

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Udang air tawar genus *Macrobrachium* termasuk dalam famili Palaemonidae (Wowor *et al.*, 2004) merupakan salah satu kelompok krustasea yang memiliki distribusi luas di perairan tropis dan subtropis (De Grave *et al.*, 2008), termasuk di perairan Indonesia yang umumnya ditemukan di perairan tawar seperti sungai, danau, rawa, dan daerah estuari yang memiliki hubungan dengan ekosistem laut (Wowor & Ng, 2007). Spesies ini memiliki sebaran yang luas di kawasan Asia Tenggara, termasuk beberapa pulau besar di Indonesia (Jayachandran *et al.*, 2019). Keberadaan *Macrobrachium* dalam ekosistem perairan tidak hanya penting dari segi ekonomi sebagai sumber protein bagi manusia (Mushthofa *et al.*, 2014), tetapi juga memiliki peran ekologis yang signifikan dalam menjaga keseimbangan ekosistem (Eprilurahman *et al.*, 2021; Wowor *et al.*, 2009).

Sebagai organisme yang bersifat omnivora, *Macrobrachium* berperan dalam rantai makanan dengan mengonsumsi detritus, alga, dan invertebrata kecil (Lazarus *et al.*, 2025). Peran ini membantu dalam proses dekomposisi bahan organik dan mendukung siklus nutrisi dalam ekosistem perairan (New *et al.*, 2009). Selain itu, organisme ini juga menjadi sumber makanan bagi berbagai predator seperti ikan dan burung air, sehingga berkontribusi dalam menjaga keseimbangan rantai makanan di perairan (Wowor & Ng, 2007). Selain peranannya dalam rantai makanan, *Macrobrachium* juga dikenal sebagai bioindikator kualitas lingkungan perairan yang cukup sensitif terhadap perubahan kualitas air (Mushthofa *et al.*, 2014), sehingga perubahan dalam populasi dan distribusi *Macrobrachium* dapat mencerminkan kondisi ekosistem perairan tersebut (Cai & Ng, 2017).

Beberapa spesies *Macrobrachium* telah dibudidayakan secara komersial, seperti *M. rosenbergii*, *M. lanchesteri*, dan *M. lar* (Annawaty & Wowor, 2015). Namun, masih banyak spesies *Macrobrachium* lainnya yang belum terkarakterisasi dengan baik, terutama di wilayah Indonesia timur seperti Sulawesi. Sulawesi dikenal sebagai salah satu pulau dengan keanekaragaman hayati yang tinggi, termasuk udang air tawarnya (Wowor *et al.*, 2009).

Daerah aliran sungai (DAS) merupakan wilayah yang mengumpulkan semua air permukaan dan aliran air hujan yang mengalir ke arah sungai utama dan anak sungai dan membentuk sistem hidrologi yang terintegrasi (Asdak, 2023). DAS yang ada di Sulawesi Selatan mencakup Sungai Pattunuang. Sungai ini merupakan salah satu sungai yang berada di kawasan karst dan mempunyai variasi kedalaman dari beberapa puluh sentimeter hingga sedalam lebih dari dua meter. Kawasan karst memiliki daya dukung relatif rendah terhadap kehidupan spesies di dalamnya karena lingkungan karst bercirikan tandus dan gersang, sehingga hanya jenis tumbuhan dan hewan tertentu yang mampu bertahan hidup dan dapat mendiami kawasan karst (Permana *et al.*, 2018). Kawasan karst merupakan salah satu habitat yang paling

terfragmentasi dan sumber makanan yang terbatas (Bichuette & Trajano, 2015) yang menyebabkan organisme dalam ekosistem beradaptasi secara spesifik dan bergantung pada lingkungan karst (Putri *et al.*, 2020) Kawasan karst memiliki tingkat endemisitas yang tinggi, organisme di dalamnya memiliki potensi untuk menjadi sumber daya yang terspesialisasi dan dapat menciptakan peluang ekologis untuk eksplorasi organisme tropis serta mendorong keragaman spesies yang lebih besar (Hanly *et al.*, 2017; Omar *et al.*, 2021). Di Sungai ini ditemukan organisme jenis iktiofauna endemik, moluska dan krustasea (Alshad, 2022). Beberapa penelitian telah dilakukan di DAS Kab. Maros, yaitu terkait aspek biologi, reproduksi dan informasi genetik ikan-ikan endemik, serta kualitas air di beberapa sungai yang berada di DAS Kab. Maros, namun penelitian terkait udang air tawar belum pernah dilakukan. Keberadaan *Macrobrachium* di Sulawesi telah dilaporkan dalam beberapa penelitian sebelumnya seperti di Morowali Utara, Donggala, Toli-toli dan di Pulau Labolo Sulawesi Tengah, namun informasi mengenai karakter molekuler dari *Macrobrachium* di wilayah ini masih terbatas (Wowor & Ng, 2007). Selama ini, identifikasi umumnya dilakukan secara morfologi namun metode ini memiliki keterbatasan karena adanya spesies yang secara morfologi memiliki kemiripan yang tinggi bahkan tidak terlihat perbedaan (Simbolon *et al.*, 2021).

Salah satu aspek penting dalam mengidentifikasi dan mengelompokkan spesies udang air tawar adalah dengan mengamati karakter morfologinya. Karakter morfologi seperti bentuk rostrum, jumlah dan pola duri pada karapas, serta bentuk dan susunan ruas-ruas pada kaki renang (*pleopod*) dan kaki jalan (*pereiopod*) telah menjadi ciri utama dalam membedakan spesies udang air tawar (Cai & Ng, 2017; Jayachandran *et al.*, 2019). Menurut Fransen *et al.* (2010) identifikasi secara morfologi cukup sulit dilakukan karena begitu banyak karakter umum yang sama untuk semua spesies, seringkali ditemukan variasi morfologi yang signifikan dalam satu spesies, terutama pada spesies yang memiliki sebaran geografis yang luas. Hal ini membuat diperlukannya pendekatan lain untuk melakukan identifikasi secara akurat, salah satu metode yang bisa digunakan adalah identifikasi molekuler dengan DNA barcoding.

DNA merupakan suatu molekul yang membawa semua informasi tentang kehidupan di dalam kromosom (Abdullah *et al.*, 2011). DNA barcoding adalah teknik dalam biologi molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies organisme menggunakan informasi genetik dari sekuens DNA. Teknik ini melibatkan pengambilan sekuens DNA pendek dari satu atau beberapa gen yang telah ditentukan (*barcode*) kemudian membandingkan dengan referensi database DNA untuk mengidentifikasi spesies (Ward *et al.*, 2005). Gen yang umum digunakan dalam DNA barcoding adalah gen mitokondria *cytochrome oxidase I* (COI) untuk hewan dan gen *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase* (rbcL) dan *maturase K* (matK) untuk tumbuhan (Kress *et al.*, 2015). Gen COI dapat digunakan di semua tingkat organisme untuk mengidentifikasi spesies (Serdianti *et al.*, 2020). Gen COI memiliki keunggulan dengan tingkat kestabilan yang tinggi dan laju evolusi yang relatif lebih lambat dibandingkan gen lain pada mtDNA (Hidayani *et al.*, 2020 ; Dha-li *et al.*, 2010). Metode ini dapat digunakan untuk memvalidasi spesies kriptik yang banyak

ditemukan pada hewan dengan morfologi serupa namun terdapat perbedaan secara genetik (Trivedi *et al.*, 2016). Pemahaman tentang hubungan kekerabatan antar spesies juga merupakan aspek penting untuk mengetahui kajian evolusi dan distribusi geografis organisme tersebut (Astuti *et al.*, 2022). Menurut Hubert *et al.* (2016) cakupan taksa air tawar Sulawesi untuk DNA barcoding masih belum lengkap, sehingga perlu adanya eksplorasi salah satunya di Sungai pattunuang untuk menambah informasi dalam studi molekulernya.

Studi mengenai genus *Macrobrachium* telah dilakukan di daerah lain seperti di Kalimantan, Sumatra, dan Papua (Imron *et al.*, 2009). Informasi tentang *Macrobrachium* di Sulawesi Selatan masih minim (Nugroho *et al.*, 2009), meskipun beberapa penelitian telah mengkaji spesies *Macrobrachium* di Sulawesi Selatan, yaitu *M. horstii* dari sebuah sungai dekat Palopo (Wowor & Choy, 2001); *M. esculentum* dari Sungai Pongkeru (Wowor *et al.*, 2009); *M. rosenbergii* dan *M. idae* dari Danau Tempe, Luwu Utara, dan Sungai Kariango dan Kalibone (Wahidah *et al.*, 2015). Spesies *M. latidactylus* yang ditemukan di Sungai Gililana, Morowali Utara, Sulawesi (Laewa *et al.*, 2018). Namun, identifikasi morfologi dan DNA barcoding dari sampel *Macrobrachium* di DAS Pattunuang, Kabupaten Maros belum dilakukan.

Penelitian bertujuan untuk menganalisis karakter morfologi dan DNA barcoding *Macrobrachium* sp. dari DAS Maros di Sulawesi Selatan. Karakteristik morfometrik dan meristik dari *Macrobrachium* sp. yang dikumpulkan dari Sungai Pattunuang dianalisis, kemudian dilakukan identifikasi dengan metode DNA barcoding (COI), dan pohon filogenetiknya juga direkonstruksi untuk menganalisis hubungannya dengan kerabat terdekatnya berdasarkan urutan dari database GenBank. Penelitian ini penting sebagai upaya penyedia data awal tentang identifikasi morfologi dan DNA barcoding dari udang air tawar di Sungai Pattunuang, Kabupaten Maros serta memberikan kontribusi untuk pengelolaan sumberdaya perikanan agar dapat menjaga keseimbangan ekosistem di Sungai Pattunuang.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Bagaimana karakter morfologi *Macrobrachium* sp. yang ditemukan di Sungai Pattunuang, Kabupaten Maros?
2. Bagaimana hubungan kekerabatan *Macrobrachium* sp. (berdasarkan hasil DNA barcoding) dari Sungai Pattunuang dengan *Macrobrachium* lainnya yang ada di GenBank (jarak genetik, pohon filogenetik dan *haplotype network*)?
3. Bagaimana kesesuaian identifikasi secara morfologi dengan identifikasi berdasarkan DNA barcoding terhadap *Macrobrachium* sp. yang ditemukan di Sungai Pattunuang, Kabupaten Maros?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Menganalisis karakter morfologi *Macrobrachium* sp. yang ditemukan di Sungai Pattunuang, Kabupaten Maros.

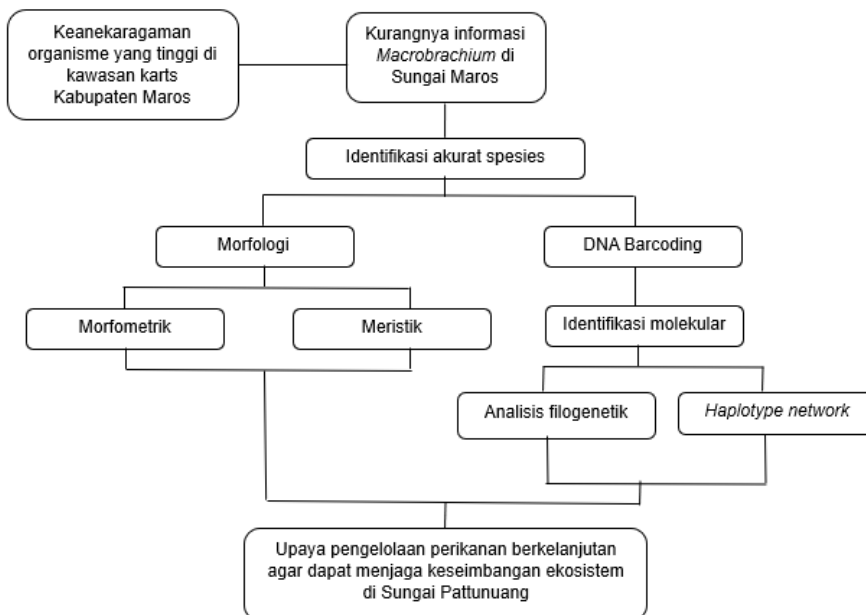
2. Menganalisis hubungan kekerabatan dan keragaman *Macrobrachium* sp. dari Sungai Pattunuang dengan *Macrobrachium* lainnya yang ada di GenBank.
3. Menganalisis kesesuaian identifikasi secara morfologi dengan identifikasi DNA barcoding terhadap *Macrobrachium* sp. yang ditemukan di Sungai Pattunuang, Kabupaten Maros.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah berupa data klasifikasi spesies secara lebih akurat yang tidak dapat terlihat secara visual dalam upaya pengelolaan sumber daya perikanan yang berkelanjutan, selain itu juga digunakan sebagai referensi database yang berguna dalam melakukan identifikasi *Macrobrachium* sp. yang ditemukan di Sulawesi.

1.5 Kerangka Pikir

Sungai Pattunuang, Kabupaten Maros memiliki tingkat keanekaragaman organisme perairan yang cukup tinggi, banyak ditemukan berbagai jenis iktiofauna, moluska dan krustasea. Namun, informasi terkait jenis udang air tawar masih sangat kurang, selama ini identifikasi umumnya dilakukan secara morfologi namun metode ini memiliki keterbatasan karena adanya beberapa spesies yang memiliki kemiripan morfologi yang tinggi, sehingga perlu adanya identifikasi yang lebih akurat dengan menggunakan metode molekuler yaitu DNA barcoding (COI). Penelitian ini memberikan informasi terkait karakter morfologi, identifikasi molekuler (jarak genetik, rekonstruksi pohon filogenetik dan *haplotype network*) pada jenis krustasea yang ditemukan. Penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan informasi untuk pengelolaan keseimbangan ekosistem di perairan. Secara sistematis bisa dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Pengambilan sampel dilaksanakan pada bulan Maret hingga September 2023, analisis sampel dilaksanakan pada bulan Januari hingga Maret 2024. Pengambilan sampel dilakukan di Sungai Pattunuang, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan (Gambar 2). Identifikasi morfologi dilakukan mengikuti petunjuk kunci identifikasi Wowor *et al.* (2004) dan dilakukan pengukuran morfometrik dan meristik (11 karakter) Munasinghe & Thushari (2010) di Laboratorium Biologi Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. Ekstraksi DNA dan PCR dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau (BPPBAP), Kabupaten Maros. Sekuensing DNA dilakukan di PT Genetics Science Jakarta.



Gambar 2. Peta lokasi pengambilan sampel

2.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel kaki jalan (*pereiopod*), ethanol 96%, mini kit DNA genom (Geneaid), gel agarose 1%, primer jgLCO1490 dan jgHCO2198, pewarna DNA *Nucleic Acid Gel Stain* (GelRed). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaring untuk mengambil sampel, penggaris untuk mengukur bagian tubuh udang, tube 1,5 ml untuk menyimpan jaringan sampel yang telah dipreparasi, pinset, wadah, kertas *tagging*, alat tulis dan kamera. Alat yang digunakan untuk metode molekuler *freezer*, vortex mixer, sentrifuge, UV lamp transilluminator dengan GelDoc, dan thermocycler.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Pengambilan dan Sortir Sampel

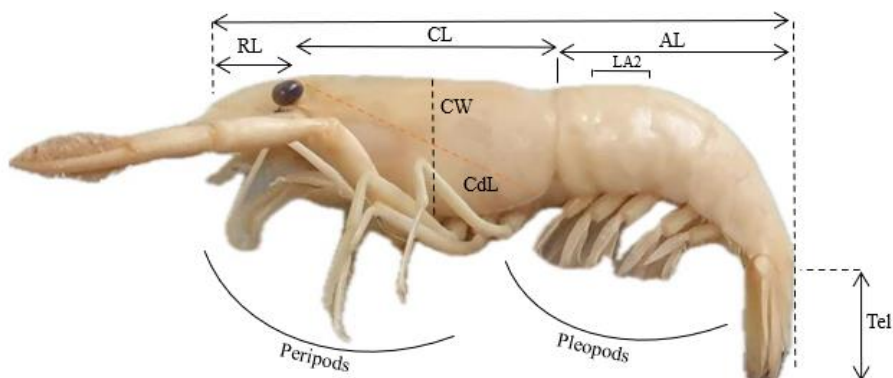
Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan alat tangkap jaring pukat tarik dengan ukuran panjang 4,7 m dan lebar 1 m dengan ukuran mata jaring 3 mm. Sampel yang didapatkan dipisahkan berdasarkan jenisnya seperti krustasea, moluska dan iktiofauna. Kemudian dilakukan dokumentasi, agar proses dokumentasi berjalan dengan lancar maka sampel dimasukkan ke dalam wadah yang berisi minyak cengkeh agar biota tidak banyak bergerak, setelah itu masing-masing dari jenis sampel diberikan kode. Kemudian, diambil jaringan pada kaki jalan (*pereiopod*) dan dimasukkan ke dalam microtube 2 ml dengan 96% ethanol untuk analisis molekuler dengan metode DNA barcoding. Sampel dimasukkan ke dalam wadah pengkoleksian untuk diidentifikasi secara morfologi di Laboratorium Biologi Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin.

2.3.2 Karakterisasi Morfologi

Pengukuran morfologis didasarkan pada kunci identifikasi Wowor *et al.* (2004). Pengukurannya dilakukan secara manual dengan mengamati sembilan karakter morfometrik dan dua karakter meristik (Tabel 1) (Gambar 3). Pengukuran karakter morfometrik dan meristik didasarkan pada Munasinghe & Thushari (2010). Pengukuran dilakukan dengan menggunakan mistar dengan ketelitian 1 mm. Analisis karakter meristik didasarkan pada distribusi persentase seragam di atas (dorsal) dan di bawah (ventral) rostrum. Posisi pengukuran panjang total (TL) pada sampel diluruskan dari bagian antenula hingga ujung telson (Gambar 3).

Tabel 1. Karakteristik, simbol dan definisi pengukuran karakter morfometrik dan meristik (Munasinghe & Thushari, 2010)

Karakteristik	Simbol	Definisi
Karakter morfometrik		
Panjang total	TL	Panjang dari antenula hingga ujung telson
Panjang abdomen	AL	Panjang dari depan karapas hingga ujung telson
Panjang telson	Tel	Panjang maksimum telson
Panjang karapas	CL	Panjang dari dasar mata hingga batas depan karapas
Lebar karapas	CW	Lebar karapas
Panjang diagonal karapas	CdL	Panjang dari dasar mata hingga batas karapas bawah
Panjang segmen abdominal 1	LA 1	Panjang segmen abdomen 1
Panjang rostrum	RL	Panjang dari ujung hingga dasar rostrum
Panjang segmen abdominal 2	LA 2	Panjang segmen abdomen 2
Karakter meristik		
Jumlah gerigi atas rostrum	NUT	Jumlah duri bagian atas rostrum
Jumlah gerigi bawah rostrum	NLT	Jumlah duri bagian bawah rostrum



Gambar 3. Karakter morfometrik *Macrobrachium* sp. dari Sungai Pattunuang

2.3.3 Karakter Molekular

2.3.3.1 Ekstraksi DNA

Ekstraksi umumnya dilakukan untuk memisahkan DNA dari komponen lainnya yaitu protein dan lipid. Pada proses ekstraksi DNA digunakan sampel *pereiopod* pada udang yang dimasukkan dalam tube dengan 96% larutan ethanol. Umumnya proses ekstraksi ini menggunakan mini kit DNA genom (Geneaid) yang sesuai dengan protokol pabrik (Jayachandran *et al.*, 2019). Jaringan spesimen yang diambil 0.03 g, kemudian ditambahkan 200 μ L GT buffer, 20 μ L Proteinase K, *vortex* selama 10 detik, inkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Dimasukkan GBT 200 μ L kemudian invert, inkubasi kembali pada suhu 60°C selama 30 menit, kemudian disentrifuge 14.000 rpm selama 3 menit, pipet supernatan lalu pindahkan ke tube 1,5 ml, ditambahkan RNase 4 μ L kemudian invert lalu diamkan selama 5 menit. Dimasukkan 200 μ L ethanol absolut lalu invert, sampel dipipet ke *column spin* kemudian sentrifuge selama 3 menit, ganti *column spin* bagian luar dengan yang baru. Dimasukkan W1 buffer 400 μ L, sentrifuge selama 3 menit, buang hasil filter lalu tambah 600 μ L wash buffer, sentrifuge selama 3 menit. Dimasukkan elution buffer 100 μ L lalu diamkan selama 5 menit, sentrifuge selama 3 menit untuk pengkoleksian DNA, kemudian disimpan pada suhu -20°C. Hasilnya berupa *clear solution* yang berupa DNA murni.

2.3.3.2 Amplifikasi DNA target

DNA genomik hasil ekstraksi kemudian diamplifikasi menggunakan teknik PCR agar menghasilkan DNA target yaitu bagian tertentu dari gen mitokondria *cytochrome oxidase subunit I* (COI mtDNA) dengan menggunakan primer *forward* jgLCO1490 (5'-TIT CIA CIA AYC AYA ARG AYA TTG G-3') dan primer *reverse* jgHCO2198 (5'-TAI ACY TCI GGR TGI CCR AAR AAY CA-3') (Geller *et al.*, 2013). Total volume PCR adalah 20 μ L, dimana setiap reaksi terdiri dari campuran 1 μ L template DNA hasil ekstraksi, 1,2 μ L masing-masing primer dalam konsentrasi 10 mM, 12,5 μ L *ready mix* dan 14,5 μ L ddH₂O. Pada prosesnya, denaturasi awal pada suhu tinggi 95°C selama 5, kemudian terdiri dari 35 siklus meliputi denaturasi pada suhu tinggi 95°C selama 30 detik untuk memisahkan untai DNA, annealing pada suhu 50°C selama 30 detik

untuk penempelan primer pada untai DNA target dan ekstensi pada suhu optimal enzim 72°C selama 45 detik untuk aktivitas enzim DNA polimerase dalam memperpanjang untai DNA. Ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit untuk memastikan setiap untai DNA diperpanjang secara sempurna (Veneza *et al.*, 2018). Produk PCR selanjutnya masuk pada tahap elektroforesis yang divisualisasikan pada gel agarosa 1% yang dicampur dengan pewarna DNA. Produk PCR yang diamplifikasi yang menghasilkan pita bening dan bersih dikirim untuk sekuensing Sanger ke PT Genetics Science Indonesia di Jakarta.

2.3.3.3 Sekuensing DNA (Sanger Sequence)

Produk PCR yang berhasil diamplifikasi dikirim untuk sekuensing di PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta. Pada tahap ini, sampel yang digunakan adalah produk PCR yang sudah dimurnikan serta primer *forward* dan *reverse* yang digunakan pada proses amplifikasi PCR. Siklus reaksi sekuensing yang terjadi dimulai dengan denaturasi DNA untai ganda. Kemudian penempelan primer pada DNA utas tunggal dan diperpanjang dengan menggunakan campuran dNTPs. Hasil sekuensing akan berupa data kromatogram. Hasil sekuen kemudian diedit menggunakan aplikasi MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021).

2.4 Analisis Data

Hasil analisis morfometrik dan meristik dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel menggunakan microsoft excel. File sekuen (kromatogram) yang diperoleh dimasukkan ke dalam perangkat lunak Mega 11 (Tamura *et al.*, 2021). Sekuens yang memenuhi kriteria kualitas dibersihkan, dipangkas, disejajarkan dan urutan maju dan mundur untuk setiap spesimen digabungkan untuk menghasilkan DNA barcode. Urutan DNA barcode yang homolog diperoleh dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) GenBank menggunakan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), dapat diakses melalui situs web NCBI ([//blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)) (Madden, 2013). Analisis jarak genetik dan rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *neighbors-joining* (1000 ulangan bootstrap) dengan model kimura 2-parameter (Kimura, 1980) di Mega 11 (Tamura *et al.*, 2021). Analisis haplotipe mencakup urutan sekuen yang memiliki georeferensi dari *clade* terdekat dalam analisis filogenetik dan dilakukan menggunakan perangkat lunak DnaSP, Network dan Notepad++.