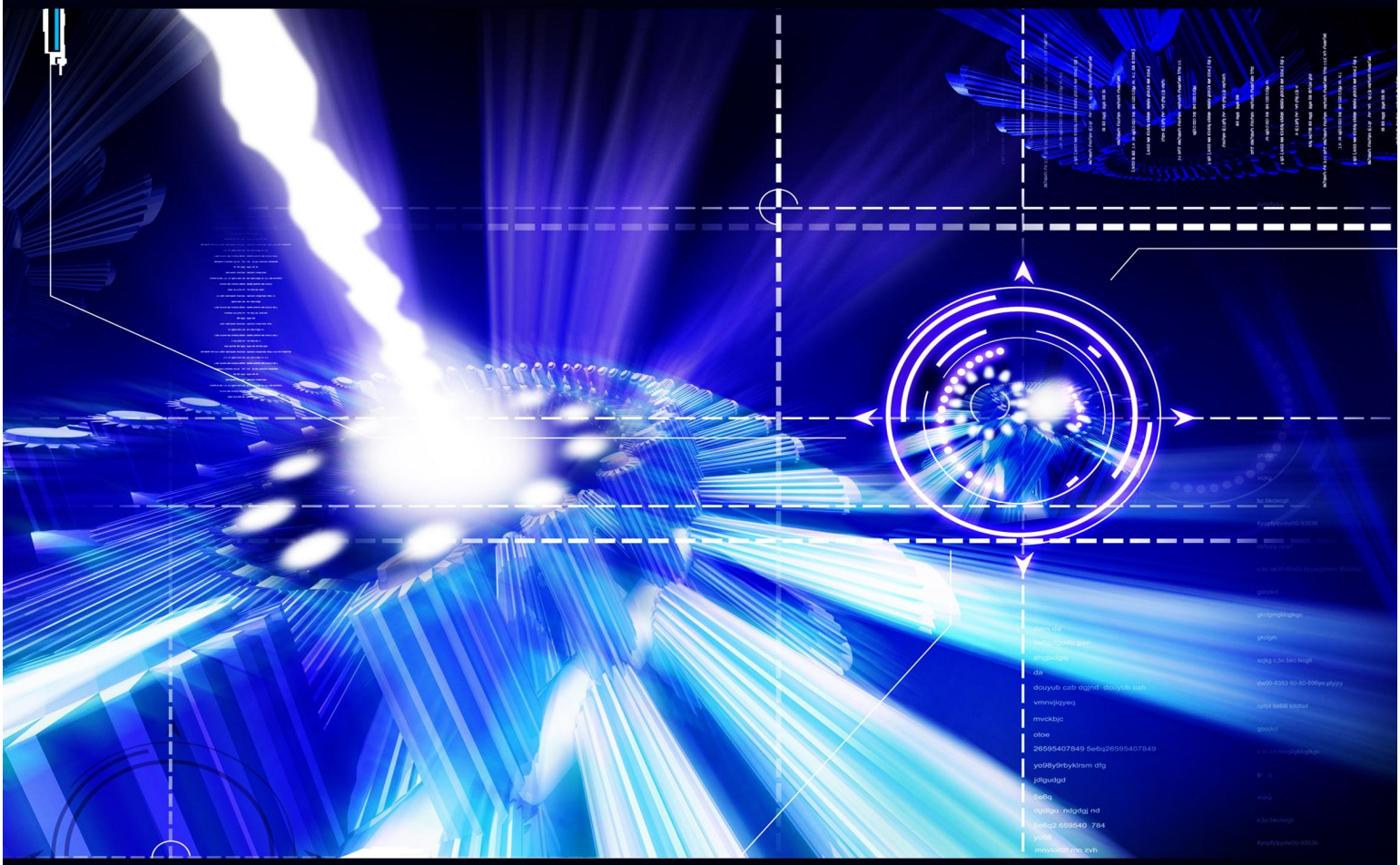
RISTEK

INSINAS 2013

SEMINAR NASIONAL INSENTIF RISET SINAS

MEMBANGUN SINERGI RISET NASIONAL UNTUK KEMANDIRIAN TEKNOLOGI



Jakarta, 7-8 November 2013

ASISTEN DEPUTI RELEVANSI PROGRAM RISET IPTEK

DEPUTI BIDANG RELEVANSI DAN PRODUKTIVITAS IPTEK

KEMENTERIAN RISET DAN TEKNOLOGI

ISBN 978-602-18926-6-4

PROSIDING
Seminar Insentif Riset SINas
(INSINAS 2013)

Jakarta, 7 – 8 November 2013

“ MEMBANGUN SINERGI RISET NASIONAL UNTUK KEMANDIRIAN TEKNOLOGI”

Penyusun :
Ir. Bambang Priwanto
Drs. Dadi Alamsyah, M.Si
Drs. Abdul Waid
Drs. Ermalina, M.Sc
Dr. Hendro Wicaksono, M.Sc
Ir. Marhaindro Waluyo, MT
Drs. Enny Lestariningsih, MM
Ir. Hari Jusron, M.Sc
Ir. Pancara Sutanto
Ir. Sjaeful Irwan, MM
Dr. Syafarudin
Dr. rer. nat. Ahmad Saufi, M.Sc
Muhammad Athar Ismail, M.E
Ratna Farianingsih, S.E.
Entin Laelasari, S.Sos.
Aris Irawan, ST
Zaenal Arifin, M.Si
Sasti Orisa, ST
Roosida Taufani, S.E., MM.
Engkas Sukaesih, MA
Leni Purwaningsih, STP

Penyunting :
Prof. Dr. Ir. Djoko Wahyu Karmiadji
Ir. Ahmad Dading Gunadi, MA
Ir. Hary Soebagyo, MT
Rahmat Fazri, S.E

Penerbit
Asdep Relevansi Program Riptek,
Deputi Bidang Relevansi dan Produktivitas Iptek,
KEMENTERIAN RISET DAN TEKNOLOGI
Gedung II – BPPT, Lantai 21, Jl. MH. Thamrin 8, Jakarta,
Tlp. 021 3169840, Fax. 3102368
e-Mail : insinas@ristek.go.id, http://www.ristek.go.id

VARIASI HAPLOTIPE PADA POPULASI ALAMI UDANG GALAH *(Macrobracium rosenbergii)* ASAL PAPUA

Robi Binur[1)], Abdul Hamid A. Toha[2)], Adi Pancoro[3)]

[1.] Jur. Biologi, FMIPA Universitas Negeri Papua, Jl. Gunung Salju Amban, Manokwari Papua Barat
[2.] Jur. Perikanan FPPK, Universitas Negeri Papua, Jl Gunung Salju Amban, Manokwari Papua Barat
[3.] Lab. Genetika, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha No. 10 Bandung

Jakarta, 7 - 8 November 2013

ABSTRAK

Papua dikenal kaya akan biodiversitas dan kehidupan liar yang masih terjaga. Hal ini memungkinkan dijumpainya variasi haplotipe yang unik dan berbeda antar lokasi. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui variasi haplotipe udang galah (M. rosenbergii) dari beberapa populasi alami di Papua. Sampel dikoleksi dari empat lokasi, yaitu Sungai Andai (Manokwari), Danau Sentani (Jayapura), Kali Maro (Merauke), dan Sungai Minyak (Bintuni). Penentuaan keragaman haplotipe menggunakan penanda DNA mitokondria COI. Variasi haplotipe dianalisis dengan Sofware DnaSP 5.10. Selanjutnya dibuat jejaringnya (Network) dengan Sofware Network 4.6.1.1. Pohon filogeni dikonstruksi dengan metode Neighbor Joining (NJ) dengan Sofware MEGA 5.05 (replikasi 1000 kali). Hasilnya terdapat 11 variasi haplotipe udang galah yang dijumpai. Sebanyak 9 haplotipe (90,90%) bersifat terbatas (singletons) yang ditemukan di satu lokasi, dan sisanya 2 haplotipe ditemukan didua populasi. Keragaman nukleotida (Pi) berkisar antara 0,1-11% (rata-rata 3,3%). Semua populasi menunjukkan keragaman haplotipe (Hd) cukup tinggi (rata-rata 63%). Keragaman haplotipe tertinggi dari populasi Merauke (80%) dan terendah dari populasi Jayapura (52%). Populasi dari Merauke menunjukkan hubungan genetik yang terpisah dengan populasi lain. Populasi ini selanjutnya dapat didomestikasi untuk menjadi sumber indukan.

Kata kunci: Udang galah, Macrobrachium rosenbergii, Variasi haplotipe, DNA Mitokondria COI.

I. PENDAHULUAN

Udang galah *(Macrobrachium rosenbergii)* merupakan jenis udang air tawar (Palemonid) terbesar di dunia (Wowor dan Ng 2007). Panjang total tubuh jantan dewasa dapat mencapai 320 mm dan betina 250 mm dengan berat >250 gram (Brown dkk. 2010). Oleh karena itu, udang ini bernilai ekonomis tinggi yang banyak dibudidayakan di seluruh dunia. Penghasil utama udang ini adalah China (56.3%), Thailand (12.5%), India (12.3%), Taiwan (4.5%), dan Vietnam (FAO 2012; New 2010) .

Udang ini termasuk jenis asli Indonesia yang tersebar luas, mulai dari Aceh sampai Papua. Berdasarkan karakter morfologi dan genetiknya, daerah sebaran alami udang ini terbagai dua, yaitu bagian Barat *(Western)* dan bagian Timur *(Eastern)*. Bagian Barat diidentifikasikan sebagai sub-spesies *M. rosenbergii schenkeli* Johnson (1973) atau *M. rosenbergii dacqueti* (Sunier, 1925) yang tersebar di Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. Sedangkan bagian Timur diidentifikasikan sebagai sub-spesies *M. rosenbergii rosenbergii* (de Man, 1879) yang tersebar di Sulawesi dan Papua (Holthuis dan Ng 2010; New 2002). Sub-spesies bagian barat umum dibudidaya di Indonesia dan

negara penghasil lainnya (Wowor dan Ng 2007). Sedangkan sub-spesies bagian timur belum banyak dibudidayakan.

Papua dikenal kaya akan biodiversitas, memiliki alam dan kehidupan liar yang masih terjaga. Selain itu, memiliki bentang alam (geografis) yang unik dan terisolir sehingga menyebabkan tingginya variasi. Hal ini memungkinkan dijumpainya haplotipe yang unik dan berbeda antar daerah. Secara umum, Pulau Papua (New Guinea) terbagi kedalam enam wilayah geografis, yaitu (1) Kepulauan Raja Ampat, (2) Semenanjung Vogelkop dan Bomberai (Kepala Burung), (3) Daerah pesisir bagian Utara dan Lembah Mamberamo, (4) Deretan Pegunungan Tengah, (5) Dataran rendah bagian Selatan, dan (6) Semenanjung Papua (PNG) (WWF 2002).

Penelitian sebelumnya tentang sebaran genetik udang galah pernah dilakukan oleh de Bruyn dkk. (2004) dengan DNA mitokondria (mtDNA) (CO1 dan 16S). Tetapi penelitiannya melingkupi daerah geografis yang luas, meliputi wilayah Barat *(Western)* dan Timur *(Eastern)*. Untuk daerah Timur (Papua) sampel diambil dari satu lokasi, yaitu dari Sungai Ajkwa (Timika). Dari penelitian tersebut menunjukkan udang galah dari Papua memiliki hubungan genetik yang dekat dengan Papua New Guinea (PNG) dan Filipina (PH). Secara keseluruhan penelitiannya tidak menggambarkan sebaran genetik udang galah yang ada di Papua. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tersendiri tentang keragaman genetik udang ini di Papua yang meliputi beberapa lokasi, terutama variasi haplotipenya.

Penelitian ini dilakukan dengan pendekatan marka genetik DNA mitokondria (COI), untuk menambah data genetik yang sudah ada. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui keragaman haplotipe udang galah asli Papua. Hasil ini diharapkan menjadi rekomendasi untuk domestikasi indukan baru udang galah.

II. METODE

Koleksi Sampel dan Ekstraksi DNA

Sampel dikoleksi dari empat lokasi di Papua, yaitu Sungai Andai (Manokwari), Danau Sentani (Jayapura), Kali Maro (Merauke), dan Sungai Minyak (Bintuni). Masing-masing lokasi dikoleksi sebanyak 10 individu. Sampel selanjutnya disimpan dalam etanol (70%) sampai saat digunakan untuk ekstraksi. Ekstraksi DNA dilakukan dengan Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) mengikuti protokol produknya. Ekstraksi menggunakan jaringan otot (20-30 mg) yang dibantu dengan nitrogen cair.

Primer, PCR, dan Sekuensing

Primer yang digunakan mengacu pada penelitian Folmer dkk. (1994), dengan panjang produk PCR sekitar 710 pb. Urutan sekuen forward (LCO1490), yaitu 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' dan riverse (HC02198), yaitu 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'.

Komposisi reaksi PCR (25 µl), yaitu 2,5 µl dNTPs (8 µM), 2,5 µl PCR Buffer (10x), 1,25 µl primer forward (10 mM), 1,25 µl primer riverse (10 mM), 2 $MgCl_2$ (25 mM), 0,125 µl Amplitag (5 unit/µl), 1 µl DNA genom (2,5 ng/µl), 1 µl BSA, dan 13,5 µl ddH_20. Amplifikasi dilakukan dalam mesin Thermal cycler Biorad 48-Well.

Reaksi PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Dengan profil PCR yaitu pre-denaturation 94°C (5 menit), denaturasi 94°C (30 detik), penempelan primer 50°C (30 detik), pemanjangan 72°C (45 detik), dan pemanjangan akhir 72°C (10 menit). Hasil PCR disekuensing menggunakan jasa 1st BASE (Kuala Lumpur) melalui PT. Genetika Science Indonesia.

Analisis Data

Grafik elektroferogram yang diperoleh diedit menggunakan Sofware Geneious Pro 6.05 (Biomatters). Urutan sekuen CO1 yang diperoleh di MSA *(Multiple Sequences Aligment)* dengan ClustalX 1.83 (Thompson dkk. 1997). Variasi haplotipe udang galah dianalisis dengan Sofware DnaSP 5.10 (Librado dan Rozas 2009). Selanjutnya dibuat jejaringnya (Network) dengan Sofware Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology). Hubungan kekerabatan antar individu (filogeni) dikonstruksi dengan metode Neighbor Joining (NJ) (Jukes-Cantor model) dengan Sofware MEGA 5.05 (Tamura dkk. 2011). Konstruksi pohon filogeni dilakukan dengan replikasi *(bootstrap)* 1000 kali.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

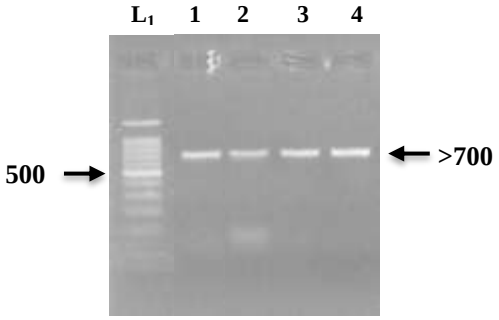
PCR dan Sekuensing

Total sampel yang di PCR sebanyak 40 individu dari 4 lokasi (Manokwari, Jayapura, Merauke, dan Bintuni). Dari masing-masing lokasi di PCR sebanyak 10 individu. Hasil PCR menunjukkan gen COI teramplifikasi dengan panjang sekitar 710 pb (**Gambar 1**). Hasil ini sama dengan penelitian Folmer dkk. (1994) yang memperoleh ukuran panjang amplifikasi yang sama dalam penyusunan primer universal kelompok metazoa invertebrata termasuk udang (Arthropoda), yang digunakan dalam penelitian ini.

Hasil PCR ini selanjutnya dilakukan pengurutan DNA (sekuensing). Hasilnya menunjukkan urutan DNA COI yang dapat dibaca dengan baik sebanyak 25 sekuen. Setelah dilakukan pengeditan, panjang yang diperoleh sekitar 540 pb. Hasil ini berbeda dengan penelitian de Bruyn (2004)dalam penentuan biogeografi dari sejarah evolusi udang galah, yaitu 602 pb.

Variasi Haplotipe Populasi

Semua sekuen menunjukkan komposisi AT (54,5%) lebih tinggi dari GC (45,5%), dengan kesamaan sekuen *(identical sites)* (74,6%) (**Tabel 1**). Populasi dari Manokwari (Sungai Andai) memiliki kesamaan sekuen paling rendah (78,5%), dan populasi dari Bintuni (S. Minyak) paling tinggi (99,4%). Hal ini menunjukkan populasi dari Manokwari memiliki variasi gen COI yang cukup variatif, sedangkan populasi dari Bintuni yang paling rendah. Hasil ini juga terlihat dari perhitungan indeks keragaman nukleotida (Pi) sebesar 0,11 (11%) (**Tabel 3**).



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA mitokondria COI *M. rosenbergii*. Hasil menunjukkan panjangnya sekitar 710 pb; L1= Ladder 100 pb.

Tabel 1. Komposisi basa dan kesamaan sekuen mtDNA COI setiap populasi.

Populasi	Panjang (pb)	% AT	% GC	% Pairwise identity	% Identical sites
Bintuni (S. Minyak)	533	54,8	45,2	99,8	99,4
Manokwari (S. Andai)	535	54,4	45,6	88,9	78,5
Jayapura (D. Sentani)	539	54,8	45,1	99,1	96,8
Marauke (Kali Maro)	533	53,9	46,2	98,6	96,1
Rata-rata		**54,5**	**45,5**	**96,6**	**92,7**

Variasi haplotipe yang diperoleh dari keseluruhan populasi sebanyak 11 haplotipe (**Tabel 2**). Sebanyak 9 haplotipe (90,90%) yang dijumpai bersifat terbatas *(singletons)* yang hanya ditemukan di satu lokasi. Haplotipe tersebut, yaitu haplotipe1, haplotipe2, haplotipe3 (Merauke); haplotipe6, haplotipe7 (Jayapura); haplotipe8, haplotipe9 (Bintuni); dan haplotipe10, haplotipe11 (Manokwari). Sedangkan sisanya ditemukan didua populasi, yaitu haplotipe4 (Bintuni dan Merauke) dan haplotipe5 (Manokwari dan Jayapura).

Populasi Merauke (Kali Maro) memiliki variasi haplotipe terbanyak, yaitu 4 haplotipe (haplotipe1, haplotipe2, haplotipe3, haplotipe4). Sedangkan untuk populasi yang lain diperoleh masing-masing 3 haplotipe (**Tabel 3**). Populasi Bintuni (S. Minyak) memiliki haplotipe4, haplotipe8), dan haplotipe9. Populasi Manokwari (S. Andai) memiliki haplotipe5, haplotipe10, dan haplotipe11. Populasi Jayapura (D. Sentani) memiliki haplotipe5, haplotipe6, dan haplotipe7. Haplotipe yang banyak dijumpai yaitu haplotipe5 (9 sampel) yang tersebar di dua populasi (Manokwari, Jayapura) (**Tabel 2**)

Tabel 2. Sebaran variasi haplotipe setiap populasi berdasarkan mtDNA COI.

Haplotipe	Populasi				Total *n*	Total Pop.
	Bintuni (S. Minyak)	Manokwari (S. Andai)	Jayapura (D. Sentani)	Merauke (Kali Maro)		
1				1	1	1
2				3	3	1
3				1	1	1
4	4			1	5	2
5		4	5		9	2
6			1		1	1
7			1		1	1
8	1				1	1
9	1				1	1
10		1			1	1
11		1			1	1

n = jumlah sampel (individu)

Keragaman nukleotida *(nucleotides diversity)* (Pi) berkisar antara 0,001-0,11 (0,1%-11%). Keragaman nukleotida tertinggi terdapat di populasi Manokwari (0,11) (11%) dan terendah di populasi Bintuni (0,001) (0,1%). Secara keseluruhan keragaman nukleotida ini masih rendah (rata-rata 0,033 atau 3,3%). Sedangkankeragaman haplotipe *(haplotypes diversity)* (Hd) berkisar antara 0,524-0,80 (52%-80%). Dari kisaran tersebut menunjukkan semua populasi memiliki keragaman haplotipe cukup tinggi yaitu rata-rata 0,631 atau 63% (> 50%),. Keragaman haplotipe tertinggi terdapat di populasi Merauke (0,80) (80%) dan terendah di populasi Jayapura (0,524) (52%) (**Tabel 3**).

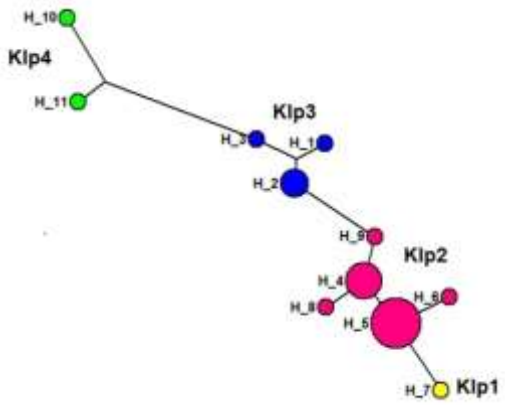
Tabel 3. Keragaman Haplotipe (Hd) dan Nukleotida (Pi) setiap populasi.

Populasi	∑ Haplotipe	Keragaman nukleotida (Pi)	Keragaman haplotipe (Hd)
Bintuni (S. Minyak)	3	0,001	0,600
Manokwari (S. Andai)	3	0,110	0,600
Jayapura (D. Sentani)	3	0,006	0,524
Marauke (Kali Maro)	4	0,014	0,800
Rata-rata		**0,033**	**0,631**

Berdasarkan estimasi banyaknya posisi mutasi, hubungan *(network)* antar haplotipe menunjukkan ada 4 kelompok *(clade).* Kelompok 1 terdiri dari satu haplotipe (H7), kelompok 2 terdiri dari lima haplotipe (H4, H5, H6, H8, H9), kelompok 3 terdiri dari tiga haplotipe (H1, H2, H3), dan kelompok 4 terdiri dari dua haplotipe (H11, H10) (**Gambar 2**). Kelompok yang memiliki mutasi paling banyak adalah antara kelompok 3 dan 4 (> 50mutasi). Berdasarkan populasi, kelompok 1

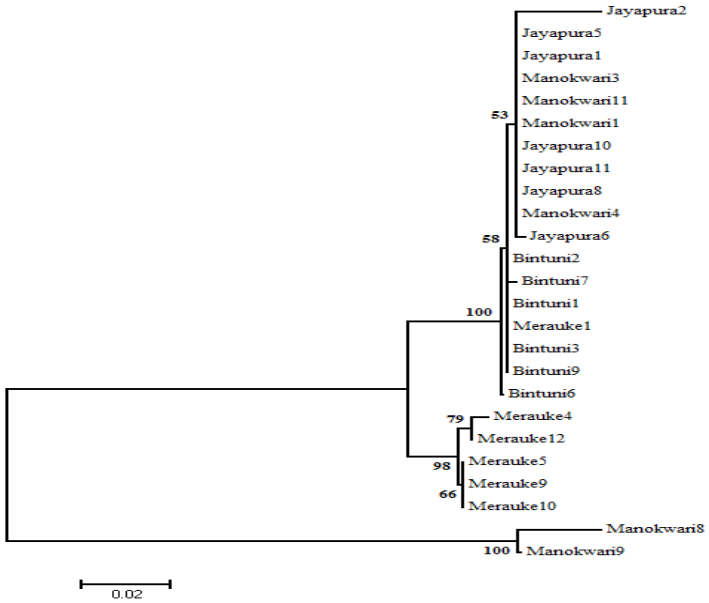
terdiri dari satu populasi, yaitu Jayapura (H7). Kelompok 2 terdiri dari tiga populasi, yaitu populasi Bintuni (H4, H8, H9), Manokwari (H5), dan Jayapura (H6). Kelompok 3 terdiri dari satu populasi, yaitu populasi Merauke (H1, H2, H3). Serta kelompok 4 terdiri dari satu populasi, yaitu

Manokwari (H11, H10). Haplotipe 7 terpisah sendiri dari populasi lainnya. Hal ini menunjukkan haplotipe7 memiliki variasi genetik yang berbeda dengan haplotipe lainnya.



Gambar 2. Hubungan jejaring *(network)* antar haplotipe berdasarkan Median Joining. Dari jejaring tersebut terdapat tiga kelompok *(clade)* haplotipe, yaitu kelompok 1 (H7), kelompok 2 (H4, H5, H6, H8, H9), kelompok 3 (H1, H2, H3), dan kelompok 4 (H11, H10). H= Haplotipe.

Pohon filogeni menunjukkan terdapat tiga grup, yaitu grup 1, 2, dan 3. Grup pertama terdiri dari populasi Jayapura (Jayapura 1, 2, 5, 6, 8, 10, 11), Manokwari (Manokwari 1, 3, 4, 11), dan Bintuni (Bintuni 1, 2, 3, 6, 7, 9). Grup dua hanya terdiri dari populasi Merauke (Merauke 4, 5, 9, 10, 12). Sedangkan grup tiga terdiri dari populasi Manokwari (Manokwari 8 dan 9) (**Gambar 3**). Secara umum hubungan kekerabatan antar populasi Jayapura, Manokwari, dan Bintuni cenderung dekat. Kecuali sampel Manokwari 8 dan 9 yang terpisah membentuk grup sendiri. Populasi dari Merauke mengelompok sendiri, hal ini menunjukkan hubugan genetik populasi ini terpisah dengan populasi lain. Secara geografis Merauke terpisah jauh dengan lokasi lainnya, yang terletak dibagian Selatan Pulau New Guinea yang berdekatan dengan Australia bagian utara. Daerah ini juga memiliki kawasan lahan basah terluas di New Guniea, yang dikenal kaya akan udang galah. Olah karena itu, daerah ini memungkinkan ditemukannya variasi haplotipe udang galah yang tinggi.



Gambar 3. Pohon filogeni dari keempat populasi dengan metode Neighbour-joining (NJ) dengan replikasi *(bootstrap)* 1000 kali. Berdasarkan jarak genetik *(genetics distance)* terdapat tiga grup. Populasi Merauke cenderung mengelompok sendiri, dan sampel Manokwari8 dan 9 terpisah dari grup lainnya.

IV. KESIMPULAN

Terdapat 11 variasi haplotipe *M. rosenbergii* yang dijumpai, dari empat lokasi (Manokwari, Bintuni, Jayapura, Merauke). Secara umum semua populasi memiliki keragaman haplotipe (Hd) yang tinggi (rata-rata 63%). Populasi yang memiliki variasi haplotipe paling banyak, yaitu Merauke (4 haplotipe) dengan keragamane haplotipe (Hd) (80%) dan keragaman nukleotida (Pi) (1,4%). Populasi ini selanjutnya dapat didomestikasi untuk dikembagkan menjadi indukan.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Brown, J.H., New, M.B., dan Ismael D., (2010), Biology, 18-39 *dalam* New, M.B., Valenti, W.C., Tidwell, J.H., D'Abramo, L.R., dan Kutty, M.N., Eds, *Freshwater Prawns Biology and Farming,* 570 p., Wiley-Blackwell, United Kingdom.

[2] de Bruyn, M., John A.W., dan Peter B.M., (2004), Huxley's line Demarcates Extensive Genetic Divergence Between Eastern and Western Forms of The Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii. Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 251–257.

[3] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (2012), Cultured Aquatic Species Information Programme Macrobrachium rosenbergii (De Man, 1879). http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Macrobrachium_rosenbergii/en

[4] Folmer, O., M. Black., W. Hoeh., R. Lutz., and R. Vrijenhoek., (1994), DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5): 294-299.

[5] Holthuis, L.B. dan Ng, P.K.L., (2010), Nomenclature and Taxonomy, 12-17 *dalam* New, M.B., Valenti, W.C., Tidwell, J.H., D'Abramo, L.R., dan Kutty, M.N., Eds, *Freshwater Prawns Biology and Farming,* 570 p., Wiley-Blackwell, United Kingdom.

[6] Librado, P. and Rozas, J., (2009), DnaSP v5: Asoftware for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. Bioinformatics 25: 1451-1452.

[7] New, M.B., (2010), History and Global Status of Freshwater Prawn Farming *dalam* New, M.B., Valenti, W.C., Tidwell, J.H., D'Abramo, L.R., dan Kutty, M.N., Eds, *Freshwater Prawns Biology and Farming,* 570 p., Wiley-Blackwell, United Kingdom.

[8] New, M.B., (2002), Farming Freshwater Prawns A Manual for The Culture of The Giant River Prawn *(Macrobrachium rosenbergii).* Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO) Rome, 219 p.

[9] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., dan Kumar, S., (2011), MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* :1-9.

[10] Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. dan Higgins, D.G., (1997), The ClustalX Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.

[11] Wild World Fund (WWF), (2002), Forests of New Guinea. News Letter WWF South Pacific Programme.

[12] Wowor, D., dan Ng, P.K.L., (2007), The Giant Freshwater Prawns of The *Macrobrachium rosenbergii* Species Group (Crustacea: Decapoda: Caridea: Palaemonidae). *The Raffles Buletin of Zoology* 55: 321-336.

Penerbit
Asisten Deputi Relevansi Program Riset Iptek
Deputi Bidang Relevansi dan Produktivitas Iptek
KEMENTERIAN RISET DAN TEKNOLOGI

Gedung II BPPT Lt.21 Jl.MH.Thamrin 8 Jakarta
Telp. (021) 3169840, Fax. (021) 3101728
email: insinas@ristek.go.id
www.ristek.go.id