

KERAGAMAN GENETIK TIGA VARIETAS UDANG GALAH, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) MENGGUNAKAN PENANDA DNA MITOKONDRIA

Fetrlisa Silitonga¹, Ratu Siti Aliah², Indra Gumay Yudha³
Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung
Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung, Lampung, 34145
E-mail: fetrlisa.silitonga@gmail.com

1. Mahasiswa Jurusan Perikanan dan Kelautan, Universitas Lampung
2. Pusat Teknologi Produksi Pertanian, BPPT
3. Dosen Jurusan Perikanan dan Kelautan, Universitas Lampung

ABSTRAK

Syarat dilakukan persilangan yaitu tersedianya indukan yang berbeda secara genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman genetik tiga varietas udang galah (populasi aceh, populasi solo, dan strain siratu) menggunakan metode RFLP. Genom mtDNA diekstrak menggunakan metode *phenol-chloroform*, diamplifikasi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) primer yang digunakan yaitu COI (*forward* 5' - ACG CAA CGG TGG CTT TTC-3' dan *reverse* 5'-TAG TTA GCT GTT AGG GGG AT-3') dan primer 16S rDNA (*forward* 5'-GGT AAT TTG ACC GTG CGA AG -3' dan *reverse* 5'-ACC AGC TAA ACG GCT ACA CCT -3'). Produk PCR COI sepanjang 1516 pasang basa (bp) direstriksi dengan menggunakan 5 enzim (*Ava* II, *Msp* I, *Rsa* I, *Hae* III, dan *Taq* I) dan 16S rDNA sepanjang 444 pasang basa (bp) menggunakan enzim *Mbo* I, *Msp* I, *Sau3A* II, *Hae* III, dan *Taq* I). Hasil penelitian menunjukkan pada region COI terdapat 22 haplotipe, sedangkan pada region 16S rDNA menunjukkan 2 haplotipe. Berdasarkan ada tidaknya situs restriksi pada masing-masing mtDNA, diperoleh nilai keragaman genetik pada mtDNA COI populasi aceh 0,836, strain siratu 0,829 dan populasi solo 0,517, sedangkan pada mtDNA 16S rDNA populasi aceh 0,488, strain siratu 0,066 dan populasi solo 0. Jarak genetik menggunakan region COI dan 16S rDNA menunjukkan bahwa populasi aceh-solo yang tertinggi (jauh) dengan nilai berturut-turut 0,0800 dan 0,6170.

Kata kunci : persilangan, primer, mtDNA, haplotipe, restriksi

PENDAHULUAN

Udang galah, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1979) merupakan salah satu produk unggulan komoditas perikanan air tawar yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi dan banyak diminati oleh konsumen dari berbagai negara (FAO, 2011). Produksi udang galah pada tahun 2014 sebesar 1754 ton (KKP, 2015).

Induk yang digunakan untuk memproduksi larva udang galah saat ini hampir seluruhnya berasal dari induk-induk hasil perbanyakkan induk alam maupun hasil rekayasa genetik. Udang galah strain GI

macro (KKP, 2014) dan strain siratu (KKP, 2015) merupakan strain udang galah hasil perbaikan genetik melalui program seleksi. Selain seleksi, kegiatan persilangan juga merupakan salah satu usaha perbaikan genetik dalam rangka menghasilkan benih unggul. Khasani *et al.* (2010) menjelaskan bahwa syarat agar dapat dilakukan perkawinan silang adalah tersedianya populasi udang galah yang berbeda secara genetik, baik karena terisolasi geografi maupun populasi hasil budidaya yang telah didomestikasi. Pesilangan dapat dilakukan secara resiprokal yang artinya penggunaan individu jantan dan betina dengan satu sifat

yang berbeda dapat dilakukan secara bolak balik tanpa ada pengaruhnya dalam rasio fenotip generasi kedua.

Sejak tahun 2016 BPPT telah menginisiasi program pengembangan udang galah unggul (hibrida) melalui persilangan resiprokal dan udang galah *neofemale* dengan aplikasi teknologi *RNA interference*. Dalam proses persilangan resiprokal digunakan 3 varietas udang galah yang berasal dari Sungai Peureulak (Aceh Timur), Sungai Bengawan Solo (Jawa Tengah), dan strain siratu (udang galah hasil persilangan BBPBAT Sukabumi).

Selanjutnya dalam tulisan ini populasi udang galah yang berasal dari Sungai Peureulak disebut sebagai populasi aceh; serta populasi udang galah yang berasal dari), Sungai Bengawan Solo disebut sebagai populasi solo. Untuk menunjang keberhasilan program ini, karakterisasi genetik dari populasi atau strain udang galah yang digunakan untuk kegiatan ini perlu diketahui. Kilawati (2006) menyatakan bahwa analisis keragaman genetik suatu organisme mampu dijadikan sebagai landasan persilangan untuk menghasilkan benih yang unggul.

Menurut Carvalho dan Pitcher (1995) estimasi keragaman genetik dapat dilakukan dengan menggunakan penanda-

penanda molekuler. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah penanda DNA mitokondria. Menurut Soewardi (2007), ada tiga karakteristik penting dari DNA mitokondria (mtDNA) untuk studi perbedaan genetik, yaitu: 1) Evolusinya cepat, mtDNA berevolusi 5-10 kali lebih cepat dari DNA inti sel; 2) Menurun secara maternal dan mtDNA berada pada sel sitoplasma; 3) Tidak ada segregasi atau rekombinasi. Selain itu, tipe mutasi mtDNA sederhana, yakni substitusi basa atau mutasi panjang basa dan terjadi terutama di *small non coding region*; sehingga polimorfisme mtDNA merupakan penanda genetik netral.

Untuk dapat menghasilkan strain udang galah yang unggul sebagai calon induk diperlukan data tentang keragaman genetik udang galah tersebut. Oleh karena itu, dilakukan analisis keragaman genetik induk udang galah menggunakan penanda DNA mitokondria dengan mengetahui keragaman genetik udang galah populasi aceh, populasi solo, dan strain siratu serta jarak genetik antar ketiganya.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan keragaman genetik mtDNA tiga varietas udang galah (aceh, solo, dan siratu) yang akan digunakan dalam proses persilangan resiprokal untuk mendapatkan udang galah hibrida yang unggul.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2017 sampai dengan Maret 2018 di Pusat Teknologi Produksi Pertanian (PTPP), Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung PCR, tabung berukuran 1,5 ml, mikropipet, mesin PCR, *sentrifuge*, inkubator, lemari pendingin, lampu ultraviolet, komputer, kamera palaroid, dan alat elektroforesis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 90 sampel (30 aceh, 30 solo, dan 30 siratu) kaki renang udang galah dengan masing-masing sampel yang digunakan sebanyak 5-10 mg, primer COI (*forward* 5' -ACG CAA CGG TGG CTT TTC-3' dan *reverse* 5' -TAG TTA GCT GTT AGG GGG AT-3') dan primer 16S rDNA (*forward* 5' -GGT AAT TTG ACC GTG CGA AG -3' dan *reverse* 5' -ACC AGC TAA ACG GCT ACA CCT -3') (Jang *et al.*, 2005), 1M Tris-HCl (pH 8), 1M NaCl, 0,5 M EDTA (pH 8), 10 % SDS, 8 M urea, akuades steril, RNAse (1mg/ml), proteinase-K, larutan PCI (25 : 24 : 1) dan CI (24:1), alkohol 90%, larutan natrium

asetat 3 M, agarose, dNTP, *buffer taq*, ddH₂O, *taq polymerase*, DNA udang galah (template), DNA *ladder* (1 kb), enzim restriksi COI (*Ava* II, *Msp* I, *Rsa* I, *Hae* III, dan *Taq* I), dan enzim restriksi 16S rDNA (*Mbo* I, *Msp* I, *Sau3A* I, *Hae* III, dan *Taq* I).

Prosedur Penelitian

Ekstraksi DNA

Sumber sel yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah potongan organ udang galah, yaitu kaki renang (15 jantan dan 15 betina masing-masing populasi) dengan bobot 5-10 mg. Metode yang digunakan adalah standar *phenol chloroform* (Nugroho, 1997 dalam Soewardi, 2007).

Potongan organ sebanyak 5-10 mg per sampel, dimasukkan ke dalam tabung mikro berukuran 1,5 ml yang berisi 500 µl larutan sel lisis yang terdiri dari 1M Tris-HCl (pH 8), 1M NaCl, 0,5 M EDTA (pH 8), 10 % SDS, 8 M urea, dan akuades steril. Selanjutnya sampel ditambahkan 20 µl/ml proteinase-K, dihomogenkan selama 10 detik menggunakan *vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mempercepat proses lisis sel.

Larutan sel hasil inkubasi ditambah dengan 700 µl larutan PCI (*phenol: chloroform : isoamylalcohol*) dengan perbandingan 25:24:1, kemudian di-*sentrifuge* dengan

kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Setelah itu larutan supernatan (lapisan paling atas) diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro berukuran 1,5 ml yang baru. Larutan supernatan ditambah dengan 600 μ l larutan CI (*chloroform: isoamylalcohol* dengan perbandingan 24:1), kemudian di-*sentrifuge* dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Setelah di-*sentrifuge* larutan supernatan (lapisan paling atas) diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro berukuran 1,5 ml yang baru. Supernatan dalam tabung mikro yang diperoleh pada tahap 2 ditambahkan dengan larutan NaOAC sebanyak 10% dari total supernatan dan alkohol 99% sebanyak 2 kali volume supernatan. Selanjutnya tabung mikro yang berisi larutan sampel di-*sentrifuge* dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit sampai terlihat lapisan putih. Lapisan putih yang diperoleh ditambah dengan 800 μ l alkohol 70% kemudian di-*sentrifuge* dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit sampai terlihat lapisan putih yang disebut endapan DNA.

Endapan DNA yang diperoleh pada tahap 3 kemudian diambil dengan cara dibuang cairan supernatannya dan dikeringkan dengan cara diletakkan di atas kertas hisap atau *tissue* pada suhu ruang. Setelah kering ditambahkan 40 μ l DNA

rehydration solution (TE-Buffer) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, sampel dapat segera digunakan atau disimpan terlebih dahulu pada suhu -20°C sebelum dilakukan pengecekan hasil ekstraksi melalui elektroforesis pada gel agarose dan lampu ultraviolet.

Amplifikasi-mtDNA COI dan 16S rDNA

Tahap pertama dalam amplifikasi mtDNA COI dan 16S rDNA adalah menyiapkan tabung PCR berukuran 0,75 ml yang telah diberi tanda. Bahan yang digunakan (ddH₂O, enzim *taq polymerase*, dNTP mix, larutan *buffer* enzim, primer *reverse* dan *forward* dan DNA *template*) dicampurkan ke dalam tabung berukuran 1,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung PCR 0,75 ml yang telah disiapkan dengan konsentrasi yang seimbang, DNA udang galah dimasukkan ke dalam masing-masing tabung PCR. Selanjutnya tabung yang berisi sampel dimasukkan ke dalam mesin PCR yang telah diprogram.

Reaksi amplifikasi mtDNA COI pada mesin PCR berlangsung dalam beberapa tahap, 5 menit dengan suhu 94°C untuk pradenaturasi, 1 menit dengan suhu 94°C untuk denaturasi, 1 menit dengan suhu 53,6°C untuk penempelan DNA (*annealing*), dan 1 menit pada suhu 72°C untuk pemanjangan fragmen DNA (ekstensi). Proses ini diakhiri dengan pasca PCR selama 5 menit dengan suhu 72°C dan

normalisasi pada suhu 4°C selama 5 menit. Reaksi amplifikasi-mtDNA 16S rDNA pada mesin PCR berlangsung dalam beberapa tahap, 5 menit dengan suhu 94°C untuk pradenaturasi, 1 menit dengan suhu 94°C untuk denaturasi, 1 menit dengan suhu 46°C untuk penempelan DNA (*annealing*), dan 1 menit pada suhu 72°C untuk pemanjangan fragmen DNA (ekstensi). Proses ini diakhiri dengan pasca-PCR selama 5 menit dengan suhu 72°C dan normalisasi pada suhu 15°C selama 1 menit.

Restriksi Enzim Endonuklease

Amplikon mtDNA COI dan 16S rDNA dipotong dengan menggunakan enzim restriksi yang dapat mengenali atau memotong pasang basa yang spesifik (Tabel 1). Pemotongan mtDNA dengan enzim restriksi dilakukan dengan cara mencampur 3 µl hasil PCR mtDNA, 1 µl buffer enzim, 0,25 enzim restriksi, dan 4 µl ddH₂O ke dalam tabung mikro 1,5 ml (*ependorf*). Larutan yang telah homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C atau 65°C sesuai enzim yang digunakan selama lebih kurang 2 jam.

Tabel 1. Jenis enzim restriksi

Enzim	Situs Pemotongan
<i>Ava</i> II	(5'-G G (A/T) CC-3') (3'-CC (T/A) G G-5')
<i>Hae</i> III	(5'-GG CC-3') (3'-CC GG-5')
<i>Msp</i> I	(5'-C C GG-3') (3'-GG C C-3')
<i>Taq</i> I	(5'-T C GA-3') (3'-AG C T-5')
<i>Rsa</i> I	(5'-G T A C-3') (3'-C A T G-5')
<i>Mbo</i> I	(5'-GATC-3') (3'-CTAG 3')
<i>Sau</i> 3AI	(5'-GATC-3') (3'-CTAG 3')

Keterangan

| = *blunt end* ;
 └─┘ = *stickey end*

Elektroforesis dan Visualisasi

Elektroforesis dilakukan dengan metode gel agarosa. Konsentrasi agarosa yang digunakan untuk hasil PCR adalah 0,8%, sedangkan untuk hasil restriksi yaitu 1%. Pembuatan gel agarosa dilakukan dengan melarutkan 0,8 atau 1 gram bubuk agarosa ke dalam 100 ml *buffer* TBE 1x atau TAE 1x. Campuran tersebut kemudian dipanaskan sampai bubuk agarosa larut sempurna yang ditandai dengan warnanya yang tampak jernih (bening). Selanjutnya larutan gel agrosa tersebut dicetak pada *tray* elektroforesis yang telah disiapkan sebelumnya dan dipasang *comb*. Gel agarosa dibiarkan dingin dan mengeras selama lebih kurang 30 menit. Gel agarosa diletakkan pada pada alat elektroforesis sampai tanda tera atau sampai gel

tenggelam. Sekuens mtDNA sebanyak 4 µl ditambahkan larutan *loading dye* (50 mM EDTA, 30% gliserol, 0,25% *bromophenol* biru, dan 0,25% *xylene cyanol*), kemudian dimasukkan ke dalam lubang-lubang cetakan pada gel. Marka DNA 1 kb juga dimasukkan ke dalam *well* sebagai pembanding. Selanjutnya gel agarose diamati di atas lampu ultraviolet dan didokumentasikan menggunakan kamera polaroid khusus.

Analisis Data

Analisis variasi DNA dilakukan untuk melihat variasi genetik udang galah berdasarkan ada tidaknya situs restriksi pada mtDNA COI dan 16S rDNA. Setiap enzim restriksi memiliki pola pemotongan yang berbeda dan setiap individu memiliki pola pemotongan yang mungkin berbeda pada tiap enzim yang digunakan. Berdasarkan pola pemotongan tersebut dibuatlah haplotipe. Keragaman haplotipe (*h*) dalam suatu populasi dihitung menurut persamaan Nei dan Tajima (1981) :

$$h = 2n(1 - \sum X_i^2) / (2n-1)$$

Keterangan :

h : Diversitas haplotipe

n : Ukuran sampel

X_i : Frekuensi haplotipe sampel ke-*i*

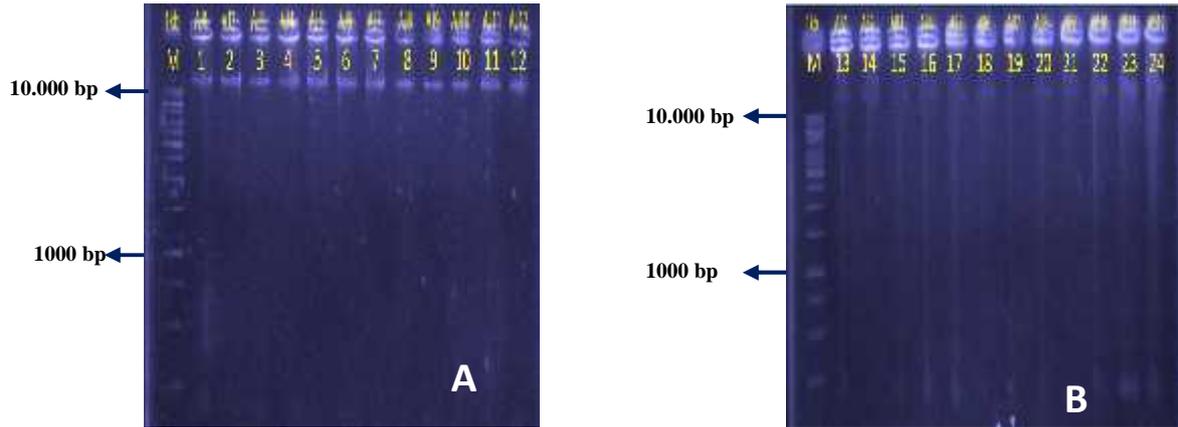
Kekerabatan antar populasi dianalisis menggunakan jarak genetik berdasarkan UPGMA modifikasi Rogers (1972) dari

haplotipe dengan menggunakan program TFPGA (*tool for population genetic analysis*) yang dihasilkan dalam bentuk dendogram.

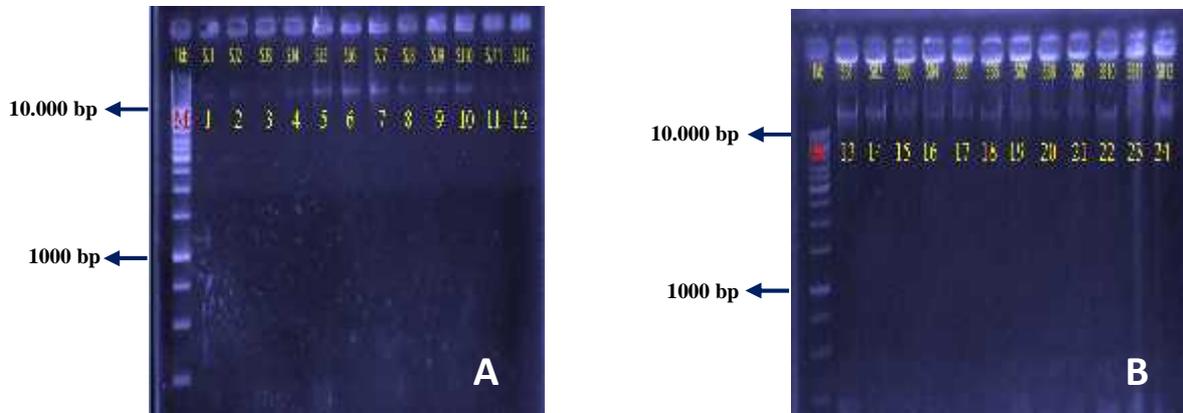
HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA Genom Udang Galah

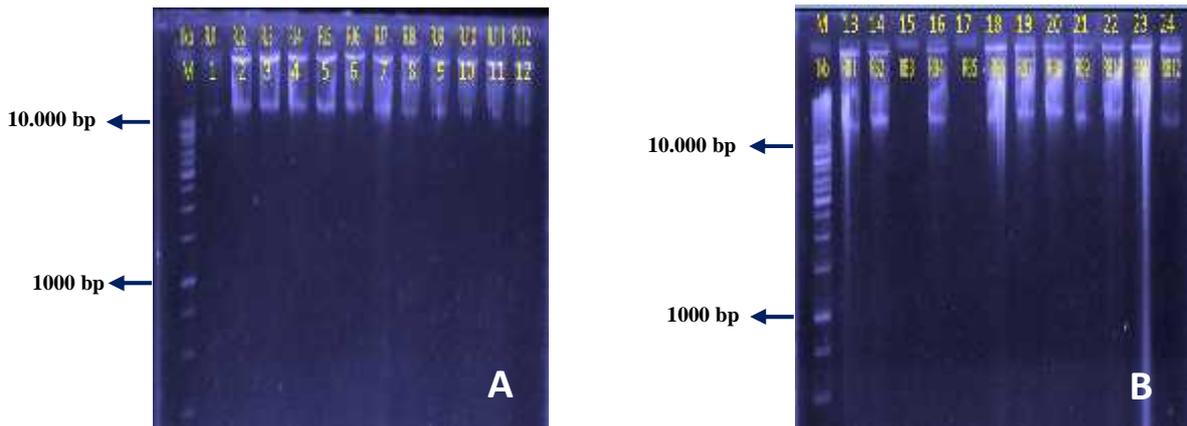
Isolasi DNA merupakan langkah awal dalam analisis molekuler berbasis DNA. Pengecekan DNA genom pada udang galah dari tiga varietas dilakukan dengan menggunakan proses elektroforesis gel. DNA genom udang galah yang dihasilkan berukuran lebih dari 10.000 bp (Gambar 1, 2, dan 3). Rata-rata ukuran DNA mitokondria udang melebihi 10.000 bp, seperti pada *Litopenaeus vannamei* dan *Fenneropenaeus chinensis* yang berukuran 15.989 bp dan 15.004 bp (Shen *et al.*, 2007), serta *Panaeus monodon* berukuran 15.984 bp (Wilson *et al.*, 2000). Kualitas DNA genom yang dihasilkan akan membentuk pola pita yang memiliki tingkat ketebalan yang berbeda. Hal tersebut berkaitan dengan konsentrasi DNA yang didapatkan. Semakin tinggi konsentrasi yang didapatkan, maka pita yang terbentuk semakin tebal dan terang (Sanbrook dan Russel, 2001). Genom yang diperoleh dari hasil ekstraksi diamplifikasi menggunakan primer mtDNA COI dan mtDNA 16S rDNA.



Gambar 1. Visualisasi genom mtDNA udang galah populasi aceh.



Gambar 2. Visualisasi genom mtDNA udang galah populasi solo.



Gambar 3. Visualisasi genom mtDNA udang galah strain siratu.

Amplifikasi region mtDNA COI dan 16S rDNA

Hasil analisis elektroforesis gel menunjukkan bahwa primer COI berhasil mengamplifikasi daerah mtDNA COI dari sampel kaki renang udang galah, ditandai dengan adanya tampilan pita DNA ada jalur lintasan sekitar 1516 bp (Lampiran 1). Panjang fragmen hasil amplifikasi dicocokkan dengan situs penempelan pasangan primer pada sekuen gen mtDNA udang galah (*GenBank* No. Acc.

AY659990.1) versi primer premier 6. Suhu optimum untuk *annealing* mtDNA COI udang galah pada penelitian ini adalah 53,6 °C. Amplifikasi daerah mtDNA 16S rDNA dengan menggunakan primer 16S rDNA berhasil dilakukan ditandai dengan tampak pita DNA berukuran sekitar 444 bp yang divisualisasikan melalui elektroforesis gel (Lampiran 2). Suhu optimum untuk *annealing* mtDNA 16S rDNA udang galah pada penelitian ini adalah 46°C.

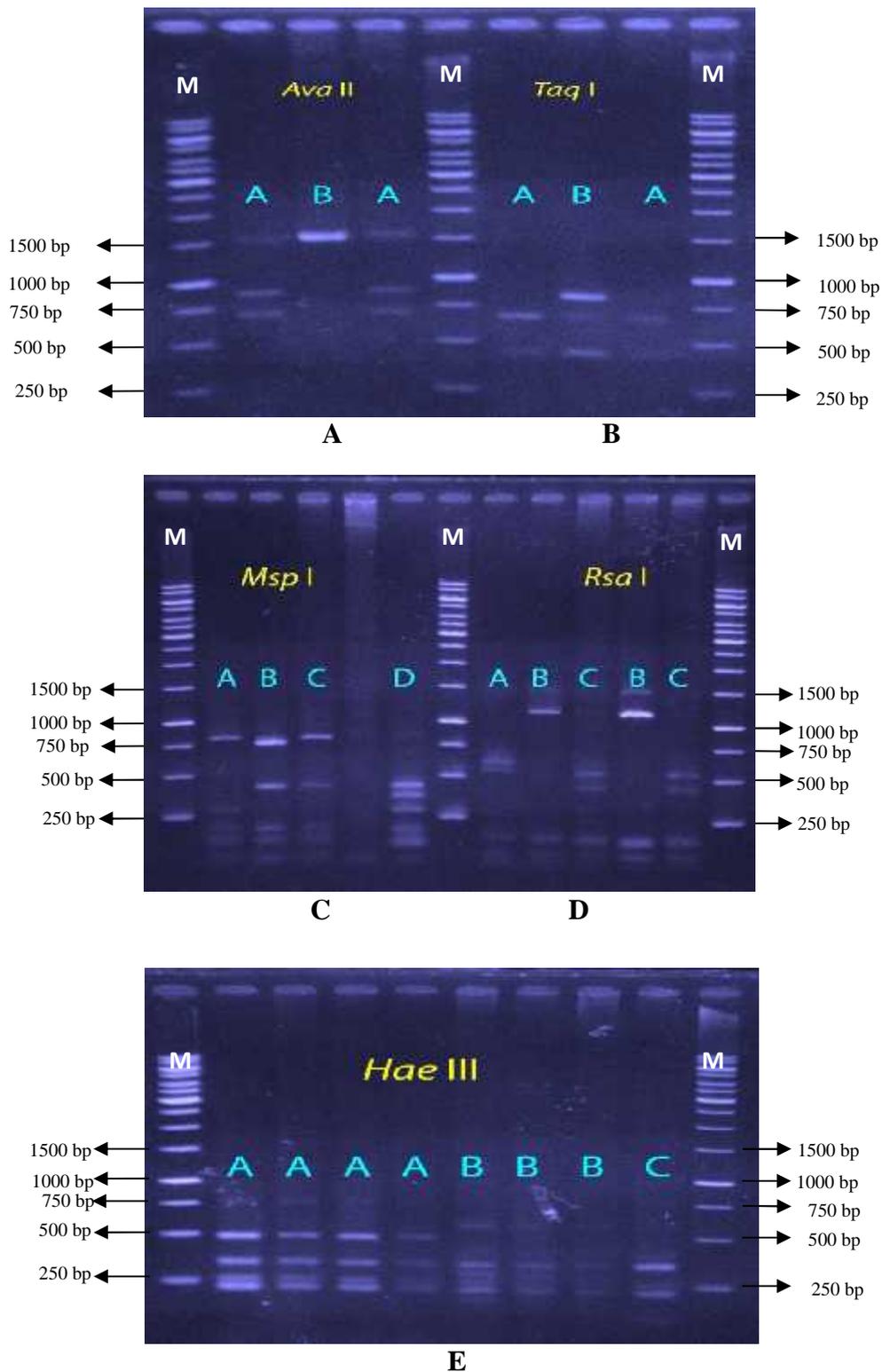
Keragaman Genetik mtDNA COI Udang Galah

Keragaman Haplotipe Udang Galah Menggunakan Gen COI

Profil pemotongan kelima enzim disajikan pada Gambar 4. Enzim restriksi yang digunakan dalam penelitian ini mengenali situs pemotongan fragmen DNA yang berbeda atau secara spesifik.

Enzim *Ava* II yang mengenali situs pemotongan 5 pasang basa (G G(A/T)CC) menunjukkan dua pola potongan DNA, enzim *Msp* I yang mengenali situs pemotongan 4 pasang basa C CGG memberikan empat pola potongan DNA, enzim *Rsa* I yang mengenali situs pemotongan 4 pasang basa GT AC, enzim

ini memberikan tiga pola potongan DNA, enzim *Hae* III yang mengenali situs pemotongan 4 pasang basa GG TC dan memberikan tiga pola potongan DNA, serta enzim *Taq* I yang mengenali situs 4 pasang basa T CGA memberikan dua pola potongan DNA. Berdasarkan pada jumlah alel atau potongan yang dijumpai pada masing-masing enzim restriksi, kelima enzim restriksi mampu memotong DNA tunggal lokus COI pada udang galah dengan variatif karena menghasilkan lebih dari satu jenis alel.



Gambar 4. Pola fragmen mtDNA COI pada elektroforesis gel.

Keterangan : A= enzim *Ava II*; B= enzim *Taq I*; C= enzim *Msp I*; D= enzim *Rsa I*; E= *Hae III*

Produk restriksi dari kelima enzim restriksi menunjukkan perbedaan dalam jumlah dan

ukuran fragmen restriksi (*restriction fragment*) beserta situs restriksinya

(restriction sites). Enzim restriksi *Msp I* memiliki pola potongan yang paling tinggi yaitu sebanyak 4 pola, sedangkan enzim restriksi *Ava II* dan *Taq I* yang memiliki pola potongan terendah yaitu sebanyak 2

pola. Berdasarkan tipe potongan yang dihasilkan kelima enzim restriksi memiliki tipe polimorfik, karena pola potongan yang dihasilkan pada setiap enzim melebihi satu pola (pola yang berbeda) (Tabel 2).

Tabel 2. Tipe digesti dan ukuran fragmen mtDNA COI udang galah yang direstriksi dengan enzim *Ava II*, *Msp I*, *Rsa I*, *Hae III*, dan *Taq I*

Jenis enzim restriksi				
<i>Ava II</i>	<i>Msp I</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Taq I</i>
(A)	(A)	(A)	(A)	(A)
830+635 (1516 bp)	800+300+250+100 (1450 bp)	700+600+200 (1500 bp)	500+400+250+200 (1350 bp)	666+427 (1093 bp)
(B)	(B)	(B)	(B)	(B)
1516 bp	750+400+250 (1400 bp)	1200+200+100 (1300 bp)	600+350+300+200 (1450 bp)	950+407 (1142 bp)
	(C)	(C)	(C)	
	800+400+200+100 (1500 bp)	600+400+200 (1200 bp)	400+300+200 (900 bp)	
	(D)			
	500+400+300+200+100 (1500 bp)			

Keterangan : A,B,C,dan D menunjukkan pola potongan (restriksi).

Komposit haplotipe mtDNA COI yang dihasilkan sebanyak 22 macam, jumlah haplotipe yang tertinggi terdapat pada udang galah strain siratu (11 tipe komposit haplotipe) dengan frekuensi berkisar dari 0,033 hingga 0,333, kemudian 10 tipe haplotipe ditemui pada populasi aceh dengan kisaran frekuensi haplotipe 0,033 hingga 0,300, serta jumlah yang rendah ditemui pada populasi solo (5 tipe komposit haplotipe) dengan kisaran frekuensi haplotipe 0,033 hingga 0,667 (Tabel 3).

Berdasarkan haplotipe mtDNA COI yang muncul terdapat haplotipe spesifik yaitu AABAA. Haplotipe AABAA hanya muncul pada populasi aceh dengan frekuensi yang relatif tinggi yaitu 9 sampel, sedangkan tipe potongan terendah pada populasi solo yaitu AAAAA, BABAA, dan AACAA dengan frekuensi masing-masing 1 sampel.

Tabel 3. Keragaman haplotipe dari 3 varietas udang galah mtDNA COI

No.	Haplotipe	Aceh		Solo		Siratu	
		N	F	n	f	n	f
1.	AAAAA	1	0,033				
2.	AABAA	9	0,300				
3.	AABCB	1	0,033				
4.	AABAB	3	0,100				
5.	ADBAA	1	0,033				
6.	AACAA	1	0,033				
7.	BABAB	4	0,133				
8.	BABBB	5	0,167				
9.	BABAA	5	0,167				
10.	ACCAA					1	0,033
11.	ACCBA					2	0,067
12.	AAABA					1	0,033
13.	ACCCA					1	0,033
14.	ADCBA					1	0,033
15.	ABCCA					1	0,033
16.	BABBA					4	0,133
17.	BBBBBA					1	0,033
18.	AACBA			6	0,200	2	0,067
19.	ABCAA			1	0,033	10	0,333
20.	ABCBA			20	0,667	6	0,200
21.	ABBBA			2	0,067		
22.	AABBA			1	0,033		
Jumlah Sampel		30		30		30	
Jumlah Haplotipe		9		5		11	
Keragaman Haplotipe		0,836		0,517		0,829	

Keterangan :

n : jumlah sampel

f : frekuensi haplotipe

Keragaman haplotipe yang tinggi ditemui pada populasi aceh dengan nilai 0,836 dan yang rendah pada populasi solo dengan nilai 0,517 (Tabel 6). Keragaman haplotipe pada penelitian ini yang yang lebih tinggi terdapat pada populasi aceh, sehingga dapat dikatakan bahwa populasi aceh memiliki keragaman genetik lebih tinggi

dibandingkan dengan populasi siratu dan solo, hal ini mengacu pada Tarwinangsih *et al.* (2011) tingkat keragaman genetik yang tinggi suatu populasi dapat diindikasikan dari jumlah haplotipe dan keragaman haplotipe yang juga tinggi.

Berdasarkan haplotipe mtDNA COI yang muncul terdapat haplotipe spesifik yaitu AABAA. Haplotipe AABAA hanya muncul pada populasi aceh dengan frekuensi yang relatif tinggi yaitu 9 sampel, sedangkan tipe potongan terendah pada populasi solo yaitu AAAAA, BABAA, dan AACAA dengan frekuensi masing-masing 1 sampel. Populasi solo memiliki tipe potongan yang dominan yaitu ABCBA dengan frekuensi 20 sampel, sedangkan tipe pemotongan ABCAA dan AABBA yang terendah yaitu 1 sampel. Pada strain siratu tipe potongan yang dominan yaitu ABCAA dengan jumlah 10 sampel, sedangkan tipe potongan ACCAA, AAABA, ACCCA, ADCBA, ABCCA, dan BBBBA yang terendah dengan jumlah 1 sampel.

Berdasarkan tipe potongan (haplotipe), 3 tipe potongan pada strain siratu terdeteksi juga pada populasi solo, yaitu AACBA (siratu 2 sampel dan solo 6 sampel), ABCAA (siratu 10 sampel dan solo 1 sampel), dan ABCBA (siratu 6 sampel dan solo 20 sampel). Hal ini menunjukkan bahwa strain siratu dan solo mirip atau serupa secara genetik.

Enzim restriksi yang polimorfik mendeteksi perbedaan panjang fragmen yang terpotong adalah enzim *Msp* I, karena

pola potongan pada *Msp* I lebih banyak daripada keempat enzim lainnya. Keragaman haplotipe pada sekuens mtDNA COI udang galah populasi aceh, populasi solo, dan strain siratu pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan keragaman haplotipe hasil penelitian Mandayasa (2007) pada udang galah yang berasal dari Makassar-Sulawesi (0,111) dan Sukabumi-Jawa (0,280) pada daerah mtDNA COI dengan menggunakan 4 jenis enzim restriksi.

Jarak Genetik mtDNA COI Udang Galah

Nilai jarak genetik disajikan dalam bentuk matriks seperti tertera pada Tabel 4, sedangkan ilustrasi dendogram ditampilkan pada Gambar 5. Jarak genetik antara populasi udang galah solo dengan strain siratu adalah yang terdekat (terkecil) yaitu 0,1558. Adapun jarak genetik antara populasi solo dengan aceh merupakan yang tertinggi dengan nilai 0,6150. Populasi yang memiliki nilai jarak genetik semakin rendah mengindikasikan bahwa populasi tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang semakin dekat dan jarak genetik yang semakin tinggi maka hubungan kekerabatannya jauh (Putri, 2013).

Tabel 4. Jarak genetik mtDNA COI 3 varietas udang galah (*M. rosenbergii*) berdasarkan modifikasi Rogers (1972)

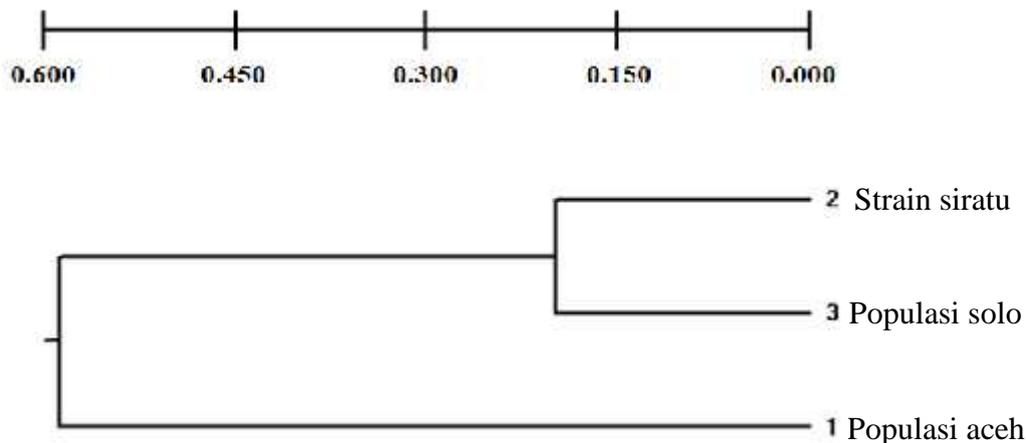
Populasi	Aceh	Siratu	Solo
Aceh	-	0,4789	0,6170
Siratu	0,4789	-	0,1558
Solo	0,6170	0,1558	-

Informasi jarak genetik dapat dijadikan dasar untuk menentukan individu ataupun populasi yang akan dipilih sebagai materi persilangan. Menurut Rahayu (2010) yang menyatakan bahwa semakin jauh (tinggi) jarak genetik suatu populasi maka memiliki efek heterosis yang tinggi apabila disilangkan.

Ilustrasi dendogram memberikan informasi kekerabatan ketiga populasi udang galah. Hasil analisis menunjukkan adanya perstrukturasi genetik sebagai gambaran pemisahan populasi menjadi dua unit, yaitu populasi aceh dan populasi siratu-solo. Data jarak genetik yang dipetakan menggunakan program UPGMA menunjukkan bahwa strain siratu dan populasi solo berada dalam satu *cluster*, sedangkan pada populasi aceh berbeda *cluster*. Dendogram jarak genetik menunjukkan bahwa strain siratu dan populasi solo memiliki tingkat kekerabatan yang lebih dekat, yaitu 0,1558.

Pola kekerabatan suatu populasi diduga terjadi karena adanya penyebaran dan proses migrasi (*gene flow*). Sebagaimana

yang dikatakan oleh Simmon *et al.* (2006), *gene flow* atau migrasi merupakan suatu proses perpindahan gen antarpopulasi. Perpindahan gen antarpopulasi ini dapat disebabkan oleh perpindahan individu atau populasi dari habitat populasi solo ke habitat populasi siratu atau sebaliknya akibat campur tangan manusia atau secara alami akibat dari lokasi habitat kedua populasi ini yang berdekatan.



Gambar 5. Dendrogram jarak genetik 3 varietas udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) berdasarkan program UPGMA pada sekuens mtDNA COI.

Keragaman Genetik mtDNA 16S rDNA Udang Galah

Keragaman haplotipe Udang Galah Menggunakan Gen 16S rDNA

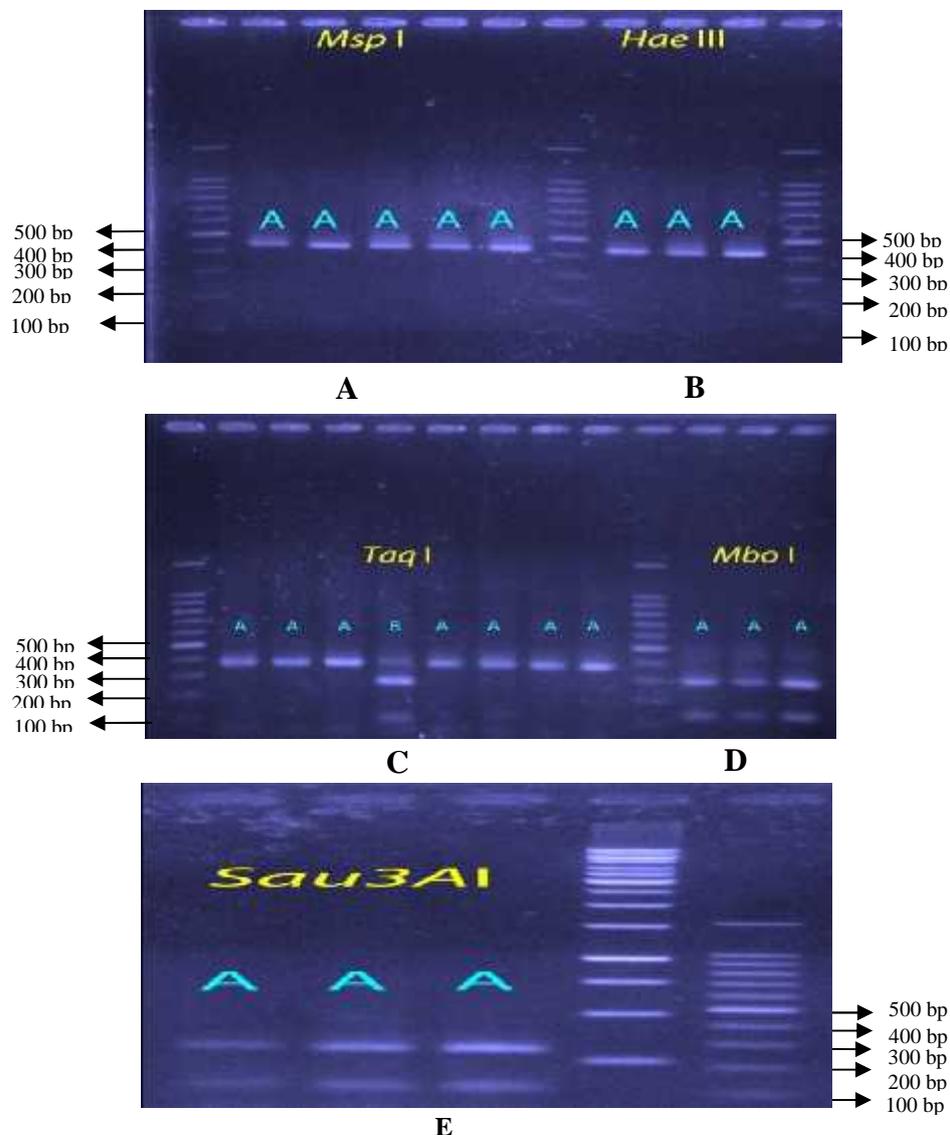
Hasil restriksi (Gambar 6) menunjukkan bahwa enzim *Mbo* I yang mengenali situs pemotongan 4 pasang basa GATC menunjukkan satu pola potongan DNA. Enzim *Msp* I yang mengenali situs pemotongan 4 pasang basa C CGG memberikan satu pola potongan DNA. Enzim *Sau3A* I yang mengenali situs pemotongan 4 pasang basa GT AC memberikan tiga pola potongan DNA. Enzim *Hae* III yang mengenali situs pemotongan 4 pasang basa GATC dan memberikan satu pola potongan DNA, serta enzim *Taq* I yang mengenali 4 situs pasang basa T CGA memberikan pemotongan dua pola potongan DNA. Berdasarkan pada jumlah alel atau potongan yang dijumpai pada masing-

masing enzim restriksi, kelima enzim restriksi mampu memotong DNA tunggal lokus 16S rDNA pada udang galah dengan variatif karena menghasilkan lebih dari satu jenis alel. Enzim restriksi yang paling sensitif mendeteksi perbedaan panjang fragmen yang terpotong adalah enzim *Taq* I yang memiliki dua pola potongan.

Pola monomorfik yang dihasilkan populasi solo dengan satu pola potongan, yaitu (AAAAA) menunjukkan bahwa semua sampel yang diuji mempunyai situs restriksi pada posisi yang sama. Pola monomorfik menunjukkan kemungkinan homozigositas alel-alel pada situs yang dikenali oleh enzim restriksi (Campbell, 2010). Homozigositas menunjukkan

rendahnya variasi urutan DNA dan rendahnya variasi gen yang dimiliki sehingga dapat berdampak buruk terhadap perubahan lingkungan. Rendahnya variasi urutan DNA disebabkan karena terbatasnya jumlah individu sehingga terjadi pembatasan pertukaran gen dan terkait dengan perkawinan sekerabat yang semakin meningkat dan menyebabkan penghanyutan genetik (*genetic drift*).

Namun, homozigositas dalam populasi menandakan bahwa ada sifat khusus dari populasi tersebut yang menyebabkan individu dari populasi mampu bertahan dari seleksi alam yang telah terjadi (Murtidjo, 2001). Pola polimorfik pada populasi aceh dan siratu dengan haplotipe lebih dari dua pola menunjukkan bahwa kedua populasi ini heterozigositas pada sekuens mtDNA 16S rDNA.



Gambar 6. Pola fragmen mtDNA COI pada elektroforesis gel
 Keterangan : A= enzim *Msp I*; B= enzim *Hae III*; C= enzim *Taq I*; D= enzim *Mbo I*; E=enzim *Sau3A I*

Berdasarkan hasil restriksi diperoleh 2 macam komposit haplotipe mtDNA 16S rDNA *region*. Ukuran fragmen mtDNA

udang galah yang direstriksi dengan enzim *Mbo I*, *Msp I*, *Sau3A I*, *Hae III*, dan *Taq I* disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Tipe digesti dan ukuran fragmen mtDNA udang galah yang direstriksi dengan enzim *Mbo I*, *Msp I*, *Sau3A I*, *Hae III*, dan *Taq I*

Jenis enzim restriksi				
<i>Mbo I</i>	<i>Msp I</i>	<i>Sau3A I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Taq I</i>
(A)	(A)	(A)	(A)	(A)
300+144 (444 bp)	444 bp	300+140 (444 bp)	444 bp	384+60 (444 bp)
				(B)
				320+120 (444 bp)

Keterangan : A dan B menunjukkan pola potongan (restriksi)

Komposit haplotipe mtDNA 16S rDNA yang dihasilkan sebanyak 2 macam, diantaranya 2 tipe komposit haplotipe ditemui pada populasi aceh dengan frekuensi berkisar dari 0,4 hingga 0,6, kemudian 2 tipe haplotipe ditemui pada populasi siratu dengan kisaran frekuensi haplotipe 0,033 hingga 0,967, serta tipe komposit haplotipe terendah ditemui pada populasi solo yaitu 1 (AAAAA) dengan kisaran frekuensi haplotipe 0,033 hingga 0,367 (Tabel 6). Pola potongan yang dominan pada populasi aceh, siratu, dan solo adalah AAAAA dengan komposit berturut-turut 18, 29, dan 30 sampel. Sebaliknya, pola potongan yang tidak dominan dari ketiga populasi ini yaitu AAAAB dengan komposisi berturut-turut adalah 12, 1, dan 0 sampel.

Keragaman haplotipe tertinggi ditemui pada populasi aceh dengan nilai 0,488, populasi siratu 0,066, dan terendah pada populasi solo dengan nilai 0 (Tabel 6). Rendahnya keragaman haplotipe pada populasi solo menunjukkan bahwa populasi ini memiliki keragaman genetik yang rendah. Tingkat keragaman haplotipe ketiga populasi menggunakan penanda mtDNA 16S rDNA Keragaman haplotipe udang galah menggunakan mtDNA 16S rDNA lebih tinggi jika dibandingkan dengan keragamana haplotipe daerah mtDNA 16S rDNA yang dilakukan pada udang windu (*Panaeus monodon*) dimana hanya 1 enzim restriksi yang menunjukkan pola pemotongan dengan keragaman haplotipe sebesar 0,0422 (Prastowo *et al.*, 2009).

Tabel 6. Keragaman haplotipe dari 3 varietas udang galah dari mtDNA 16S rDNA

No.	Haplotipe	Aceh		Siratu		Solo	
		n	F	N	f	n	f
1	AAAAA	18	0,6	29	0,967	30	1
2	AAAAB	12	0,4	1	0,033		
Jumlah sampel		30		30		30	
Jumlah haplotipe		2		2		1	
Keragaman haplotipe		0,488		0,066		0	

Keterangan :

n : jumlah sampel

f : frekuensi haplotipe

Tingkat keragaman genetik dari jumlah maupun keragaman haplotipe pada udang galah yang diamati pada sekuens mtDNA 16S rDNA lebih rendah dibandingkan dengan keragaman haplotipe pada sekuens mtDNA COI. Perbedaan yang signifikan ini menyebabkan sekuens 16S rDNA tidak cukup baik dibandingkan sekuens COI sebagai penanda molekuler dalam menentukan keragaman genetik. Hal ini diduga karena laju mutasi mtDNA COI yang lebih tinggi dari laju mutasi mtDNA 16S rDNA. Menurut Hebert *et al.*, (2003a) *region* COI memiliki laju mutasi yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan laju mutasi dua gen mitokondria lain seperti 12S dan 16S rDNA. Laju mutasi COI yang lebih tinggi mengakibatkan gen ini mampu memperlihatkan perbedaan antarpopulasi atau bahkan antarindividu dalam satu spesies (Bucklin *et al.*, 2003).

Jarak Genetik mtDNA 16S rDNA Udang Galah

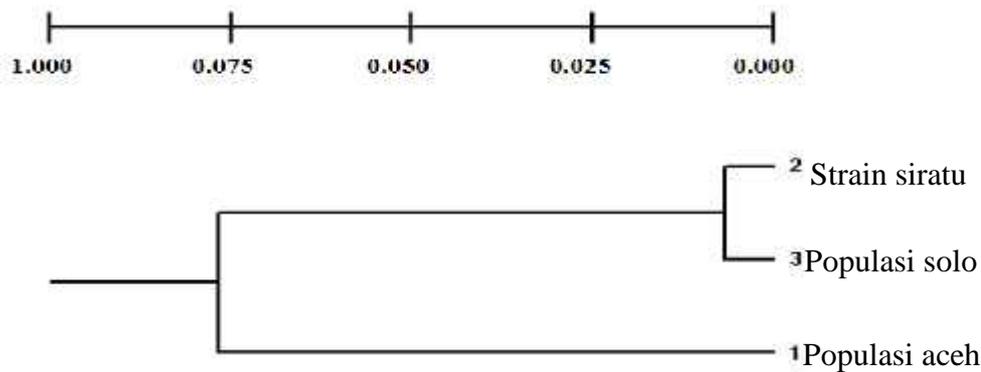
Hasil jarak genetik menunjukkan bahwa populasi solo-siratu memiliki jarak genetik yang terkecil yaitu 0,0067 (Tabel 7). Adapun jarak genetik populasi solo-aceh lebih besar dibandingkan jarak genetik antara populasi siratu-solo. Menurut Nugroho *et al.* (2006) jarak genetik menunjukkan nilai kekerabatan. Semakin kecil jarak genetik maka akan semakin banyak kemiripan populasi tersebut. Letak geografis antara Sungai Bengawan Solo dengan Pelabuhan Ratu diduga berkontribusi terhadap nilai jarak genetik. Jarak anatar kedua lokasi ini yang berdekatan terjadinya perpindahan populasi solo menuju habitat populasi aceh atau sebaliknya yang mungkin terjadi akibat campur tangan manusia atau secara alami. Hal ini diduga mengakibatkan persilangan antara kedua populasi ini yang menyebabkan terjadinya *gene flow* atau perpindahan gen antarpopulasi, sehingga terjadi kemiripan secara genetik.

Tabel 7. Jarak genetik mtDNA 16S rDNA 3 varietas udang galah (*M. rosenbergii*) berdasarkan modifikasi Rogers (1972).

Populasi	Aceh	Siratu	Solo
Aceh			
Siratu	0,0733		
Solo	0,0800	0,0067	

Data jarak genetik yang dipetakan menunjukkan populasi solo dengan populasi siratu berada pada satu *cluster* (Gambar 7). Kedua populasi ini berada pada satu *cluster* diduga karena memiliki nilai jarak genetik yang terdekat dibandingkan dengan kekerabatan antara strain siratu dengan populasi aceh. Pola

kekerabatan suatu populasi diduga terjadi karena adanya penyebaran dan proses migrasi strain siratu menuju habitat populasi solo atau sebaliknya yang menyebabkan perpindahan gen (*gene flow*) diduga akibat persilangan antarpopulasi tersebut.



Gambar 7. Dendrogram jarak genetik 3 varietas udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) pada sekuens mtDNA 16S rDNA.

KESIMPULAN

Keragaman genetik udang galah berdasarkan keragaman haplotipe mtDNA COI populasi aceh, strain siratu, dan populasi solo berturut-turut adalah 0,836, 0,829, dan 0,517. Adapun keragaman haplotipe mtDNA 16S rDNA populasi

aceh, strain siratu, dan populasi solo berturut-turut adalah 0,488, 0,066, dan 0. Jarak genetik berdasarkan mtDNA COI dan 16S rDNA yang tertinggi yaitu populasi aceh dengan populasi solo dengan nilai berturut-turut 0, 6170 dan 0,0800.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Pusat Teknologi Produksi Pertanian (PTPP), Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong. yang telah mendukung dan memfasilitasi kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Calvarlho, G. R., dan Pitcher, T. J. (1995). *Molecular Genetics in Fisheries*. Chapman & Hall, Inc. London. 141Hal.
- Campbell, N. A., dan Reece, J. B. (2002). *Biologi Edisi Kelima Jilid 1*. Erlangga, Jakarta. 295 Hal.
- Cifti, Y. dan I. Okumus. (2002). Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I-Basic Principles of Fish Population Genetics. *Journal. Fisheries and Aquatic Sciences*, Turkish. Hal 145-155.
- Fahri, S. (2002). Keragaman Genetik Ikan terbang, *Cyprinus opisthopterus* di Perairan Teluk Mandar, Teluk Manado dan teluk Tomini Sulawesi. *Tesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Hal 14-17.
- FAO. (2011). *Culture Aquatic Species Information Programme Macrobrachium rosenbergii (de Man, 1879)*. Food Agriculture Organization of the United Nations: Fisheries and Aquaculture Department. Hal 1-3.
- Haryanti, S.B., Permana, G.N., Susanto, B. (2005). Karakteristik Genetik Induk Rajungan, *Portunus pelagicus* dari beberapa perairan Melalui Analisis RFLP mtDNA. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Hal 57-62.
- Khasani, I., Imron, dan Iswanto, B. (2010). *Standar Operasional Budidaya Udang Galah Guna Mendukung Pemuliaan*. Sukamandi: Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Badan Riset Kelautan dan Perikanan. 5 Hal.
- Kilawati. (2006). *Studi Molekuler: Diversitas Genetik Udang Putih (Penaeus vannamei) dan Udang Windu (Penaeus monodon)*. Malang, Jawa Timur.: Fakultas Perikanan UNIBRAW. 214 Hal.
- KKP. (2014). *Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. Nomor 23/Kepmen-KP/2014 tentang Pelepasan Udang Galah GI Macro II*. Kementrian Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 7 Hal.
- KKP. (2015). *Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 25 /Kepmen-KP/2015 tentang Pelepasan Udang Galah Siratu*. Kementrian Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 7 Hal.
- KKP. (2015). *Statistik Perikanan Budidaya Indonesia (Indonesian aquaculture Statistics) 2014*. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Kementrian Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Leary, R.F., F.W. Allendorf, and K.L. Knudsen. (1985). *Development instability and high meristic counts in interspecific hybrid of salmonid fishes*. *Evolution*. 1326 Hal.
- Liu, M.Y., Cai, Y.X. dan Tzeng, C.S. (2007). Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian Species. *J. Zoological Studies*. Hal 272-289.

- Mandyasa, I. W. G. (2007). Studi Keragaman Genetika Populasi Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii*) Berdasarkan Polimorfisme Mitokondria DNA. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 47 Hal.
- Murtidjo, B. A. (1992). *Budidaya Udang Galah Sistem Monokultur*. Kanisius, Yogyakarta : 121 Hal.
- Nei M dan Tajima F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Journal Genetics*. Hal 146 – 163.
- Nugroho, E. (1997). Practical Manual on Detection of DNA Polymorphism in Fish Population Study. *Bulletin of Marine Science and Fisheries No.17/1997*. 109 Hal.
- Nugroho, E. (2001). Population genetic studies on the aquaculture fish in genus *Seriola* for teir risk management. *PhD Thesis*, Tohoku University. Hal 123.
- Nugroho, E. Subagja, J., dan Kurniasih, T. (2006). Evaluasi Keragaman Genetik Ikan Kancra dengan Menggunakan Marker mtDNA D-Loop dan RAPD. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Hal 211-217.
- Prastowo, B. W., Rahardianti, R., Nur, E. M., dan Arief Taslihan. 2009. Profil Heterogenitas Genetik Induk Udang Windu (*Penaeus monodon*) Turunan F1 Melalui Analisis DNA Mitokondria-RFLP dan RAPD. *Skripsi*. Hal 25-30.
- Putri, R. 2013. Identifikasi keragaman gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) DNA Mitokondria pada ayam lokal Indonesia. *Skripsi*. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan. IPB. 25 Hal.
- Rogers, J.S. (1972). *Measures of genetic similarity and genetic distance*. In *Studies in Genetics VII*. University of Texas Publication No. 7213. Austin. 154 Hal.
- Sanbrook, J dan Russel, D. (2001). *Molecular Cloning Third Edition*. New York: CSHL Press. 1936 Hal.
- Shen, X., Ren, J., Cui, Z., Sha, Z., Wang, B., dan Xiang, J., B. (2007). *The complete mitochondrial genome of two common shrimps (litopenaeus vannamei and Fenneropenaeus chinensis) and their phylogenomic considerations*. 403Hal.
- Simmons M, Mickett K, Kucuktas H, Li P, Dunham R, dan Luiz Z. (2006). *Fish Molecular Genetic and Biotechnology Laboratory*. 203 Swingle Hall, Department of Fisheries and Allied Aquacultures and Program of Cell and Molecular Biosciences. Aquatic Genomic Unit, Auburn University, Auburn. AL 36894. USA. 146 Hal.
- Soewardi, K. (2007). *Pengelolaan Keragaman Genetik Sumberdaya Perikanan dan Kelautan*. Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bogor. 90Hal.
- Tarwinangsih, A., Farajallah, C., Sumantri, dan E, Andreas. (2011). Analisis Keragaman Genetik Kerbau Lokal (*Bubalus bubalis*) berdasarkan Haplotipe DNA Mitokondria. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner*. Hal 59-67.
- Wilson, K., Cahill, V., Ballment, E., Benzie, J. (2000). *The Complete Sequece of The Mitochondrial Genome of The Crustacean Panaeus monodon : are Malacostracan Crustacean More Clesely Related to Insects than to Branchiopods*. *Mol. Biol. Evol.* Hal 6.