)**: 9–17.
- Chace FA, Bruce AJ. 1993. *The Caridean Shrimps (Crustacea: Decapoda) of the Albatross Philippine Expedition, 1907-1910, Part 6: Superfamily Palaemonoidea*. Washington D. C.: Smithsonian Institution Press, pp. 20-22.
- Chen J, Wu Y, Yang H, Bergelson J, Kreitman M, Tian D. 2009. Variation in the ratio of nucleotide substitution and indel rates across

- genomes in mammals and bacteria. *Molecular Biology and Evolution* **26(7)**: 1523–1531
- De Jong MA, Wahlberg N, van Eijk M, Brakefield PM, Zwaan BJ. 2011. Mitochondrial DNA signature for range-wide populations of *Bicyclus anynana* suggests a rapid expansion from recent refugia. *PloSONE* **6(6)**: 1–5.
- Fassler J, Cooper P. 2011. *Blast Glossary*. US. National Center for Biotechnology Information. P : 8
- Hadiprata NLMIYS, Putra IMBAPA, Mahardika IGNK, Wandia IN, Nindhia TS. 2015. Identifikasi Spesies Ikan Kerapu di Pasar Ikan Karangasem dan Kedonganan Bali Menggunakan DNA Mitokondria Gen 16s rRNA. *Jurnal Veteriner* **16(3)**: 423-431
- Holthuis LB. 1950. Preliminary descriptions of twelve new species of palaemonid prawns from american waters (Crustacea Decapoda). *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen* **53**: 93-99.
- Jose D, Nidhin B, Kumar KPA, Pradeep PJ, Harikrishnan M. 2015. A molecular approach towards the taxonomy of fresh water prawns *Macrobrachium striatum* and *M. equidens* (Decapoda, Palaemonidae) using mitochondrial markers. *Mitochondrial DNA*. 1-9. DOI: 10.3109/19401736.2015. 1041114
- Lyons DM, Luring AS. 2017. Evidence for the selective basis of transition-to-transversion substitution bias in two RNA viruses. *Molecular Biology and Evolution* **34(12)**: 3205–3215.
- Munasinghe DHN, Thushari GGN. 2010. Analysis of morphological variation of four populations of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) (Crustacea: Decapoda) in Sri Lanka. *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.)* **39 (1)**: 53-60.
- 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.
- Page TJ, Hughes JM. 2011. Neither molecular nor morphological data have all the answers; with an example from *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) from Australia. *Zootaxa* **2874**: 65-68
- Putranto TWC, Andriani R, Munawwaroh A, Irawan B, Soegianto A. 2014. Effect of cadmium on survival, osmoregulation and gill structure of the Sunda prawn, *Macrobrachium sintangense* (de Man), at different salinities. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. **47(5)**: 349-360
- Sharma C, Krishna G, Kumar AP, Nayak SK. 2014. Phylogeny of *Macrobrachium* species using mitochondrial rRNA ribosomal DNA. *Cell Tissue Res*. **14(3)**: 4525- 4529.
- 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*
- 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. Doi: 10.1038/srep04089.