

## DNA Barcoding dan Filogeni Molekuler Belangkas *Tachypleus* (*Horseshoe crab*) dari Pulau Madura, Jawa Timur, Indonesia

DNA Barcoding and Molecular Phylogeny of *Tachypleus* (*Horseshoe Crab*) From Madura Island, East Java, Indonesia

Deni Rafsanjani<sup>1</sup>, Wahyu Andy Nugraha<sup>1</sup>, Insafitri<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Kelautan, Universitas Trunojoyo Madura, Jalan Raya Telang, Kamal, Bangkalan 69162, Indonesia

\*Korespondensi: insafitri@trunojoyo.ac.id

Disubmit: 17 Desember 2023, Direvisi: 2 Januari 2024, Diterima: 31 Agustus 2024

### ABSTRAK

Belangkas merupakan hewan laut yang sering ditemukan di perairan Madura. Belangkas adalah kekayaan hayati laut Indonesia yang belum banyak dimanfaatkan. Hewan akuatik ini juga disebut living fosil yang artinya sudah hidup sejak zaman purba. Informasi terkait struktur genetik dan filogenetik dari belangkas di daerah madura masih jarang diketahui. Oleh karena itu perlu pengkajian untuk mengungkap jenis belangkas dengan menggunakan metode DNA barcoding dan filogenetiknya. Penelitian ini menggunakan COI sebagai marka molekuler, dengan metode PCR. Dengan DNA barcoding hanya memerlukan spesimen yang sangat sedikit/kecil tetapi mampu mendokumentasikan keragaman grup-grup taksonomi yang belum di kenal atau berasal dari daerah yang belum pernah teridentifikasi, dan mampu mengungkapkan variasi baru/keragaman baru pada spesies-spesies yang sebelumnya digolongkan pada satu spesies saja. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel *Tachypleus* mempunyai kedekatan 100% dengan *Tachypleus gigas*. Hasil filogenetik sampel dari pulau Madura berada dalam satu kelompok dengan *Tachypleus gigas* dari lokasi lain.

**Kata kunci:** COI, living fosil, PCR, struktur genetik

### ABSTRACT

Horseshoe crab is a marine animal that is often found in Madura waters. Horseshoe crab is Indonesia's marine biodiversity that has not been widely exploited. This aquatic animal is also called a living fossil, which means it has been alive since ancient times. Information regarding the genetic and phylogenetic structure of Horseshoe crab in the Madura area is still rarely known. Therefore, it is necessary to study to reveal the type of Horseshoe crab using the DNA barcoding method and molecular phylogeny. This research uses COI as a molecular marker, using the PCR method. With DNA barcoding, it only requires very few/small specimens but is able to document the diversity of taxonomic groups that are not yet known or come from areas that have never been identified, and is able to reveal new variations/new diversity in species that were previously classified as only one species. The results showed that the *Tachypleus* samples were 100% close to *Tachypleus gigas*. The phylogenetic results of samples from the island of Madura are in the same group as *Tachypleus gigas* from other locations.

**Keywords:** COI, Genetic Structure, living fossil, PCR

## PENDAHULUAN

Pulau Madura merupakan bagian dari wilayah Provinsi Jawa Timur, yang letaknya berada di utara kota Surabaya. Luas Pulau Madura sekitar 10 persen dari wilayah Jawa Timur yang memiliki luas mencapai 47.799,75 km<sup>2</sup>. Daerah Madura terletak antara koordinat 113 32' 54' BT – 116 16' 48' BT dan diantara 4 55' LS – 7 24LS, dimana pada bagian utara berbatasan dengan Laut Jawa, sebelah timur berbatasan dengan Laut Flores dan Jawa, pada bagian selatan berbatasan dengan Selat Madura, serta pada bagian barat berbatasan dengan Surabaya. Wilayah Madura dibagi menjadi empat kabupaten, yaitu Kabupaten Bangkalan, Kabupaten Sampang, Kabupaten Pamekasan serta Kabupaten Sumenep. Suhu dipulau Madura berkisar antara 27°C - 28°C yang menyebabkan tanah di daerah Madura tidak subur (Agustin & Fachruddin, 2020).

Madura yang dikelilingi oleh laut memiliki keragaman hayati yang sangat melimpah pada sektor kelautannya. Mulai dari keragaman mangrove, lamun, terumbu karang, hewan-hewan karang, serta hewan laut lainnya seperti belangkas. Belangkas merupakan hewan laut yang sering ditemukan di perairan madura. Belangkas adalah kekayaan hayati laut indonesia yang belum banyak dimanfaatkan termasuk untuk biofarmasi, ekologi, dan evolusi (Krisfalusi-Gannon, 2018). Hewan akuatik ini juga disebut *living fosil* yang artinya sudah hidup sejak zaman purba. Spesies belangkas (*Horseshoe crab*) ada empat di dunia hingga saat ini, yaitu *Limulus polyphemus*, *Tachypleus gigas*, *Tachyplus tridentatus*, dan *Carcinoscorpius rotundicauda* (Insafitri & Nugraha, 2024). Minim ditemukannya belangkas (*Horseshoe crab*) disebabkan oleh beberapa aspek seperti pencemaran, perburuan komersial, degradasi habitat dan reklamasi (Mauludiyah et al., 2022).

DNA Barcode merupakan alat molekuler dan bioinformatika untuk mengidentifikasi spesies biologi. Tujuan dari DNA Barcode ada dua yaitu

identifikasi molekuler spesies yang belum terdeskripsikan maupun yang sudah terdeskripsikan. DNA barcoding di usulkan pertama kali oleh Hebert et al. (2003), menyatakan bahwa semua spesies organisme dapat diidentifikasi dengan menggunakan sekuen pendek dari sebuah gen yang posisinya di dalam genom telah terstandarisasi (disepakati bersama) yang disebut sebagai “DNA Barcode”. Keunggulan DNA barcoding adalah memerlukan spesimen yang sangat sedikit/kecil, mampu mendokumentasikan keragaman grup-grup taksonomi yang belum di kenal atau grup-grup taksonomi yang berasal dari daerah yang belum pernah teridentifikasi, mampu mengungkapkan variasi baru/keragaman baru pada spesies-spesies yang sebelumnya digolongkan pada satu spesies saja. DNA barcoding dapat digunakan untuk dua tujuan, yaitu sebagai perangkat baru untuk membantu para ahli taksonomi yang biasa bekerja keras pada spesimen-spesimen yang sulit diidentifikasi dan merupakan perangkat inovatif bagi yang bukan ahli taksonomi dan untuk mengidentifikasi spesies secara cepat dan bisa digunakan untuk analisis filogeni molekuler (Baek et al., 2014; Sarmiento et al., 2021). Sehingga identifikasi tanaman dengan menggunakan DNA barcoding bisa dilakukan oleh siapa saja (yang bukan ahli taksonomi) asal memiliki pengetahuan dan keterampilan teknis tentang DNA barcoding (Hikam et al., 2021).

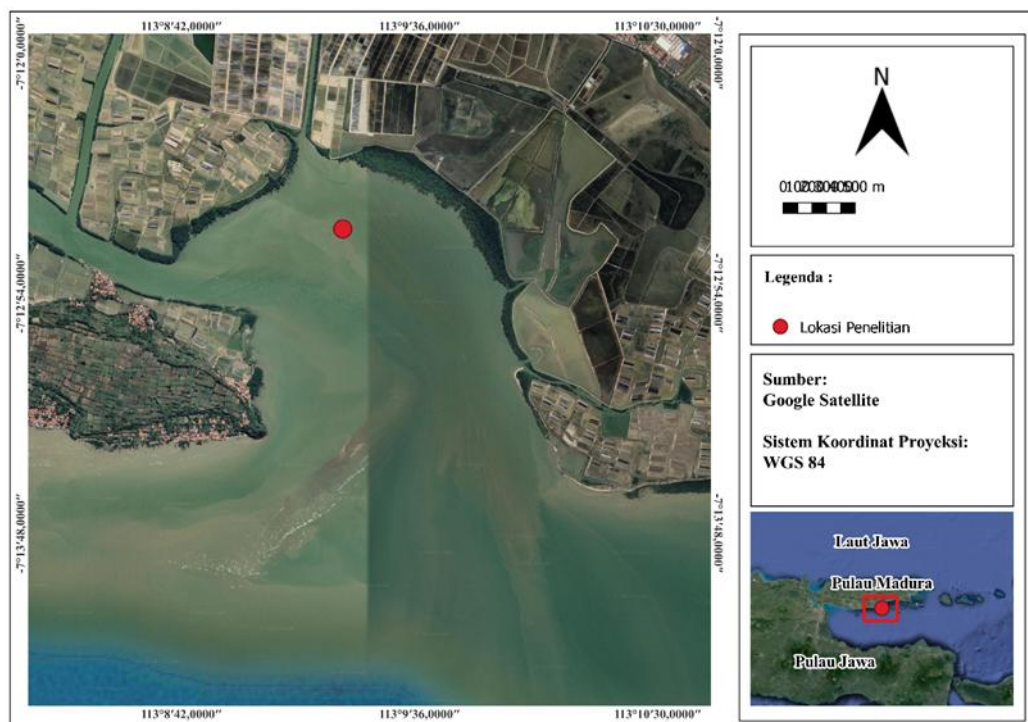
Penelitian terkait belangkas (*Horseshoe crab*) masih sangat minim sehingga belangkas di perairan Tajungan, Kabupaten Bangkalan belum diketahui jenis, habitat dan kondisi lingkungan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai spesies belangkas salah satunya *Tachypleus*, dimana genus ini dapat mudah ditemukan pada perairan tersebut. Upaya dalam mempertahankan keberlangsungan hidup penelitian ini perlu dilakukan karena mempunyai tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui karakter morfometrik belangkas (*Horseshoe crab*) genus *Tachypleus* pada perairan Madura, mengidentifikasi

belangkas (*Horseshoe crab*) genus *Tachypleus* pada perairan Madura menggunakan DNA barcoding dan untuk menganalisis filogeni molekulernya.

### METODE PENELITIAN

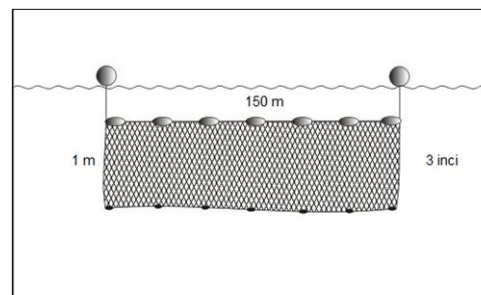
Penelitian DNA Barcoding Belangkas (*Horseshoe crab*) dilaksanakan di kawasan perairan Desa Tajungan, Kabupaten Bangkalan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2023. Peta lokasi penelitian dapat dilihat pada

Gambar 1. Pengujian Sampel dilakukan pada Laboratorium Biologi Laut Universitas Trunojoyo Madura dan Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro. Pengambilan data belangkas dilakukan selama 5 hari menggunakan jaring rajungan dengan membentangkan jaring ke perairan yang sudah ditentukan titik lokasinya secara random. Pengambilan data belangkas untuk mengetahui perbedaan karakter morfometriknya dan pembuatan DNA Barcoding pada perairan Desa Tajungan, Kabupaten Bangkalan.



Gambar 1. Peta Lokasi Penelitian di Desa Tajungan, Bangkalan

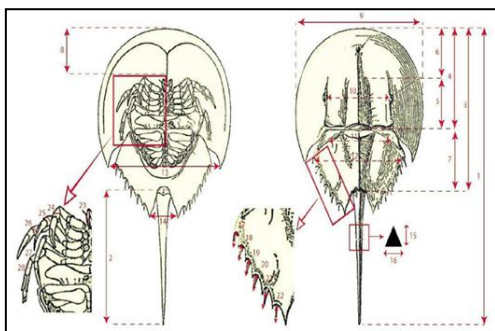
Panjang dari jaringnya sendiri adalah 150 m, lebar 3 m, dengan diameter mata jaring 3 inci. Belangkas yang tertangkap kemudian dibawa ke laboratorium untuk diidentifikasi karakter morfometriknya dan diambil jaringannya untuk dijadikan DNA Barcoding. Pemotongan jaringan dilakukan secara hati-hati untuk menghindari kematian pada belangkas sehingga kelestariannya tetap terjaga. Ilustrasi jaring rajungan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Ilustrasi Gillnet Rajungan (Wujdi, 2014)

## Pengukuran Morfometrik

Identifikasi secara morfologi secara visual dan pengukuran morfometrik mengikuti Meilana et al (2016) diukur menggunakan vernier caliper (jangka sorong) dengan ketelitian 0,1 mm, terdiri dari 28 bagian seperti: (1) Panjang total, (2) Panjang telson, (3) Panjang badan, (4) Panjang prosoma, (5) Panjang median ridge, (6) Panjang depan ocelli, (7) Panjang ophistoma, (8) Tebal ventral messel, (9) Lebar maksimum prosoma, (10) Jarak antar mata majemuk, (11) Jarak antar auriculata spine, (12) Jarak antar marginal process, (13) Jarak antar sudut posterior, (14) Jarak antar sudut anal, (15) Tinggi pertengahan telson, (16) Lebar pertengahan telson, (17) Panjang marginal spine I, (18) Panjang marginal spine II, (19) Panjang marginal spine III, (20) Panjang marginal spine IV, (21) Panjang marginal spine V, (22) Panjang marginal spine VI, (23) Diameter capit chelicera, (24) Diameter capit pedipalpi, (25) Diameter capit kaki jalan I, (26) Diameter capit kaki jalan II, (27) Diameter capit kaki jalan III, (28) Diameter capit kaki jalan IV. Bagian-bagian tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Bagian Badan Belangkas (Meilana et al., 2016)

## Prosedur DNA Barcoding

Pengambilan sampel jaringan pada bagian insang, potong dengan gunting dan pinset yang sudah disterilkan sebelumnya dengan ethanol 75% dan bersihkan dengan tissue. Kemudian sterilkan kembali pinset dan gunting, bilas dengan

ethanol dan bersihkan dengan tisu untuk dapat digunakan kembali ke sample individu berikutnya. Setiap Potongan-potongan kecil kemudian dimasukkan ke dalam 2 mL cryovial berlabel. Untuk menghindari resampling, setiap sample yang sudah dipotong diberi tag menggunakan nomor plastik kecil dan pengikat kabel. Sampel diawetkan dalam etanol 95% sampai digunakan.

## Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode ekstraksi DNA yang cepat dan sederhana dengan resin Chelex 100 (BioRad). Bagian jaringan 0,2 mm dikerok menggunakan spatula steril dan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL berisi 250 uL Chelex 10%. Sampel kemudian divorteks dalam bubuk Chelex selama 10-15 detik sebentar dengan kecepatan tinggi dan disentrifugasi selama 10-15 detik. Diinkubasi selama 45 menit pada suhu 95 °C (Akbar & Aris, 2018). Chelex kemudian disentrifugasi lagi selama 10-15 detik untuk memastikan bahwa semua isi berada di bagian bawah tabung mikrosentrifus. Supernatan langsung digunakan untuk amplifikasi Polymerase Chain Reaction (PCR).

## Amplifikasi PCR

Reaksi PCR dilakukan dalam volume 25 µL, menggunakan 1,25 µL template. Primer universal untuk gen COI, terdiri dari forward primer JgLCO1490 : 5'-TIT CIA CIA AYC AYA ARG AYA TTG G-3' dan reverse primer JgHCO2198 : 5'-TAI ACY TCI GGR TGI CCR AAR AAY CA-3' (Geller et al. 2013). Reaksi PCR dilakukan dalam volume 25 µL, menggunakan 1,25 µL cetakan DNA. Setiap reaksi termasuk 12,5 µL MyTeq™ Red Mix (Bioline), 1 µL setiap primer dan 9,25 µL ddH<sub>2</sub>O. Profil thermocycling meliputi denaturasi awal 95°C selama 4 menit, 40 siklus 95°C selama 30 detik, 50°C selama 30 detik, dan 72°C selama 1 menit, dengan perpanjangan akhir 72°C selama 10 menit.



## Elektroforesis

Reaksi PCR diperiksa pada gel agarosa 1% yang diwarnai dengan Floresafe. Hasil PCR divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) dengan SB-buffer (sodium borik buffer). Agarosa sebanyak 0.5 gram dimasukkan kedalam 50 mL SB-buffer setelah itu dipanaskan menggunakan microwave hingga berwarna jernih kemudian di cetak menggunakan cetakan gel yang sudah dipersiapkan dan tunggu hingga mengeras. Produk PCR sebanyak 4 ul dicampurkan dengan 1 ul loading dye setelah itu dimasukkan ke dalam sumur gel. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Pewarnaan DNA memakai Floresafe dengan merendam gel ke larutan Floresafe selama 10 menit kemudian dibilas dengan aquades. Pita DNA bisa dilihat dengan bantuan UV transluminator serta didokumentasikan menggunakan kamera digital. Urutan maju dan mundur dikoreksi menggunakan MEGA X kemudian disejajarkan menggunakan ClustalW (Kumar et al. 2016). Urutan individu dibandingkan dengan data National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) menggunakan Program Basic Local Alignment Search Tool; (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (BLAST). Metode Neighbor Joining (NJ) digunakan untuk menghasilkan rekonstruksi filogenetik Analisis NJ berdasarkan jarak genetik, dilakukan di MEGA X dengan model Kimura 2-Parameter menggunakan 1000 ulangan bootstrap untuk menilai dukungan clade.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Morfometrik Belangkas

Belangkas (*Horseshoe crab*) yang tertangkap di Desa Tajungan dan dijadikan sampel, selanjutnya diidentifikasi jenis kelaminnya dan diukur karakter morfometriknya. Sampel belangkas dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 3. Sampel *Tachypleus gigas*

Hasil pengukuran karakter morfometrik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengukuran Karakter Morfometrik Belangkas dengan kode sampel TG pada Desa Tajungan, Kabupaten Bangkalan

No	Anatomi Belangkas	Ukuran Morfometrik (mm)
1	Panjang Total	365
2	Panjang Telson	205
3	Panjang Badan	170
4	Panjang Prosoma	110
5	Panjang Median Ridge	55
6	Panjang Depan Ocelli	45
7	Panjang Ophistoma	70
8	Tebal Ventral Messel	45
9	Lebar Maksimum Prosoma	172
10	Jarak antar Mata Majemuk	80
11	Jarak antar Auriculata Spine	95
12	Jarak antar Marginal Proses	110
13	Jarak antar Sudut Posterior	140
14	Jarak antar Sudut Anal	42
15	Tinggi Pertengahab Telson	45
16	Lebar Pertengahan Telson	10
17	Panjang Marginal Spine	13
18	Panjang Marginal Spine II	20
19	Panjang Marginal Spine III	13
20	Panjang Marginal Spine IV	14

21	Panjang Marginal Spine V	13
22	Panjang Marginal Spine VI	14
23	Diameter Capit Chelicera	18
24	Diameter Capit Pedipalpi	76
25	Diameter Capit Kaki Jalan I	69
26	Diameter Capit Kaki Jalan II	34
27	Diameter Capit Kaki Jalan III	34
28	Diameter Capit Kaki Jalan IV	43
	Berat	212 gram

Menurut Syahir *et al.*, (2020) morfometri belangkas *T. gigas* memiliki perbedaan signifikan antara individu jantan dan betina. Belangkas *T. gigas* betina memiliki karakter morfometri yang lebih besar dibandingkan belangkas jantan. Lebar prosoma maksimal belangkas *T. gigas* jantan dan betina yang ditemukan sebesar 220 mm dan 300 mm, panjang total belangkas *T. gigas* jantan dan betina yang ditemukan sebesar 390 mm dan 500 mm, panjang karapas belangkas *T. gigas* individu jantan dan betina yang ditemukan sebesar 230 mm dan 290 mm, serta berat tubuh belangkas *T. gigas* individu jantan dan betina yang ditemukan sebesar 388 gram dan 951 gram berturut-turut.

Pada penelitian ini menunjukkan *T. gigas* yg ditemukan di Perairan Tajungan memiliki panjang prosoma sebesar 110 mm, panjang total sebesar 365 mm, lebar maksimum prosoma sebesar 172 mm, dan berat tubuh sebesar 212 gram. Perbedaan nilai morfometrik yang dihasilkan disebabkan oleh habitat pengambilan belangkas, kerapatan populasi dan ketersediaan pakan di lingkungan habitat (Syahir *et al.*, 2020).

### DNA Barcoding dan Filogeni Molekuler

Menurut Fietri (2021) pohon filogenik merupakan suatu bentuk gambaran silsilah dari makhluk hidup baik

tumbuhan ataupun hewan yang membentuk cabang menyerupai pohon. Ilmu filogenetik bisa memperkirakan evolusi yang terjadi pada masa lalu dengan cara membandingkan sekuens DNA atau Protein. Identifikasi secara molekuler lewat media DNA Barcoding mempunyai kelebihan dalam identifikasi spesies dan sudah terbukti berhasil pada organisme laut seperti belangkas.

Analisis DNA Barcoding dengan sampel belangkas yang di temukan di perairan tajungan menghasilkan beberapa urutan belangkas, antara lain. Sekuens gen dianalisis menggunakan program MEGA 11, dimana urutan gen didapatkan dari NCBI Gen Bank. Urutan sekuens COI yang sudah dipilih kemudian disimpang dalam format FASTA serta beberapa penyelarasan urutan DNA dilakukan di program MEGA 11. Pohon filogeni dibuat dengan menggunakan filogenetik analisis *Neighbor joining* (NJ) dan metode *Maximum Likelihood* (ML) dengan Kimura 2-parameter. DNA Barcoding dari sample penelitian ini adalah:

```
ATATTTAATTTTTGGTATCTGAGCTGCTAT
AGTTGGTACCGCTCTTAGAATCTTAATTCG
AGCTGAACTTGGCCAACCAGGCTCATTGAT
TGGGGATGATCAAATTTACAATGTAATTGT
TACAGCCCATGCATTTCGTAATAATTTTTTT
TATAGTAATACCTGTAATAATTGGAGGTTT
TGTAATTGATTAACCCCATTAATACTAGG
GGCTCCAGACATGGCTTTCCCCCGTTTAA
TAATATAAGATTTTGATTACTCCCCCCTTC
CTTTCTTCTTCTTCTTAGTTTCAGCCACAGT
TGAAAGAGGGGCAGGAACAGGATGAACAGT
TTATCCTCCTTTAGCCTCAAATATTGCTCA
TGCAGGAGGATCAGTTGATCTAACAATCTT
CTCCTTACACTTAGCAGGAATTTCTCAAT
TTTAGGAGCTATTAATTTTCATCACAACAAT
TATTAATATACGTACATCAGGCATAGTTCT
AGAACGCATACCTTTATTTGTATGATCTGT
TAAAATTACAGCAATTCTCCTTCTTCTTC
CTTACCTGTTTTAGCTGGCGCTATCACAAT
ACTTTTAAACAGATCGAAATTTCAACACATC
CTTCTTTGACCCAGCAGGCGGTGGTGACCC
AGTT
```

Sekuens nukleotida dianalisis pensejajaran sekuens (edit/alignment build) dengan Clustal-W dengan menggunakan software MEGA 11. Sekuens yang memiliki banyak kemiripan

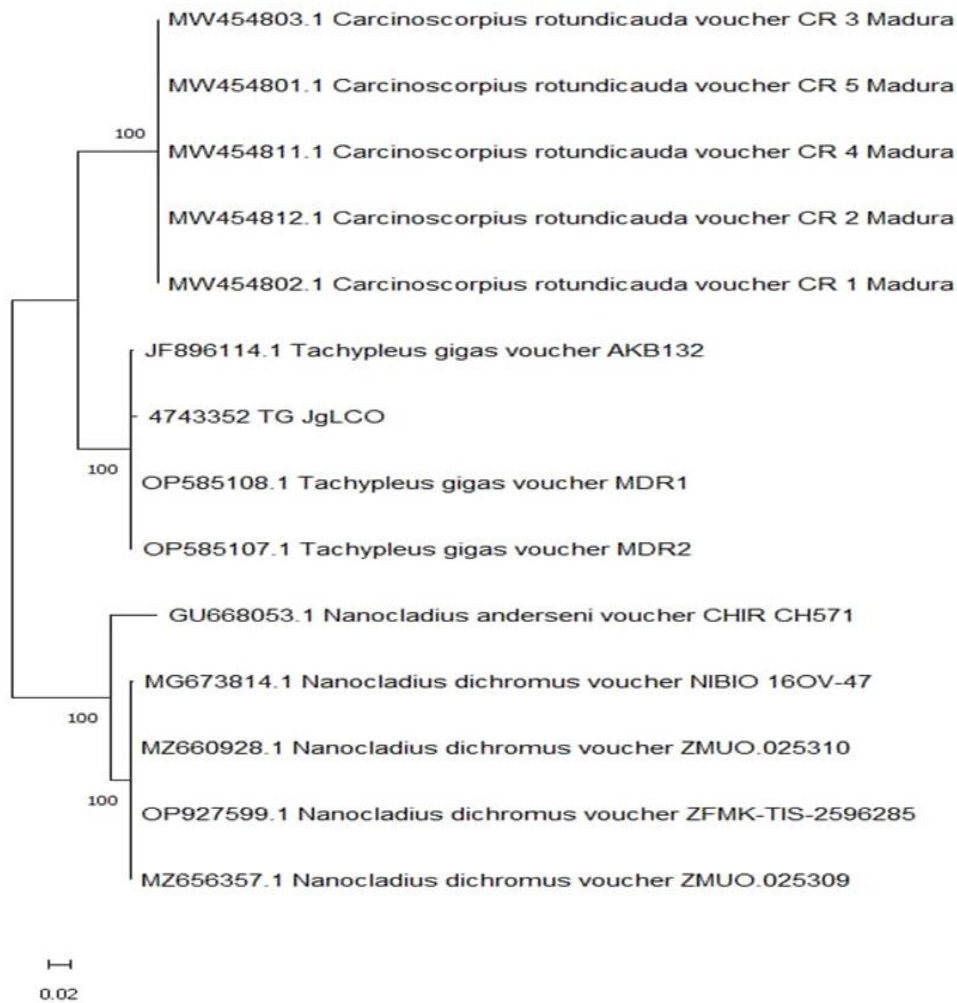
dipotong pada ujung 5', ujung 3' atau keduanya. Analisis filogenetik molekuler menggunakan metode maximum likelihood dengan bootstrap sebanyak 1000 menggunakan model kimura 2-parameter. Pohon filogenetik yang sudah terbentuk dibagi menjadi 2 jenis yakni original dan hasil bootstrap.

Menurut penelitian Erwyansyah *et al.*, (2018) menyatakan bahwa data DNA yang didapat dari pengolahan menggunakan software MEGA X kemudian di copy dan di masukan ke website NCBI ditemukan hasil dimana sampel yang di dapat di Perairan Tajungan

di identifikasi sebagai belangkas spesies *Tachypleus gigas* dengan persen identifikasi 99,33 %. Hasil BLAST-n 97 didapatkan kedekatan sebesar 99% dengan 98 beberapa jenis *T. tridentatus* pada database 99 NCBI kode akses EF460846.1, JQ739210.1, 100 FJ860267.1, dan U09387.1. Komposisi basa 101 nukleotida terdiri dari 38,3-38,8% basa timina (T), 29,3-30,3% basa adenina (A), 103 17,2-18,1% basa sitosina (C) dan 13,8-14,2% 104 basa guanina (G). Konstruksi pohon filogeni 105 *T. tridentatus* B (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Blast DNA Belangkas dari Website NCBI.

Description	Scientific name	Max Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc Len	Accession
<i>Tachypleus gigas</i> mitochondrion complete genome	<i>Tachypleus gigas</i>	1149	1149	100%	0.0	99.37%	14956	NC_052701.1
<i>Tachypleus gigas</i> mitochondrion complete genome	<i>Tachypleus gigas</i>	1138	1138	100%	0.0	99.05%	15000	MW446184.1
<i>Tachypleus gigas</i> voucher AKB132 Cytochrome Oxidase Subunit I	<i>Tachypleus gigas</i>	1138	1138	100%	0.0	99.05%	691	JF896114.1
<i>Tachypleus tridentatus</i> mitochondrion complete genome	<i>Tachypleus tridentatus</i>	867	867	100%	0.0	91.32%	15006	MW420922.1
<i>Tachypleus tridentatus</i> voucher MNHN-JAD27 Cytochrome Oxidase Subunit I	<i>Tachypleus tridentatus</i>	867	867	100%	0.0	91.32%	999	JN018216.1
<i>Tachypleus tridentatus</i> mitochondrion complete genome	<i>Tachypleus tridentatus</i>	867	867	100%	0.0	91.32%	15008	NC_012574.1
<i>Tachypleus tridentatus</i> mitochondrion complete genome	<i>Tachypleus tridentatus</i>	861	861	100%	0.0	91.17%	15006	JQ739210.1



Gambar 5. Pohon Filogenetik Belangkas (*Horseshoe crab*) di Pulau Madura

Hasil dari melakukan analisis dengan menggunakan software MEGA 11 dan memperoleh data pohon filogenetik serta analisis jarak genetik antar spesies yang ditemukan pada perairan desa tajungan kabupaten bangkalan. Pohon filogenetik disajikan pada Gambar 5. Hasil analisis filogenetik pada belangkas Horseshoe crab terdiri atas 2 kelompok in group dan 2 kelompok out group. Kelompok in grub terdiri dari spesies belangkas *Carcinoscorpius rotundicauda* dan *Tachypleus gigas*. Pada klad pertama spesies yang memiliki hubungan dekat yaitu *Carcinoscorpius rotundicauda* dengan nilai bootstrap 100, hal serupa juga dilaporkan oleh Dhar *et al.*, 2016; Kamaruzzaman *et al.*, 2011. Menurut Dharmayanti (2011) nilai bootstrap adalah nilai yang digunakan untuk menguji

seberapa baik set data model yang digunakan, jika nilai bootstrap rendah maka sekuen dari analisis untuk mendapatkan sebuah pohon filogenetika menjadi tidak dapat dipercaya. Ditambahkan oleh Muzzazinah (2017) pohon filogenetik yang tinggi dan baik adalah pohon filogenetik dengan nilai bootstrap diatas 70. Pada Klad kedua terdapat sampel DNA yang didapat di daerah perairan Tajungan dimana sampel tersebut berada di satu kelompok dengan spesies *Tachypleus gigas* yang mengartikan bahwa sampel di perairan Tajungan merupakan spesies *Tachypleus gigas* serta nilai bootstrap 100. Pada out group, spesies yang digunakan adalah *Nanocladus dichromus*. Dijelaskan oleh Pangestika *et al.* (2015) out group sangat dibutuhkan dalam pembuatan pohon



filogenetik. Out group bertujuan untuk mengetahui karakter primitif (plesiomorf) dan karakter derivat (*apomorf*) dari kelompok in group serta untuk menentukan titik awal pembentukan sebuah pohon filogenetik (Muzzazinah, 2017).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Meilana *et al.* (2016) diperoleh hasil bahwa konstruksi pohon filogeni *Tachypleus gigas* terpisah dengan *C. rotundicuada*, hal ini berkaitan dengan perbedaan ekologi dimana *C. rotundicuada* berhabitat di estuari dan mangrove. Wilayah ini merupakan wilayah yang sedikit terpapar oleh air dari lautan terbuka, sehingga gene flow antara populasi spesies ini lebih terbatas.

### KESIMPULAN

Karakter morfometrik belangkas (*Horseshoe crab*) di perairan Desa Tajungan Kabupaten Bangkalan menunjukkan spesies *Tachypleus gigas* yang memiliki ciri-ciri morfometrik lebih kecil daripada *Tachypleus gigas* di tempat lain, hasil analisis belangkas pada perairan Madura merupakan spesies *Tachypleus gigas*, dimana memiliki nilai kekerabatan sebesar 100%, analisis filogenetik molekuler menunjukkan sampel dari Pulau Madura satu kerabat atau satu kelompok dengan jenis *Tachypleus gigas* dari beberapa lokasi lain.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami penulis sampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Trunojoyo Madura untuk pendanaan hibah penelitian no. 5645/UN46.4.1/PT.01.03/2023.

### DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, N. S., & Fachruddin, A. S. (2020). Analisis Perubahan Garis Pantai di Pulau Madura Menggunakan Citra Satelit Landsat 8. *Juvenil*, 1(3), 427-436. <https://doi.org/10.21107/juvenil.v1i3.8843>
- Baek, S. Y., Choi, E. H., Jang, K. H., Ryu, S. H., Park, S. M., Suk, H. Y., Chang, C. Y., & Hwang, U. W. (2014). Complete mitochondrial genomes of *Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus tridentatus* (Xiphosura, Arthropoda) and implications for chelicerate phylogenetic studies. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 479. <https://doi.org/10.7150/ijbs.8739>
- Dhar, B., Ghose, A., Kundu, S., Malvika, S., Neelima Devi, N., Choudhury, A., Ghorai, S., Trivedi, S., & Ghosh, S. K. (2016). DNA barcoding: Molecular positioning of living fossils (horseshoe crab). *DNA Barcoding in Marine Perspectives: Assessment and Conservation of Biodiversity*, 181-199. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41840-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41840-7_12)
- Dharmayanti, N. I. (2011). *Filogenetika Molekular: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi*, 30, 1–10.
- Erwyansyah., Wardiatno, Y., Kurnia, R., & Butet, N. A. (2018). Kepastian Taksonomi Dan Sebaran Belangkas 1 *Tachypleus tridentatus* Leach 1819 Di Perairan Balikpapan Timur. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 10 (3), 546 - 559. <https://doi.org/10.29244/jitkt.v10i3.21917>
- Fietri, W. A., Abdul, R., & Yuni, A. (2021). Analisis Filogenetik Ikan Tuna (*Thunnus spp*) di Perairan Maluku Utara Menggunakan COI (Cytochrome Oxidase I). *Jurnal Biologi Makassar*, 6(2), 31-39.
- Hikam, A. M., Nurul, J. M., Muhammad, D., & Abdul, H. A. T. (2021). DNA barcoding pada invertebrate laut. *Jurnal Biologi Udayana*, 25(1), 46-56.
- Insafitri, I., & Nugraha, W. A. (2024). DNA Barcoding of Horseshoe Crab From Madura Island. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 117, p. 01013). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202411701013>

- Kamaruzzaman, B. Y., John, B. A., Zaleha, K., & Jalal, K. C. A. (2011). Molecular phylogeny of horseshoe crab. *Asian J Biotechnol*, 3(3), 302-309.  
<https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.302.309>
- Krisfalusi-Gannon, J., Ali, W., Dellinger, K., Robertson, L., Brady, T. E., Goddard, M. K., Tinker-Kulberg, R., Kepley, C. L., & Dellinger, A. L. (2018). The role of horseshoe crabs in the biomedical industry and recent trends impacting species sustainability. *Frontiers in Marine Science*, 5, 185.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00185>
- Meilana, L., Yusli, W., Nurlisa, A.B dan Majariana, K. (2016). Karakteristik Morfologi dan Identifikasi Molekuler dengan Marka CO1 pada Mimi (*Tachypleus gigas*) di Perairan Utara Pulau Jawa. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 8(1), 145-158.
- Mauludiyah, N.R., Adelin, N., Safira, K dan Dwi, A.R. (2022). Potensi Mimi Mintuna (*Horseshoe Crab*) Khas Madura Sebagai Daya Tarik Wisata Masyarakat Jawa Timur. *Sains dan Matematika*, 7(1), 33-38.  
<https://doi.org/10.26740/sainsmat.v7n1.p33-38>
- Muzzazinah. (2017). Metode filogenetik pada indigofera. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi*, 25-40.
- Pangestika, Y., Budiharjo, A., Pancasakti, H., & Kusumaningrum. (2015). Analisis Filogenetik Curcuma Zedoaria (Temu Putih) Berdasarkan Gen Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Akademika Biologi*, 4(4), 8–13.
- Pertiwi, N. P. N., Mahardika, I. G. N. K., & Watiniasih, N. L. (2015). Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Pada Ikan Karang Anggota Famili *Pseudochromidae* (Dottyback) Untuk Identifikasi Spesies Secara Molekular. *Jurnal Biologi*, 19(2), 1-5.
- Sarmiento, M. E., Chin, K. L., Lau, N. S., Aziah, I., Norazmi, M. N., Acosta, A., Ismail, A., & Yaacob, N. S. (2021). Mitochondrial DNA sequence of the horseshoe crab *Tachypleus gigas*. *Mitochondrial DNA Part B*, 6(6), 1710–1714.  
<https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1930213>
- Sumarmin, R., Abdu, R., & Fajri, M. I. (2017). Morfometrik Kepiting Tapal Kuda dari Daerah Sungai Nipah dan Air Bangis Sumatera Barat. *Journal Biosains*, 1(2), 24-32.
- Setyawati, R., & Siti, Z. (2021). Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*, 4(1), 36-40.  
<https://doi.org/10.22146/ijl.v4i1.65550>
- Subari, A., Abdul, R., & Ramadhan, S. (2021). *Phylogenetic Analysis* of *Rasbora* spp. Based on the Mitochondrial DNA COI gene in Harapan Forest. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(1), 89-94.  
<https://doi.org/10.29303/jbt.v21i1.2351>
- Sunaryo, W. (2015). Review: Aplikasi DNA barcoding untuk Analisis Keragaman Genetik Lai-durian (*Durio zibethinus x kutejensis*) asal Kalimantan Timur. *Pros Semnas Masy Biodiv Indon*, 1(6): 1273-1277.
- Syahir, S., Ari, H. P., Tri, R. S. (2020). Morfologi Belangkas *Tachypleus gigas* (Muller, 1785) di Kawasan Pesisir Batu Ampar, Kalimantan Barat. *Jurnal Protobiont*, 9(2), 117-124.  
<http://doi.org/10.26418/protobiont.v9i2.43885>