



Keragaman genetik mimi (*Carcinoscorpius rotundicauda* dan *Tachypleus gigas*) di perairan Demak, Madura dan Balikpapan berdasarkan penanda *Random Amplified Polymorphic DNA*

Genetic diversity of horseshoe crabs (*Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus gigas*) in Demak, Madura and Balikpapan waters based on Random Amplified Polymorphic DNA marker

Naila K. Aini^a, Ali Mashar^b, Hawis H. Madduppa^c, Yusli Wardiatno^{bd}

^a Mahasiswa Pascasarjana Prodi Pengelolaan Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor, 16680, Indonesia [+62 82213739330]

^b Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor, 16680, Indonesia

^c Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor, 16680, Indonesia

^d Pusat Penelitian Lingkungan Hidup, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor, 16680, Indonesia

Article Info:

Received: 12 - 03 - 2020

Accepted: 31 - 03 - 2020

Keywords:

Adaptation capability, heterozygosity, Limulidae, Xiphosura

Corresponding Author:

Yusli Wardiatno
Departemen Manajemen
Sumberdaya Perairan, Fakultas
Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor;
Tel. +628128608966
Email:
yusli@apps.ipb.ac.id

Abstract. *Horseshoe crab is an exotic and protected marine organism in Indonesia and is considered as the living fossil animal in the world. IUCN conservation status of *Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus gigas* is still Data Deficient, and in Indonesia research on genetic population is lacking, if any. This study aims to reveal genetic diversity of *C. rotundicauda* and *T. gigas* populations in northern Java (Demak and Madura) and Balikpapan waters. This research was conducted by using molecular analysis with genetic markers Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). The primers used in this study were OPB 06, OPG 10, and OPX 03. The results showed that the highest polymorphism of *C. rotundicauda* was found in Demak (74.6667%) and heterozygosity was 0.2669. Furthermore, *T. gigas* had the highest polymorphism in Madura (74.3590%) and heterozygosity was 0.25551. Based on pairwise comparison tests, populations of *C. rotundicauda* and *T. gigas* in Demak, Madura, and Balikpapan were significantly different ($p < 0.05$). The difference is believed due to the limitation movement of horseshoe crabs from and into the three locations, as well as the presence of natural geographic barrier. Thus, it can be concluded that horseshoe crabs in northern Java and Balikpapan waters has different genetic diversity. Genetically, horseshoe crab in northern Java or Balikpapan had relatively moderate diversity and low adaptation capability.*

How to cite (CSE Style 8th Edition):

Aini NK, Mashar A, Maduppa HH, Wardiatno Y. 2020. Keragaman genetik mimi (*Carcinoscorpius rotundicauda* dan *Tachypleus gigas*) di perairan Demak, Madura dan Balikpapan berdasarkan penanda *Random Amplified Polymorphic DNA*. *JPSL* 10(1): 124-137. <http://dx.doi.org/10.29244/jpsl.10.1.124-137>.

PENDAHULUAN

Mimi atau belangkas (*horseshoe crab*) merupakan salah satu hewan yang berasal dari famili Limulidae. Mimi adalah biota perairan yang eksotik dan merupakan salah satu *living fossil animal* yang ada di dunia (Eldredge dan Stanley, 1984). Hewan ini ditemukan sejak zaman Paleozolitikum periode Ordovician dan diduga nenek moyangnya berasal dari zaman Mesozolitikum. Hingga saat ini, di dunia terdapat empat jenis mimi. *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille, 1802), *Tachypleus gigas* (Müller, 1785), dan *Tachypleus tridentatus* (Leach, 1819) ditemukan hidup di sekitar kawasan pantai Asia termasuk Indonesia dan biasa disebut dengan *Asian horseshoe crab*. Selanjutnya, *Limulus polyphemus* atau biasa dikenal sebagai *Atlantic horseshoe crab* hanya ditemukan di pantai Atlantik Amerika Utara (Walls *et al.*, 2002).

Mimi adalah hewan yang dilindungi di Indonesia, namun penelitian terhadap hewan ini tidak sebanyak hewan yang dilindungi lainnya, misalnya seperti penyu (Ismane *et al.*, 2018) atau gajah Sumatera (Febryano dan Rusita, 2018). Status konservasi setiap jenis mimi berbeda satu sama lain. Jenis *C. rotundicauda* dan *T. gigas* berstatus konservasi *data deficient* (World Conservation Monitoring Centre 1996a). Makna dari status tersebut adalah informasi yang ada saat ini belum memadai untuk menentukan resiko kepunahan dari kedua jenis mimi ini. *T. tridentatus* mempunyai status perlindungan *endangered* (EN) atau terancam punah (Laurie *et al.*, 2019). Status konservasi *T. tridentatus* diperbarui pada bulan April 2019, status konservasi sebelumnya adalah *data deficient* (World Conservation Monitoring Centre, 1996b). Mimi jenis *L. polyphemus* mempunyai status IUCN *lower risk / near threatened* atau rentan (Smith *et al.*, 2016).

Mimi mempunyai persebaran yang luas. Persebaran mimi terbagi menjadi dua wilayah yang besar yaitu di wilayah Atlantik Utara dan Asia. Persebaran mimi di Atlantik Utara terdapat di sepanjang pantai Atlantik dan Teluk Mexico dengan kelimpahan terbesar dapat ditemukan di antara Virginia dan New Jersey (Shuster, 1982). Persebaran mimi di wilayah perairan Asia mulai dari India hingga Jepang termasuk sekitar Indonesia dan Filipina (Walls *et al.*, 2002). Persebaran mimi di perairan berkaitan dengan kondisi arus dan fase larva (planktonik) (Shanks, 2009). Mimi dewasa cenderung akan melakukan migrasi ke pantai untuk proses pemijahan dan meletakkan telur. Telur tersebut akan menetas setelah masa inkubasi selama kurang lebih dua hingga empat minggu (Sekiguchi *et al.*, 1982). Setelah menetas menjadi larva, mimi akan bergerak menuju ke perairan terbuka untuk tumbuh dan berkembang. Larva mimi akan berenang bebas kurang lebih selama enam hari sebelum menetap (*settle*) di dasar perairan. Kondisi lingkungan perairan menentukan pergerakan larva mimi sebelum akhirnya menetap di dasar wilayah lokasi tertentu. Keterkaitan antara populasi di lokasi satu dengan lainnya dapat diketahui melalui penanda genetik.

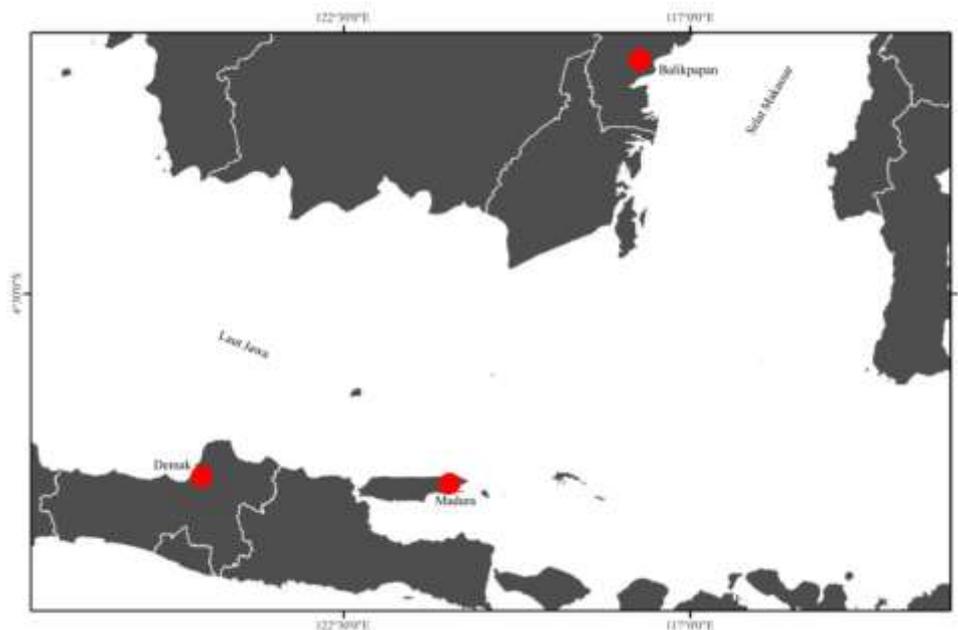
Penanda genetik merupakan urutan DNA yang dapat diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Urutan basa nukleotida yang beragam antar spesies dapat digunakan sebagai penanda spesifik yang memberikan pengetahuan mengenai hubungan filogenetik untuk mengatasi keraguan dalam sistematika. Penanda genetik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) merupakan amplifikasi genom DNA berdasarkan teknik PCR (Williams *et al.*, 1990). Analisis ini menggunakan primer tunggal dengan panjang urutan basa nukleotida sebanyak 10 basa. Analisis RAPD digunakan untuk melihat keragaman genetik berdasarkan tingkat polimorfisme. Ruas penempelan dengan perbedaan panjang fragmen DNA diasumsikan mengikuti pola pewarisan Mendel (Chauhan dan Rajiv, 2010). RAPD DNA *fingerprint* dapat memberikan penjelasan secara global jumlah urutan DNA dalam suatu populasi, walaupun terbatas oleh sifat anomin dari poliorfisme genetik yang diperoleh. Penanda RAPD mempunyai kelebihan tidak memerlukan informasi urutan basa nukleotida untuk melakukan pembacaan (Iyengar *et al.*, 2000; Nebauer *et al.*, 2000). Teknik ini lebih murah dan cepat untuk dilakukan. Kekurangan dari RAPD yaitu belum mampu membedakan antara lokus homozigot dan heterozigot sehingga memerlukan analisis urutan basa nukleotida dengan teknik yang beresolusi tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap keragaman genetik pada populasi mimi jenis *C. rotundicauda* dan *T. gigas* di perairan Demak, Madura, dan Balikpapan.

Pemilihan lokasi tersebut berdasarkan pada dua pertimbangan. Pertama pesisir Balikpapan mewakili lokasi habitat mimi dengan kondisi ekosistem mangrove yang masih baik. Selain itu, mimi yang ditemukan di Balikpapan mempunyai ukuran yang lebih besar (Hery Seputro dari Dinas Pangan Pertanian dan Perikanan Kota Balikpapan, komunikasi pribadi 2019). Mangrove di Balikpapan terdapat di Kelurahan Teritip dengan luasan ± 61.35 ha (Noor dan Helminuddin, 2009). Mimi yang ditemukan sekitar pesisir utara Jawa mempunyai ukuran yang lebih kecil jika dibandingkan dengan mimi yang berasal dari pesisir Balikpapan (Mashar *et al.*, 2017). Kedua, sebagai pembanding dipilih lokasi pesisir utara Jawa khususnya Demak dan Madura sebagai ekosistem dengan kondisi sudah banyak terjadi kerusakan (Faturrohmah dan Majuki, 2017), tetapi masih terdapat ekosistem mangrove walaupun tidak sebaik di Balikpapan. Luasan mangrove di Demak (daerah Betahwalang) mencapai 37.41 ha (Faturrohmah, 2017) sedangkan di Madura (daerah Kalianget, Sumenep) adalah 39.4 ha (Muhsoni *et al.*, 2011). Selain itu tekanan penangkapan terhadap sumberdaya mimi di kedua daerah tersebut cukup tinggi.

METODE

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April hingga Desember 2019 di Laboratorium Biologi Molekuler, Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Pengambilan sampel dilakukan di tiga lokasi yaitu Demak (daerah Betahwalang), Madura (daerah Kalianget, Sumenep), dan Balikpapan (Gambar 1).



Gambar 1 Peta lokasi penelitian yang memperlihatkan titik pengambilan contoh kedua jenis mimi (bulatan merah), yakni *C. rotundicauda* dan *T. gigas*.

Metode Pengumpulan Data

Pengambilan contoh dilakukan dengan menggunakan teknik acak sederhana. Contoh mimi didapatkan dari jaring yang dijalankan oleh kapal nelayan atau diambil menggunakan tangan secara langsung. Contoh yang diambil adalah mimi jenis *C. rotundicauda* dan *T. gigas*. Dilakukan pengukuran mimi contoh yang didapatkan dalam kondisi hidup diambil darahnya masing-masing sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan ke dalam tube berukuran 2 mL yang telah berisi alkohol *absolute* (100%) sebanyak 1 mL (Dillon *et al.*, 1996; Quicke *et al.*, 1999).

Ekstraksi DNA

Sampel darah yang berasal dari Demak, Madura, dan Balikpapan akan diisolasi dan diekstraksi, tetapi sebelumnya dilakukan pencucian terlebih dahulu untuk menghilangkan kandungan alkohol yang digunakan sebagai pengawetnya. Tahap pencucian dilakukan dengan menggunakan akuades. Sampel darah sebanyak 400-500 μL dipindahkan ke dalam *microtube* 1.5 ml kemudian disentrifius selama 1.5 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Supernatan dihilangkan dan setiap tube diisi dengan akuades sebanyak 400 μL dan disentrifius. Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali. Setelah itu dilakukan isolasi dan diekstraksi untuk memperoleh total genom sesuai dengan arahan protokol GeneAID Kit.

Amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan metode RAPD

Screening 13 jenis primer dilakukan sebagai tahap awal dalam analisis RAPD. Primer yang dipilih untuk analisis adalah primer yang mampu menghasilkan pitapolimorfik. Hasil pengujian tahap awal primer yang menghasilkan pita tersebut diantaranya adalah OPB 06, OPG 10, dan OPX 03. PCR dilakukan dengan menggunakan *thermocycler gradient* (AB) dengan tujuan pengaturan suhu *annealing* dapat dilakukan sesuai dengan *temperature melting* (TM) masing-masing primer. Komponen bahan yang digunakan dalam PCR terdiri atas 12.5 μL *Dream Taq Master Mix 2x* (Thermo Scientific, USA), 1 μL primer RAPD, 3 μL DNA, dan ditambahkan *free water* sampai dengan total volume 25 μL . Tahapan PCR yang dilakukan diantaranya denaturasi awal pada suhu 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama satu menit, *annealing* dilakukan sesuai dengan TM masing-masing primer (OPB 06 39.8°C, OPG 10 41.2°C, OPX 03 41.8°C) selama satu menit, dan elongasi 72°C selama dua menit, dan *post* elongasi 72°C selama satu menit (modifikasi dari Williams *et al.*, 1990).

Elektroforesis dan Visualisasi

Produk PCR kemudian dielektroforesis. Produk tersebut dimasukkan ke dalam sumur pada *gel agarose* 1.5% sebanyak 6 μL (sudah termasuk *dye*) (modifikasi dari Williams *et al.*, 1990). Media yang digunakan adalah larutan 1x TBE (Tris Borate EDTA) (Lee dan Cowman 1994). Elektroforesis dilakukan bersama dengan marker 100 bp pada tegangan listrik sebesar 100 volt selama 60 menit menggunakan PowerPac Basic (Bio-Rad). Visualisasi dilakukan dengan menggunakan bantuan sinar UV (Gel documentation –UV transiluminator Alphamager).

Metode Analisis Data

Scoring kemunculan fragmen DNA dilakukan pada hasil elektroforesis yang telah diperoleh. Kemunculan fragmen tersebut akan bergantung pada berat molekul yang dihasilkan. Prediksi berat molekul produk amplifikasi dilakukan dengan menggunakan bantuan *software* AlphaView SA. *Scoring* dilakukan dengan cara memberikan nilai 1 untuk fragmen DNA yang muncul dan nilai 2 untuk fragmen DNA yang tidak muncul (mengubah menjadi data biner). Hasil *scoring* yang berupa data biner dianalisis dengan menggunakan *software* TFGA (*Tools for Population Genetic Analyses*). *Software* tersebut digunakan untuk menentukan nilai derajat polimorfisme, heterozigositas, serta jarak genetik. Pembuatan dendrogram digunakan untuk melihat pengelompokan hirarki mimi yang berada di Demak, Madura, dan Balikpapan serta koefisien nilai F_{ST} digunakan untuk melihat kemampuan migrasi individu. Kedua analisis tersebut dilakukan berdasarkan UPGMA (*Unweighted Pair Group Arithmetic Average*) (Miller, 1997).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil amplifikasi menggunakan primer OPB 06, OPX 03, dan OPG 10 pada 70 contoh mimi yang terdiri atas 30 individu *C. rotundicauda* dari ketiga lokasi penelitian masing-masing 10 individu (Demak, Madura, dan Balikpapan), 30 individu *T. gigas* juga dari lokasi yang sama (Gambar 2).

Carcinoscorpius rotundicauda

Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa setiap primer memiliki profil jumlah fragmen yang berbeda karena memiliki daerah penempelan yang berbeda-beda disetiap individu. Total jumlah lokus yang muncul dengan menggunakan tiga jenis primer (OPB 06, OPG 10, OPX 03) pada jenis *C. rotundicauda* di tiga lokasi adalah 75 lokus (Tabel 1). Jumlah lokus paling banyak berada pada primer OPG10 sebanyak 29 lokus, sedangkan jumlah paling sedikit pada primer OPB 06 sebanyak 19 lokus. Jumlah kisaran fragmen yang paling banyak ditemukan pada populasi *C. rotundicauda* di Balikpapan, sedangkan jumlah kisaran fragmen yang paling sedikit ditemukan di populasi Madura.

Hasil analisis ukuran fragmen pada jenis *C. rotundicauda* di masing-masing lokasi berbeda satu sama lain. Ukuran fragmen *C. rotundicauda* paling panjang diantara ketiga lokasi tersebut terdapat di Balikpapan dengan kisaran 200 hingga 2900 pb. Kisaran ukuran terpanjang *C. rotundicauda* di Balikpapan pada primer OPG 10 dan terpendek pada primer OPB 06. Kisaran ukuran fragmen *C. rotundicauda* di Madura paling rendah dibandingkan dengan lokasi lainnya yaitu pada kisaran ukuran 200 hingga 2400 pb. Pajang fragmen dengan ukuran terpanjang terdapat pada primer OPX 03 dan terpendek pada OPG 10. Ukuran fragmen *C. rotundicauda* di Demak berkisar antara 200 hingga 2500 pb, dengan ukuran terpanjang pada primer OPX 03 yaitu 400-2400 pb dan ukuran terpendek 200-1500 pb (Tabel 1).

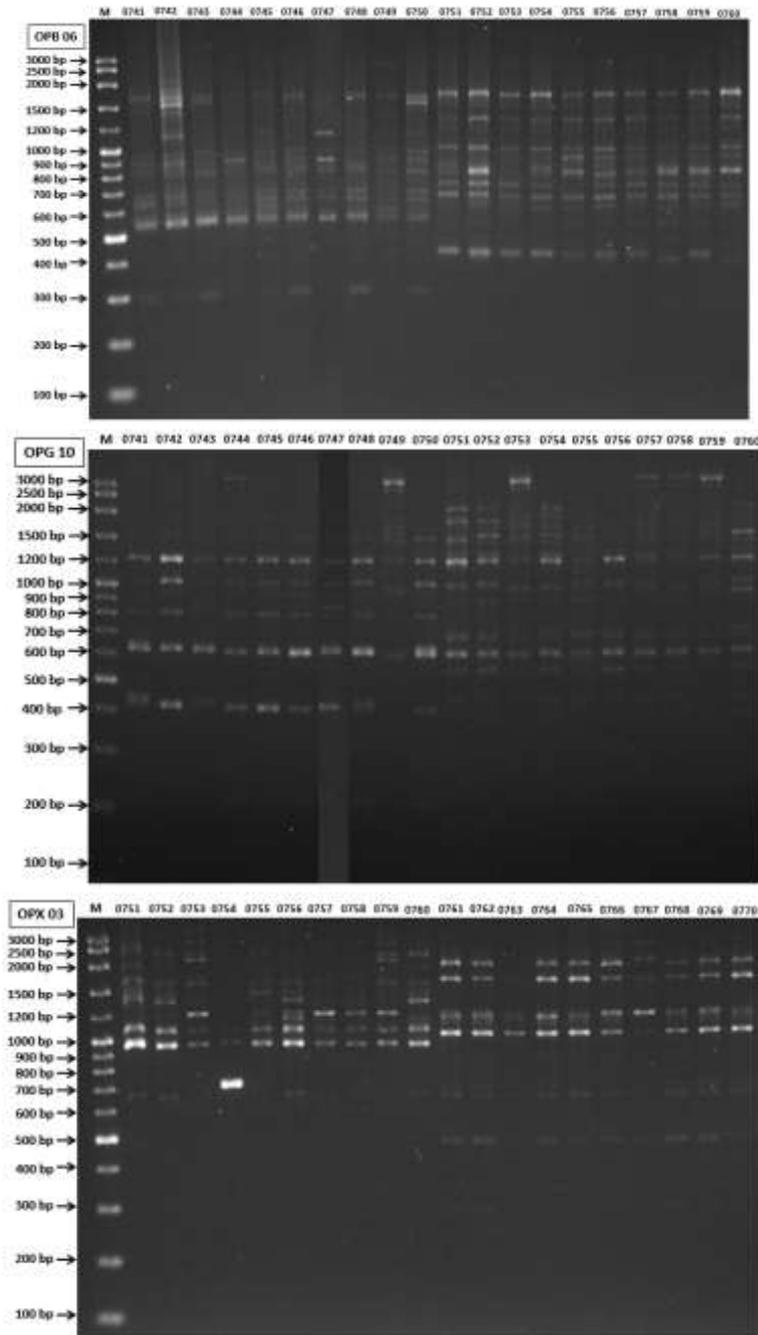
Variasi keragaman genetik berdasarkan derajat polimorfisme dan heterozigositas *C. rotundicauda* di Demak, Madura, dan Balikpapan terdapat di Tabel 2. Berdasarkan hasil analisis, derajat polimorfisme tertinggi pada *C. rotundicauda* terdapat di Demak dengan nilai persentase sebesar 74.6667%. Keragaman genetik terendah berdasarkan nilai derajat polimorfisme terdapat pada *C. rotundicauda* di Madura dengan nilai sebesar 58.6667%. Selain derajat polimorfisme terdapat nilai heterozigositas yang dapat menggambarkan keragaman genetik. Nilai heterozigositas tertinggi pada *C. rotundicauda* terdapat di Demak sedangkan nilai heterozigositas terendah terdapat di Balikpapan yaitu 0.2669 dan 0.1885. Sementara itu, nilai derajat polimorfisme antar populasi di ketiga lokasi tersebut adalah 76% dengan nilai heterozigositas 0.2678.

Hasil uji F_{ST} berpasangan ditampilkan pada Tabel 3. Berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa antara ketiga populasi *C. rotundicauda* di Demak, Madura, dan Balikpapan pada ketiga spesies mempunyai karakter *genotype* yang berbeda secara signifikan satu sama lain ($p < 0.05$). Perbedaan terjauh terdapat di antara Madura dan Balikpapan sedangkan perbedaan terdekat terdapat diantara Demak dan Madura.

Tachypleus gigas

Berdasarkan hasil analisis RAPD diperoleh bahwa setiap jenis primer yang digunakan menampilkan jumlah dan ukuran fragmen yang disetiap individu. Jumlah lokus yang diperoleh dengan menggunakan primer OPB 06, OPG 10, OPX 03 pada jenis *T. gigas* di tiga lokasi adalah 78 lokus (Tabel 5). Jumlah lokus paling banyak berada pada primer OPG10 sebanyak 32 lokus, sedangkan jumlah paling sedikit pada primer OPB 06 sebanyak 19 lokus. Jumlah kisaran fragmen *T. gigas* di masing-masing lokasi hampir sama yaitu Demak sebanyak 2 hingga 15, Madura 2 hingga 16, dan Balikpapan 3 hingga 14.

Jarak genetik yang diperoleh digambarkan dengan menggunakan dendogram (Gambar 3). Hasil tersebut menunjukkan bahwa jarak genetik *C. rotundicauda* di Demak dan Madura lebih dekat dibandingkan dengan Balikpapan yaitu (Tabel 4). Jarak genetik terjauh *C. rotundicauda* terdapat di antara Madura dan Balikpapan yaitu 0.3604.



Gambar 2 Sebagian dari hasil amplifikasi dengan menggunakan primer OPB 06, OPX 03, dan OPG 10 pada *C. rotundicauda* dan *T. gigas*.

Tabel 1 Kisaran jumlah fragmen pada populasi *C. rotundicauda* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan.

	Kisaran Jumlah Fragmen			Kisaran Ukuran Fragmen (pb)			Jumlah lokus per primer
	Demak	Madura	Balikpapan	Demak	Madura	Balikpapan	
OPB 06	0-12	5-12	7-12	300-1500	300-1800	300-1700	19
OPG 10	0-16	3-11	6-11	200-2500	200-1500	200-2900	29
OPX 03	0-14	1-12	5-12	450-2400	400-2400	450-2800	27
Total	0-16	3-12	5-12	200-2500	200-2400	200-2900	75

Tabel 2 Heterozigositas dan polimorfisme pada populasi *C. rotundicauda* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan.

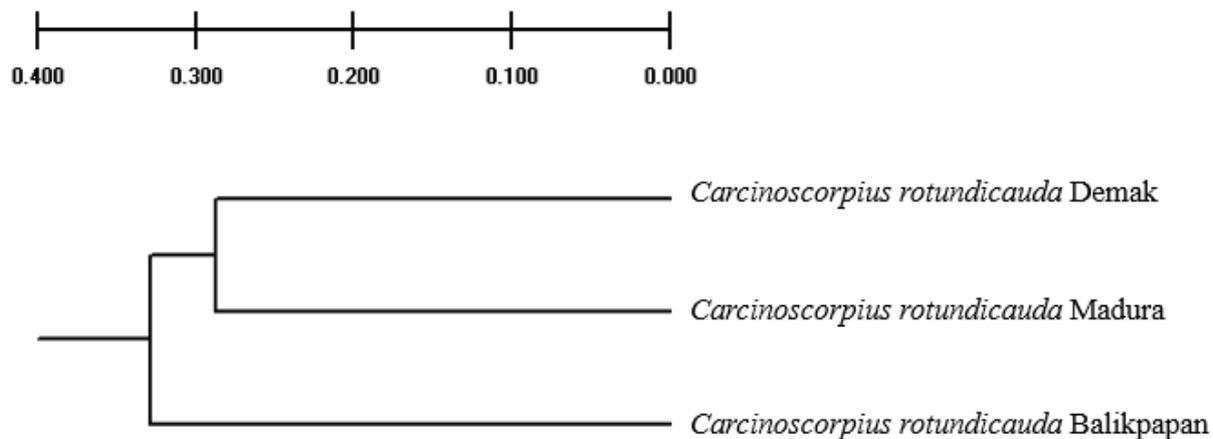
	Heterozigositas	Polimorfisme (%)
Demak	0.2669	74.6667
Madura	0.1921	58.6667
Balikpapan	0.1885	64
Antar populasi	0.2678	76

Tabel 3 Nilai F_{ST} populasi *C. rotundicauda* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan

	Demak	Madura	Balikpapan
Demak	-		
Madura	0.0004	-	
Balikpapan	0.0001	0.0000	-

Tabel 4 Jarak genetik pada populasi *C. rotundicauda* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan

	Demak	Madura	Balikpapan
Demak	-		
Madura	0.2874	-	
Balikpapan	0.2963	0.3604	-



Gambar 3 Visualisasi jarak genetik pada populasi *C. rotundicauda* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan

Hasil analisis ukuran fragmen pada jenis *T. gigas* di setiap lokasi penelitian berbeda satu sama lain. Ukuran fragmen *T. gigas* di Balikpapan lebih panjang dibanding dengan lokasi lainnya yaitu kisaran 400 hingga 3000 pb. Kisaran ukuran terpanjang *T. gigas* di Balikpapan terdapat pada primer OPG 10 dan terpendek pada primer OPB 06. Berbeda halnya dengan *T. gigas* Demak yang mempunyai kisaran ukuran fragmen lebih rendah dibandingkan dengan lokasi lainnya yaitu 200 hingga 2500 pb. Populasi *T. gigas* di Demak ini mempunyai kisaran ukuran fragmen terpanjang terdapat pada primer OPX 03 dan terpendek pada OPG 10 (Tabel 5).

Hasil analisis RAPD pada *T. gigas* di Demak, Madura, dan Balikpapan menunjukkan derajat polimorfisme dan nilai heterozigositas yang berbeda-beda (Tabel 6). Derajat polimorfisme tertinggi pada jenis *T. gigas* terdapat di Madura dengan nilai persentase sebesar 74.3590%. Keragaman genetik terendahnya terdapat di Demak dengan nilai persentase sebesar 51.2821%. Selain derajat polimorfisme terdapat nilai heterozigositas. Nilai heterozigositas tertinggi pada *T. gigas* terdapat di Madura sedangkan nilai heterozigositas terendah terdapat di Balikpapan yaitu 0.2551 dan 0.1864. Sementara itu, nilai derajat polimorfisme antar populasi di ketiga lokasi tersebut adalah 89.7436% dengan nilai heterozigositas 0.2938.

Uji F_{ST} berpasangan dilakukan untuk mengetahui kemampuan migrasi suatu individu. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Tabel 7 menunjukkan bahwa ketiga populasi *T. gigas* di Demak, Madura, dan Balikpapan berbeda secara signifikan ($p < 0.05$). hal tersebut mengartikan bahwa pola perpindahan *T. gigas* dari satu lokasi ke lokasi lainnya cenderung rendah. Selain itu, hasil analisis tersebut juga menunjukkan bahwa populasi *T. gigas* di ketiga lokasi mempunyai karakter *genotype* yang berbeda satu sama lain.

Berdasarkan hasil analisis, diperoleh nilai jarak genetik yang menunjukkan bahwa jarak genetik *T. gigas* di Demak dan Madura lebih dekat dibandingkan dengan *T. gigas* Balikpapan yaitu 0.3232 (Gambar 4). Jarak genetik terjauh *T. gigas* terdapat di antara Demak dan Balikpapan yaitu 0.4631 (Tabel 8).

Tabel 5 Kisaran jumlah fragmen pada populasi *T. gigas* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan

	Kisaran Jumlah Fragmen			Kisaran Ukuran Fragmen (pb)			Jumlah lokus per primer
	Demak	Madura	Balikpapan	Demak	Madura	Balikpapan	
OPB 06	2-9	2-11	11-14	400-1900	400-1900	400-1600	19
OPG 10	12-15	6-16	8-14	200-2100	300-2900	400-2900	32
OPX 03	4-13	7-13	3-9	300-2500	300-2500	650-3000	27
Total	2-15	2-16	3-14	200-2500	300-2900	400-3000	78

Tabel 6 Heterozigositas dan polimorfisme pada populasi *T. gigas* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan

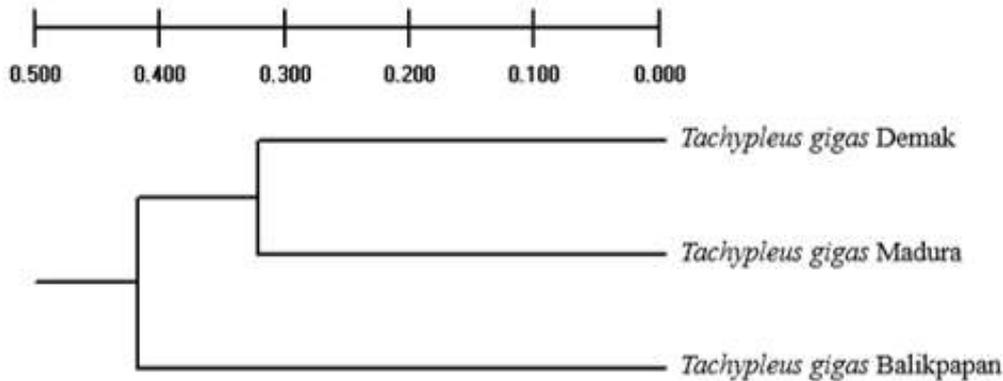
	Heterozigositas	Polimorfisme (%)
Demak	0.1950	51.2821
Madura	0.2551	74.3590
Balikpapan	0.1864	52.5641
Antar populasi	0.2938	89.7436

Tabel 7 Nilai F_{ST} pada populasi *T. gigas* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan

	Demak	Madura	Balikpapan
Demak	-		
Madura	0.0000	-	
Balikpapan	0.0000	0.0000	-

Tabel 8 Jarak genetik pada populasi *T. gigas* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan

	Demak	Madura	Balikpapan
Demak	-		
Madura	0.3232	-	
Balikpapan	0.4631	0.3847	-



Gambar 4 Visualisasi jarak genetik pada populasi *T. gigas* yang diambil dari perairan utara Jawa (Demak dan Madura) dan Balikpapan

Pembahasan

Ukuran mimi yang ditemukan di Balikpapan cenderung lebih besar (Hery Seputro dari Dinas Pangan Pertanian dan Perikanan Kota Balikpapan, komunikasi pribadi 2019) diantaranya karena tekanan tangkapan mimi di Balikpapan lebih rendah. Hal tersebut dikarenakan mimi di Balikpapan cenderung tidak dikonsumsi oleh masyarakat setempat. Kondisi mangrove di Balikpapan lebih luas dibandingkan dengan Demak (daerah Betahwalang) dan Madura (daerah Kalianget). Berbeda halnya dengan di Demak dan Madura, mimi di kedua daerah tersebut masih dikonsumsi oleh masyarakat khususnya betina yang bertelur (komunikasi pribadi 2019 dengan nelayan Betahwalang, Kabupaten Demak dan Kalianget, Kabupaten Sumenep, Madura). Ancaman keberadaan mimi menjadi serius dengan adanya budaya festival *dugderan* di Kendal, Jawa Tengah. Telur mimi di festival tersebut menjadi menu makanan yang sangat diminati, sehingga permintaan mimi betina bertelur menjadi meningkat. Tidak hanya di Indonesia, mimi betina bertelur juga menjadi salah satu menu makanan eksklusif di beberapa restoran mahal di Thailand dan Malaysia (Christianus dan Saad, 2007). Hal lain yang menjadi ancaman mimi adalah perlakuan nelayan terhadap mimi. Sebagian besar nelayan menyatakan bahwa mimi adalah hama yang bersifat merusak jaring nelayan apabila tertangkap, sehingga cenderung melakukan pelepasan paksa dari jaring. Selain itu, mimi juga dimanfaatkan secara komersil sebagai umpan penangkapan ikan sidat (*Anguilla rostrata*) (Kreamer dan Michels 2009), di Jambi (Kuala Tungkal) digunakan sebagai umpan ikan sembilang (*Euristhmus microceps*) (Rubiyanto 2012) dan beberapa juga di impor ke Amerika utara untuk digunakan sebagai umpan penangkapan (Smith *et al.* 2016).

Analisis kisaran ukuran dan jumlah fragmen yang menempel pada setiap individu berdasarkan primer masing-masing cenderung berbeda. Pemilihan primer dalam analisis RAPD berpengaruh karena setiap primer mempunyai situs penempelannya masing-masing. Hal tersebut mengakibatkan adanya perbedaan kemunculan pita polimorfik yang dihasilkan. Keberhasilan suatu primer dalam mengamplifikasi DNA *template* ditentukan oleh ada tidaknya kesamaan (homologi) antara sekuen nukleotida primer dan sekuen nukleotida DNA *template*. Hal lain yang juga dapat mempengaruhi perbedaan tersebut diantaranya suhu annealing, enzim *Taq* DNA polimerase, dan kualitas serta kuantitas DNA (Panner *et al.*, 1999). Kontaminasi adanya senyawa lain saat ekstraksi juga dapat menurunkan kualitas pita dan konsentrasi DNA sehingga mempengaruhi kemunculan pita menjadi tidak jelas (Wedden *et al.*, 1992). Sebelum melakukan analisis RAPD sebaiknya melakukan proses *screening* primer terlebih dahulu. Hal tersebut dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh primer yang sesuai untuk dapat menghasilkan pita polimorfik.

Keragaman genetik penelitian ini didasarkan derajat polimorfisme dan heterozigositas. Polimorfisme merupakan ukuran keragaman genetik berdasarkan proporsi lokus polimorf terhadap total lokus yang teridentifikasi, sedangkan heterozigositas adalah ukuran keragaman genetik berdasarkan proporsi jumlah individu heterozigot dalam populasi (Soewardi, 2007). Keragaman genetik *C. rotundicauda* berdasarkan derajat polimorfisme di Demak, Madura, dan Balikpapan masih tergolong sedang, namun dari ketiga lokasi tersebut *C. rotundicauda* di Demak mempunyai keragaman tertinggi. Hal tersebut juga didukung dengan nilai heterozigositas yang lebih tinggi dibandingkan dengan dua lokasi lainnya. Berbeda halnya dengan *T. gigas* keragaman tertinggi terdapat di Madura dengan nilai derajat polimorfisme dan heterozigositas masing-masing adalah 74.3590% dan 0.2551. Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan dengan polimorfisme *T. gigas* di Cherating, Malaysia yaitu 83.33%, akan tetapi nilai tersebut juga lebih tinggi dibandingkan dengan *T. gigas* yang berasal dari Tanjung Dawai, Malaysia yaitu sebesar 44.44% (Ismail *et al.*, 2011).

Perbedaan nilai derajat polimorfisme terjadi karena perbedaan variasi genetik intrapopulasi dan pola diferensiasi populasi dalam penanda genetik seperti *allozymes*, DNA mitokondria, dan mikrosatelit (Selander *et al.*, 1970; Saunders *et al.*, 1986; King *et al.*, 2005). Penelitian Primer RAPD pada dasarnya didesain untuk mendeteksi polimorfisme yang disebabkan oleh adanya mutasi poin (Smith, 2005). Kemunculan pita polimorfisme pada penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat bentuk mutasi insersi dan delesi yang terjadi saat amplifikasi (Clark dan Lanigan, 1993). Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai derajat polimorfisme intrapopulasi dan interpopulasi pada spesies *C. rotundicauda* dan *T. gigas* masih tergolong sedang. Berdasarkan hasil yang diperoleh, nilai heterozigositas *C. rotundicauda* dan *T. gigas* intrapopulasi tergolong rendah dan cenderung homogen. Penurunan heterozigositas suatu populasi dapat menghilangkan keberadaan alel potensial, misal yang berkaitan dengan ketahanan terhadap penyakit, timbulnya abnormalitas, serta gangguan pertumbuhan (Slamat, 2009). Nilai heterozigositas dalam keragaman genetik menunjukkan tingkat potensi adaptasi terhadap lingkungan. Semakin rendah nilai heterozigositas maka semakin sedikit gen yang terlibat dalam menyumbangkan tingkat kebugaran suatu populasi yang artinya spesies tersebut mempunyai kemampuan adaptasi yang lemah (Tave, 1993). Secara umum, rendahnya keragaman genetik intrapopulasi akan memberikan efek terhadap rendahnya daya adaptasi suatu spesies dalam populasi untuk mempertahankan kelangsungan hidup jangka panjang (Schemske *et al.*, 1994).

Uji perbandingan berpasangan (F_{ST}) digunakan untuk melihat keterkaitan antara populasi. Hasil pengukuran keragaman antar populasi berdasarkan pada uji F_{ST} menunjukkan bahwa populasi *C. rotundicauda* dan *T. gigas* di Demak, Madura, dan Balikpapan berbeda secara signifikan ($p < 0.05$). Hal tersebut mengindikasikan bahwa ketiga populasi *C. rotundicauda* dan *T. gigas* berasal dari stok dengan keragaman alel terfiksasi yang berbeda antar populasinya. Selain itu, hal tersebut juga mengindikasikan bahwa aliran gen (*gene flow*) yang terjadi antara ketiga populasi tersebut cenderung rendah. Perbedaan populasi tersebut diduga karena kemampuan mimi dalam melakukan perpindahan (*movement*) dari lokasi satu ke lokasi lainnya cenderung terbatas. King *et al.* (2005) menjelaskan bahwa secara genetik bahwa pergerakan mimi terbatas di beberapa bagian dari wilayah jelajahnya. Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian Moore dan Perrin (2007) terkait dengan penggunaan ruang dan pola pergerakan mimi (*L. polyphemus*) berdasarkan musim. Penelitian lain yang mendukung keterbatasan wilayah jelajah mimi pernah dilakukan di Taiwan untuk jenis *T. tridentatus*. Penelitian tersebut menjelaskan bahwa antar populasi terjadi aliran gen pada jarak 15 km dimana jarak tersebut dianggap sebagai jarak pendek antara dua populasi, aliran gen tidak ditemukan di antara dua populasi ketika jarak geografisnya melebihi 150 km (Yang *et al.*, 2007). Jarak maksimum yang tercatat pada penelitian terkait pola pergerakan dan perpindahan *L. polyphemus* di teluk Great, New Hampshire (AS) adalah 9,2 km (Schaller *et al.*, 2010). Studi populasi yang dilakukan di perairan Atlantik Utara mulai dari New York hingga teluk Delaware dan Chesapeake mencatat sebanyak 14 individu mimi yang melakukan pergerakan atau perpindahan pada kisaran jarak 104 - 265 km (Swan, 2005). Grogan (2004) berhasil mengungkap bahwa mimi mempunyai jarak perpindahan maksimum yang berbeda antara jantan dan betina. Mimi betina mampu menempuh jarak hingga 493.74 km sedangkan mimi jantan hanya mampu menempuh jarak maksimum 363.7 km. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa mimi betina mempunyai wilayah jelajah yang lebih luas dibandingkan dengan

mimi jantan. Hal tersebut menjelaskan bahwa tidak cukup hanya jarak geografis yang menjadi pembatas antar populasi, akan tetapi terdapat faktor lain yang juga berperan penting salah satunya adalah adanya *natural barriers* (Pierce *et al.*, 2000; Grogan, 2004).

Jarak genetik populasi mimi jenis *C. rotundicauda* dan *T. gigas* di ketiga lokasi penelitian terlihat bahwa hubungan kekerabatan mimi di Demak dan Madura lebih dekat dibandingkan dengan mimi yang berada di Balikpapan. Hal tersebut dapat terjadi karena mimi di Demak dan Madura masih berada dalam wilayah yang sama yaitu pantai utara Jawa. Berdasarkan siklus hidupnya, mimi dewasa cenderung berdiam di dasar dan melakukan perpindahan ke daerah pantai untuk melakukan proses reproduksi (Sekiguchi, 1988). Larva mimi jenis *L. polyphemus* cenderung akan bersifat planktonik selama periode waktu yang singkat sebelum akhirnya menerap didasar perairan (Shuster, 1982). Berbeda halnya dengan *T. tridentatus*, larva jenis ini setelah menetas akan mendiami daerah yang dekat dengan tempat menetasnya (*natal beach*) (Sekiguchi, 1988; Chen *et al.*, 2004). Pada dasarnya mimi mempunyai wilayah jelajah yang terbatas (Pierce *et al.*, 2000) terlebih untuk jenis *C. rotundicauda* yang habitatnya di mangrove, akan tetapi di daerah utara Jawa mimi menjadi salah satu komoditas makanan yang populer, sehingga terdapat kemungkinan adanya intervensi serta peran manusia (Chiu dan Morton, 1999).

KESIMPULAN

Mimi (*C. rotundicauda* dan *T. gigas*) di perairan Demak, Madura, dan Balikpapan berasal dari satu nenek moyang yang sama. Persentase nilai keragaman genetik cenderung sedang dan beresiko mengarah ke rendah. Kedua jenis spesies tersebut di masing-masing lokasi berpeluang membentuk spesies yang berbeda berdasarkan rendahnya tingkat adaptasi. Prediksi populasi mimi di Demak, Madura, dan Balikpapan kedepannya akan cenderung homogen secara genetik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Pusat Penelitian Oseanografi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (PPO-LIPI) melalui Demand-Driven Research Fund (DDRF) No. B-5063/IPK.2/KS.02/III/2019 untuk YW dan IPB melalui skema PMDSU No. 6623/IT3.L1/PN/2019 ke YW (mengikuti kontrak antara Universitas IPB dan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi No. 261/SP2H/LT/DRPM/ 2019). Para penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada mereka yang membantu dalam pengumpulan sampel dan pekerjaan laboratorium: Heri Seputro, Rani Nuraisah, Agus Alim Hakim, dan Ananingtyas Septia Darmarini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chauhan T, Rajiv K. 2010. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 1: 281-291.
- Chen C-P, Yeh H-Y, Lin P-F. 2004. Conservation of horseshoe crabs in Kinmen, Taiwan: strategies and practices. *Biodiversity and Conservation*. 13: 1889–1904.
- Chiu HMC, Morton B. 1999. The distribution of horseshoe crabs *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda* in Hong Kong. *Asian Marine Biology*. 16:185-196.
- Christianus A, Saad CR. 2007. Horseshoe crabs in Malaysia and the world. *Fishery Mail*. 16: 8-9.
- Clark AG, Lanigan CMS. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Molecular and Biological Evolution*. 10: 1096-1111.
- Dillion N, Austin AD, Bartowsky E. 1996. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*. 5(1): 21-24.
- Eldredge N, Stanley SM. 1984. *Living Fossils*. Berlin (BE): Springer.

- Faturrohmah S, Marjuki B. 2017. Identifikasi dinamika spasial sumberdaya mangrove di wilayah pesisir Kabupaten Demak Jawa Tengah. *Majalah Geografi Indonesia*. 31(1): 56-64.
- Febryano IG, Rusita. 2018. Persepsi wisatawan dalam pengembangan wisata pendidikan berbasis konservasi gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*). *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*. 8(3): 376-382.
- Grogan WN. 2004. *A mid-Atlantic study of the movement patterns and population distribution of the American horseshoe crab*, L. Polyphemus. [master thesis]. Virginia (USA): Virginia Polytechnic Institute dan State University.
- Ismail N, Taib M, Shamsuddin AA, Shazani S. 2011. Genetic variability of wild horseshoe crab, *Tachypleus gigas* (MÜller) in Tanjung Dawai, Kedah and Cherating, Pahang, Peninsular Malaysia. *European Journal of Scientific Research*. 60 (4): 592-601.
- Ismane MA, Kusmana C, Gunawan A, Affandi R, Suwardi S. 2018. Keberlanjutan pengelolaan kawasan konservasi penyu di pantai Pangumbahan, Sukabumi, Jawa Barat. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*. 8(1): 36-43.
- Iyengar A, Piyapattanakorn S, Stone DM, Heipel DA, Howell BR, Baynes SM, Maclean N. 2000. Identification of microsatellite repeats in turbot (*Scophthalmus maximus*) and dover sole (*Solea solea*) using RAPDbased technique: characterization of microsatellite markers in dover sole. *Marine Biotechnology*. 2: 49-56.
- King TL, Eackles MS, Spidle AP, Brockmann HJ. 2005. Regional differentiation and sex-biased dispersal among populations of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Transactions of the American Fisheries Society*. 134: 441-465.
- Kreamer G, Michels S. 2009. History of horseshoe crab harvest on Delaware Bay. Di dalam: *Biology and conservation of horseshoe crabs*. Tanacredi JT, Botton ML, Smith DR, editor. New York (NY): Springer. hlm 299–313.
- Laurie K, Chen CP, Cheung SG, Do V, Hsieh H, John A., Mohamad F, Seino S, Nishida S, Shin P, Yang M. *Tachypleus tridentatus* (errata version published in 2019). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019 [Internet]. 2019 [cited 2020 Jan 18]. Available from: <https://www.iucnredlist.org/species/21309/149768986>.
- Leary RF, Allendorf FW, Knudsen KL. 1985. Development instability and high meristic counts in interspecific hybrid of salmonid fishes. *Evolution*. 39: 318-326.
- Mashar A, Butet NA, Juliandi B, Qonita Y, AA Hakim, Wardiatno Y. 2017. Biodiversity and distribution of horseshoe crabs in northern coast of Java and southern coast of Madura. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 54: 012076.
- Meilana L, Wardiatno Y, Butet NA, Krisanti M. 2016. Karakter morfologi dan identifikasi molekuler dengan marka gen CO1 pada mimi (*Tachypleus gigas*) di Perairan Utara Jawa. *Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 8: 145-158.
- Miller MP. 1997. *Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*. Software didistribusikan oleh penulis. Tersedia di: <http://www.marksgeneticsoftware.net/>.
- Moore S, Perrin S. 2007. Seasonal Movement and Resource-Use Patterns of Resident Horseshoe Crab (*Limulus polyphemus*) Populations in a Maine, USA Estuary. *Estuaries and Coasts*. 30 (6): 1016–1026.
- Muhsoni FF, Syarif M, Effendi M. 2011. Inventarisasi data potensi sumberdaya wilayah pesisir Kabupaten Sumenep. *Jurnal Kelautan*. 4(1): 96 - 201.
- Nebauer SG, del Castillo-Agudo L, Segura J. 2000. An assesment of genetic relationships within the genus *Digitalis* based on PCR-generated RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 100:1209-1216.
- Noor P, Helminuddin. 2009. Valuasi ekonomi pemanfaatan hutan mangrove di kelurahan Teritip kota Balikpapan. *Jurnal Kehutanan Tropika Humida*. 2 (1): 69-80.

- Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Applications*. 2(4): 341–345. doi:10.1101/gr.2.4.341.
- Pierce JC, Tan G, Gaffney PM. 2000. Delaware bay and Chesapeake bay populations of the horseshoe crab *Limulus polyphemus* are genetically distinct. *Estuaries*. 23: 690-698.
- Quicke DLJ, Belshaw R, Lopez-Vaamonde C. 1999. Preservation of hymenopteran specimens for subsequent molecular and morphological study. *Zoologica Scripta*. 28(1-2): 261-267.
- Rubiyanto E. 2012. *Studi Populasi Mimi (Xiphosura) di Perairan Kuala Tungkal, Kabupaten Tanjung Jabung Barat, Jambi* [tesis]. Depok (ID): Universitas Indonesia.
- Saunders NC, Kessler LG, Avise JC. 1986. Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics*. 112(3): 613-627.
- Schaller YS, Chabot CC, Watson III WH. 2010. Seasonal movements of American horseshoe crabs *L. polyphemus* in the Great Bay Estuary, New Hampshire USA. *Current Zoology*. 56(5): 587-598.
- Schaller YS, Chabot CC, Watson III WH. 2010. Seasonal movements of American horseshoe crabs *L. polyphemus* in the Great Bay Estuary, New Hampshire USA. *Current Zoology*. 56(5): 587-598.
- Schemske DW, Husband BC, Ruckelshaus MH, Goodwillie C, Parker IM, Bishop JG. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology*. 75: 584–606
- Sekiguchi K, Yamamichi Y, Costlow JD. 1982. Horseshoe crab development studies I. Normal embryonic development of *Limulus polyphemus* compared with *Tachypleus tridentatus*. Di dalam: Boneventura J, Bonaventura C, Tesh S, editor. *Physiology and Biology of Horseshoe Crabs: Studies on Normal and Environmentally Stressed Animals*. New York (NY): Alan R. Liss, Inc. hlm 53-73.
- Sekiguchi K. 1988. *Biology of Horseshoe Crabs*. Tokyo (JPN): Science House.
- Selander RK, Yang SY, Lewontin RC, Johnson WE. 1970. Genetic variation in the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*), a phylogenetic "relic". *Evolution*. 24: 402-414.
- Shanks AL. 2009. Pelagic larval duration and dispersal distance revisited. *Biological Bulletin*. 16: 373-385.
- Shuster CN Jr. 1982. A pictorial review of the natural history and ecology of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, with reference to other limulidae. pp. 1–52. In: *Physiology and Biology of Horseshoe Crabs: Studies on Normal and Environmentally Stressed Animals*. (Bonaventura JC. Bonaventura, dan S. Tesh, Eds. New York (NY): Alan R Liss, Inc.
- Slamat. 2009. *Keanekaragaman genetik ikan betok (Anabas testudineus Bloch) pada ekosistem perairan rawa di Provinsi Kalimantan Selatan* [master tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Smith DR, Beekey MA, Brockmann HJ, King TL, Millard MJ, Zaldívar-Rae JA. 2016. *Limulus polyphemus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. e.T11987A80159830. Available online at: <http://www.iucnredlist.org/details/11987/0>.
- Smith JP. 2005. Random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Stock Identification Methods*. 5(18): 371-388.
- Soewardi K. 2007. *Pengelolaan Keragaman Genetik Sumberdaya Perikanan dan Kelautan*. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Swan BL. 2005. Migrations of adult horseshoe crabs, *Limulus polyphemus*, in the Middle Atlantic Bight: a 17-year tagging study. *Estuaries*. 29(1): 28-40.
- Tave D. 1993. *Genetic for fish hatchery managers*. Netherland (EU): Kluwer Academic Publishers.
- Walls EA, Berkson J, Smith SA. 2002. The horseshoe crab, *Limulus polyphemus*: 200 million years of existence, 100 years of study. *Reviews in Fisheries Science*. 10(1): 39-73.
- Weeden NF, Timmerman GM, Hemmat M, Kneen BE, Lodhi M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Joint Plant Breeding Symposia Series, November 1, 1992, Minneapolis, MN. Crop Science Society of America, Madison, WI.
- Williams JG, Kubelik AR, Lival KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-5.

- World Conservation Monitoring Centre. 1996b. *Tachypleus Tridentatus*, *The IUCN Red List of Threatened Species* [Internet]: [diunduh 28 Maret 2020] e. T21309A9267047. Tersedia pada: <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T21309A9267047.en>
- World Conservation Monitoring Centre. 1996a. *Tachypleus gigas*. *The IUCN Red List of Threatened Species* [Internet]. [diunduh 18 Januari 2020]. Tersedia pada: <https://www.iucnredlist.org/species/21308/9266907>.
- Yang MC, Chen CA, Hsieh HL, Chen CP. 2007. Population Subdivision of the tri-spine horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus* in Taiwan Strait. *Zoological Science*. 24: 219-224. Yang MC, Chen CA, Hsieh HL, Chen CP. 2007. Population Subdivision of the tri-spine horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus* in Taiwan Strait. *Zoological Science*. 24: 219-224.