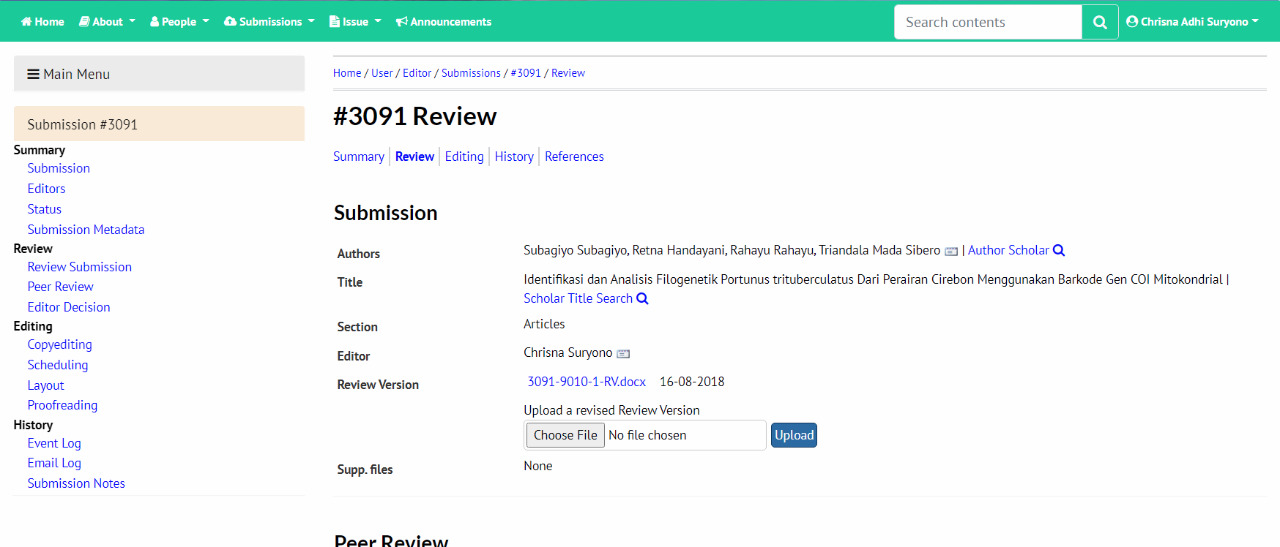
KORESPONDENSI PAPER

Judul : Identifikasi dan analisis filogenetik rajungan (*Portunus trituberculatus*) dari perairan

Cirebon menggunakan barkode gen cytochrome c oxidase subunit I (COI) mitokondrial

Jurnal : Jurnal Kelautan Tropis

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| No | AKTIVITAS | TANGGAL | KETERANGAN | HALAMAN |
| 1 | Pengiriman/ mengunggah artikel | 16 Agustus 2018 | Artikel telah berhasil disubmit di jurnal JKT | 1-12 |
| 2 | Comment | 1 Oktober 2018 | Email : Keputusan perlu revisi minor untuk 3091-9010-1-RV | 13-25 |
| 3 | Pengiriman/ menggunggah revisi artikel | 20 Oktober 2018 | Email : pengiriman naskah revisi artikel 3091-9010-1-RV | 26-30 |



Identifikasi dan analisis filogenetik rajungan (*Portunus trituberculatus*) dari perairan Cirebon menggunakan barkode gen cytochrome c oxidase subunit I (COI) mitokondrial

Subagiyo1), Ch. **Retna** Handayani2), Rahayu2)

1. Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedharto SH, Kamous Undip Tembalang, Semarang 50275

1. Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau

Jalan Cik Lanag Bulu Jepara 59418

Email: subagiyo,kelautan13@gmail.com

Abstract

*Trituberous Portunus* crab specimens from Cirebon waters were successfully identified using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI) genes. Analysis of haplotype distribution with *Portunus trituberculatus* from China, Korea, India and the Philippines obtained from NCBI gene banks obtained 17 haplotypes from 25 specimens, with haploid diversity 0.943 + 0.031 and nucleotide diversity 0.04821 + 0.0139. The Cirebon specimen is a haplotype separate from the others. The results of phylogenetic studies showed 25 specimens clustered into 3 different lineages with a genetic distance of 12.76%, 14.24% and 14.33%. The genetic distance within each lineage group ranges from 0 - 2.92%. The Cirebon crab specimen is in the same lineage as the Philippine specimen with 1% genetic distance.

Keyword : crab, *Trituberous Portunus,*  barcoding, gen COI

Abstrak

Specimen rajungan *Portunus trituberculatus* dari perairan Cirebon berhasil di identifikasi menggunakan gen mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI). Analisis distribusi haplotype dengan data *P trituberculatus* yang berasal dari China, Korea, India dan Filipina yang didapat dari genebank NCBI didapatkan 17 haplotipe dari 25 spesimen, dengan keragaman haploid 0,943 +0.031 dan keragaman nukleotida 0,04821+0.0139. Spesimen Cirebon merupakan haplotype yang terpisah dari yang lainnya. Hasil kajian filogenetik menunjukkan 25 spesimen mengelompok ke dalam 3 garis keturunan yang berbeda dengan jarak genetik 12,76 %, 14,24 % dan 14,33 %. Jarak genetic didalam masing-masing kelompok garis keturunan berkisar antara 0 – 2,92 %. Spesimen rajungan Cirebon berada pada garis keturunan yang sama dengan specimen Filipina dengan jarak genetic 1%. .

Kata kunci : rajungan, *Portunus pelagicus,* barcoding, gen COI

**Pendahuluan**

*P. trituberculatus* dikenal dengan nama lain *gazami crab, Japanese blue crab* atau *horse crab*. Spesies ini memiliki distribusi geografis di Samudera Hindia dan Samudera Pasifik Barat: Asia Tenggara dan Timur (dari Jepang, Korea, Cina dan Formosa dan Teluk Bengala), ke Barat, Utara dan Timur Australia (http://www.fao.org/fishery/species/2630/en). Menurut Liu et al (2013) *P. trityberculatus* merupakan kelompok perikanan tangkap terbesar di dunia (menempati sekitar seperempat tangkapan komersial di seluruh dunia). Sebagian besar dari total tangkapan kepiting ini (∼95%) terjadi di Cina di tiga daerah penangkapan utama: Laut Cina Timur, Laut Kuning, dan Laut Bohai. Di Indonesia data mengenai spesies ini sangat jarang. Irawan & Soegianto (2006) melaporkan bahwa *P. trituberculatus* merupakan spesies yang jarang ditemukan.

*P. trituberculatus*  secara umum memiliki penampilan yang mirip dengan *Portunus pelagicus*. *P. trituberculatus* dibedakan dari P. pelagicus karena memiliki 3 gigi frontal (4 di *P. pelagicus*) dan memiliki 4 duri di merus cheliped (3 di *P. pelagicus*) (http://www.fao.org/fishery/species/2630/en). Sehingga dapat dengan mudah diidentifikasi secara fenotipik. Akan tetapi metode berbasis fenotipik ini tidak mampu untuk membedakan variasi intraspesies yang terjadi atau diferensiasi genetic antar inidividu dalam populasi. Salah satu pendekatan yang ditawarkan untuk ini adalah DNA barcoding. Pada penelitian ini *P trituberculatus* tertangkap di perairan Cirebon pada tahun 2016. Data barcoding *P trituberculatus* di Indonesia masih belum ada. Oleh karena itu specimen yang tertangkap ini dilakukan analisis barcoding dan membandingkannya dengan data spesies yang sama yang ada di database BOLD system dan gene bank NCBI. DNA barcoding merupakan alat yang kuat untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasikan spesies (Shen *et al,* 2013). Marka gen DNA mitokondria yang mengkodekan gen sitokrom oksidase (COI) umum digunakan untuk barkoding. Variasi intraspesifik biasanya kurang dari 2,0% dan dalam banyak kasus kurang dari 1,0% (Shen *et al,* 2013). Penggunaan gen COI sebagai marka untuk barcoding dan identifikasi jenis-jenis kepiting telah memberikan banyak hasil seperti *Portunus sanguinolentus*, *Charybdis natator,* *P. pelagicus* and *P.trituberculatus,* dan *Travancoriana napaea* (Umamaheswari *et al,* 2016), fiddler crabs *Uca annulipes* dan *U. perplexa* (Abbas *et al,* 2016). Selain itu DNA barcoding juga digunakan untuk studi keragaman genetic *Portunus pelagicus* (Klinbunga, *et al,* 2010 ; Sienes *et al,* 2014 ‘ Ren *et al,* 2017), *P. trituberculatus* (Guo *et al*, 2012), *Portunus sanguinolentus* (Naz *et al*, 2016; Ren *et al,* 2017). Pada penelitian ini DNA barcode juga digunakan untuk mengevaluasi perbedaan intraspesifik dari berbagai lokasi tangkap di dunia yang datanya diperoleh dari gene bank (NCBI) yang selanjutnya digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan jalur keturunannya. Penelitian mengenai filogenetik rajungan menggunakan gene penanda COI juga telah berhasil dilakukan (Mantelatto *et al*, 2007 ; Fujaya, *et al,* 2016).

ﬁddler crabs

Uca annulipes

and

U. perplexa

ﬁddler crabs

Uca annulipes

and

U. perplexa

**Materi dan metode**

Spesimen rajungan diperoleh dari tangkapan nelayan Cirebon yang melakukan kegiatan penangkapan di perairan Cirebon (*one day fishing).* Spesimen yang diperoleh langsung diidentifikasi secara fenotipik dan diambil bagian capit kemudian diawetkan menggunakan ethanol 96 % sampai dilakukan analisis molekular.

**Ekstraksi DNA**

DNA genom rajungan diekstraksi menggunakan Chelex 5%. Sampel capit depan rajungan diambil bagian ototnya menggunakan pinset steril dan dihancurkan dengan mortar dalam lumpang porselin. Homegenat yang diperoleh ditambahkan buffer TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris: pH 8.0), dihomogenkan dan dibiarkan selama 15 menit pada suhu ruangan. Suspensi homogenate ini disnetrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm untuk mendapatkan massa sel. Massa sel yang diperoleh kemudian ditambahkan Chelex 5 % dan proteinase K selanjutnya divortex. Suspensi sel ini diinkubasi pada suhu 56 °C selama 15-30 menit, Selanjutnya di masukkan ke dalam penangas air yang mendidih selama 8 menit. DNA genom diperoleh dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit. Debris sel mengendap dan DNA ada di supernatant.

**Amplifikasi dan sekuensing**

Amplifikasi gen COI menggunakan kit PCR dan pasangan primer universal gen COI :

LCOI 1490-5’-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’

HCOI 2198-5’-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’.

Amplifikasi dilakukan pada *Hotstart* 94 oC (5 menit), denaturasi 94 oC (5 menit) diikuti 35 siklus 94 oC (1 menit), annealing 56 oC 1 menit, ekstensi 72 oC (1.5 menit) dan ekstensi akhir 72 oC (5 menit) serta Hold 12 oC. Kegiatan amplifikasi ini dilakukan di laboratorium Hasil amplifikasi gen COI di sekusing melalui Genetika Science Indonesia.

**Analisis data**

Sekuens gen COI dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA 5.20 meliputi edit/aligment menggunakan ClustalW. Sekuens diidentifikasi menggunakan BOLD system (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS\_OpenIdEngine) dan BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Analisis filogenetika dilakukan dengan perangkat lunak MEGA 5.2 menggunakan metode statistic Neighbor-joining (NJ) dan Maximum Likelihood (ML). Test phylogeny dengan bootstrap methods, dan model Kimura 2-parameter. Jarak genetic, dihitung menggunakan fasilitas yang ada di MEGA 5.2. Data yang digunakan dalam rekonstruksi filogenetika meliputi specimen rajungan *P. trituberculatus* yang diperoleh dari perairan Cirebon dan data FASTA gen COI specimen rajungan *P. trituberculatus* yang diperoleh dari database NCBI (Tabel 1). Analisis haplotype dan polymorphisme dilakukan menggunakan perangkat lunak DnaSP v 5

Tabel 1. Data fasta sekuens gen COI spesimen rajungan *P. pelagicus* yang diambil dari database NCBI untuk rekonstruksi filogenetik

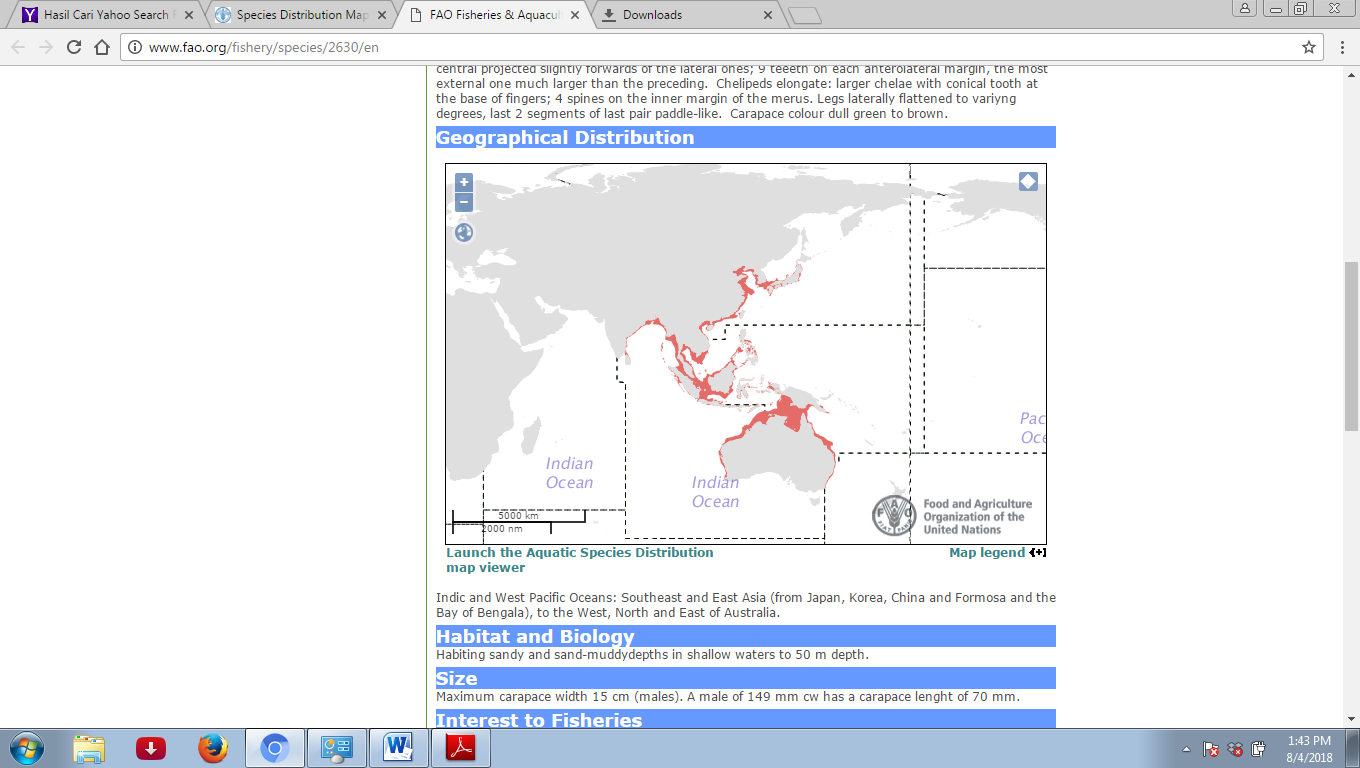
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Spesimen** | **Asal spesimen** | **Acc.number** |
| *P. trituberculatus* voucher CrP10 | Philippines: Pangasinan, Region 1 | KF604898.1 |
| *P. trituberculatus* voucher CrP12 | Philippines: Pangasinan, Region 1 | KF604899.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306720 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976344.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306725 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976352.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306722 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976349.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306727 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976354.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306728 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976355.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306729 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976356.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306733 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976343.1 |
| *P. trituberculatus* isolate De172910-1-1 | Korea | JX502944.1 |
| *P. trituberculatus* voucher CASMBGM-1PR | Tamil Nadu, India | MG753565.1 |
| *P. trituberculatus* voucher CASMBGM-PR3 | Tamil Nadu, India | MG753567.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr2 | China | GQ180780.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr3 | China | GQ180781.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr4 | China | GQ180782.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr5 | China | GQ180783.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 1 | China | GU321229.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 15 | China | GU321240.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 16 | China | GU321241.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 18 | China | GU321243.1 |

**Hasil dan pembahasan**

Hasil identifikasi specimen rajungan CR 2 yang ditangkap di perairan Cirebon menggunakan barcoding bold system menunjukkan sebagai spesies *P. trituberculatus* dengan nilai kesamaan sebesar 99.67 % demikian juga menggunakan analisis BLAST NCBI menunjukkan identic dengan *P. trituberculatus* sebesar 99% (Tabel 2). Berdasarkan tingkat similaritas dan identity yang sangat tinggi ( ≥ 99% ) menunjukkan bahwa DNA barcoding berdasarkan gen cytochrome c oxidase I (COI) mitokondrial dapat digunakan untuk identifikasi specimen rajungan CR2. Hal ini sesuai dengan Hebert et al. (2003) bahwa DNA barcoding menggunakan fragmen pendek mitokondria merupakan alat yang efektif untuk diagnosis spesies. Informasi mengenai *P trituberculatus* di Indonesia sangat sedikit sekali. Menurut FAO (2018) perairan Indonesia merupakan daerah distribusi jenis rajungan ini (Gambar 1).

Tabel 2. Hasil identifikasi menggunakan BOLD system dan analisis blast NCBI

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Spesimen | Similaritas | Spesies | Max score | Query cover | Identity | Spesies | Accession |
| CR2 | 99.67 % | *Portunus trituberculatus* | 1094 | 100 % | 99 % | *Portunus trituberculatus* | KF604898 |



Gambar 1. Distribusi geografi *P trituberculatus*

: pasti : tidak pasti : area tangkapan FAO

Sumber : http://www.fao.org/fishery/species/2630/en.

Analisis filogenetik menggunakan data gen COI *P. trituberculatus* yang ada di database NCBI ( 21 dari China, 1 dari Korea, 2 dari India ) dan 1 specimen yang berasal dari tangkapan di perairan Cirebon menggunakan Neighbor-joining (NJ) methods (Saitou & Nei 1987) dan Maximum Likelihood method (ML) menggunakan model Kimura 2-parameter Kimura M. (1980) dengan *bootstrap* 1000 kali ( Felsenstein 1985) dengan menunjukkan secara konsistensi pola garis keturunan yang sama (Gambar 2 dan Gambar 3). Penggunaan 2 spesies *out group* yaitu *Octopus vulgaris* (accession FN24381.1) dan *Uroteuthis duvauceli* (accession KC951889.1) pada pohon filogenetik menggambarkan semua garis percabangan *P. trituberculatus* berasal dari ancestor yang sama. Hal ini menunjukkan garis keturunan monofiletik (Baum *et al,* 2008). Berdasarkan hasil analisis filogenetik dengan 2 metode ini semua data set mengelompok ke dalam 3 garis keturunan (lineage) yang berbeda yang berasal dari 1 ancestor yang sama. Pengelompokan ini didukung dengan nilai bootstrap sebesar 81 – 100 %. Spesimen yang berasal dari China dan Korea berada dalam 1 lineage yang sama (lineage A), specimen India berada dalam 1 lineage yang sama (lineage B) dan specimen Filipina dan Cirebon berada dalam 1 lineage yang sama (lineage C). Pengelompokan ke dalam 3 garis keturunan ini juga diperkuat oleh analisis jarak genetic antar kelompok garis keturunan (Tabel 3). Jarak genetic antara lineage A dan B sebesar 12,76 %, antara A dan C sebesar 14,24 % dan antara B dan C sebesar 14,33 %. Sedangkan jarak genetic intralineage antara 0 – 2,92 %. Spesimen Cirebon karena berada dalam lineage yang sama dengan specimen Filipina menunjukkan adanya hubungan kekeraban yang dekat terutama dengan specimen KF604898.1. Hal ini diukung dengan nilai bootstrap sebesar 100 %. Kedekatan ini juga ditunjukkan oleh jarak genetic antara specimen Filipina KF604898.1 dengan specimen Cirebon sebesar 1%.

Tabel 3. Jarak genetic tiga garis keturunan *P. trituberculatus*. Diagonal kekanan merupakan nilai jarak genetic intra garis keturunan, nilai dibawah diagonal merupakan jarak genetic inter garis keturunan. Nilai diatas diagonal adalah standard deviasi jarak genetic inter garis keturunan

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lineage C | 0,0292 | 0,0155 | 0,0149 |
| Lineage A | 0,1424 | 0,0046 | 0,0158 |
| Lineage B | 0,1276 | 0,1433 | 0 |



*Lineage B P.trituberculatus*

*Lineage A P.trituberculatus*

*Lineage C P.trituberculatus*

Gambar 2. Analisis hubungan filogenetika diantara *P. trituberculatus* berdasarlan gen COI sepanjang 602 bp dengan metode Neighbor-Joining (model Kimura-2 parameter). Bootstrap (1000 replikan). Analisis dilakukan di MEGA 5.2.



*Lineage A P.trituberculatus*

*Lineage B P.trituberculatus*

*Lineage C P.trituberculatus*

Gambar 3. Analisis hubungan filogenetika berdasarlan gen COI pada 25 sekuens *P. trituberculatus* dengan metode Maximum Likelihood dengan model Kimura 2-parameter. Bootstrap (1000 replikan). Analisis dilakukan di MEGA 5.2.

Hasil analisis haplotype menggunakan DnaSP v 5 menunjukkan bahwa pada lienage A terdapat 20 sekuens yang terdistribusi kedalam 13 haplotipe, pada lineage B terdapat 2 sekuens yang terdistribusi ke dalam 2 haplotipe dan pada lineage C terdapat 3 sekuens yang terdistribusi ke dalam 3 haplotipe (Tabel 4 ). Keragaman haplotype tertinggi terdapat di lienage C yaitu sebesar 1 dan terendah di lineage B sebesar 0. Keragaman nucleotide tertinggi terjadi di lineage C yaitu sebesar 2,842 % dan terendah di lineage B sebesar 0 (Tabel 5). Analisis keragaman terhadap 25 sekuens menunjukkan semua data tersebar ke dalam 17 haplotype dan spesimen rajungan Cirebon merupakan satu haplotype tersendiri yang terpisah dengan data rajungan lainnya (Tabel 4). Hasil analisis keragaman seluruh data *P. trituberculatus* yang ada teridentifikasi sebanyak 128 situs polimorfik dan jumlah mutasi sebanyak 144, keragaman haploid sebesar 0,943 +0.031 dan keragaman nukleotida sebesar 0,04821+0.0139 (Tabel 6). Kelompok garis keturunan A beranggotakan specimen dari China dan Korea. Hasil penelitian Guo *et al* (2009) terhadap *P.* *trituberculatus* di sepanjang pantai China didapatkan 53 mtDNA haplotypes dari 72 individu dan 102 situs mutasi terdeteksi di 617 bp. Keragaman haplotypic dan keanekaragaman nukleotida berkisar antara 0,733-1,00 dan 0,00759-0,02614. Hasil yang lain didapatkan oleh Xu & Liu (2009) melalui studi menggunakan metode *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLPs) terhadap 213 samples *P.* *trituberculatus* yang diperoleh di 3 area tangkap East China Sea, Yellow Sea, dan Bohai Sea terdistribusi ke dalam 25 haplotypes dengan 22 *variable sites.*

Tabel 4. Distribusi haplotype 25 spesimen *P. trituberculatus.* Jumlah urutan yang digunakan: 25, Wilayah terpilih: 1-615 Jumlah situs: 615, Jumlah total situs (tidak termasuk situs dengan kesenjangan / data yang hilang): 610, Situs dengan kesenjangan penjajaran: tidak dipertimbangkan.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| haplotype | Spesimen | Asal spesimen |
| Hap\_1: 1 | KF604898.1 | Filipina |
| Hap\_2: 1 | KF604899.1 | Filipina |
| Hap\_3: 4 | KP976344.1 KP976349.1 KP976355.1 KP976343.1 | China |
| Hap\_4: 5 | KP976356.1 KP976354.1 KP976352.1 GU321243.1 GQ180779.1 | China |
| Hap\_5: 1 | JX502944.1 | Korea |
| Hap\_6: 2 | MG753567.1 MG753565.1 | India |
| Hap\_7: 1 | GQ180780.1 | China |
| Hap\_8: 1 | GQ180781.1 | China |
| Hap\_9: 1 | GQ180783.1 | China |
| Hap\_10: 1 | GU321241.1 | China |
| Hap\_11: 1 | GU321240.1 | China |
| Hap\_12: 1 | GU321229.1 | China |
| Hap\_13: 1 | CR2\_Cirebon\_Indonesia | Indonesia |
| Hap\_14: 1 | GU321230.1 | China |
| Hap\_15: 1 | GU321244.1 | China |
| Hap\_16: 1 | GU321242.1 | China |
| Hap\_17: 1 | GU321231.1 | China |
|  |  |  |

Tabel 5. Hasil analisis keragaman *P. trituberculatus*  intra garis keturunan

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *Lineage A* | *Lineage B* | *Lineage C* |
| Jumlah sekuens | 20 | 2 | 3 |
| Jumlah segregating sites, S | 20 | 0 | 26 |
| Jumlah haplotypes, h | 13 | 1 | 3 |
| Keragaman Haplotype , Hd | 0,9158 | 0 | 1 |
| Keragaman Nukleotide, Pi | 0.0046 | 0 | 0.02842 |

Tabel 6. Keragaman *P. trituberculatus*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Jumlah sekuen | h | S | Eta | Hd: | Pi |
| 25 | 17 | 128 | 144 | 0,943 +0.031 | 0,04821+0.0139 |

Jumlah haplotypes, h, Jumlah tempat polimorfik (*segregating*), S , Keragaman Haplotype , Hd, Keragaman Nucleotide , Pi dan Jumlah total mutasi , Eta

**Kesimpulan**

DNA barcoding menggunakan gen Cytochrom oxidase sub unit I mitokondrial dapat digunakan untuk identifikasi spesies rajungan. Pada penelitian ini specimen rajungan *P. trituberculatus*, dari perairan Cirebon dapat diidentifikasi secara akurat dengan tingkat similaritas sebesar 99,67 %. Hasil analisis filogenetik dengan 24 spesies yang sama yang berasal dari China, Korea, India dan Filipina (data diambil dari gen bank NCBI) menunjukkan bahwa specimen Cirebon secara genetis masuk ke dalam kelompok garis keturunan yang sama dengan spesies Filipina. Sedangkan berdasarkan analisis distribusi haplotype menunjukkan specimen Cirebon merupakan haplotype tersendiri.

Daftar Pustaka

Abbas E.M., Abdelsalam K.M., Mohammed-Geba K, Ahmed H.O, and Kato M., 2016, Genetic and morphological identification of some crabs from the Gulf of Suez, Northern Red Sea, Egypt, The Egyptian Journal of Aquatic Research, 42, 3:319-329

Apreshgi, K. P., K. V. Dhaneesh, Radhakrishnan T. and Kumar A.B, 2016, DNA barcoding of fiddler crabs Uca annulipes and U. perplexa (Arthropoda, Ocypodidae) from the southwest coast of India, J. Mar. Biol. Ass. India, 58 (1), January-June 2016. doi: 10.6024/jmbai.2016.58.1.1865-13

Baum, D. (2008) Reading a phylogenetic tree: The meaning of monophyletic groups. Nature Education 1(1):190

Guo E, Liu Y, Cui Z, Li X, Cheng Y, Wu X., 2012, Genetic variation and population structure of swimming crab (Portunus trituberculatus) inferred from mitochondrial control region. Mol Biol Rep. 39(2):1453-63. doi: 10.1007/s11033-011-0882-3. .

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270(1512), 313–321. http://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

http://www.fao.org/fishery/species/2630/en

http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/reykjavik/pdf/14Kenchington\_v6\_final.pdf

Irawan, B dan Soegianto, A., 2006, Kekayaan Jenis Portunidae Di Sisi Shipping Line Selat Madura, Berk. Penel. Hayati: 11 (93–96)

Klinbunga, S., Thamniemdeec, N., Yuvanatemiya, V., Khetpu,K., Khamnamtong , B., Menasveta, P., 2010, Species identification of the blue swimming crab Portunus pelagicus in Thai waters using mtDNA and RAPD-derived SCAR markers, Aquaculture 308:S39–S46

Liu, S., Sun, J., Hurtado, L.A., 2013, Genetic differentiation of Portunus trituberculatus, the world’s largestcrab fishery, among its three main fishing areas, Fisheries Research 148: 38– 46. http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2013.08.003

Mantelatto, F.L., Robles, R. and Felder, D.L., 2007,Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus Portunus (Crustacea, Brachyura, Portunidae), Zoological Journal of the Linnean Society, 150, 211–220

Naz, F., Saher, N.U., And Kama, M., 2016, Genetic Diversity Of The Portunus Sanguinolentus (Herbst, 1783) (Decapoda, Brachyura, Portunidae) In Indo West Pacific Region Based On Mitochondrial Dna 16s Gene, Pakistan Journal of Marine Sciences, Vol. 25(1&2), 59-68,

Ren G., Ma H., Ma C., Wang W., Chen W., & Ma L, 2017, Genetic diversity and population structure of Portunus sanguinolentus (Herbst, 1783) revealed by mtDNA COI sequences, Journal Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Sequencing, and Analysis , 28, 5 : 740-746

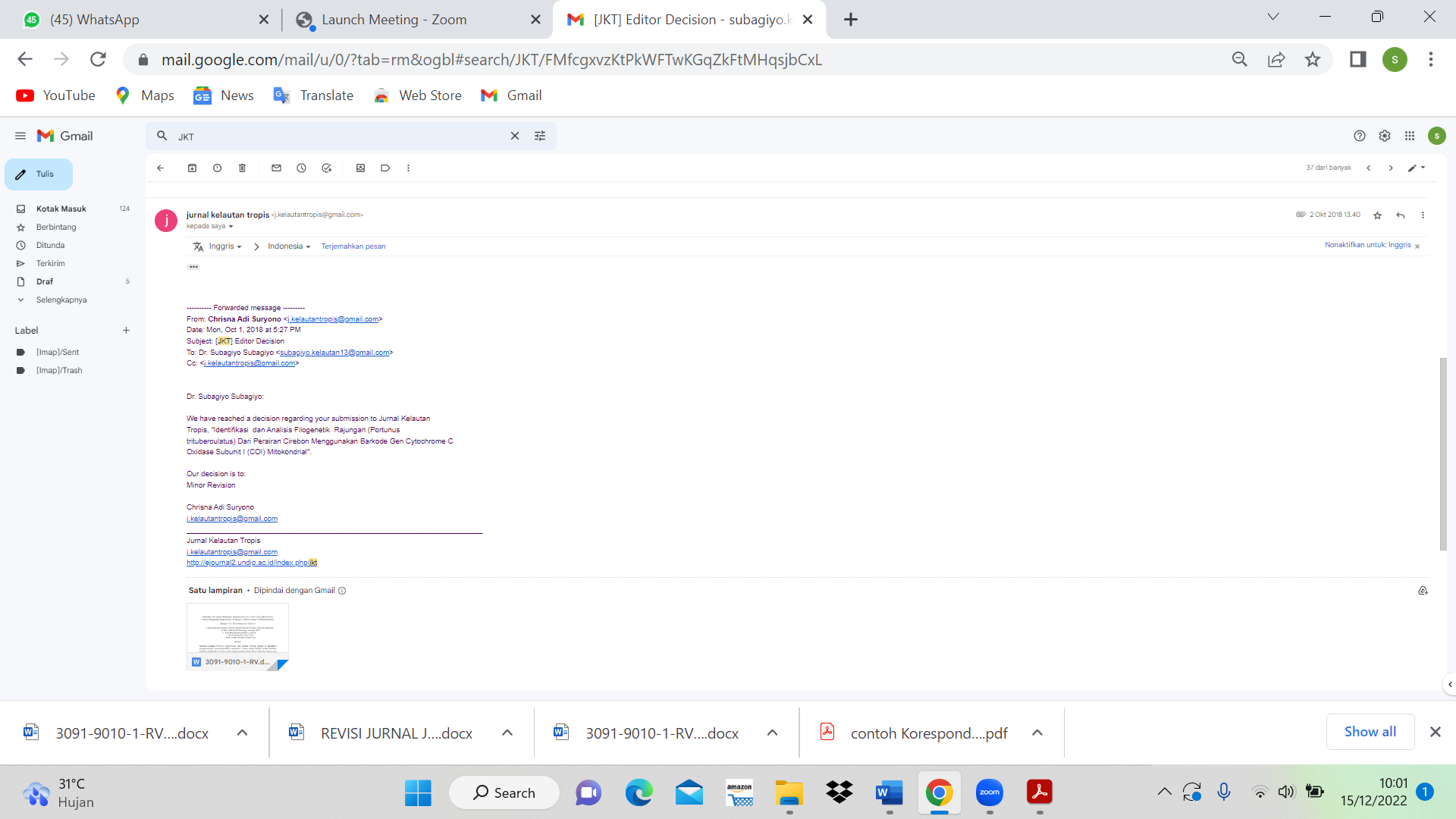
Ren G, Ma H, Ma C, Wang W, Chen W, Ma L., 2017, Genetic diversity and population structure of Portunus sanguinolentus (Herbst, 1783) revealed by mtDNA COI sequences.Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. 28(5):740-746. doi: 10.1080/24701394.2016.1177040.

Ren G1, Ma H1,2, Ma C1, Wang W1, Chen W1, Ma L1.2017, Genetic diversity and population structure of Portunus sanguinolentus (Herbst, 1783) revealed by mtDNA COI sequences, Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. 28(5):740-746. doi: 10.1080/24701394.2016.1177040.

Shen Y-Y, Chen X, Murphy R.W. , 2013, Assessing Dna Barcoding As A Tool For Species Identification And Data Quality Control. Plos One 8(2): E57125. Doi:10.1371/Journal.Pone.0057125

Sienes , P.M.Q, Willette, D.A., Romena , L.R., Alvior , C. G. and Estacion J.S. 2014, Genetic diversity and the discovery of a putative cryptic species within a valued crab fishery, Portunus pelagicus (Linnaeus 1758), in the Philippines, Philippine Science Letters, 7 (2):317-323.

Xu , Q., Liu, R., Liu Y., 2009, Genetic population structure of the swimming crab, Portunus trituberculatus in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 371:121–129. doi:10.1016/j.jembe.2009.01.014



Identifikasi dan Analisis Filogenetik Rajungan (*Portunus trituberculatus*) Dari Perairan Cirebon Menggunakan Barkode Gen Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) Mitokondrial

Subagiyo1), Ch. Retna Handayani2), Rahayu2)

1. Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedharto SH, Tembalang, Semarang 50275

1. Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau

Jalan Cik Lanag Bulu Jepara 59418

Email: subagiyo,kelautan13@gmail.com

Abstrak

Spesimen rajungan *Portunus trituberculatus* dari perairan Cirebon berhasil diidentifikasi menggunakan gen mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI). Analisis distribusi haplotipe dengan data *P trituberculatus* yang berasal dari China, Korea, India dan Filipina yang diperoleh dari data genebank NCBI didapatkan 17 haplotipe dari 25 spesimen, dengan keragaman haploid 0,943 +0.031 dan keragaman nukleotida 0,04821+0.0139. Spesimen Cirebon merupakan haplotipe yang terpisah dari yang lainnya. Hasil kajian filogenetik menunjukkan 25 spesimen mengelompok ke dalam 3 kluster dari 2 garis keturunan yang berbeda dengan jarak genetik berturut turut 12,76 %, 14,24 % dan 14,33 %. Jarak genetik di dalam masing-masing kluster berkisar antara 0 – 2,92 %. Spesimen rajungan Cirebon berada pada garis keturunan dan kluster yang sama dengan spesimen Filipina dengan jarak genetik 1%.

Kata kunci : rajungan, *Portunus trituberculatus* *,* barcoding, gen COI

Abstract

*Portunus trituberculatus* spesimen from Cirebon waters were successfully identified using mitochondrial DNA cytochrome c oxydase subunit I (COI) genes. Analysis of haplotype distribution with *P. trituberculatus* from China, Korea, India and the Philippines obtained from NCBI gene banks obtained 17 haplotypes from 25 specimens, with haploid diversity 0.943 +0.031 and nucleotide diversity 0.04821 + 0.0139. The Cirebon spesimen is a haplotipe separate from the others. The results of phylogenetic studies showed 25 spesimens clustered into 3 cluster in 2 different lineages with a genetic distance respectively 12.76%, 14.24% and 14.33%. The genetic distance within each cluster ranges from 0 - 2.92%. The Cirebon crab specimen is in the same cluster as the Philippine specimen with 1% genetic distance.

Keyword :crab, *Portunus trituberculatus* barcoding, gen COI

**Pendahuluan**

*Portunus. trituberculatus* dikenal dengan nama lain *gazami crab, Japanese blue crab* atau *horse crab*. Spesies ini memiliki distribusi geografis di Samudera Hindia dan Samudera Pasifik Barat: Asia Tenggara dan Timur (dari Jepang, Korea, Cina dan Formosa dan Teluk Bengala), ke Barat, Utara dan Timur Australia (FAO, 2018). Menurut Liu *et al.* (2013) *P. trityberculatus* merupakan hasil perikanan tangkap terbesar di dunia (menempati sekitar seperempat tangkapan komersial di seluruh dunia). Sebagian besar dari total tangkapan kepiting ini (95%) terjadi di Cina di tiga daerah penangkapan utama: Laut Cina Timur, Laut Kuning, dan Laut Bohai. Di Indonesia *P. trituberculatus* merupakan spesies yang jarang ditemukan (Irawan & Soegianto, 2006).

*P. trituberculatus*  secara umum memiliki penampilan yang mirip dengan *Portunus pelagicus*. *P. trituberculatus* dibedakan dari *P. pelagicus* karena memiliki 3 gigi frontal (4 di *P. pelagicus*) dan memiliki 4 duri di merus cheliped (3 di *P. pelagicus*) (FAO (2018), sehingga dapat dengan mudah diidentifikasi secara fenotipik. Selanjutnya untuk mengetahui adanya variasi atau keragaman intraspesik diperlukan pendekatan molelular diantaranya adalah menggunakan urutan gen mtDNA (Habib, *et al.,* 2011) yang dikenal dengan nama *DNA barcoding* (Raupach & Radulovici. 2015). Data *barcoding P trituberculatus* di Indonesia masih belum ada. Oleh karena itu spesimen *P trituberculatus* yang tertangkap di perairan Cirebon pada tahun 2016 ini akan dilakukan analisis barcoding dan membandingkannya dengan data spesies yang sama yang ada di database BOLD (*The Barcode of Life Data*System**)** dan *gene bank* NCBI (*The*National Center for Biotechnology Information).

DNA barcoding merupakan *tool* yang kuat untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasikan spesies (Shen *et al,* 2013). Marka gen DNA mitokondria yang mengkodekan gen sitokrom oksidase (COI) umum digunakan untuk barkoding. Variasi intraspesifik biasanya kurang dari 2,0% dan dalam banyak kasus kurang dari 1,0% (Shen *et al,* 2013). Penggunaan gen COI sebagai marka untuk *barcoding* dan identifikasi jenis-jenis kepiting telah memberikan banyak hasil seperti *Portunus sanguinolentus*, *Charybdis natator, P. pelagicus*, *P.trituberculatus* dan *Travancoriana napaea* (Umamaheswari *et al,* 2016), fiddler crabs *Uca annulipes* dan *U. perplexa* (Abbas *et al,* 2016). Selain itu *DNA barcoding* juga digunakan untuk studi keragaman genetic *Portunus pelagicus* (Klinbunga, *et al,* 2010 ; Sienes *et al,* 2014 ; Ren *etal,* 2017), *P. trituberculatus* (Guo *et al*, 2012), *Portunus sanguinolentus* (Naz *et al*, 2016 ; Ren *et al,* 2017). Pada penelitian ini *DNA barcode* juga digunakan untuk mengevaluasi perbedaan intraspesifik dari berbagai lokasi tangkap di dunia yang datanya diperoleh dari gene bank (NCBI) yang selanjutnya digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan jalur keturunannya. Penelitian mengenai filogenetik rajungan menggunakan gene penanda COI juga telah berhasil dilakukan (Mantelatto*et al*, 2007 ;Fujaya, *et al,* 2016).

ﬁddler crabs

Uca annulipes

and

U. perplexa

ﬁddler crabs

Uca annulipes

and

U. perplexa

**Materi dan metode**

Spesimen rajungan diperoleh dari tangkapan nelayan Cirebon yang melakukan kegiatan penangkapan di perairan Cirebon (*one day fishing). Satu* spesimen yang diperoleh langsung diidentifikasi secara fenotipik dan diambil bagian capit kemudian diawetkan menggunakan ethanol 96 % sampai dilakukan analisis molekular.

**Ekstraksi DNA**

DNA genom rajungan diekstraksi dengan metode menggunakan Chelex 5% menurut Aranishi & Okimoto (2006) yang dimodifikasi. Sampel capit depan rajungan diambil bagian ototnya menggunakan pinset steril dan dihancurkan dengan mortar dalam lumpang porselin. Homegenat yang diperoleh ditambahkan buffer TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris: pH 8.0), dihomogenkan dan dibiarkan selama 15 menit pada suhu ruangan. Suspensi homogenate ini disnetrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm untuk mendapatkan massa sel. Massa sel yang diperoleh kemudian ditambahkan Chelex 5 % dan proteinase K selanjutnya divortex. Suspensi sel ini diinkubasi pada suhu 56 °C selama 15-30 menit, Selanjutnya dimasukkan ke dalam penangas air yang mendidih selama 8 menit. DNA genom diperoleh dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit. Debris sel mengendap dan DNA ada di supernatant.

**Amplifikasi dan sekuensing**

Gen COI diamplifikasi menggunakan kit PCR dan primer universal gen COI : LCOI 1490-5’-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’ dan HCOI 2198-5’-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’ (Gebhardt & Knebelsberger, 2015). Siklus thermal yang digunakan adalah hasil optimasi yang dilakukan di laboratorium manajemen kesehatan hewan akuatik  (MKHA)  Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara**.** Amplifikasi dilakukan pada *Hotstart* 94 oC (5 menit), denaturasi 94 oC (5 menit) diikuti 35 siklus 94 oC (1 menit), annealing 56 oC 1 menit, ekstensi 72 oC (1.5 menit) dan ekstensi akhir 72 oC (5 menit) serta Hold 12 oC. Kegiatan amplifikasi ini dilakukan di laboratorium Hasil amplifikasi gen COI di sekuensing melalui Genetika Science Indonesia.

**Analisis data**

Sekuens gen COI dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA 5.20 meliputi edit/aligment menggunakan ClustalW. Sekuens diidentifikasi menggunakan *BOLD system* (<http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine>) dan BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Analisis filogenetika dilakukan dengan perangkat lunak MEGA 5.2 menggunakan metode statistiK *Neighbor-joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML). *Test phylogeny* dengan *bootstrap methods* dan model Kimura 2-parameter. Jarak genetiK, dihitung menggunakan fasilitas yang ada di MEGA 5.2. Data yang digunakan dalam rekonstruksi filogenetik meliputi spesimen rajungan *P. trituberculatus* yang diperoleh dari perairan Cirebon dan data FASTA gen COI spesimen rajungan *P. trituberculatus* yang diperoleh dari database NCBI (Tabel 1). Analisis haplotipe dan polimorfisme dilakukan menggunakan perangkat lunak DnaSP v 5

Tabel 1. Data fasta sekuens gen COI spesimen rajungan *P. pelagicus* yang diambil dari database NCBI untuk rekonstruksi filogenetik (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

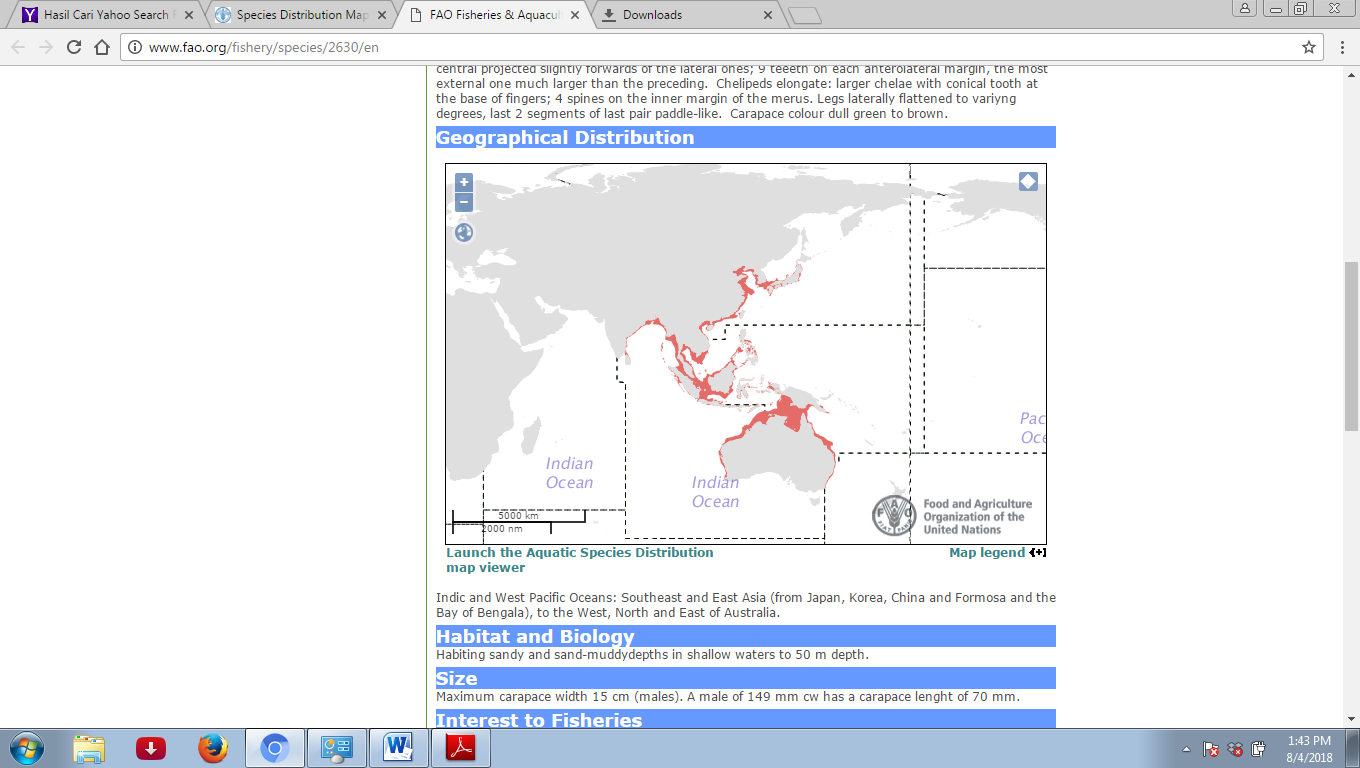
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Spesimen** | **Asal spesimen** | **Acc.number** |
| *P. trituberculatus*voucher CrP10 | Philippines: Pangasinan, Region 1 | KF604898.1 |
| *P. trituberculatus*voucher CrP12 | Philippines: Pangasinan, Region 1 | KF604899.1 |
| *P. trituberculatus*voucher ihb201306720 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976344.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306725 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976352.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306722 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976349.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306727 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976354.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306728 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976355.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306729 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976356.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306733 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976343.1 |
| *P. trituberculatus* isolate De172910-1-1 | Korea | JX502944.1 |
| *P. trituberculatus* voucher CASMBGM-1PR | Tamil Nadu, India | MG753565.1 |
| *P. trituberculatus* voucher CASMBGM-PR3 | Tamil Nadu, India | MG753567.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr2 | China | GQ180780.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr3 | China | GQ180781.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr4 | China | GQ180782.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr5 | China | GQ180783.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 1 | China | GU321229.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 15 | China | GU321240.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 16 | China | GU321241.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 18 | China | GU321243.1 |

**Hasil dan pembahasan**

Hasil identifikasi spesimen rajungan CR 2 yang ditangkap di perairan Cirebon menggunakan *barcoding bold system* menunjukkan sebagai spesies *P. trituberculatus* dengan nilai kesamaan sebesar 99.67% demikian juga menggunakan analisis BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) NCBI menunjukkan kemiripan dengan *P. trituberculatus* sebesar 99% (Tabel 2). Berdasarkan tingkat kesamaan dan identity yang sangat tinggi ( ≥ 99% ) menunjukkan bahwa *DNA barcoding* berdasarkan gen cytochrome c oxidase I (COI) mitokondrial dapat digunakan untuk identifikasi spesimen rajungan CR2. Hal ini sesuai dengan Hebert *et al.* (2003) bahwa *DNA barcoding* menggunakan fragmen pendek mitokondria efektif untuk diagnosis spesies. Informasi mengenai *P trituberculatus* di Indonesia sangat sedikit sekali. Menurut FAO (2018) perairan Indonesia merupakan daerah distribusi jenis rajungan tersebut (Gambar 1).

Tabel 2. Hasil identifikasi menggunakan BOLD system dan analisis blast NCBI

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Spesimen | Similaritas | Spesies | Max score | Query cover | Identity | Spesies | Accession |
| CR2 | 99.67% | *Portunus trituberculatus* | 1094 | 100 % | 99 % | *Portunus trituberculatus* | KF604898 |



Gambar 1. Distribusi geografi *P trituberculatus*

: pasti : tidak pasti : area tangkapan FAO

Sumber : FAO (2018)

Analisis filogenetik menggunakan data gen COI *P. trituberculatus* yang ada di database NCBI (21 dari China, 1 dari Korea, 2 dari India )dan 1 spesimen yang berasal dari tangkapan di perairan Cirebon menggunakan *Neighbor-joining (NJ) methods* (Saitou & Nei 1987) dan *Maximum Likelihood method**(*ML) menggunakan model Kimura 2-parameter Kimura M. (1980)dengan *bootstrap* 1000 kali ( Felsenstein 1985) dengan menunjukkan secara konsistensi pola garis keturunan yang sama (Gambar 2 dan Gambar 3). Penggunaan 2 spesies *out group* yaitu *Octopus vulgaris* (*accession* FN24381.1) dan *Uroteuthis duvauceli* (*accession* KC951889.1) pada pohon filogenetik menggambarkan semua garis percabangan *P. trituberculatus* berasal dari *ancestor* yang sama. Hal ini menunjukkan garis keturunan monofiletik (Baum *et al,* 2008). Berdasarkan hasil analisis filogenetik dengan 2 metode ini semua data set mengelompok kedalam 2 garis keturunan (*lineage*) yang berbeda yang berasal dari 1 *ancestor* yang sama. Pengelompokan ini didukung dengan nilai bootstrap sebesar 81 – 100 %. Spesimen yang berasal dari China dan Korea berada dalam 1 garis keturunan yang sama (*lineage* A), spesimen India, Filipina dan Cirebon berada dalam 1 garis keturunanyang sama (*lineage* B). Selanjutnya garis keturunan B terbagi menjadi 2 klaster yaitu klaster yang terdiri dari specimen India dan klaster yang terdiri dari specimen Filipina dan specimen Cirebon. Pengelompokan ke dalam 3 kluster ini juga diperkuat oleh analisis jarak genetik antar kelompok (Tabel 3). Jarak genetik antara lineage A dan B sebesar 12,76 %, antara A dan B klaster 2 sebesar 14,24 % dan antara B klaster 2 dan B klaster 3 sebesar 14,33 %. Sedangkan jarak genetik *intralineage* antara 0 – 2,92 %. Spesimen Cirebon karena berada di dalam klaster yang sama dengan spesimen Filipina menunjukkan adanya hubungan kekeraban yang dekat terutama dengan spesimen KF604898.1. Hal ini diukung dengan nilai bootstrap sebesar 100 %. Kedekatan ini juga ditunjukkan oleh jarak genetik antara spesimen Filipina KF604898.1 dengan spesimen Cirebon sebesar 1%.

Tabel 3. Jarak genetik tiga klaster *P. trituberculatus*. Diagonal kekanan merupakan nilai jarak genetic intra garis keturunan, nilai dibawah diagonal merupakan jarak genetic inter garis keturunan. Nilai diatas diagonal adalah standard deviasi jarak genetik inter garis keturunan

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *Lineage* C | *Lineage* A | *Lineage* B |
|  | *Klaster* 3 | *Klaster* 1 | *klaster* 2 |
| *Lineage* C, klaster 3 | 0,0292 | 0,0155 | 0,0149 |
| *Lineage* A, klaster 1 | 0,1424 | 0,0046 | 0,0158 |
| *Lineage* B, klaster 2 | 0,1276 | 0,1433 | 0 |



*Lineage B , klaster 3 P.trituberculatus*

*Lineage B , klaster 2 P.trituberculatus*

*Lineage A, klaster 1 P.trituberculatus*

Gambar 2. Analisis hubungan filogenetika diantara *P. trituberculatus* berdasarkan gen COI sepanjang 602bp dengan metode *Neighbor-Joining* (model Kimura-2 parameter). Bootstrap (1000 replikan). Analisis menggunakan MEGA 5.2.



*Lineage B , klaster 3 P.trituberculatus*

*Lineage B, klaster 2 P.trituberculatus*

*Lineage A P.trituberculatus*

Gambar 3.Analisis hubungan filogenetika berdasarlan gen COI pada 25 sekuens *P. trituberculatus* dengan metode *Maximum Likelihood* dengan model Kimura 2-parameter. Bootstrap (1000 replikan). Analisis dilakukan di MEGA 5.2.

Hasil analisis haplotipe menggunakan DnaSP v 5 menunjukkan bahwa lienage A terdapat 20 sekuens yang terdistribusi dalam 13 haplotipe, pada lineage B kluster 2 terdapat 2 sekuens yang terdistribusi dalam 2 haplotipe dan pada lineage B kluster 3 terdapat 3 sekuens yang terdistribusi ke dalam 3 haplotipe (Tabel 4 ). Keragaman haplotipe tertinggi terdapat di lineage B kluster 3 yaitu sebesar 1 dan terendah di lineage B kluster 2 sebesar 0. Keragaman nucleotide tertinggi terjadi di lineage B kluster 3 yaitu sebesar 2,842 % dan terendah di lineage B kluster 2 sebesar 0 (Tabel 5). Analisis keragaman terhadap 25 sekuens menunjukkan semua data tersebar kedalam 17 haplotipe dan spesimen rajungan Cirebon merupakan satu haplotipe tersendiri yang terpisah dengan data rajungan lainnya (Tabel 4). Hasil analisis keragaman seluruh data *P. trituberculatus* yang ada teridentifikasi sebanyak 128 situs polimorfik dan jumlah mutasi sebanyak 144, keragaman haploid sebesar 0,943 +0.031 dan keragaman nukleotida sebesar 0,04821+0.0139 (Tabel 6). Kelompok garis keturunan A beranggotakan spesimen dari China dan Korea. Hasil penelitian Guo *et al* (2009) terhadap *P.trituberculatus*di sepanjang pantai China didapatkan 53 mtDNA haplotipes dari 72 individu dan 102 situs mutasi terdeteksi di 617 bp. Keragaman haplotipik dan keanekaragaman nukleotida berkisar antara 0,733-1,00 dan 0,00759-0,02614. Hasil yang lain didapatkan oleh Xu *et al.,* (2009) melalui studi menggunakan metode *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLPs) terhadap 213 samples *P.trituberculatus*yang diperoleh di 3 area tangkap East China Sea, Yellow Sea, dan Bohai Sea terdistribusi ke dalam 25 haplotipe dengan 22 *variable sites.*

Tabel 4. Distribusi haplotipe25 spesimen*P. trituberculatus.* Jumlah urutan yang digunakan: 25, Wilayah terpilih: 1-615 Jumlah situs: 615, Jumlah total situs (tidak termasuk situs dengan kesenjangan / data yang hilang): 610, Situs dengan kesenjangan penjajaran: tidak dipertimbangkan.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Haplotipe | Spesimen | Asal spesimen |
| Hap\_1: 1 | KF604898.1 | Filipina |
| Hap\_2: 1 | KF604899.1 | Filipina |
| Hap\_3: 4 | KP976344.1 KP976349.1 KP976355.1 KP976343.1 | China |
| Hap\_4: 5 | KP976356.1 KP976354.1 KP976352.1 GU321243.1 GQ180779.1 | China |
| Hap\_5: 1 | JX502944.1 | Korea |
| Hap\_6: 2 | MG753567.1 MG753565.1 | India |
| Hap\_7: 1 | GQ180780.1 | China |
| Hap\_8: 1 | GQ180781.1 | China |
| Hap\_9: 1 | GQ180783.1 | China |
| Hap\_10: 1 | GU321241.1 | China |
| Hap\_11: 1 | GU321240.1 | China |
| Hap\_12: 1 | GU321229.1 | China |
| Hap\_13: 1 | CR2\_Cirebon | Indonesia |
| Hap\_14: 1 | GU321230.1 | China |
| Hap\_15: 1 | GU321244.1 | China |
| Hap\_16: 1 | GU321242.1 | China |
| Hap\_17: 1 | GU321231.1 | China |
|  |  |  |

Tabel 5. Hasil analisis keragaman *P. trituberculatus* intra garis keturunan

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *Lineage A*  Kluster 1 | *Lineage B*  Kluster 2 | *Lineage B*  Kluster 3 |
| Jumlah sekuens | 20 | 2 | 3 |
| Jumlah *segregating sites,* S | 20 | 0 | 26 |
| Jumlah haplotipes, h | 13 | 1 | 3 |
| Keragaman Haplotipe , Hd | 0,9158 | 0 | 1 |
| Keragaman Nukleotida, Pi | 0.0046 | 0 | 0.02842 |

Tabel 6.Keragaman *P. trituberculatus*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Jumlah sekuen | h | S | Eta | Hd: | Pi |
| 25 | 17 | 128 | 144 | 0,943 +0.031 | 0,04821+0.0139 |

Jumlah haplotipes, h, Jumlah tempat polimorfik (*segregating*), S , Jumlah total mutasi , Eta, Keragaman Haplotipe , Hd, dan Keragaman Nukleotida , Pi.

**Kesimpulan**

*DNA barcoding* menggunakan gen Cytochrom oxidase sub unit I mitokondrial dapat digunakan untuk identifikasi spesies rajungan. Pada penelitian ini spesimen rajungan *P. trituberculatus*, dari perairan Cirebon dapat diidentifikasi secara akurat dengan tingkat similaritas sebesar 99,67 %. Hasil analisis filogenetik dengan 24 spesies yang sama yang berasal dari China, Korea, India dan Filipina (data diambil dari gen bank NCBI) menunjukkan bahwa spesimen Cirebon secara genetis masuk ke dalam kelompok garis keturunan yang sama dengan spesies Filipina. Sedangkan berdasarkan analisis distribusi haplotipe menunjukkan spesimen Cirebon merupakan haplotipe tersendiri.

Daftar Pustaka

Abbas E.M., Abdelsalam K.M., Mohammed-Geba K, Ahmed H.O, and Kato M., 2016, Genetic and morphological identification of some crabs from the Gulf of Suez, Northern Red Sea, Egypt, The Egyptian Journal of Aquatic Research, 42, 3:319-329

Apreshgi, K. P., K. V. Dhaneesh, Radhakrishnan T. and Kumar A.B, 2016, DNA barcoding of fiddler crabs *Uca annulipes* and *U. perplexa (*Arthropoda, Ocypodidae) from the Ssouthwest coast of India, J. Mar. Biol. Ass. India, 58 (1), doi: 10.6024/jmbai.2016.58.1.1865-13

Aranishi, F., T. Okimoto, 2006, A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle J Appl Genet 47(3):251–254

Baum, D. (2008) Reading a phylogenetic tree: The meaning of monophyletic groups. Nature Education 1(1):190

Fisheries and Aquaculture Department, 2018, Eshragh, R. & B. S. Leander, 2014, Molecular contributions to species boundaries in dicyemid parasites from eastern Pacific cephalopods, Marine Biology Research, <http://dx.doi.org/10.1080/17451000.2014.943241>

FAO, 2018, Species Fact Sheets *Portunus trituberculatus* (Miers, 1876), http://www.fao.org/fishery/species/2630/en

Fujaya, Y., Asphama, A. I., Hidayani, A. A., Parenrengi, A. & Tenriulo, A. (2016). High genetic vari ation of Portunus pelagicus from Makassar Straits revealed by RAPD markers and mitochondrial 16S rRNA sequences. African Journal of Biotechnology , 15(7), 180-190

Gebhardt, K. & T. Knebelsberger, 2015, Identification of cephalopod species from the North and Baltic Seas using morphology, COI and 18S rDNA sequences, Helgol Mar Res, 69:259–271, DOI 10.1007/s10152-015-0434-7

Guo E, Liu Y, Cui Z, Li X, Cheng Y, Wu X., 2012, Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. Mol Biol Rep. 39(2):1453-63. doi: 10.1007/s11033-011-0882-3. .

Habib, M., W. S. Lakra, V. Mohindra , P. Khare, A. S. Barman, A. Singh, K. K. Lal, P. Punia, A. A. Khan, 2011, Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of Channa marulius (Channidae: Perciformes), Mol Biol Rep, 38:841–846 DOI 10.1007/s11033-010-0175-2.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270(1512) : 313–321. http://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

Irawan, B dan Soegianto, A., 2006, Kekayaan Jenis Portunidae Di Sisi Shipping Line Selat Madura, Berk. Penel. Hayati, 11:93–96.

Klinbunga, S., Thamniemdeec, N., Yuvanatemiya, V., Khetpu,K., Khamnamtong , B., Menasveta, P., 2010, Species identification of the blue swimming crab Portunus pelagicus in Thai waters using mtDNA and RAPD-derived SCAR markers, Aquaculture 308:S39–S46

Liu, S., Sun, J., Hurtado, L.A., 2013, Genetic differentiation of Portunus trituberculatus, the world’s largestcrab fishery, among its three main fishing areas, Fisheries Research 148: 38– 46. http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2013.08.003

Mantelatto, F.L., Robles, R. and Felder, D.L., 2007,Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus Portunus (Crustacea, Brachyura, Portunidae), Zoological Journal of the Linnean Society, 150: 211–220

Naz, F., Saher, N.U., And Kama, M., 2016, Genetic Diversity Of The Portunus Sanguinolentus (Herbst, 1783) (Decapoda, Brachyura, Portunidae) In Indo West Pacific Region Based On Mitochondrial Dna 16s Gene, Pakistan Journal of Marine Sciences, 25 (1&2), 59-68,

Raupach, M.J., Radulovici A.E., 2015, Looking back on a decade of barcoding crustaceans. ZooKeys 539: 53–81. doi: 10.3897/zookeys.539.6530

Ren G., Ma H., Ma C., Wang W., Chen W., & Ma L, 2017, Genetic diversity and population structure of *Portunus sanguinolentus* (Herbst, 1783) revealed by mtDNA COI sequences, Journal Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Sequencing, and Analysis , 28 (5) : 740-746

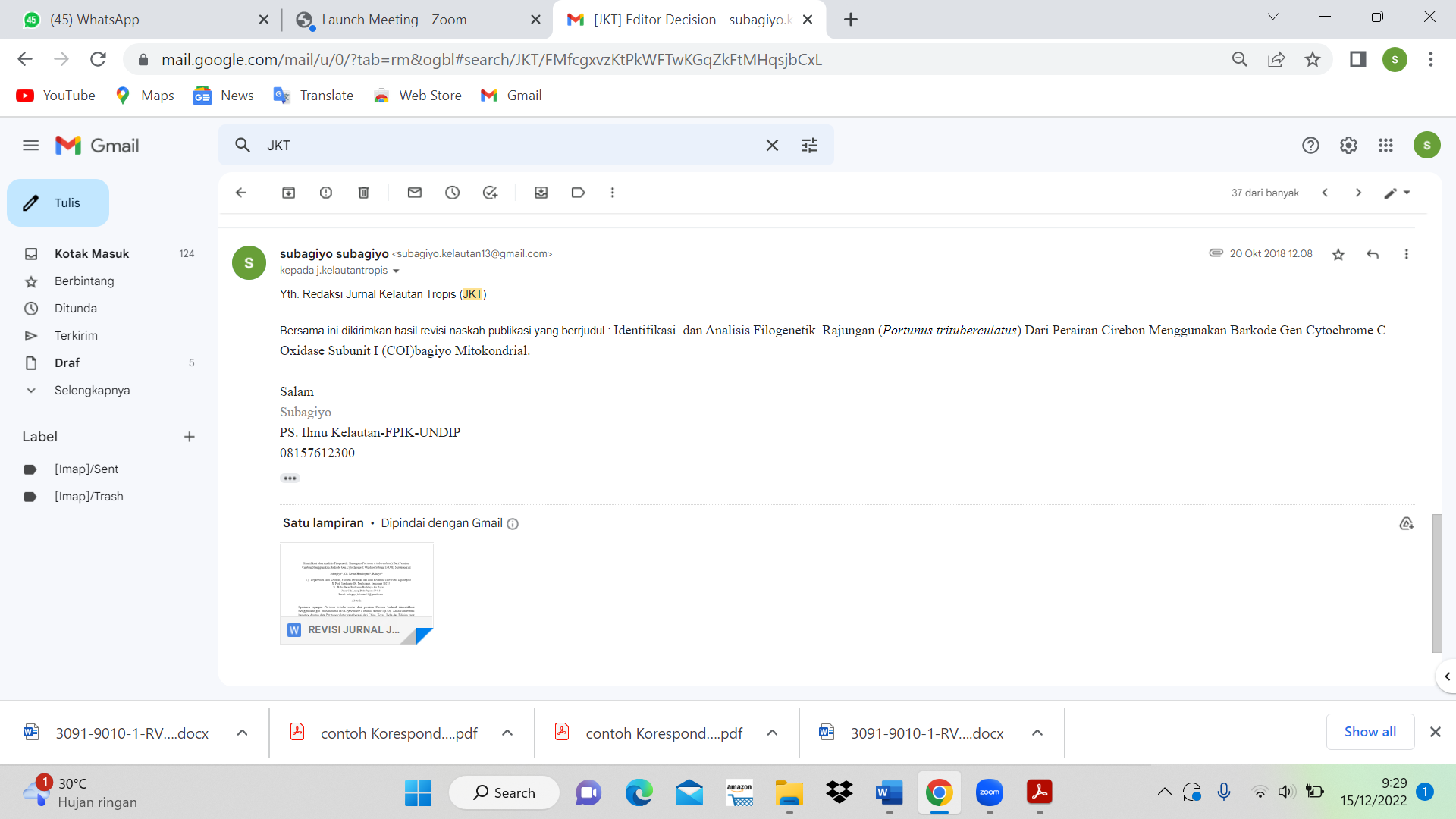
Ren G, Ma H, Ma C, Wang W, Chen W, Ma L., 2017, Genetic diversity and population structure of Portunus sanguinolentus (Herbst, 1783) revealed by mtDNA COI sequences. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. 28(5):740-746. doi: 10.1080/24701394.2016.1177040.

Shen Y-Y, Chen X, Murphy R.W. , 2013, Assessing Dna Barcoding As A Tool For Species Identification And Data Quality Control. Plos One 8(2): E57125. Doi:10.1371/Journal.Pone.0057125

Sienes , P.M.Q, Willette, D.A., Romena , L.R., Alvior , C. G. and Estacion J.S. 2014, Genetic diversity and the discovery of a putative cryptic species within a valued crab fishery, *Portunus pelagicus* (Linnaeus 1758), in the Philippines, Philippine Science Letters, 7 (2):317-323.

Umamaheswari, S., P. S. Bhavan, R. Udayasuriyan, C. Vadivalagan and R. Kalpana, 2016, Discrimination of four marine crabs and one freshwater crab through mt-COI gene, Journal of Entomology and Zoology Studies, 4(5): 766-782

Xu , Q., Liu, R., Liu Y., 2009, Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 371:121–129. doi:10.1016/j.jembe.2009.01.014



Identifikasi dan Analisis Filogenetik Rajungan (*Portunus trituberculatus*) Dari Perairan Cirebon Menggunakan Barkode Gen Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) Mitokondrial

Subagiyo1), Ch. Retna Handayani2), Rahayu2)

1. Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedharto SH, Tembalang, Semarang 50275

1. Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau

Jalan Cik Lanag Bulu Jepara 59418

Email: subagiyo,kelautan13@gmail.com

Abstrak

Spesimen rajungan *Portunus trituberculatus* dari perairan Cirebon berhasil diidentifikasi menggunakan gen mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI). Analisis distribusi haplotipe dengan data *P trituberculatus* yang berasal dari China, Korea, India dan Filipina yang diperoleh dari data genebank NCBI didapatkan 17 haplotipe dari 25 spesimen, dengan keragaman haploid 0,943 +0.031 dan keragaman nukleotida 0,04821+0.0139. Spesimen Cirebon merupakan haplotipe yang terpisah dari yang lainnya. Hasil kajian filogenetik menunjukkan 25 spesimen mengelompok ke dalam 3 kluster dari 2 garis keturunan yang berbeda dengan jarak genetik berturut turut 12,76 %, 14,24 % dan 14,33 %. Jarak genetik di dalam masing-masing kluster berkisar antara 0 – 2,92 %. Spesimen rajungan Cirebon berada pada garis keturunan dan kluster yang sama dengan spesimen Filipina dengan jarak genetik 1%.

Kata kunci : rajungan, *Portunus trituberculatus* *,* barcoding, gen COI

Abstract

*Portunus trituberculatus* spesimen from Cirebon waters were successfully identified using mitochondrial DNA cytochrome c oxydase subunit I (COI) genes. Analysis of haplotype distribution with *P. trituberculatus* from China, Korea, India and the Philippines obtained from NCBI gene banks obtained 17 haplotypes from 25 specimens, with haploid diversity 0.943 +0.031 and nucleotide diversity 0.04821 + 0.0139. The Cirebon spesimen is a haplotipe separate from the others. The results of phylogenetic studies showed 25 spesimens clustered into 3 cluster in 2 different lineages with a genetic distance respectively 12.76%, 14.24% and 14.33%. The genetic distance within each cluster ranges from 0 - 2.92%. The Cirebon crab specimen is in the same cluster as the Philippine specimen with 1% genetic distance.

Keyword :crab, *Portunus trituberculatus* barcoding, gen COI

**Pendahuluan**

*Portunus. trituberculatus* dikenal dengan nama lain *gazami crab, Japanese blue crab* atau *horse crab*. Spesies ini memiliki distribusi geografis di Samudera Hindia dan Samudera Pasifik Barat: Asia Tenggara dan Timur (dari Jepang, Korea, Cina dan Formosa dan Teluk Bengala), ke Barat, Utara dan Timur Australia (FAO, 2018). Menurut Liu *et al.* (2013) *P. trityberculatus* merupakan hasil perikanan tangkap terbesar di dunia (menempati sekitar seperempat tangkapan komersial di seluruh dunia). Sebagian besar dari total tangkapan kepiting ini (95%) terjadi di Cina di tiga daerah penangkapan utama: Laut Cina Timur, Laut Kuning, dan Laut Bohai. Di Indonesia *P. trituberculatus* merupakan spesies yang jarang ditemukan (Irawan & Soegianto, 2006).

*P. trituberculatus*  secara umum memiliki penampilan yang mirip dengan *Portunus pelagicus*. *P. trituberculatus* dibedakan dari *P. pelagicus* karena memiliki 3 gigi frontal (4 di *P. pelagicus*) dan memiliki 4 duri di merus cheliped (3 di *P. pelagicus*) (FAO (2018), sehingga dapat dengan mudah diidentifikasi secara fenotipik. Selanjutnya untuk mengetahui adanya variasi atau keragaman intraspesik diperlukan pendekatan molelular diantaranya adalah menggunakan urutan gen mtDNA (Habib, *et al.,* 2011) yang dikenal dengan nama *DNA barcoding* (Raupach & Radulovici. 2015). Data *barcoding P trituberculatus* di Indonesia masih belum ada. Oleh karena itu spesimen *P trituberculatus* yang tertangkap di perairan Cirebon pada tahun 2016 ini akan dilakukan analisis barcoding dan membandingkannya dengan data spesies yang sama yang ada di database BOLD (*The Barcode of Life Data*System**)** dan *gene bank* NCBI (*The*National Center for Biotechnology Information).

DNA barcoding merupakan *tool* yang kuat untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasikan spesies (Shen *et al,* 2013). Marka gen DNA mitokondria yang mengkodekan gen sitokrom oksidase (COI) umum digunakan untuk barkoding. Variasi intraspesifik biasanya kurang dari 2,0% dan dalam banyak kasus kurang dari 1,0% (Shen *et al,* 2013). Penggunaan gen COI sebagai marka untuk *barcoding* dan identifikasi jenis-jenis kepiting telah memberikan banyak hasil seperti *Portunus sanguinolentus*, *Charybdis natator, P. pelagicus*, *P.trituberculatus* dan *Travancoriana napaea* (Umamaheswari *et al,* 2016), fiddler crabs *Uca annulipes* dan *U. perplexa* (Abbas *et al,* 2016). Selain itu *DNA barcoding* juga digunakan untuk studi keragaman genetic *Portunus pelagicus* (Klinbunga, *et al,* 2010 ; Sienes *et al,* 2014 ; Ren *etal,* 2017), *P. trituberculatus* (Guo *et al*, 2012), *Portunus sanguinolentus* (Naz *et al*, 2016 ; Ren *et al,* 2017). Pada penelitian ini *DNA barcode* juga digunakan untuk mengevaluasi perbedaan intraspesifik dari berbagai lokasi tangkap di dunia yang datanya diperoleh dari gene bank (NCBI) yang selanjutnya digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan jalur keturunannya. Penelitian mengenai filogenetik rajungan menggunakan gene penanda COI juga telah berhasil dilakukan (Mantelatto*et al*, 2007 ;Fujaya, *et al,* 2016).

ﬁddler crabs

Uca annulipes

and

U. perplexa

ﬁddler crabs

Uca annulipes

and

U. perplexa

**Materi dan metode**

Spesimen rajungan diperoleh dari tangkapan nelayan Cirebon yang melakukan kegiatan penangkapan di perairan Cirebon (*one day fishing). Satu* spesimen yang diperoleh langsung diidentifikasi secara fenotipik dan diambil bagian capit kemudian diawetkan menggunakan ethanol 96 % sampai dilakukan analisis molekular.

**Ekstraksi DNA**

DNA genom rajungan diekstraksi dengan metode menggunakan Chelex 5% menurut Aranishi & Okimoto (2006) yang dimodifikasi. Sampel capit depan rajungan diambil bagian ototnya menggunakan pinset steril dan dihancurkan dengan mortar dalam lumpang porselin. Homegenat yang diperoleh ditambahkan buffer TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris: pH 8.0), dihomogenkan dan dibiarkan selama 15 menit pada suhu ruangan. Suspensi homogenate ini disnetrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm untuk mendapatkan massa sel. Massa sel yang diperoleh kemudian ditambahkan Chelex 5 % dan proteinase K selanjutnya divortex. Suspensi sel ini diinkubasi pada suhu 56 °C selama 15-30 menit, Selanjutnya dimasukkan ke dalam penangas air yang mendidih selama 8 menit. DNA genom diperoleh dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit. Debris sel mengendap dan DNA ada di supernatant.

**Amplifikasi dan sekuensing**

Gen COI diamplifikasi menggunakan kit PCR dan primer universal gen COI : LCOI 1490-5’-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’ dan HCOI 2198-5’-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’ (Gebhardt & Knebelsberger, 2015). Siklus thermal yang digunakan adalah hasil optimasi yang dilakukan di laboratorium manajemen kesehatan hewan akuatik  (MKHA)  Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara**.** Amplifikasi dilakukan pada *Hotstart* 94 oC (5 menit), denaturasi 94 oC (5 menit) diikuti 35 siklus 94 oC (1 menit), annealing 56 oC 1 menit, ekstensi 72 oC (1.5 menit) dan ekstensi akhir 72 oC (5 menit) serta Hold 12 oC. Kegiatan amplifikasi ini dilakukan di laboratorium Hasil amplifikasi gen COI di sekuensing melalui Genetika Science Indonesia.

**Analisis data**

Sekuens gen COI dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA 5.20 meliputi edit/aligment menggunakan ClustalW. Sekuens diidentifikasi menggunakan *BOLD system* (<http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine>) dan BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Analisis filogenetika dilakukan dengan perangkat lunak MEGA 5.2 menggunakan metode statistiK *Neighbor-joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML). *Test phylogeny* dengan *bootstrap methods* dan model Kimura 2-parameter. Jarak genetiK, dihitung menggunakan fasilitas yang ada di MEGA 5.2. Data yang digunakan dalam rekonstruksi filogenetik meliputi spesimen rajungan *P. trituberculatus* yang diperoleh dari perairan Cirebon dan data FASTA gen COI spesimen rajungan *P. trituberculatus* yang diperoleh dari database NCBI (Tabel 1). Analisis haplotipe dan polimorfisme dilakukan menggunakan perangkat lunak DnaSP v 5

Tabel 1. Data fasta sekuens gen COI spesimen rajungan *P. pelagicus* yang diambil dari database NCBI untuk rekonstruksi filogenetik (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

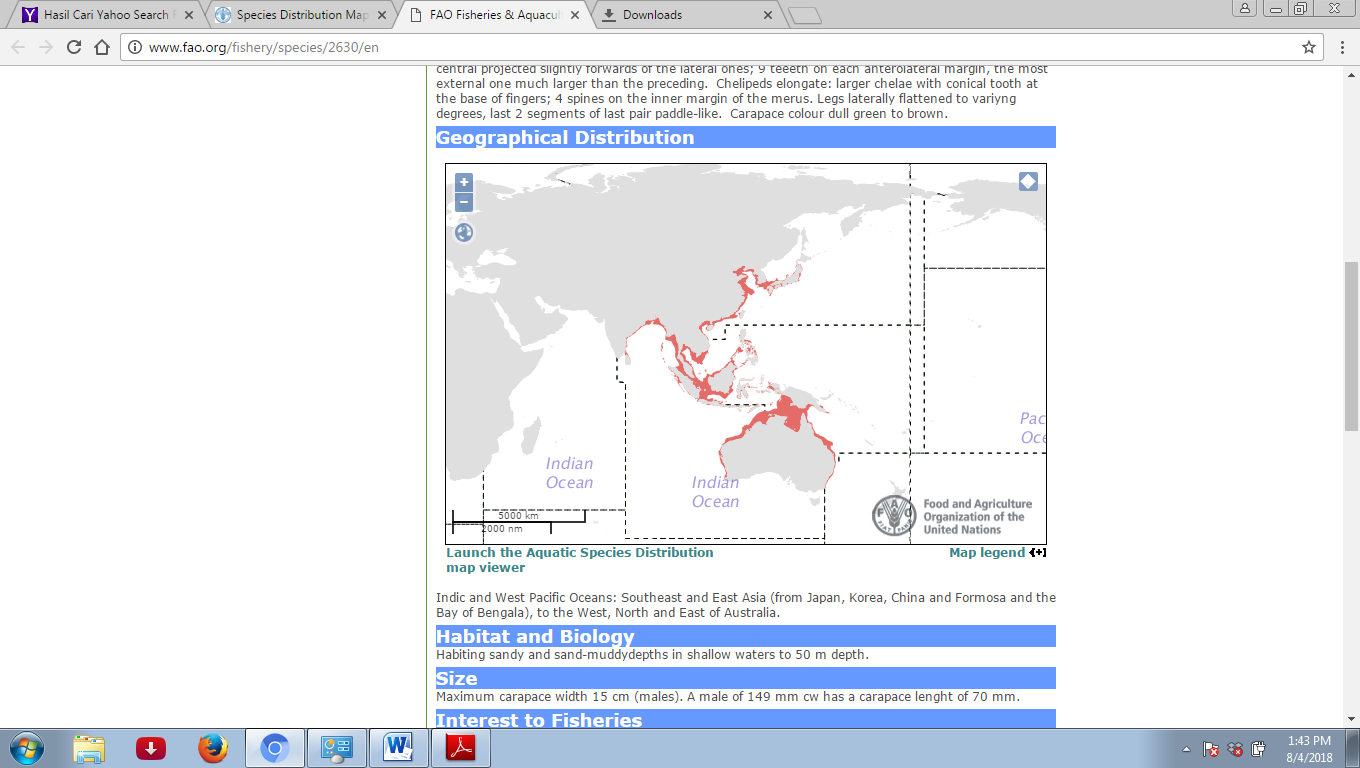
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Spesimen** | **Asal spesimen** | **Acc.number** |
| *P. trituberculatus*voucher CrP10 | Philippines: Pangasinan, Region 1 | KF604898.1 |
| *P. trituberculatus*voucher CrP12 | Philippines: Pangasinan, Region 1 | KF604899.1 |
| *P. trituberculatus*voucher ihb201306720 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976344.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306725 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976352.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306722 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976349.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306727 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976354.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306728 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976355.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306729 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976356.1 |
| *P. trituberculatus* voucher ihb201306733 | China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket | KP976343.1 |
| *P. trituberculatus* isolate De172910-1-1 | Korea | JX502944.1 |
| *P. trituberculatus* voucher CASMBGM-1PR | Tamil Nadu, India | MG753565.1 |
| *P. trituberculatus* voucher CASMBGM-PR3 | Tamil Nadu, India | MG753567.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr2 | China | GQ180780.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr3 | China | GQ180781.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr4 | China | GQ180782.1 |
| *P. trituberculatus* isolate Potr5 | China | GQ180783.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 1 | China | GU321229.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 15 | China | GU321240.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 16 | China | GU321241.1 |
| *P. trituberculatus* haplotype 18 | China | GU321243.1 |

**Hasil dan pembahasan**

Hasil identifikasi spesimen rajungan CR 2 yang ditangkap di perairan Cirebon menggunakan *barcoding bold system* menunjukkan sebagai spesies *P. trituberculatus* dengan nilai kesamaan sebesar 99.67% demikian juga menggunakan analisis BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) NCBI menunjukkan kemiripan dengan *P. trituberculatus* sebesar 99% (Tabel 2). Berdasarkan tingkat kesamaan dan identity yang sangat tinggi ( ≥ 99% ) menunjukkan bahwa *DNA barcoding* berdasarkan gen cytochrome c oxidase I (COI) mitokondrial dapat digunakan untuk identifikasi spesimen rajungan CR2. Hal ini sesuai dengan Hebert *et al.* (2003) bahwa *DNA barcoding* menggunakan fragmen pendek mitokondria efektif untuk diagnosis spesies. Informasi mengenai *P trituberculatus* di Indonesia sangat sedikit sekali. Menurut FAO (2018) perairan Indonesia merupakan daerah distribusi jenis rajungan tersebut (Gambar 1).

Tabel 2. Hasil identifikasi menggunakan BOLD system dan analisis blast NCBI

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Spesimen | Similaritas | Spesies | Max score | Query cover | Identity | Spesies | Accession |
| CR2 | 99.67% | *Portunus trituberculatus* | 1094 | 100 % | 99 % | *Portunus trituberculatus* | KF604898 |



Gambar 1. Distribusi geografi *P trituberculatus*

: pasti : tidak pasti : area tangkapan FAO

Sumber : FAO (2018)

Analisis filogenetik menggunakan data gen COI *P. trituberculatus* yang ada di database NCBI (21 dari China, 1 dari Korea, 2 dari India )dan 1 spesimen yang berasal dari tangkapan di perairan Cirebon menggunakan *Neighbor-joining (NJ) methods* (Saitou & Nei 1987) dan *Maximum Likelihood method**(*ML) menggunakan model Kimura 2-parameter Kimura M. (1980)dengan *bootstrap* 1000 kali ( Felsenstein 1985) dengan menunjukkan secara konsistensi pola garis keturunan yang sama (Gambar 2 dan Gambar 3). Penggunaan 2 spesies *out group* yaitu *Octopus vulgaris* (*accession* FN24381.1) dan *Uroteuthis duvauceli* (*accession* KC951889.1) pada pohon filogenetik menggambarkan semua garis percabangan *P. trituberculatus* berasal dari *ancestor* yang sama. Hal ini menunjukkan garis keturunan monofiletik (Baum *et al,* 2008). Berdasarkan hasil analisis filogenetik dengan 2 metode ini semua data set mengelompok kedalam 2 garis keturunan (*lineage*) yang berbeda yang berasal dari 1 *ancestor* yang sama. Pengelompokan ini didukung dengan nilai bootstrap sebesar 81 – 100 %. Spesimen yang berasal dari China dan Korea berada dalam 1 garis keturunan yang sama (*lineage* A), spesimen India, Filipina dan Cirebon berada dalam 1 garis keturunanyang sama (*lineage* B). Selanjutnya garis keturunan B terbagi menjadi 2 klaster yaitu klaster yang terdiri dari specimen India dan klaster yang terdiri dari specimen Filipina dan specimen Cirebon. Pengelompokan ke dalam 3 kluster ini juga diperkuat oleh analisis jarak genetik antar kelompok (Tabel 3). Jarak genetik antara lineage A dan B sebesar 12,76 %, antara A dan B klaster 2 sebesar 14,24 % dan antara B klaster 2 dan B klaster 3 sebesar 14,33 %. Sedangkan jarak genetik *intralineage* antara 0 – 2,92 %. Spesimen Cirebon karena berada di dalam klaster yang sama dengan spesimen Filipina menunjukkan adanya hubungan kekeraban yang dekat terutama dengan spesimen KF604898.1. Hal ini diukung dengan nilai bootstrap sebesar 100 %. Kedekatan ini juga ditunjukkan oleh jarak genetik antara spesimen Filipina KF604898.1 dengan spesimen Cirebon sebesar 1%.

Tabel 3. Jarak genetik tiga klaster *P. trituberculatus*. Diagonal kekanan merupakan nilai jarak genetic intra garis keturunan, nilai dibawah diagonal merupakan jarak genetic inter garis keturunan. Nilai diatas diagonal adalah standard deviasi jarak genetik inter garis keturunan

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *Lineage* C | *Lineage* A | *Lineage* B |
|  | *Klaster* 3 | *Klaster* 1 | *klaster* 2 |
| *Lineage* C, klaster 3 | 0,0292 | 0,0155 | 0,0149 |
| *Lineage* A, klaster 1 | 0,1424 | 0,0046 | 0,0158 |
| *Lineage* B, klaster 2 | 0,1276 | 0,1433 | 0 |



*Lineage B , klaster 3 P.trituberculatus*

*Lineage B , klaster 2 P.trituberculatus*

*Lineage A, klaster 1 P.trituberculatus*

Gambar 2. Analisis hubungan filogenetika diantara *P. trituberculatus* berdasarkan gen COI sepanjang 602bp dengan metode *Neighbor-Joining* (model Kimura-2 parameter). Bootstrap (1000 replikan). Analisis menggunakan MEGA 5.2.



*Lineage B , klaster 3 P.trituberculatus*

*Lineage B, klaster 2 P.trituberculatus*

*Lineage A P.trituberculatus*

Gambar 3.Analisis hubungan filogenetika berdasarlan gen COI pada 25 sekuens *P. trituberculatus* dengan metode *Maximum Likelihood* dengan model Kimura 2-parameter. Bootstrap (1000 replikan). Analisis dilakukan di MEGA 5.2.

Hasil analisis haplotipe menggunakan DnaSP v 5 menunjukkan bahwa lienage A terdapat 20 sekuens yang terdistribusi dalam 13 haplotipe, pada lineage B kluster 2 terdapat 2 sekuens yang terdistribusi dalam 2 haplotipe dan pada lineage B kluster 3 terdapat 3 sekuens yang terdistribusi ke dalam 3 haplotipe (Tabel 4 ). Keragaman haplotipe tertinggi terdapat di lineage B kluster 3 yaitu sebesar 1 dan terendah di lineage B kluster 2 sebesar 0. Keragaman nucleotide tertinggi terjadi di lineage B kluster 3 yaitu sebesar 2,842 % dan terendah di lineage B kluster 2 sebesar 0 (Tabel 5). Analisis keragaman terhadap 25 sekuens menunjukkan semua data tersebar kedalam 17 haplotipe dan spesimen rajungan Cirebon merupakan satu haplotipe tersendiri yang terpisah dengan data rajungan lainnya (Tabel 4). Hasil analisis keragaman seluruh data *P. trituberculatus* yang ada teridentifikasi sebanyak 128 situs polimorfik dan jumlah mutasi sebanyak 144, keragaman haploid sebesar 0,943 +0.031 dan keragaman nukleotida sebesar 0,04821+0.0139 (Tabel 6). Kelompok garis keturunan A beranggotakan spesimen dari China dan Korea. Hasil penelitian Guo *et al* (2009) terhadap *P.trituberculatus*di sepanjang pantai China didapatkan 53 mtDNA haplotipes dari 72 individu dan 102 situs mutasi terdeteksi di 617 bp. Keragaman haplotipik dan keanekaragaman nukleotida berkisar antara 0,733-1,00 dan 0,00759-0,02614. Hasil yang lain didapatkan oleh Xu *et al.,* (2009) melalui studi menggunakan metode *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLPs) terhadap 213 samples *P.trituberculatus*yang diperoleh di 3 area tangkap East China Sea, Yellow Sea, dan Bohai Sea terdistribusi ke dalam 25 haplotipe dengan 22 *variable sites.*

Tabel 4. Distribusi haplotipe25 spesimen*P. trituberculatus.* Jumlah urutan yang digunakan: 25, Wilayah terpilih: 1-615 Jumlah situs: 615, Jumlah total situs (tidak termasuk situs dengan kesenjangan / data yang hilang): 610, Situs dengan kesenjangan penjajaran: tidak dipertimbangkan.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Haplotipe | Spesimen | Asal spesimen |
| Hap\_1: 1 | KF604898.1 | Filipina |
| Hap\_2: 1 | KF604899.1 | Filipina |
| Hap\_3: 4 | KP976344.1 KP976349.1 KP976355.1 KP976343.1 | China |
| Hap\_4: 5 | KP976356.1 KP976354.1 KP976352.1 GU321243.1 GQ180779.1 | China |
| Hap\_5: 1 | JX502944.1 | Korea |
| Hap\_6: 2 | MG753567.1 MG753565.1 | India |
| Hap\_7: 1 | GQ180780.1 | China |
| Hap\_8: 1 | GQ180781.1 | China |
| Hap\_9: 1 | GQ180783.1 | China |
| Hap\_10: 1 | GU321241.1 | China |
| Hap\_11: 1 | GU321240.1 | China |
| Hap\_12: 1 | GU321229.1 | China |
| Hap\_13: 1 | CR2\_Cirebon | Indonesia |
| Hap\_14: 1 | GU321230.1 | China |
| Hap\_15: 1 | GU321244.1 | China |
| Hap\_16: 1 | GU321242.1 | China |
| Hap\_17: 1 | GU321231.1 | China |
|  |  |  |

Tabel 5. Hasil analisis keragaman *P. trituberculatus* intra garis keturunan

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *Lineage A*  Kluster 1 | *Lineage B*  Kluster 2 | *Lineage B*  Kluster 3 |
| Jumlah sekuens | 20 | 2 | 3 |
| Jumlah *segregating sites,* S | 20 | 0 | 26 |
| Jumlah haplotipes, h | 13 | 1 | 3 |
| Keragaman Haplotipe , Hd | 0,9158 | 0 | 1 |
| Keragaman Nukleotida, Pi | 0.0046 | 0 | 0.02842 |

Tabel 6.Keragaman *P. trituberculatus*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Jumlah sekuen | h | S | Eta | Hd: | Pi |
| 25 | 17 | 128 | 144 | 0,943 +0.031 | 0,04821+0.0139 |

Jumlah haplotipes, h, Jumlah tempat polimorfik (*segregating*), S , Jumlah total mutasi , Eta, Keragaman Haplotipe , Hd, dan Keragaman Nukleotida , Pi.

**Kesimpulan**

*DNA barcoding* menggunakan gen Cytochrom oxidase sub unit I mitokondrial dapat digunakan untuk identifikasi spesies rajungan. Pada penelitian ini spesimen rajungan *P. trituberculatus*, dari perairan Cirebon dapat diidentifikasi secara akurat dengan tingkat similaritas sebesar 99,67 %. Hasil analisis filogenetik dengan 24 spesies yang sama yang berasal dari China, Korea, India dan Filipina (data diambil dari gen bank NCBI) menunjukkan bahwa spesimen Cirebon secara genetis masuk ke dalam kelompok garis keturunan yang sama dengan spesies Filipina. Sedangkan berdasarkan analisis distribusi haplotipe menunjukkan spesimen Cirebon merupakan haplotipe tersendiri.

Daftar Pustaka

Abbas E.M., Abdelsalam K.M., Mohammed-Geba K, Ahmed H.O, and Kato M., 2016, Genetic and morphological identification of some crabs from the Gulf of Suez, Northern Red Sea, Egypt, The Egyptian Journal of Aquatic Research, 42, 3:319-329

Apreshgi, K. P., K. V. Dhaneesh, Radhakrishnan T. and Kumar A.B, 2016, DNA barcoding of fiddler crabs *Uca annulipes* and *U. perplexa (*Arthropoda, Ocypodidae) from the Ssouthwest coast of India, J. Mar. Biol. Ass. India, 58 (1), doi: 10.6024/jmbai.2016.58.1.1865-13

Aranishi, F., T. Okimoto, 2006, A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle J Appl Genet 47(3):251–254

Baum, D. (2008) Reading a phylogenetic tree: The meaning of monophyletic groups. Nature Education 1(1):190

Fisheries and Aquaculture Department, 2018, Eshragh, R. & B. S. Leander, 2014, Molecular contributions to species boundaries in dicyemid parasites from eastern Pacific cephalopods, Marine Biology Research, <http://dx.doi.org/10.1080/17451000.2014.943241>

FAO, 2018, Species Fact Sheets *Portunus trituberculatus* (Miers, 1876), http://www.fao.org/fishery/species/2630/en

Fujaya, Y., Asphama, A. I., Hidayani, A. A., Parenrengi, A. & Tenriulo, A. (2016). High genetic vari ation of Portunus pelagicus from Makassar Straits revealed by RAPD markers and mitochondrial 16S rRNA sequences. African Journal of Biotechnology , 15(7), 180-190

Gebhardt, K. & T. Knebelsberger, 2015, Identification of cephalopod species from the North and Baltic Seas using morphology, COI and 18S rDNA sequences, Helgol Mar Res, 69:259–271, DOI 10.1007/s10152-015-0434-7

Guo E, Liu Y, Cui Z, Li X, Cheng Y, Wu X., 2012, Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. Mol Biol Rep. 39(2):1453-63. doi: 10.1007/s11033-011-0882-3. .

Habib, M., W. S. Lakra, V. Mohindra , P. Khare, A. S. Barman, A. Singh, K. K. Lal, P. Punia, A. A. Khan, 2011, Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of Channa marulius (Channidae: Perciformes), Mol Biol Rep, 38:841–846 DOI 10.1007/s11033-010-0175-2.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270(1512) : 313–321. http://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

Irawan, B dan Soegianto, A., 2006, Kekayaan Jenis Portunidae Di Sisi Shipping Line Selat Madura, Berk. Penel. Hayati, 11:93–96.

Klinbunga, S., Thamniemdeec, N., Yuvanatemiya, V., Khetpu,K., Khamnamtong , B., Menasveta, P., 2010, Species identification of the blue swimming crab Portunus pelagicus in Thai waters using mtDNA and RAPD-derived SCAR markers, Aquaculture 308:S39–S46

Liu, S., Sun, J., Hurtado, L.A., 2013, Genetic differentiation of Portunus trituberculatus, the world’s largestcrab fishery, among its three main fishing areas, Fisheries Research 148: 38– 46. http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2013.08.003

Mantelatto, F.L., Robles, R. and Felder, D.L., 2007,Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus Portunus (Crustacea, Brachyura, Portunidae), Zoological Journal of the Linnean Society, 150: 211–220

Naz, F., Saher, N.U., And Kama, M., 2016, Genetic Diversity Of The Portunus Sanguinolentus (Herbst, 1783) (Decapoda, Brachyura, Portunidae) In Indo West Pacific Region Based On Mitochondrial Dna 16s Gene, Pakistan Journal of Marine Sciences, 25 (1&2), 59-68,

Raupach, M.J., Radulovici A.E., 2015, Looking back on a decade of barcoding crustaceans. ZooKeys 539: 53–81. doi: 10.3897/zookeys.539.6530

Ren G., Ma H., Ma C., Wang W., Chen W., & Ma L, 2017, Genetic diversity and population structure of *Portunus sanguinolentus* (Herbst, 1783) revealed by mtDNA COI sequences, Journal Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Sequencing, and Analysis , 28 (5) : 740-746

Ren G, Ma H, Ma C, Wang W, Chen W, Ma L., 2017, Genetic diversity and population structure of Portunus sanguinolentus (Herbst, 1783) revealed by mtDNA COI sequences. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. 28(5):740-746. doi: 10.1080/24701394.2016.1177040.

Shen Y-Y, Chen X, Murphy R.W. , 2013, Assessing Dna Barcoding As A Tool For Species Identification And Data Quality Control. Plos One 8(2): E57125. Doi:10.1371/Journal.Pone.0057125

Sienes , P.M.Q, Willette, D.A., Romena , L.R., Alvior , C. G. and Estacion J.S. 2014, Genetic diversity and the discovery of a putative cryptic species within a valued crab fishery, *Portunus pelagicus* (Linnaeus 1758), in the Philippines, Philippine Science Letters, 7 (2):317-323.

Umamaheswari, S., P. S. Bhavan, R. Udayasuriyan, C. Vadivalagan and R. Kalpana, 2016, Discrimination of four marine crabs and one freshwater crab through mt-COI gene, Journal of Entomology and Zoology Studies, 4(5): 766-782

Xu , Q., Liu, R., Liu Y., 2009, Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 371:121–129. doi:10.1016/j.jembe.2009.01.014