

KARAKTER MORFOLOGI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER DENGAN MARKA GEN COI PADA MIMI (*Tachypleus gigas*) DI PERAIRAN UTARA PULAU JAWA

MORPHOLOGICAL CHARACTER AND MOLECULAR IDENTIFICATION WITH COI GENE MARKER OF HORSESHOE CRABS (*Tachypleus gigas*) AT COASTAL WATERS OF NORTHERN JAVA ISLAND

Lusita Meilana^{1*}, Yusli Wardiatno², Nurlisa A Butet², dan Majariana Krisanti²

¹Sekolah Pascasarjana, P.S. Pengelolaan Sumber Daya Perairan, IPB, Bogor

²Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, FPIK-IPB, Bogor

*E-mail: lusitameilana@yahoo.co.id

ABSTRACT

The existence of horseshoe crabs *Tachypleus gigas* is currently on the threatened condition and its population status is also unclear. The objectives of this research were to assess the horseshoe crabs morphological characters and to identify based on molecular marker of Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene. The samples were collected from five locations (Segara Menyan Subang, Ujung Kulon Banten, Tambak Lorok Semarang, Betah Walang Demak, and Kenjeran Surabaya) in October 2014 until June 2015. A total of 27 parameters for 62 individuals were used to determine connectivity and character identifier among populations. Data were tested using non-parametric analysis. While, the 5 individuals from each sites were used for molecular analysis including several stages of the DNA extraction, DNA electrophoresis, amplification and visualization of DNA fragments, and DNA sequencing. The results obtained based on morphological characters that *T. gigas* of Surabaya formed a unique group due to its body size (X1-X2 and X4-X16) was larger than the other 5 body parts (X22, X23, X26-X28) of Semarang, Demak, Subang, and Banten. According to molecular results, there were 650 bp conserve nucleotide sequences. Analysis using software MEGA 5.0 showed that there were 73 existence of specific nucleotide sites that can be used to distinguishes between *T. gigas* in-groups and out-groups (*T. gigas* from Central Arabian Sea, *T. tridentatus* from Sweden, and *Carcinoscorpius rotundicauda* from USA).

Keywords: horseshoe crabs, Java coast, morphology, identification molecular, COI gene.

ABSTRAK

Keberadaan spesies mimi *T. gigas* saat ini sudah pada kondisi terancam dan status populasinya juga belum diketahui dengan jelas. Tujuan penelitian ini adalah untuk meneliti karakteristik morfologi mimi berdasarkan 27 karakter morfologi dan mengidentifikasi mimi berdasarkan marka gen *Cytochrome Oxidase* Subunit I (COI). Sampel diambil dari lima lokasi (Segara Menyan Subang, Ujung Kulon Banten, Tambak Lorok Semarang, Betah Walang Demak, dan Kenjeran Surabaya) pada bulan Oktober 2014 sampai Juni 2015. Sebanyak 27 karakter morfologi dari 62 individu digunakan untuk mengetahui konektivitas dan karakteristik antar populasi. Pengujian data dilakukan dengan menggunakan analisis non-parametrik. Sedangkan, 5 individu dari masing masing lokasi digunakan untuk analisis molekuler yang meliputi beberapa tahapan diantaranya yaitu ekstraksi DNA genomik, elektroforesis DNA, amplifikasi dan visualisasi fragmen DNA, serta sekuensing DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *T. gigas* Surabaya membentuk kelompok tersendiri karena memiliki ukuran tubuh (X1-X2 dan X4-X16) lebih besar dan 5 anggota tubuh (X22, X23, X26-X28) yang relatif lebih besar dibandingkan Semarang, Demak, Subang, dan Banten. Tidak terdapat konektivitas antar populasi berdasarkan karakter morfologi. Dihasilkan nukleotida dengan panjang 650 pb bersifat conserve. Analisis menggunakan *soft-ware* MEGA 5.0 menunjukkan sebanyak 73 situs spesifik yang merupakan penciri yang membedakan *T. gigas* in groups dengan *T. gigas* dari *Central Arabian Sea*, *T. tridentatus* dari Sweden dan *Car-cinoscorpius rotundicauda* dari USA sebagai outgroups.

Kata kunci: mimi, pesisir Pulau Jawa, morfologi, identifikasi molekuler, gen COI.

I. PENDAHULUAN

Mimi atau Belangkas merupakan hewan dari famili Limulidae yang dikenal sebagai *living fossils* dan *phylogenetic relicts* (Selander *et al.*, 1970). Hewan ini telah mengalami diversifikasi sejak zaman paleogene (65-23 Mya) (Obst *et al.*, 2012) dan di Indonesia merupakan salah satu sumber daya genetik yang dilindungi sesuai dengan SK Menteri Kehutanan No. 12/Kpts-III/1987 dan Peraturan Pemerintah RI No. 7/1999 (Mulya, 2004; Rubiyanto, 2012). Hingga saat ini, empat spesies mimi yang masih ada di dunia, yaitu *Limulus polyphemus* (Linnaeus, 1758) hanya terdapat di pantai Atlantik Amerika Utara (Walls *et al.*, 2002), dan ke-3 lainnya merupakan spesies Asia, yaitu *Tachypleus gigas* (Muller, 1785), *Tachypleus tridentatus* (Leach, 1892), dan *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille, 1802) (Christianus and Saad, 2007; Lee and Morton, 2005). Keberadaan ketiga spesies Asia tersebut dinyatakan *near threatened* oleh IUCN (2010), *threatened* (2014) dan *data deficient* (2015), sedangkan untuk *L. polyphemus* adalah *lower risk/near threatened* (IUCN, 2015).

Mimi merupakan hewan yang memiliki peranan penting, baik secara ekonomi maupun ekologi. Secara ekonomi, mimi dimanfaatkan sebagai hewan umpan untuk menangkap ikan sembilang (*Euristhmus microceps*) di Perairan Kuala Tungkal Jambi (Rubiyanto, 2012), belut (*Anguilla rostrata*), siput besar (Ferari and Targett, 2003), dan *whelk* (*Busycon carica* dan *B. canaliculatum*) (Novitsky *et al.*, 2002). Ratusan mimi setiap minggunya ditangkap di Sadeli Kechil dan Johor pantai timur Malaysia dan diekspor ke Thailand (Christianus and Saad, 2007). *T. tridentatus* di Hongkong menjadi makanan dijual di restoran (Shin *et al.*, 2009), sedangkan di Thailand dan Malaysia, ketiga spesies mimi Asia ini dikonsumsi sebagai makanan eksklusif (Christianus and Saad, 2007). Peranan mimi di bidang medis yaitu haemolymph dari *C. rotundicauda* dapat menetralkan tetrodotoksin (TTX) (Yeo *et al.*, 1996). Sel

darah *L. polyphemus* digunakan oleh industri medis untuk mensterilkan produk medis dan farmasi (Hurton, 2003) karena dalam darahnya mengandung *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) yang dapat mendeteksi endotoksin pada darah manusia begitu juga dengan genus *Tachypleus* menghasilkan *Tachypleusin Amoebocyt Lysate* (TAL) yang dapat mendeteksi endotoksin bakteri Gram negatif, mendeteksi endotoksin darah manusia, dan menguji obat bahwa bebas dari bakteri patogen sebelum dikonsumsi oleh manusia (Novitsky, 1994). Sel darah *C. rotundicauda* sebagai imun aktif saat terjadi infeksi (Ding *et al.*, 2005) dan menghasilkan *Carcinoscorpius Amoebocyt Lysate* (CAL) (Novitsky, 1994).

Secara ekologi, mimi memiliki peranan dalam penyeimbang rantai makanan dan sebagai sumber protein bagi setidaknya 20 spesies burung pantai yang bermigrasi (Dietl *et al.*, 2000; Harrington, 2001; Beekey *et al.*, 2013). Mimi juga berperan sebagai bioturbator dan mengendalikan hewan benthik invertebrata (Smith, 2007; John *et al.*, 2012). Selain itu, mimi juga dikonsumsi oleh monyet mangrove (*Macaca fascicularis*) (Rubiyanto, 2012).

Mimi mempunyai risiko kepunahan yang tinggi akibat adanya degradasi habitat, reklamasi, pencemaran, perburuan komersial (Mishra, 2009), hilangnya habitat dan sumber makanan, perubahan kondisi air, serta peningkatan predasi (Hu *et al.*, 2009). Seperti yang terjadi di India, Hongkong dan Singapura (Shin *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2011). Tahun 1990 populasi mimi *T. gigas* di Balramgari India tercatat sebanyak 306 individu yang didapat dalam transek sepanjang 200 meter (Chatterji *et al.*, 1992) dan pada tahun 1996 jumlah populasinya menurun menjadi 220 individu. Begitu pula di Hongkong, pengamatan pada bulan Mei-Desember 2002 tercatat densitas juvenil *T. tridentatus* di Pak Nai adalah 1,97 individu/100 m² dan dua lokasi di Hak Pak Nai adalah 1,55 individu/100 m² dan 1,14 individu/100 m² (Chiu and Morton, 2004) dan pada September 2004-Februari 2005 tercatat densitasnya adalah

0,08 individu /100 m², 0,16 individu /100 m² dan 0,23 individu /100 m² (Li, 2008). Kategori rendahnya kepadatan mimi juga terjadi di salah satu perairan Indonesia yaitu di Perairan Kuala Tungkal, kepadatan mimi *C. rotundicauda* dan *T. gigas* terhitung masing-masing 0,62 individu/100 m² dan 0,02 individu/100 m² (Rubiyanto, 2012).

Penelitian terkait mimi telah banyak dilakukan di berbagai negara, namun di Indonesia penelitian mengenai keanekaragaman genetik mimi masih sangat jarang dilakukan. Penelitian terkait mimi di Indonesia diantaranya aspek biologi reproduksi (Fachrul, 1989; Eidman, 1992; Purnomo, 1992; Eidman, 1997; Mulya, 2004; Muslihah, 2004), perkembangan embrio (Santoso, 1992; Balisani, 1994; Ismurwanti, 1994; Rahmalia, 1995; Vauziyah, 1995), morfometrik (Suparta, 1992), dan studi populasi mimi (Rubiyanto, 2012).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Suparta (1992) mengenai keragaman sifat-sifat morfometrik *T. gigas* & *C. rotundicauda* di perairan pantai Kabupaten Pandeglang dan perairan pantai Kabupaten Rembang bahwa terdapat mimi yang tidak teridentifikasi secara morfologi dan telah diduga merupakan spesies baru sehingga dibutuhkan analisis secara genetik. Genetika molekuler dibutuhkan terkait dengan ketepatan mengidentifikasi spesies dan mendukung hasil identifikasi berdasarkan sifat morfologi. Identifikasi suatu organisme mulai spesies hingga subspecies secara akurat terhadap berbagai spesies yang sulit dibedakan secara morfologi dapat menggunakan DNA *barcoding* (Hebert *et al.*, 2003). Salah satu kelompok gen yang dapat dijadikan sebagai marka molekuler untuk penentuan spesies adalah gen *Cytochrome Oxydase* subunit I (COI) pada DNA mitokondria (Solihin, 1994). COI pada mitokondria merupakan gen yang berevolusi cepat dibandingkan gen 12S rRNA dan 16S rRNA. Gen tersebut memiliki variasi yang sedikit sehingga dapat digunakan sebagai DNA *barcoding* serta sedikit mengalami delesi dan insersi dalam sekuennya (Hebert

et al., 2003). Oleh karena itu, dibutuhkan data mengenai karakter morfologi yang didukung oleh ketepatan identifikasi secara molekuler mimi dalam penelitian ini yaitu *T. gigas* yang ada di Indonesia sebagai implikasi konservasi dan manajemen serta informasi pembandingan negara lain. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji karakteristik morfologi mimi berdasarkan 27 karakter morfologi dan mengidentifikasi mimi berdasarkan marka gen *Cytochrome Oxydase* Subunit I (COI).

II. METODE PENELITIAN

2.1. Lokasi Pengambilan Sampel

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2014 sampai Juli 2015 dengan pengambilan sampel mimi spesies *T. gigas* pada lima lokasi di Pulau Jawa, yaitu Segara Menyan Subang, Ujung Kulon Banten, Tambak Lorok Semarang, Betah Walang Demak, dan Pantai Kenjeran Surabaya (Gambar 1). Analisis morfometrik dilaksanakan di Laboratorium Biologi Makro 1, Departemen Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor dan di lapangan langsung. Sedangkan analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Departemen Manajemen Sumber Daya Perairan dan Laboratorium Terpadu Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

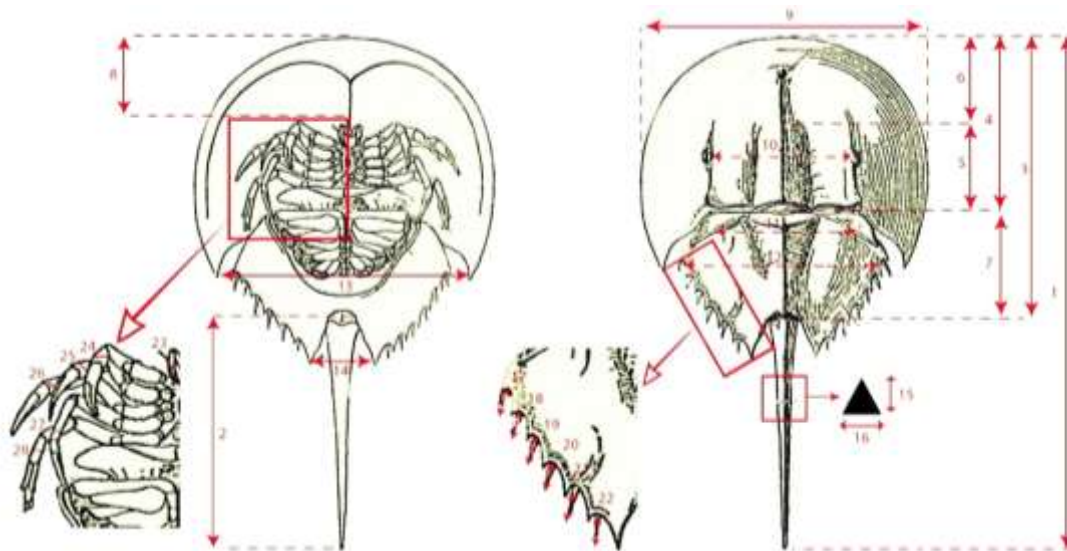
2.2. Pengambilan Sampel

2.2.1. Morfologi

Pengambilan sampel menggunakan metode *random sampling*, contoh mimi diambil dengan menggunakan jaring yang dijalkan oleh kapal nelayan atau langsung diambil dengan tangan. Mimi yang tertangkap jaring dibawa ke daratan dan diukur secara hidup-hidup. Setelah dilakukan pengukuran mimi kemudian dikembalikan ke habitatnya. Sebanyak 62 individu digunakan untuk analisis morfologi. 28 karakter morfometrik mimi diukur pada tiap sampel (Gambar 2). Begitu juga dengan 14 karakter fenotipe



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan *Tachypleus gigas* pada daerah Banten, Subang, Semarang, Demak, dan Surabaya.



Gambar 2. Karakter morfometrik mimi. Keterangan: 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.

(warna badan, bentuk frontal prosoma, bentuk duri prosoma, duri ophistoma dan prosoma, ukuran sudut anal, bentuk sudut anal, bentuk telson, duri marginal, gerigi pada telson, bagian depan operkulum, pedipalp 1, pedipalp 2, ukuran duri marginal, dan tebal lapis cangkang).

Karakter morfometrik mimi yang telah diukur diantaranya yaitu XX1: (1. Panjang total (X1), 2. Panjang telson (X2), 3. Panjang badan (X3), 4. Panjang prosoma (X4), 5. Panjang median ridge (X5), 6. Panjang depan ocelli (X6), 7. Panjang ophistoma (X7), 8. Tebal ventral messel (X8), 9. Lebar maksimum prosoma (X9), 10. Jarak antar mata majemuk (X10), 11. Jarak antar auriculata spine (X11), 12. Jarak antar marginal process (X12), 13. Jarak antar sudut posterior (X13), 14. Jarak antar sudut anal (X14), 15. Tinggi pertengahan telson (X15), 16. Lebar pertengahan telson (X16). XX2: (17. Panjang marginal spine I (X17), 18. Panjang marginal spine II (X18), 19. Panjang marginal spine III (X19), 20. Panjang marginal spine IV (X20), 21. Panjang marginal spine V (X21), 22. Panjang marginal spine VI (X22), 23. Diameter capit chelicera (X23), 24. Diameter capit pedipalpi (X24), 25. Diameter capit kaki jalan I (X25), 26. Diameter capit kaki jalan II (X26), 27. Diameter capit kaki jalan III (X27), 28. Diameter capit kaki jalan IV (X28)). Jantan dan betina dapat dilihat dari karakter capit pedipalpi dan capit kaki jalan I. Ciri pada jantan yaitu, capit pedipalpi dan capit kaki jalan I membengkok dan besar, sedangkan pada betina sama dengan kaki jalan yang lainnya kecil dan lurus. Setelah dilakukan pengukuran mimi kemudian dilepaskan kembali.

2.2.2. Molekuler

Satu sampel dari tiap lokasi diambil darahnya untuk keperluan analisis molekuler. Tahapan analisis molekuler meliputi ekstraksi DNA genomik, elektroforesis DNA, amplifikasi dan visualisasi fragmen DNA, dan sekuensing DNA. Sebanyak satu contoh dari masing-masing lokasi diambil

sampel darah sebanyak 250 µl darah yang telah diawetkan dengan alkohol absolut (1:2). Pencucian dilakukan dengan akuades sebanyak 3 kali untuk menghilangkan kandungan alkohol. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan kit komersial (*Gene Aid*, Taiwan) berdasarkan prosedur manual pabrik dengan beberapa modifikasi. Hasil isolasi kemudian dilakukan pengujian kualitas DNA total yaitu dengan elektroforesis. Pembacaan DNA total pada gel agarosa 1,2% menggunakan larutan buffer TAE1x dan pewarnaan dengan menggunakan etidium bromida 5 µl. Berdasarkan hasil elektroforesis, DNA yang memiliki kualitas baik (pita DNA terlihat jelas) dapat dilanjutkan ke tahap amplifikasi fragmen DNA gen CO1. Amplifikasi ruas gen COI dilakukan menggunakan kit komersial *Kapa Ekstra HotStart* dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Primer yang digunakan adalah primer universal (primer *F forward* dan *F reverse*) yang didesain oleh Butet (2013, *unpublished data*). Tahapan amplifikasi yang digunakan adalah predenaturasi (suhu 95°C selama 3 menit), denaturasi (suhu 95°C selama 1 menit), *annealing* (suhu 52°C selama 1 menit), *elongasi* (suhu 72°C selama 1 menit) sebanyak 35 siklus, *post PCR* (suhu 72°C selama 5 menit), dan *storage* (suhu 15°C selama 10 menit). Kemudian produk PCR divisualisasikan pada gel aragosa 1.2% dengan metode elektroforesis. Produk PCR yang memiliki kualitas baik kemudian dilakukan sekuensing yaitu untuk mengetahui runutan basa-basa nukleotida penyusun gen target. Sekuensing dilakukan di Singapura dengan metode sanger.

2.3. Analisis Data

2.3.1. Morfologi

Analisis data karakter morfologi diantaranya membentuk konstruksi pohon fenetik berdasarkan 14 karakter morfologi dengan aplikasi PAUP. Analisis statistik yang digunakan yaitu uji Kruskal-Wallis untuk komparasi karakter morfometrik di semua wilayah dengan aplikasi SPSS 17, uji Mann-Whitney untuk menentukan karakter penciri

bagi masing-masing populasi mimi antar populasi dengan SPSS 17, analisis *Multinomial logistic* yaitu untuk menguji konektivitas antar lokasi dengan SPSS 16. Analisis kluster untuk melihat kelompok-kelompok yang terbentuk berdasarkan karakter morfometrik yang diukur dengan SPSS 16.

2.3.2. Molekuler

Analisis data molekuler diantaranya jarak genetik yaitu untuk mengetahui besar perbedaan basa nukleotida mimi dari masing-masing wilayah dengan MEGA 5.0 dan pohon filogeni untuk mengetahui hubungan kekerabatan antarspesies dengan MEGA 5.0.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil

3.1.1. Morfologi *T. gigas*

Dari sampel yang diambil secara acak, diperoleh sebanyak 62 individu dari lima lokasi yaitu, 6 ekor jantan dari Banten, 19 ekor betina dari Subang, 1 ekor jantan dan 2 betina dari Semarang, 10 jantan dan 13 betina dari Demak, 7 jantan dan 4 betina dari Surabaya (Tabel 1). Ketidak-seimbangan kelimpahan, antara jantan dan betina, diduga adanya masa dimana mimi jantan yang tidak memiliki pasangan berkumpul di pantai dan bertindak sebagai satelit untuk menunggu giliran memijah.

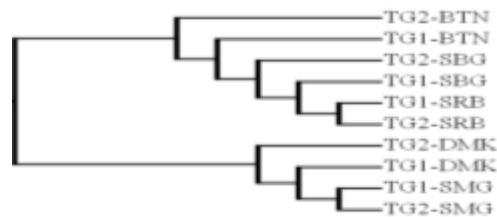
Dendogram yang terbentuk berdasarkan kemiripan dan perbedaan 14 sifat fenotip mimi didapatkan informasi bahwa *T. gigas* Banten, Subang, dan Surabaya memiliki karakter yang hampir sama, sedangkan Semarang dan Demak memiliki karakter berbeda dengan lokasi lain (Gambar 3). Perbedaan karakter ini diduga dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang berbeda.

Hasil uji Kruskal Wallis berdasarkan 27 karakter morfometrik *T. gigas* yang telah dirasiokan secara keseluruhan diperoleh hasil sebanyak 13 karakter yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) pada lokasi Semarang, Demak, Surabaya, Subang, dan Banten. Namun, pada uji ini tidak dapat diketahui secara spe-

sifik karakter mana yang memiliki beda nyata antar lokasi, sehingga dilakukan uji Mann-Whitney untuk mengetahui karakter yang berbeda nyata ($p < 0,05$) antar lokasi. Hasil uji Mann-Whitney disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Rincian jumlah *Tachypleus gigas* jantan dan betina yang tertangkap selama penelitian.

Lokasi sampling	<i>T. gigas</i>	
	Jantan	Betina
Banten	6	-
Subang	-	19
Semarang	1	2
Demak	10	13
Surabaya	7	4



Gambar 3. Konstruksi pohon fenetik *Tachypleus gigas* berdasarkan 14 karakter morfologi (keterangan: TG= *Tachypleus gigas*, BTN= Banten, SBG= Subang, SRB= Surabaya, DMK= Demak, SMG= Semarang).

Sebanyak 14 karakter morfometrik *T. gigas* dari ke-5 lokasi tersebut memiliki hubungan sifat beda nyata ($p < 0,05$) antar lokasi. Sebanyak 15 karakter tubuh, Surabaya memiliki ukuran tubuh (X1-X2 dan X4-X16) lebih besar dan 5 anggota tubuh (panjang marginal spine VI (X22), diameter capit chelicera (X23), diameter capit kaki jalan II (X26), diameter capit kaki jalan III (X27), diameter capit kaki jalan IV (X28)) yang relatif lebih besar dibandingkan daerah Semarang, Demak, Subang, dan Banten. *T. gigas* Semarang dan Demak memiliki ukuran relatif sama, begitu juga dengan Subang dan Banten.

Tabel 2. Perbandingan karakter morfometrik *Tachypleus gigas* pada lokasi Semarang, Demak, Surabaya, Subang, dan Banten.

Karakter (rata-rata±SD)	Lokasi				
	Semarang	Demak	Surabaya	Subang	Banten
X1/X3	1,9974±0,029	1,9589±0,1597	2,1519±0,3688	1,9685±0,1287	1,9362±0,1920
X2/X3	0,9974±0,0299	0,9561±0,2616 ^a	1,1546±0,2311 ^b	0,9955±0,1438	1,0003±0,2036
X4/X3	0,5751±0,0051	0,5504±0,0636	0,5984±0,0945	0,5590±0,0519	0,5664±0,0080
X5/X3	0,3168±0,0103	0,2973±0,0154 ^b	0,3379±0,0477 ^a	0,3171±0,0232 ^{ac}	0,3216±0,0276 ^{ad}
X6/X3	0,2606±0,0019	0,2589±0,0229	0,2715±0,0516	0,2546±0,0220	0,2547±0,0141
X7/X3	0,4249±0,0051 ^{bd}	0,3554±0,1144 ^b	0,4922±0,0757 ^c	0,4479±0,0233 ^{ad}	0,4420±0,0199 ^{de}
XX1 ¹ (mm)	X8/X3 0,2137±0,0076	0,2065±0,0144	0,2149±0,0345	0,2072±0,0109	0,2071±0,0053
	X9/X3 0,9370±0,0353	0,9440±0,1330	1,0267±0,1536	0,9721±0,0736	0,9898±0,0307
	X10/X3 0,5142±0,0136	0,4913±0,0300	0,5430±0,1123	0,4954±0,0233	0,4974±0,0283
	X11/X3 0,5329±0,0007	0,5303±0,0230	0,5972±0,1318	0,5399±0,0313	0,5620±0,0477
	X12/X3 0,6152±0,0189	0,6047±0,0386 ^a	0,6876±0,1374 ^b	0,6134±0,0384	0,6508±0,0437 ^{db}
	X13/X3 0,7862±0,0142	0,7767±0,0704 ^a	0,8594±0,1460	0,8184±0,0368 ^b	0,8191±0,0358
	X14/X3 0,2606±0,0019	0,2537±0,0316 ^a	0,2892±0,0624	0,2777±0,0143 ^b	0,2798±0,0200
	X15/X3 0,0429±0,0035 ^{abd}	0,0421±0,0070 ^b	0,0581±0,0123 ^{cc}	0,0471±0,0043 ^d	0,0508±0,0034 ^{cd}
	X16/X3 0,0381±0,0011 ^{abd}	0,0388±0,0055 ^b	0,0516±0,0115 ^{cc}	0,0432±0,0053 ^d	0,0456±0,0017 ^{cd}
	X17/X3 0,1106±0,0254	0,1092±0,0189	0,1200±0,0341	0,1201±0,0093	0,1269±0,0145
	X18/X3 0,1085±0,0486	0,1160±0,0263 ^a	0,1291±0,0292	0,1366±0,0152 ^b	0,1349±0,0198
	X19/X3 0,0990±0,0418 ^{ab}	0,1023±0,0385 ^b	0,1247±0,0512	0,1447±0,0128 ^c	0,1504±0,0295
	X20/X3 0,0308±0,0239 ^{abc}	0,0780±0,0560 ^b	0,1114±0,0637 ^{cd}	0,1436±0,0118 ^d	0,1519±0,0251 ^{ade}
	X21/X3 0,0378±0,0207 ^{ab}	0,0718±0,0578 ^b	0,1068±0,0651	0,1456±0,0158 ^{cd}	0,1475±0,0184 ^{ad}
XX2 ² (mm)	X22/X3 0,0308±0,0239 ^{abc}	0,0700±0,053 ^b	0,1388±0,0134 ^{bc}	0,1388±0,0134 ^d	0,1322±0,0152 ^{cde}
	X23/X3 0,0249±0,0019	0,0233±0,0026 ^{ac}	0,0274±0,0062 ^b	0,0226±0,0042 ^c	0,0247±0,0043
	X24/X3 0,0357±0,0001 ^{abc}	0,0443±0,0100 ^b	0,0569±0,0178 ^{cd}	0,0529±0,0059 ^d	0,0584±0,0033 ^{ade}
	X25/X3 0,0250±0,0133 ^{ab}	0,0425±0,0103 ^b	0,0561±0,0167 ^{cd}	0,0522±0,0057 ^d	0,0568±0,0027 ^{ade}
	X26/X3 0,0337±0,0017	0,0328±0,0021 ^{ac}	0,0376±0,0064 ^{bd}	0,0317±0,0032 ^c	0,0350±0,0010 ^d
	X27/X3 0,0337±0,0018	0,0329±0,0020 ^{abc}	0,0358±0,0066 ^{bd}	0,0314±0,0030 ^c	0,0356±0,0015 ^d
	X28/X3 0,0456±0,0080	0,0440±0,0028 ^{ad}	0,0517±0,0114 ^b	0,0388±0,0044 ^c	0,0388±0,0023 ^{cd}

Keterangan: Huruf superskrip yang berbeda pada lajur yang sama menunjukkan sifat beda nyata berdasarkan hasil uji Mann-Whitney ($p < 0,05$), X1-X28 (Gambar 1), ¹XX1: tubuh dan ²XX2: bagian anggota tubuh.

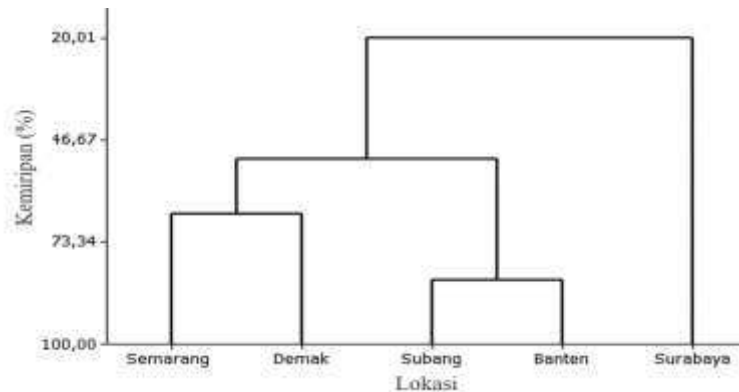
3.1.1.1. Analisis Kluster Morfometrik *T. gigas*

Analisis kluster disajikan dalam bentuk dendrogram. Analisis ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kesamaan karakter morfometrik antar populasi setiap lokasi berdasarkan 27 karakter morfometrik yang telah dirasiokan (Gambar 4). Diperoleh hasil bahwa daerah Semarang dan Demak memiliki tingkat kemiripan karakter yang tinggi sehingga membentuk satu kluster, dengan tingkat kemiripan sebesar 66,11%. Subang dan Banten memiliki tingkat kemiripan sebesar 51,66%, sedangkan Surabaya membentuk karakter tersendiri dengan tingkat kemiripan sebesar 20,01%.

T. gigas Surabaya membentuk kelompok terpisah berdasarkan karakter morfometrik karena pada daerah ini memiliki ukuran tubuh dan anggota tubuh yang relatif lebih besar dibandingkan daerah lainnya. *T. gigas* Semarang dan Demak memiliki ukuran tubuh dan anggota tubuh relatif sama sehingga keduanya membentuk satu kelompok, begitu juga dengan Subang dan Banten.

3.1.1.2. Pengelompokan *T. gigas*

Analisis logistik dilakukan untuk melihat adanya konektivitas antar lokasi berdasarkan 27 karakter yang telah dirasiokan (Tabel 3). Berdasarkan analisis tersebut diperoleh R^2 sebesar 93,8% hal ini berarti varia-



Gambar 4. Dendrogram karakter morfometrik *Tachypleus gigas* pada daerah Semarang, Demak, Subang, Banten, dan Surabaya.

Tabel 3. Konektivitas antar lokasi *Tachypleus gigas* berdasarkan 27 karakter yang telah dirasionkan.

Observed	Predicted					Percent Correct
	Semarang	Demak	Surabaya	Subang	Banten	
Semarang	2					100,0%
Demak	0	21				100,0%
Surabaya	0	0	11			100,0%
Subang	0	0	0	18		100,0%
Banten	0	0	0	0	5	100,0%
Overall Percentage	3,5%	36,8%	19,3%	31,6%	8,8%	100,0%

bel morfometrik antar tiap daerah dan 6,2% dijelaskan oleh variable di luar model. Berdasarkan tabel *classification*, model memiliki kemampuan untuk membedakan antar kelompok populasi sebesar 100% yaitu individu diklasifikasikan sebagai individu asli yang berasal dari Semarang (n=2), Demak (n=21), Surabaya (n=11), Subang (18), dan Banten (n=5). *Percent correct* dapat mencapai hingga 100% diduga karena jumlah individu yang ditemukan sangat sedikit di setiap daerahnya.

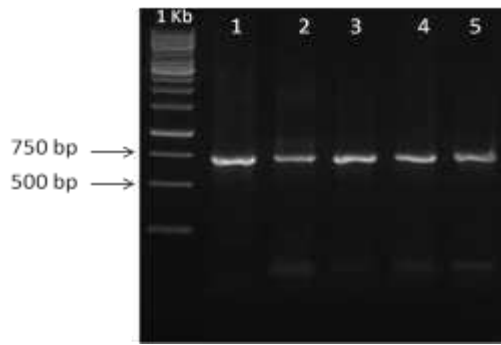
3.1.2. Molekuler *T. gigas*

3.1.2.1. Amplifikasi Fragmen DNA Gen COI Mimi

Panjang urutan basa nukleotida yang berhasil teramplifikasi yaitu 500-750 bp (Gambar 5). Panjang produk PCR yang diperoleh berkualitas baik sehingga dapat dilanjutkan pada tahap pemurnian dan sekuensing.

3.1.2.2. Sekuensing DNA dan Pensejajaran Urutan Basa Nukleotida Gen COI Mimi

Sebanyak lima sampel berhasil di sekuensing. Hasil sekuensing disejajarkan dengan primer *forward* dan *reverse*. Mengacu pada Tamura *et al.* (2011) analisis dilakukan dengan menggunakan MEGA 5.0, diperoleh hasil rata-rata komposisi basa nukleotida *T. gigas* terdiri atas 33,9% basa timin (T), 27,1 % basa adenin (A), 23,2% basa sitosin (C) dan 15,8% basa guanin (G). Dengan demikian gen COI pada *T. gigas* dikategorikan sebagai kelompok kaya akan A-T. Penjajaran sekuen nukleotida gen COI *T. gigas* menghasilkan nilai *conserved* sebesar 83,2% (452/ 543), *variabel* sebesar 12,3 % (4/543), dan *singleton* 12,3 % (4/ 543). Nilai ini menunjukkan variasi basa nukleotida berupa karakteristik pembeda antar spesies.



Gambar 5. Visualisasi DNA hasil pre-test produk PCR pada gel agarosa 0,8%. Kolom kiri sampai kanan: marker 1 kb, 1) Tg BTN, 2) Tg SBG, 3) Tg SMG, 4) Tg DM, 5) Tg SRB. (keterangan: TG= *Tachypleus gigas*, BTN = Banten, SBG = Subang, SRB = Surabaya, DMK= Demak, SMG = Semarang).

3.1.2.3. Jarak Genetik dan Konstruksi Pohon Filogeni Mimi

Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar individu. Jarak genetik fragmen gen CO1 pada ke tiga spesies ditampilkan dalam bentuk matriks. Jarak genetik antara spesies *T. gigas* Indonesia dibandingkan dengan spesies (*C. Ro-*

tundicauda, *T. tridentatus*, dan *T. gigas*) dari Negara lain (*outgroups*) dari GenBank, dan diperoleh hasil seperti pada Tabel 4. Nilai jarak genetik terendah *T. gigas* dengan spesies *outgroups*, yaitu 0,015 pada Tg BTN, Tg DMK, Tg SBG, Tg SMG dengan Tg KJ825 849, sedangkan jarak tertinggi adalah pada *T. gigas* dengan Cr AF370828 (>0,1).

Jarak genetik digunakan untuk membentuk pohon filogeni, lalu dari pohon ini dapat diketahui hubungan kekerabatan antar spesies. Pohon filogeni dikonstruksi berdasarkan metode *p-distance*. Hasil analisis filogeni diperoleh pemisahan yang nyata antara spesies Indonesia dengan spesies *outgroups* (Gambar 6).

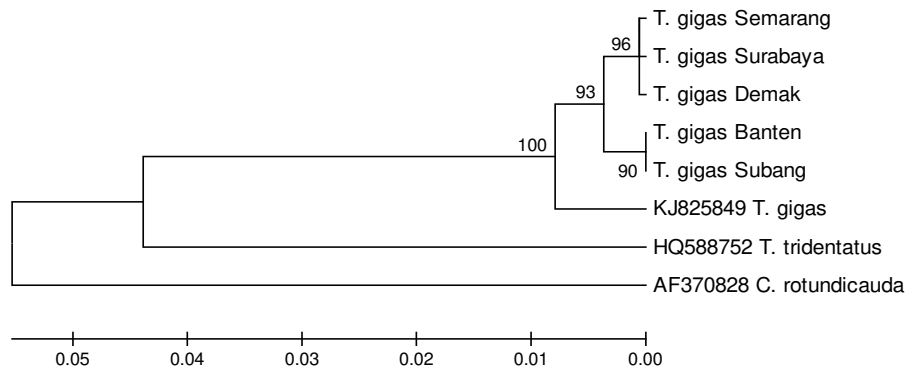
3.1.2.4. Nukleotida Spesifik dan Mutasi Gen COI Mimi

Sekuen nukleotida gen COI disejajarkan dan diperoleh sebanyak 4 situs spesifik antar spesies. Ke-4 situs spesifik ini merupakan penciri yang membedakan *T. gigas* antar lokasi. *T. gigas* Indonesia dengan *outgroups* sebanyak 73 situs spesifik. Ke-73 situs spesifik ini merupakan penciri yang membedakan *T. gigas* dengan *outgroups*. Hal ini menunjukkan adanya evolusi spesifik dari ketiga spesies tersebut.

Tabel 4. Matriks jarak genetik fragmen gen CO1 pada spesies *C. rotundicauda*, *T. tridentatus*, dan *T. gigas* Indonesia dibandingkan dengan spesies dari Negara lain (*outgroup*) dari GenBank.

Spesies_lokasi	Tg ¹ BTN ⁴	Tg ¹ SBG ⁵	Tg ¹ DMK ⁶	Tg ¹ SMG ⁷	Tg ¹ SRB ⁸	Cr ³ AF370828 ⁹	Tt ² HQ588752 ¹⁰	Tg ¹ KJ825849 ¹¹
Tg ¹ BTN ⁴								
Tg ¹ SBG ⁵	0,000							
Tg ¹ DMK ⁶	0,007	0,007						
Tg ¹ SMG ⁷	0,007	0,007	0,000					
Tg ¹ SRB ⁸	0,009	0,009	0,002	0,002				
Cr ³ AF370828 ⁹	0,107	0,107	0,112	0,112	0,114			
Tt ² HQ588752 ¹⁰	0,088	0,088	0,088	0,088	0,090	0,114		
Tg ¹ KJ825849 ¹¹	0,015	0,015	0,015	0,015	0,018	0,107	0,086	

¹Tg=*T. gigas*, ²Tt=*T. tridentatus*, ³Cr=*C. rotundicauda*, ⁴BTN=Banten, ⁵SBG=Subang, ⁶DMK=Demak, ⁷SMG=Semarang, ⁸SRB=Surabaya, ⁹AF370828=USA, ¹⁰HQ588752=Sweden, ¹¹KJ825849= Central Arabian Sea



Gambar 6. Konstruksi pohon filogeni berdasarkan gen CO1 pada spesies *T. gigas* Indonesia dibandingkan dengan spesies dari Negara lain (*outgroups*) dari GenBank (*outgroups*: AF370828=USA, HQ588752=Sweden, KJ825849= Central Arabian Sea).

Berdasarkan hasil penjabaran sekuen nukleotida gen CO1 diperoleh situs mutasi. Situs mutasi ditemukan pada spesies *T. gigas* yaitu delesi sebanyak 1 pada situs ke 107, sedangkan insersi tidak ditemukan.

3.2. Pembahasan

Sebanyak 5 lokasi penelitian diperoleh jumlah jantan dan betina masing masing spesies berbeda. Terjadi ketidakseimbangan antara spesies jantan dan betina pada *T. gigas*, betina lebih banyak ditemukan. Menurut Johnson and Brockmann (2010) perbedaan perbandingan komposisi jantan dan betina disebabkan adanya masa di mana mimi jantan yang tidak memiliki pasangan berkumpul di pantai dan bertindak sebagai satelit untuk menunggu giliran memijah.

T. gigas Surabaya membentuk kelompok terpisah berdasarkan karakter morfometrik karena pada daerah ini memiliki ukuran tubuh dan anggota tubuh yang relatif lebih besar dibandingkan daerah lainnya. Perubahan ukuran tubuh mimi dipengaruhi oleh kepadatan populasi, ketersediaan pangan, dan pengaruh kondisi lingkungan (Chatterji *et al.*, 2000; Zadeh *et al.*, 2011). Penelitian yang telah dilakukan oleh Chatterji *et al.*, (2000) diperoleh hasil bahwa penambahan panjang dan lebar karapas dipengaruhi oleh ketersediaan pakan dan kepadatan populasi. Mimi memiliki ukuran karapas yang berbeda pada

habitat yang berbeda seperti karapas populasi mimi yang ada di Malaysia memiliki karapas yang lebih besar dibandingkan dengan karapas yang ada di India dan Thailand (Chatterji, 1999; Sriyaya *et al.*, 2010).

Pada penelitian ini, Demak dan Subang merupakan lokasi dengan jumlah tangkapan mimi terbanyak, dalam sehari sebanyak 23 ekor dan 19 *T. gigas* telah tertangkap. Sebanyak 378 ekor mimi tertangkap selama 10 bulan Maret – Desember 2003 penelitian yang telah dilakukan oleh Muslihah (2004) di Mayangan Subang. Kepadatan populasi, umur, ketersediaan pangan, dan pengaruh kondisi lingkungan mempunyai hubungan yang signifikan dengan perubahan dimensi tubuh mimi (Chatterji *et al.*, 2000; Zadeh *et al.*, 2011). Di Balramgari, Orissa penambahan panjang dan lebar karapak *T. gigas* dipengaruhi oleh kepadatan dan ketersediaan pakannya. Makanan mimi tersedia di banyak tempat, jenis makanan mimi diantaranya ikan mati, polyceta, bivalvia, moluska, serta alga (Chatterji *et al.*, 2000).

Basa *T. gigas* didominasi oleh basa adenin (A) dan timin (T). Jusuf (2001) menyatakan bahwa A-T memiliki ikatan hidrogen yang terdiri dari dua ikatan dan bersifat lemah dibandingkan dengan G-C yang memiliki tiga ikatan hidrogen. Sehingga, A-T lebih mudah terpisah dan menyebabkan spesies ini memiliki kemungkinan terjadi mutasi. Urutan

nukleotida bersifat *conserve* pada tingkat spesies, hal ini ditunjukkan oleh sekuen nukleotida pada gen CO1 *T. gigas*. Keberadaan 4 situs nukleotida spesifik menjadi penciri spesies *T. gigas*, yang menunjukkan adanya evolusi spesifik pada spesies ini.

Konstruksi pohon filogeni spesies *T. gigas* dengan *outgroups* (*T. gigas*, *C. Rotundicauda*, dan *T. tridentatus* Negara lain), menunjukkan adanya pemisahan secara jelas. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga spesies tersebut memiliki karakter nukleotida yang berbeda dibandingkan dengan *outgroups* (Negara lain). Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Obst *et al.* (2012) dengan menggunakan fragmen gen 16S, 228S, dan CO1 diperoleh hasil bahwa konstruksi pohon filogeni *C. rotundicauda* terpisah dengan genus *Tachypleus*, hal ini juga berkaitan dengan perbedaan ekologi. *C. rotundicauda* merupakan spesies yang memiliki keragaman genetik paling tinggi dibandingkan dengan genus *Tachypleus* dan *Limulus*, hal ini disebabkan oleh perbedaan faktor ekologi *C. Rotundicauda* yang 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.

Identifikasi molekuler dari penelitian ini telah menunjukkan kepastian taksonomi (*taxonomy certainty*). Sehingga dapat dijadikan sebagai acuan untuk kajian genetika populasi, kajian stok, hingga tercapai data yang cukup untuk melakukan tindakan pengelolaan sumberdaya mimi melalui konservasi. Berdasarkan hasil penelitian ini, sangat penting untuk dilakukan pelarangan tegas terhadap reklamasi pantai, dan dilakukannya konservasi mimi.

IV. KESIMPULAN

T. gigas Surabaya memiliki ukuran tubuh (X1-X2 dan X4-X16) lebih besar dan 5 anggota tubuh (panjang marginal spine VI (X22), diameter capit chelicera (X23), diameter capit kaki jalan II (X26), diameter capit kaki jalan III (X27), diameter capit kaki jalan IV (X28)) yang relatif lebih besar di-

bandingkan daerah Semarang, Demak, Subang, dan Banten. Dihasilkan nukleotida dengan panjang 650 pb bersifat *conserve*. Analisis menggunakan *software* MEGA 5.0 menunjukkan sebanyak 73 situs spesifik yang merupakan penciri yang membedakan *T. gigas in-groups* dengan *T. gigas* dari *Central Arabian Sea*, *T. tridentatus* dari Sweden dan *Carcinoscorpius rotundicauda* dari USA sebagai *outgroups*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada staf Laboratorium Biologi Molekuler MSP, Biologi Makro MSP, dan Laboratorium Terpadu, FPIK, IPB atas fasilitas dan bantuan yang diberikan. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada para reviewer yang telah banyak memberikan masukan dan komentar untuk memperbaiki paper ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Balisani, S.L. 1994. Studi perkembangan embrio blangkas *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille) hasil pemijahan semi alami dan buatan. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. 67hlm.
- Beekey, M.A., J.H. Mattei, and B.J. Pierce. 2013. Horseshoe crab eggs: A rare resource for predators in Long Island Sound. *J. of Experimental Marine Biology and Ecology*, 439:152-159.
- Cartwright-Taylor, L., J. Lee, and C.C. Hsu. 2009. Population structure and breeding pattern of the mangrove horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* in Singapore. *Aquatic Biology*, 8:61-69.
- Cartwright-Taylor, L., Y.V. Bing., H.C. Chi., and L.S. Tee. 2011. Distribution and abundance of horseshoe crabs *Tachypleus gigas* and *Carcinoscorpius rotundicauda* around the main island Singapore. *Aquatic Biology*, 13:127-136.

- Chatterji, A., R. Vijayakumar, and A.H. Parulekar. 1992. Spawning migration of the horseshoe crab, *Tachypleus gigas* (Muller), in relation to lunar cycle. *Asian Fisheries Science*, 5:123-128.
- Chatterji, A., 1999. New record of the sympatric distribution of two Asian species of the horseshoe crab. *Indian J. of Marine Science*, 77(6):43-48.
- Chatterji, A., A.H. Parulekar, and R. Vijayakumar. 2000. Morphometric characteristics in the horseshoe crab *Tachypleus gigas* (Arthropoda: Merostomata). *Indian J. of Marine Science*, 29: 333-335.
- Christianus, A. and C.R. Saad. 2007. Horseshoe crabs in Malaysia and the world. *Fishery Mail*, 16:8-9.
- Chiu, H.M.C. and B. Morton. 2004. The behavior of juvenil horseshoe crabs, *Tachypleus tridentatus* (Xiphosura), on nursery beach at Shin Hau Wan, Hongkong. *Hydrobiologia*, 523:29-35.
- Dietl, J., C. Nascimento, and R. Alexander. 2000. Influence of ambient flow around the horseshoe crab *Limulus polyphemus* on the distribution and orientation of selected epizoans. *Estuaries*, 23:509-520.
- Ding, J.L., K.C. Tan, S. Thangamani, N. Kusuma, W.K. Seow, T.H.H. Bui, J. Wang, and B. Ho. 2005. Spatial and temporal coordination of expression of immune response genes during *Pseudomonas* infection of horseshoe crab, *Carcinoscorpius rotundicauda*. *Nature Publishing Group*, 6(7):557-574.
- Eidman, M., Mayunar, dan S. Redjeki. 1997. Pematangan gonad mimi ranti, *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille) dan mimi bulan *Tachypleus gigas* (Muller) dengan berbagai jenis pakan. *J. Ilmu-Ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia*, 5(1):1-6.
- Eidman, M., A.M. Samosir, dan U. Aktani. 1992. Studi biologi mimi/belangkas (subkelas Xi-phosura) dalam rangka pengembangan dan pemanfaatan sumberdaya hayati laut untuk kebutuhan industri farmasi di Indonesia. Laporan penelitian tahun I. Proyek pengembangan pendidikan ilmu kelautan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Fakultas Perikanan. IPB, Bogor. 56hlm.
- Fachrul, M.F. 1989. Aspek biologi mimi (Xilphosura). Term paper. Fakultas Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. 15hlm.
- Ferari, K.M., and N.M. Targett. 2003. Chemical attractants in horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, eggs: the potential for an artificial bait. *J. of Chemical Ecology*, 29:477-496.
- Hu, M., Y. Wang, Y. Chen, S.G. Cheung, P.K.S. Shin, and Q. Li. 2009. Summer distribution and abundance of juvenile Chinese horseshoe crabs *Tachypleus tridentatus* along an intertidal zone in Southern China. *Aquatic Biologi*, 7:107-112.
- Hurton, L., 2003. Reducing post-bleeding mortality of horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) used in the biomedical industry. Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. 80hlm.
- Harrington, B.A. 2001. Red Knot (*Calidris canutus*). In: A. Poole and F. Gill (eds.). The birds of North America. The birds of North America, Inc., Philadelphia, Pennsylvania. 24pp.
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham, and J.R. De Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc.*, 270:96-99.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2015. Red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org>. [Retrieved on Mei 2015].
- Ismurwanti, C. 1994. Studi awal pengaruh konsentrasi diazinon-60 ec terhadap perkembangan embrio dan penetasan telur mimi ranti *Carcinoscorpius ro-*

- tundicauda* (Latreille). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. 64hlm.
- John, B.A., B.Y. Kamaruzzaman, K.C.A. Jalal, and K. Zaleha. 2012. Feeding ecology and food preferences of *Carcinoscorpius rotundicauda* collected from the pahang nesting grounds. *Sains Malaysiana*, 41(7): 855-861.
- Johnson, S.L. and H.J. Brockmann. 2010. Costs of multiple mates: an experimental study in horseshoe crabs. *Animal Behaviour*, 80:773-782.
- Jusuf, M. 2001. Genetika I: struktur dan ekspresi gen. Sagung Seto. Jakarta. 285 hlm.
- Lee, C.N. and B. Morton. 2005. Experimentally derived estimates of growth by juvenile *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda* (Xiphosura) from nursery beaches in Hong Kong. *J. Marine Biology Ecology*, 318:39-49.
- Li, H.Y. 2008. The conservation of horseshoe crabs in Hong Kong. Thesis. University of Hong Kong. 312p.
- Muslihah. 2004. Beberapa aspek biologi reproduksi mimi bulan *Tachypleus gigas* di Perairan Mayangan, Kabupaten Subang, Jawa Barat. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 63hlm.
- Mishra, J.K. 2009. Horseshoe crabs, their ecobiological status along the north-east coast of India and the necessity for ecological conservation. *Dalam: Tanacredi J.T. et al. (eds.). Biology and conservation of horseshoe crabs.* Springer Science & Business Media, Heidelberg. 89-96pp.
- Mulya, M.B. 2014. Pelestarian, pemanfaatan sumberdaya genetika mimi ranti (*Carcinoscorpius rotundicauda*, L) dan mimi bulan (*Tachypleus gigas*, M). Skripsi. Universitas Sumatera Utara. 9hlm.
- Novitsky, T.J., Thomas, Dawson, E. Michael, Paus, and J. Erik. 2002. Artificial bait. United States Patent. United States. 1295p.
- Novitsky, T.J. 1994. Limulus amebocyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood. *J. of Endotoxin Research*, 1(4):253-263.
- Obst, M., S. Faurby, S. Bussarawit, and P. Funch. 2012. Molecular phylogeny of extant horseshoe crabs (Xiphosura, Limulidae) indicates Paleogene diversification of Asian species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1): 21-26.
- Purnomo, Y.A. 1992. Biologi reproduksi mimi ranti *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille) betina yang tertangkap di Perairan Rembang, Jawa Tengah. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 64hlm.
- Rahmalia, E. 1995. Pembuahan buatan dan studi awal pengaruh konsentrasi saponin terhadap perkembangan embrio dan larva mimi bulan *Tachypleus gigas* (Muller). Fakultas Perikanan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 66hlm.
- Rubiyanto, E. 2012. Studi populasi mimi (Xiphosura) di Perairan Kuala Tungkal, Kabupaten Tanjung Jabung Barat, Jambi. Tesis. Universitas Indonesia. 66hlm.
- Santoso, A.R. 1992. Pemijahan dan perkembangan embrio Mimi *Tachypleus gigas* (Muller). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. 47hlm.
- Selander, R.K., S.Y. Yang, R.C. Lewontin, and W.E. Johnson. 1970. Genetic variation in the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*), a phylogenetic "relic". *Evolution*, 24(2):402-414.
- Shin, P., H.Y. Li, and S.G. Cheung. 2009. Horseshoe crabs in Hongkong: Current population status and human exploitation. *In: Tanacredi et al. (eds.). Biology and conservation of horseshoe crabs.* Springer Science & Business Media, Heidelberg. 347-360pp.
- Smith, D.R. 2007. Effect of horseshoe crab spawning density on nest disturbance and exhumation of eggs: a simulation study. *Estuaries*, 30:287-295.

- Solihin, D.D. 1994. Peran DNA mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. *Hayati*, 1(1):1-4.
- Suparta. 1992. Keragaman sifat-sifat morfometrik mimi, *Tachypleus gigas* (MULLER) dan *Carcinoscorpius rotundicauda* (LATREILLE) di perairan pantai Kabupaten Pandeglang, Jawa Barat dan perairan pantai Kabupaten Rembang, Jawa Tengah. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. 69hlm.
- Srijaya, T.C., P.J. Pradeep, S. Mitun, A. Hasan, F. Shaharom, and A. Chatterji. 2010. A new record on the morphometric variation in the population of horseshoe crab (*Carcinoscorpius rotundicauda* Latreille) obtained from two different ecological habitats of Peninsular Malaysia. *Our Nature*, (8): 204-211.
- Taylor, L.C., J. Lee, and C.C. Hsu. 2011. Population structure and breeding pattern of the mangrove horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* in Singapore. *Aquatic Biology*, 8(1):61-69.
- Vauziyah, C. 1995. Perkembangan embrio mimi bulan *Tachypleus gigas* (Muller) dari perairan Teluk Banten pada berbagai salinitas media. Institut Pertanian Bogor. 64hlm.
- Walls, E.L., J. Berkson, and S.A. Smith. 2002. The horseshoe crab, *Limulus polyphemus*: 200 million years of existence, 100 years of study. *Review Fisheries Sciences*, (10):39-73.
- Yeo, D.S.A., J.L. Ding, and B. Ho. 1996. Neuroblastoma cell culture assay shows that *Carcinoscorpius rotundicauda* haemolymph neutralizes tetrodotoxin. *Pergamon*, 34(9):1054-1057.
- Zadeh, S.S., A. Christianus, C.R. Saad, P. Hajeb, and M.S. Kamarudin. 2011. Comparations in prosomal width and body weight among early instar stages of Malaysian Horseshoe crabs, *Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus gigas* in the laboratory. In: Tanacredi *et al.* (eds.). *Biology and conservation of horseshoe crabs*. Springer Science & Business Media. Heidelber. 267-274pp.

Diterima : 7 Agustus 2015

Direview : 23 Mei 2016

Disetujui : 25 Mei 2016