



**APPLICATION OF DNA BARCODE IN DETERMINATION OF SHRIMP SPECIES OF FRESH WATER FROM THE PROVINCE OF JAMBI**

**APLIKASI DNA BARCODE PADA PENENTUAN SPESIES UDANG AIR TAWAR YANG BERASAL DARI PROVINSI JAMBI**

**Lora Purnamasari<sup>1\*</sup>, Achmad Farajallah<sup>2</sup>, Daisy Wowor<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Biologi STKIP PGRI Sumatera Barat.

Jl. Gunung Pangilun, Kota Padang, Sumatera Barat, Indonesia.

Telp./Fax. (0751) 7053731/ (0751) 7053826. Email: [lorapurnamasari@gmail.com](mailto:lorapurnamasari@gmail.com)

<sup>2</sup>BioSains Hewan Departemen Biologi FMIPA Institut Pertanian Bogor Indonesia

<sup>3</sup>Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI Indonesia

Manuskript diterima: 18 Mei 2016. Revisi disetujui: 24 Juni 2016

**ABSTRACT**

*Jambi Province, including the areas with lowland tropical rainforest has the highest deforestation rate in the Asian region. Effects of changes in forest conversion to agricultural habitats will change the ecosystem conditions. It is thought to affect macroinvertebrate diversity there in, that affect the origin of shrimp freshwater. Morphological identification errors occurred due to the phenomenon of cryptic or siblings species. Both of them could cause problems on synonym that are multiple names on one species or vice versa. This study applied the DNA barcoding technique with nucleotides differences and genetic distance for determining some species of freshwater shrimp that found in Jambi Province. There samples were morphologically identified as there species which were included in one families. Based on COI gene analyses, those two species have been successfully identified into two species: *Macrobrachium malayanum*, , dan *M. pilimanus*. One spesies is *M. Malayanum*1, is proven as a spesies *M. Malayanum* that appropriate with the data Gen Bank.*

*Keyword: DNA barcode, determination of certain spesies, fresh water, shrimp.*

**ABSTRAK**

Provinsi Jambi memiliki hutan hujan tropis dataran rendah yang mengalami deforestasi tercepat di daerah Asia. Efek dari perubahan alih fungsi hutan ke habitat pertanian akan mengubah kondisi ekosistem. Hal tersebut diduga berpengaruh pada keanekaragaman makroinvertebrata di dalamnya. Kesalahan identifikasi morfologi dapat disebabkan oleh fenomena *cryptic species* maupun *siblings species*. Fenomena tersebut dapat menyebabkan masalah sinonim yaitu terdapat nama ganda pada satu spesies yang sama. Untuk menyelesaikan permasalahan tersebut dapat digunakan teknik DNA Barcode. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan memastikan spesies udang air tawar yang berasal dari provinsi Jambi dengan mengaplikasikan teknik DNA *barcoding*.

Berdasarkan identifikasi morfologi didapatkan 3 sampel terdiri dari satu famili. Berdasarkan analisis *COI gene*, 2 spesies berhasil diidentifikasi yaitu *Macrobrachium malayanum* dan *M. pilimanus*. Satu spesies sampel target yaitu *M. malayanum* 1 terbukti sebagai spesies *M. malayanum* yang sesuai dengan data GenBank.

Kata kunci: DNA barcoding, determinasi spesies, air tawar, udang.

---

## PENDAHULUAN

Crustacea merupakan salah satu komponen biotik yang sebagian menempati ekosistem air tawar. Lebih dari 67.000 spesies yang telah teridentifikasi. Diperkirakan masih banyak lagi spesies-spesies dari Subphylum Crustacea yang belum teridentifikasi. Decapoda merupakan salah satu Ordo dalam Subphylum Crustacea yang berisikan kepiting dan udang yang hidup di perairan tawar (Brusca dan Brusca 2003). Perbandingan dari habitat Ordo Decapoda yaitu 89 % di air laut, 20% air tawar dan 1% terestrial (Bliss, 1982).

Udang hidup di semua jenis habitat perairan dengan 89% di antaranya hidup di perairan laut, 10% di perairan air tawar dan 1% di perairan terestrial (Abele, 1982). Grave (2008) menyatakan subordo caridea terdiri dari sekitar 2.500 spesies terdiri dari 3 famili. Sebanyak 655 spesies udang air tawar yang telah diketahui, yang sebagian didominasi oleh famili Atyidae dan Palaemonidae.

Provinsi Jambi memiliki hutan hujan tropis dataran rendah yang mengalami deforestasi tercepat di daerah Asia. Efek dari perubahan alih fungsi hutan ke habitat pertanian akan mengubah kondisi ekosistem. Hal tersebut diduga berpengaruh pada keanekaragaman makroinvertebrata di dalamnya, sehingga mempengaruhi asal-usul spesies udang air tawar yang saat ini beragam. Namun hal tersebut tidak terlepas dari kemungkinan kesalahan peneliti yang mengidentifikasi spesies secara morfologi saja. Kesalahan identifikasi dapat disebabkan oleh fenomena *cryptic species* maupun *siblings species*. Kedua fenomena tersebut dapat menyebabkan masalah sinonim yaitu terdapat nama ganda pada satu spesies yang sama atau sebaliknya (Bickford dkk., 2006).

Penggunaan DNA mitokondria (mtDNA) dalam analisis biogeografi dan sistematik pada hewan sering tidak sejalan dengan analisis morfologi. Salah satu penyebabnya yaitu karakter morfologi seringkali memperlihatkan fenomena

*species cryptic*. DNA mitokondria memiliki susunan yang berbeda dengan DNA inti, ukurannya lebih kecil. Penggunaan mtDNA sebagai penanda genetik telah memberikan informasi secara kualitatif maupun kuantitatif. Selain itu mtDNA memiliki kemampuan berevolusi sangat cepat sehingga dapat digunakan untuk melacak kejadian yang relatif baru (Solihin, 1994). Teknik DNA *barcoding* dapat menyediakan sebuah “barkode biologi” dari urutan pendek DNA yang distandarisasi untuk mengenali suatu spesies (Hajibabaei dkk., 2006). Ide penggunaan *barcoding* ditujukan untuk membedakan spesies dan mengidentifikasi spesimen yang sulit dikenali, seperti fase larva, potongan organ maupun material yang mengalami pemrosesan, dengan menggunakan sekuens gen yang cukup pendek (Hebert dkk., 2003). Gen sitokrom oksidase subunit 1 yang dikenal sebagai COI, merupakan salah satu gen dalam genom mitokondria (mtDNA) yang sekuennya biasa digunakan sebagai *barcode*. Perkembangan literatur tentang *barcode* DNA menunjukkan bahwa sebuah fragmen pendek COI dapat digunakan sebagai penanda variasi yang secara akurat dapat mengidentifikasi berbagai macam hewan sampai tingkat spesies (Waugh, 2007) dan merekonstruksi filogenetik pada cabang evolusi tingkat spesies (Palumbi, 1996).

Tahun 2005, perikanan dipilih sebagai target utama untuk cakupan *barcode* dunia terkait kepentingan sosial ekonomi, sehingga saat ini lebih dari 5000 spesies telah berhasil diidentifikasi (Wong dan Hanner 2008). Gen COI pada Crustacea berukuran sekitar 1500 pb dan yang digunakan sebagai *barcode* pada hewan umumnya sekitar 700 bp, selain itu ruas gen COI ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi hampir semua hewan (Ward dkk., 2005). Teknik DNA *barcoding* memainkan peranan penting sebagai alat bantu taksonomi untuk mengungkap secara genetik spesies yang berbeda dan terpisah secara cepat dan akurat. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan memastikan spesies udang air tawar yang berasal dari provinsi Jambi dengan mengaplikasikan teknik DNA *barcoding*.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Bahan**

Sampel udang air tawar diambil dari sungai-sungai yang terdapat di Kabupaten Batanghari dan di Kabupaten Sarolangun, Provinsi Jambi. Sampel telah dipreservasi dalam etanol 70% dan EDTA 10 mM.

### **Metode**

#### **Sortir dan Identifikasi Sampel**

Sampel disortir kemudian diidentifikasi dengan menggunakan kunci identifikasi Wowor dkk., (2004) dan Cai dkk., (2007).

#### **Ekstraksi dan Isolasi DNA**

Jaringan udang untuk ekstraksi DNA berasal dari abdomen. Proses pencucian alkohol pengawet dilakukan dengan cara merendam sekitar 50 mg potongan otot dalam aquades steril, kemudian dihomogenasi dalam bufer STE (NaCl 1M, Tris-HCL 10mM, EDTA 0.1mM, pH 8). Jaringan otot dihancurkan kemudian dilisis menggunakan proteinase K 0,125 mg/ml dan sodium dodesil sulfat 1%. Pemisahan dan pemurnian DNA dari bahan organik lain selanjutnya mengikuti petunjuk kit ekstraksi *Genomic DNA mini kit for animal tissue* (Geneaid Biotech Ltd) (Lampiran 2).

#### **Amplifikasi dan Visualisasi Fragmen DNA**

Ruas gen COI genom mitokondria kemudian diamplifikasi menggunakan primer *DNA barcoding* untuk Crustacea yaitu primer forward AF286 (5'-TCTACAAAYCATAAAGAYATYGG) dan primer *reverse* AF287 (5'-GTGGCRGANGTRAARTARGCTCG). Reaksi PCR menggunakan PCR Kit Kappa 2 G *Fast*, dengan suhu *annealing* 55°C.

Keberhasilan PCR diamati menggunakan metode *polyacrilamide gel electrophoresis* (PAGE) 6% yang dijalankan pada tegangan 200 V selama 50 menit yang dilanjutkan dengan pewarnaan sensitif perak (Byun dkk., 2009).

#### **Perunutan Amplikon dan Analisis DNA**

Cetakan yang dijadikan *PCR for sequencing* merupakan amplikon dengan kualitas pita tunggal menggunakan metode *big dye terminator* dan primer yang

sama dengan amplifikasi awal. Hasil perunutan nukleotida diedit secara manual berdasarkan kromatogram kemudian dijadikan input dalam pencarian kesamaan gen menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Runutan nukleotida semua sampel dan yang homolog hasil BLAST saling disejajarkan menggunakan *Clustal W* versi 2.0 yang terdapat dalam program MEGA versi 5.00 (Tamura dkk., 2011). Analisis keragam nukleotida dilakukan untuk menentukan spesies menggunakan model *Number of differences* dan analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) dengan bootstrap 1000x.

## HASIL

### Sortir dan Identifikasi Sampel

Sortir dilakukan pada sekumpulan udang air tawar dengan berbagai fase dan ukuran dari Provinsi Jambi. Penyortiran kasar dilakukan berdasarkan perbedaan penampakan morfologi luar yang meliputi bentuk tubuh dan ciri-ciri spesifik yang dimiliki spesimen seperti bentuk karapaks, bentuk kaki jalan, dan ukuran tubuh diperoleh enam variasi morfologi. Setiap morfologi diambil dua kali ulangan untuk dilakukan *barcode* secara molekuler. Sebanyak tiga sampel berhasil diamplifikasi dan menghasilkan pita tunggal saat visualisasi pada gel akrilamid 6%. Namun hanya terdapat dua sampel yang ukuran pita DNA nya sesuai target (600-700 pb). Dua sampel yang berhasil diamplifikasi dan menghasilkan pita DNA sesuai target (600-700 pb) kemudian diidentifikasi lebih lanjut secara morfologi berdasarkan kunci identifikasi Wowor dkk., (2004) dan Cai dkk., (2007). Berdasarkan hasil identifikasi secara morfologi terdiri atas satu famili yaitu Palamonidae dan 3 spesies yaitu *M. malayanum*, *M. pilimanus*, *M. Lanchesteri* (Tabel 1).

**Tabel 1.** Hasil Identifikasi Morfologi Spesimen Udang Air Tawar

| No Spesimen | Identifikasi morfologi | Famili      |
|-------------|------------------------|-------------|
| 1           | <i>M. malayanum</i>    | Palamonidae |
| 2           | <i>M. pilimanus</i>    | Palamonidae |
| 3           | <i>M. lanchesteri</i>  | Palamonidae |

*Macrobrachium malayanum* memiliki ciri gigi pada rostrum bawah dengan 3-6 (biasanya 3-4), kaki jalan kedua memiliki corpus yang berbetuk

conical dan merus lebih pendek, preanal carina tidak ada. *Macrobrachium pilimanus* memiliki ciri gigi pada rostrum bawah dengan 1-3 (biasanya 2), carpus dengan bentuk *cup-shaped*, preanal carina ada. *Macrobrachium lanchesteri* memiliki ciri kaki jalan kedua dengan carpus lebih panjang daripada merus, rostrum memiliki 1-2 apical *teeth*.

**Tabel 2.** Hasil Identifikasi Morfologi dan *Barcode*

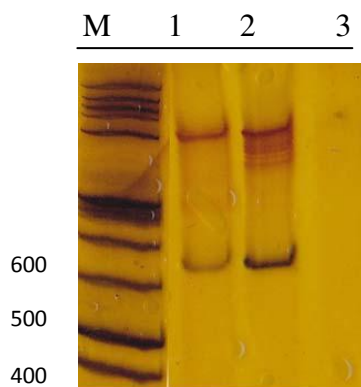
| No Spesimen | Identifikasi morfologi | Ordo     | Famili       | Identifikasi <i>Barcode</i> |
|-------------|------------------------|----------|--------------|-----------------------------|
| 1           | <i>M. malayanum</i>    | Dekapoda | Palaemonidae | <i>M. malayanum</i>         |
| 2           | <i>M. pilimanus</i>    | Dekapoda | Palaemonidae | <i>M. pilimanus</i>         |
| 3           | <i>M. lanchesteri</i>  | Dekapoda | Palaemonidae | -                           |

Berdasarkan analisis *barcode* secara molekuler menggunakan COI, maka didapatkan hasil pada nomor spesimen 1 secara identifikasi morfologi spesies *Macrobrachium malayanum* sesuai dengan identifikasi *barcode* yaitu *Macrobrachium malayanum*. Nomor spesimen 2 secara identifikasi morfologi spesies *Macrobrachium pilimanus* sesuai dengan identifikasi *barcode* yaitu spesies *Macrobrachium pilimanus*. Sedangkan nomor spesimen 3 secara morfologi identifikasi spesies *M. lanchesteri* namun setelah dilakukan identifikasi *barcode* tidak didapatkan pita yang baik sehingga tidak bisa dianalisis lebih lanjut.

### Amplifikasi dan Visualisasi DNA

Gen COI target diamplifikasi menggunakan pasangan primer AF286-AF287 berukuran sekitar 600bp. Suhu optimum penempelan primer pada saat amplifikasi yaitu 55°C. Sebanyak 3 sampel yang pita DNA targetnya terbaca jelas (Gambar 1) dijadikan cetakan dalam *PCR for sequencing*. Setelah DNA target dimurnikan dan dijadikan cetakan dalam *PCR for sequencing*, maka diperoleh tujuh sampel yang runutan nukleotidanya terbaca dengan jelas pada kromatogram.

Panjang ruas gen COI *Macrobrachium malayanum* 1 Panjang ruas gen COI *M. malayanum* dan *M. pilimanus* yang dapat dianalisa dan dibandingkan dengan runutan gen COI referensi adalah 538 nukleotida. Setelah dibandingkan dengan database bahwa *M. malayanum* adalah spesies yang sama dengan tingkat kesamaan runutan nukleotida 88%. Namun *M. pilimanus* tidak ada yang homolog yang mencapai > 80%.



**Gambar 1.** Amplikon gen COI di atas PAGE 6%. Keterangan M = *marker*, 1= *M. Malayanum1*, 2 = *M. Pilimanus*, 3 = *M. lanchesteri*

### Analisis DNA dan Filogeni

**Tabel 3.** Hasil Analisis Homologi DNA Gen COI pada *Macrobrachium malayanum*.

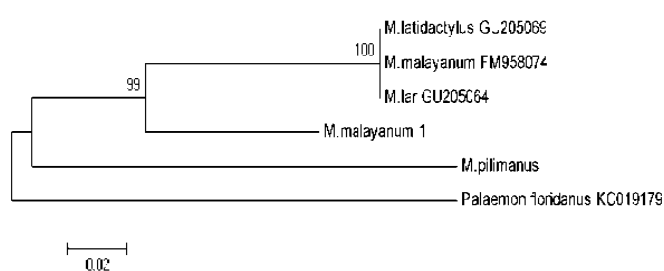
| No | Sampel               | BLAST-N                |            |           |
|----|----------------------|------------------------|------------|-----------|
|    |                      | Speises di GenBank     | Acc Number | Identitas |
| 1  | <i>M. Malayanum1</i> | <i>M. malayanum</i>    | FM 958074  | 88%       |
| 2  | <i>M. Malayanum1</i> | <i>P. floridanus</i>   | KC 019175  | 81%       |
| 3  | <i>M. Malayanum1</i> | <i>M. latidactylus</i> | GU205069   | 82%       |

Berdasarkan Tabel 3 analisis homologi DNA gen COI pada *M. Malayanum1* setelah dibandingkan dengan *database GenBank* didapatkan bahwa sampel *M. malayanum1* adalah spesies yang sama *M. malayanum* yang terdapat pada *GenBank* dengan tingkat kesamaan runutan nukleotida 88%.

**Tabel 4.** Jarak Genetik Gen COI Antar Jenis Udang Air Tawar.

| Sampel                             | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6 |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| 1. <i>M. malayanum1</i>            |       |       |       |       |       |   |
| 2. <i>M. pilimanus</i>             | 0.242 |       |       |       |       |   |
| 3. <i>M. lar</i> GU205064          | 0.137 | 0.259 |       |       |       |   |
| 4. <i>M. latidactylus</i> GU205069 | 0.137 | 0.259 | 0.000 |       |       |   |
| 5. <i>P. floridanus</i> KC 019175  | 0.250 | 0.299 | 0.274 | 0.274 |       |   |
| 6. <i>M. malayanum</i> FM 958074   | 0.137 | 0.259 | 0.000 | 0.000 | 0.274 |   |

Berdasarkan Tabel 4, jarak genetik terbesar terjadi antara *M. pilimanus* dan *P. floridanus* KC 019175 sebesar 0.299. Jarak genetik terendah dengan nilai 0.000 terjadi antara *M. lar* dan *M. latidactylus* GU205069, *M. lar* GU205064 dan *M. malayanum* FM 958074, dan *M. latidactylus* GU205069 dan *M. malayanum* FM 958074 .



**Gambar 2.** Rekonstruksi pohon filogeni udang air tawar berdasarkan mtCO1 dengan NJ

Berdasarkan Gambar 2 didapatkan pohon filogeni berdasarkan sekuen DNA dengan metode NJ menunjukkan bahwa kelompok *ingroup* terpisah dari *outgroup* *P. floridanus* KC 019175. Sampel target yaitu *M. malayanum* 1 serta *M. latidactylus* GU205069, *M. malayanum* FM 958074, dan *M. lar* GU205064 mengelompok menjadi satu kelompok dengan nilai bootstrap 99%. Pada kelompok *ingroup* *M. malayanum*1, *M. latidactylus* GU205069, *M. Malayanum* FM 958074, *M. lar* GU205064 yang lebih berkerabatan dekat, sedangkan *M. Pilimanus* membentuk cabang terpisah dari keduanya. Dapat dibuktikan bahwa jenis-jenis *ingroup* (*M. malayanum* dan *M. pilimanus*) pada pensejajaran adalah benar berbeda marga dengan *P. floridanus* KC 019175.

## PEMBAHASAN

Spesimen-spesimen yang telah diawetkan sangat sulit untuk diidentifikasi secara morfologi. Penggunaan alkohol sebagai pengawet spesimen penelitian dengan waktu penyimpanan yang cukup lama dapat menyebabkan perubahan warna maupun rusaknya beberapa bagian tubuh spesimen yang rapuh, sehingga menyebabkan kesulitan identifikasi morfologi yang berakibat pada kesalahan identifikasi beberapa spesies.

Kesalahan identifikasi juga dapat disebabkan oleh kesamaan morfologi maupun kesulitan pengidentifikasian pada spesies dengan berbagai ukuran dalam fase kehidupan yang sulit dibedakan. Pengembangan pustaka *barcode* dapat dijadikan suatu cara identifikasi sampai tingkat spesies dengan tingkat kebenaran yang tinggi. Ruas basa dari gen COI bermutasi cukup cepat sehingga dapat membedakan spesies yang hampir mirip (Hebert dkk., 2003). Teknik *barcoding* juga dapat membantu pengungkapan spesies yang bersifat *cryptic* maupun *siblings*



seperti yang terjadi pada fenomena dimorfisme Jenis *M. Malayanum* dalam penelitian ini.

Hasil identifikasi morfologi berdasarkan Wowor dkk. (2004) dan Cai dkk. (2007). mengelompokkan tiga sampel menjadi satu famili dan tiga spesies. Setelah dilakukan *barcode* secara molekuler menggunakan gen COI, maka dapat dipastikan hanya terdapat dua spesies yaitu, *Macrobrachium malayanum* dan *Macrobrachium pilimanus*.

Jarak genetik terbesar terjadi antara *M. pilimanus* dan *P. floridanus* KC 019175 sebesar 0.299. Jarak genetik terendah dengan nilai 0.000 terjadi antara *M. lar* dan *M. latidactylus* GU205069, *M. lar* GU205064 dan *M. malayanum* FM 958074, dan *M. latidactylus* GU205069 dan *M. malayanum* FM 958074 .

Setelah dilakukan perbandingan dengan data dari *GenBank*, bahwa sampel target yaitu yaitu *M. malayanum* 1 terbukti sebagai spesies *M.malayanum* yang sesuai DNA *barcode* menggunakan gen COI bisa diaplikasikan untuk menentukan spesies udang air tawar, terutama dari suku Palaemonidae, hal ini dibuktikan bahwa sampel target yaitu *M. malayanum* 1 terbukti sebagai spesies *M.malayanum* yang sesuai dengan data *GenBank*.

Penentuan spesies dengan mengaplikasikan DNA *barcode* dalam penelitian ini dapat dijadikan referensi dalam pengembangan akuakultur maupun konservasi udang air tawar.

## **SIMPULAN**

Hasil analisis DNA *barcoding* terhadap sampel, yaitu *M. malayanum* dan *M. pilimanus*. Berdasarkan hasil rekonstruksi sampel *M. malayanum*1, *M. pilimanus*, *M. latidactylus* GU205069, *M. Malayanum* FM 958074, *M. lar* GU205064 mengelompok menjadi satu kelompok.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis menyampaikan terima kasih kepada *CRC Project* sebagai penyandang dana dan memfasilitasi penelitian ini.

## **DAFTAR PUSTAKA**

Abele, I. G. 1982. The Biology Of Crustaceae, Volume 1, *Academic Press*. New York.

- Bickford D, David JK, Navjot S, Ng PKL, Rudolf M, Kevin W, Krista K, Indraneil D. 2006. Cryptic Species As A Window On Diversity And Conservation. *Ecology and Evolution* 22: 148-155.
- Bliss, DE. 1982. The biology of crustacea. Volume 1. Systematics, the Fossil Record, and Biogeography. New York: *Academic Press*.
- Brusca RC, Brusca GJ. 2003. *Invertebrates*. Edisi Kedua. Sinauer Associates. USA.
- Byun SO, Fang Q, Zhou H, Hickford JGH. 2009. An Effective Method For Silver-Staining Dna In Large Numbers Of Polyacrylamide Gels. *Anal Biochem* 385: 174-175.
- Grave SD, Cai Y, Anker A. 2008. Global Diversity Of Shrimp ( Crustacea: Decapoda: Caridea) In Freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*. (595): 287-293.
- Hajibabaei M, Daniel HJ, John MB, Winnie H, Paul DNH. 2009. DNA Barcode Distinguish Species Of Tropical Lepidoptera. *PNAS* 103: 968-971.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR de. 2003. Biological Identifications Through Dna Barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270:313-321.
- Palumbi SR. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction Dalam Molecular Systematic. Edisi ke-2. Disunting oleh Hillis DM, Moritz C, Mable BK. *Massachusetts: Sinauer*.
- Solihin DD. 1994. Peran DNA Mitokondria (MtDNA) Dalam Studi Keragaman Genetik Dan Biopopulasi Pada Hewan. *Hayati* 1: 1-4.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes B, Last, P. 2005. DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 360: 1847-185
- Waugh J. 2007. DNA Barcoding In Animal Species: Progress, Potential And Pitfalls. *BioEssays* 29:188-197
- Wong EHK dan Hanner RH. 2008. DNA Barcoding Detect Market Substitution In North American Seafood. *Food Research International* 41:828-837.
- Wowor D, Cai Y, Ng PKL. 2004. Crustacea: Decapoda, Caridae. Di dalam: Yule CM, Sen YH, editor. *Freshwater Invertebrates Of The Malaysian Region*. Kuala Lumpur. *Academy of Science Malaysia*: 337-356.