

Pemanfaatan DNA Barcoding untuk Identifikasi Spesies Bivalvia di Ekosistem Mangrove Desa Tapak, Kota Semarang

Nurul Yustina¹, Max Rudolf Muskananfolo^{2*}, Diah Ayuningrum², dan Sigit Febrianto²

¹ Mahasiswa Departemen Sumber Daya Akuatik, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

²Departemen Sumber Daya Akuatik, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Jacob Rais, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, 50275 Indonesia

Email: max.rudolf@live.undip.ac.id / nurul.yustina72@gmail.com

Abstrak

Ekosistem mangrove berada pada wilayah intertidal yang memiliki interaksi dinamis antara perairan laut, payau, sungai dan terestrial. Fungsi ekologis ekosistem mangrove sebagai pelindung pantai dari erosi, *feeding ground*, *nursery ground*, dan *spawning ground* bagi biota perairan. Biota yang beragam termasuk moluska kelas bivalvia banyak ditemui di daerah mangrove. Berbagai spesies Bivalvia banyak ditemukan di ekosistem mangrove sehingga perlu adanya identifikasi spesies untuk menggambarkan karakteristik spesies. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui spesies bivalvia di lokasi penelitian dan mengetahui hubungan filogenetik spesies yang telah ditemukan melalui analisis pohon filogenetik. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif kuantitatif dengan metode pengambilan sampel *purposive sampling*. Penelitian ini berlangsung pada bulan September – Desember 2023. Tahapan Identifikasi molekuler yang dilakukan dalam teknik DNA Barcoding adalah: ekstraksi DNA (Chelex 10% dan Kit Extraction Zymo Research), amplifikasi, visualisasi, dan *sequencing* DNA. Hasil data *sequencing* kemudian dianalisis menggunakan BLAST dan menunjukkan sampel BM1 memiliki kemiripan sebanyak 99% dengan spesies *Donax incarnatus* sedangkan 99,85% pada sampel BM2 dengan spesies *Perna viridis*. Konstruksi pohon filogenetik dibuat menggunakan *maximum likelihood* pada software MEGA XI, diperoleh bivalvia dengan kode BM1 berkerabat dengan *Donax incarnatus* dengan memiliki nilai *bootstrap* 94% sedangkan bivalvia BM2 berkerabat dengan spesies *Perna viridis* dengan nilai *bootstrap* 100%.

Kata kunci : *Donax incarnatus*, Identifikasi Molekuler, Kecamatan Tugu, *Perna viridis*, Pohon Filogenetik

Abstract

Utilization of DNA Barcoding to Identify Bivalvia Species in the Mangrove Ecosystem of Tapak Village, Semarang City

The mangrove ecosystem is located in the intertidal area which has dynamic interactions between marine, brackish, river and terrestrial waters. The ecological function of the mangrove ecosystem is as coastal protection from erosion, feeding ground, nursery ground, and spawning ground for aquatic biota. Diverse biota, including bivalve class molluscs, are often found in mangrove areas. Various species of Bivalves are found in mangrove ecosystems, so species identification is necessary to describe species characteristics. The aim of this research is to determine the bivalve species at the research location and to determine the phylogenetic relationship of the species that have been discovered through phylogenetic tree analysis. The method used in this research is descriptive quantitative with a purposive sampling method. This research will take place in September – December 2023. The molecular identification stages carried out in the DNA Barcoding technique are: DNA extraction (Chelex 10% and Zymo Research Extraction Kit), amplification, visualization and DNA sequencing. The sequencing data results were then analyzed using BLAST and showed that the BM1 sample had 99% similarity to the *Donax incarnatus* species, while the BM2 sample was 99.85% similar to the *Perna viridis* species. Phylogenetic tree construction was made using maximum likelihood in MEGA.

Keywords : *Donax incarnatus*, Molecular Identification, *Perna viridis*, Phylogenetic Tree, Tugu Distric

PENDAHULUAN

Wilayah Tapak terletak di bagian barat laut Kota Semarang. Kondisi mangrove di Dukuh Tapak tergolong cukup baik jika dibandingkan dengan daerah lain di sekitarnya (Martuti *et al.*, 2018). Hasil laporan Dinas Kelautan dan Perikanan Kota Semarang (2015) menunjukkan bahwa rata-rata kerapatan terendah mangrove kategori pohon di Dukuh Tapak Kelurahan Tugurejo 2.500 ind/ha. Hal ini karena di wilayah Tapak sering dilakukan kegiatan penanaman mangrove baik yang dilakukan oleh masyarakat setempat maupun dari lembaga-lembaga pemerintah, swasta, LSM, pelajar, dan mahasiswa. Desa Tapak merupakan salah satu wilayah di Kota Semarang yang ekosistem mangrovenya masih terjaga. Jenis mangrove yang sering dijumpai di wilayah Tapak ini adalah *Rhizophora mucronata*, *Avicennia marina*, *Excoecaria agallocha*, *Bruguiera cylindrical*, dan *Xylocarpus mocullensis* (Martuti, 2013).

Mangrove merupakan ekosistem yang berada pada wilayah intertidal, di mana pada wilayah tersebut terjadi interaksi yang dinamis antara perairan laut, payau, sungai dan terestrial. Tumbuhan mangrove dapat tumbuh dan berkembang dalam kadar garam atau salinitas cukup tinggi yaitu di daerah pasang surut air laut. Mangrove merupakan suatu tempat yang bergerak akibat adanya pembentukan tanah lumpur dan daratan secara terus menerus sehingga secara perlahan berubah menjadi semi daratan (Rahim dan Baderan, 2017). Ekosistem mangrove memiliki peranan yang sangat kompleks dalam ekosistem. Zona transisi antara ekosistem terestrial dan laut, ekosistem mangrove telah lama dikenal memiliki banyak fungsi dan merupakan penghubung penting dalam menjaga keseimbangan biologis ekosistem pesisir (Karimah, 2017). Keberadaan ekosistem mangrove mempunyai banyak manfaat bagi kehidupan dengan pengaruh yang sangat luas. Peranan hutan mangrove dalam kehidupan seperti fungsi mangrove ditinjau dari aspek; ekologi, sosial, dan ekonomi (Sihombing *et al.*, 2017). Ekosistem mangrove merupakan habitat penting bagi organisme laut. Ekosistem mangrove bermanfaat sebagai kawasan pengasuhan, pemijahan, perkembangan dan daerah mencari makanan dari beberapa jenis biota. Ekosistem mangrove merupakan tempat hidup dari berbagai jenis biota di perairan seperti ikan, gastropoda, dan Bivalvia. Bivalvia

termasuk salah satu organisme yang berasosiasi di daerah mangrove. Bivalvia merupakan hewan invertebrata yang mempunyai cangkang (Yanti *et al.*, 2022). Berbagai spesies Bivalvia banyak ditemukan di ekosistem mangrove, hidup di permukaan substrat maupun di dalam substrat dan menempel pada pohon mangrove.

Identifikasi spesies memiliki peranan penting dalam penelitian biologi dan melalui identifikasi dapat menggambarkan karakteristik spesies. Hasil identifikasi sangat bermanfaat dalam kegiatan pengelolaan dan konservasi suatu spesies. Klasifikasi taksonomi melalui pendekatan genetik penting dilakukan agar dapat menjelaskan lebih banyak tentang keanekaragaman spesies di suatu wilayah tertentu. Identifikasi suatu spesies dapat dilakukan berdasarkan pada karakteristik morfologi maupun berdasarkan karakter molekuler (Thu *et al.*, 2019). Identifikasi molekuler merupakan suatu cara mengidentifikasi menggunakan materi genetik yang dimiliki sampel biota (Chrisnawati *et al.*, 2023). DNA *barcoding* dapat digunakan untuk identifikasi spesies molekuler. Teknik ini dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu gen yang dapat dijadikan sebagai marka molekuler untuk penentuan spesies adalah gen COI pada DNA mitokondria. COI dapat dijadikan untuk identifikasi molekuler dengan memanfaatkan marka Gen COI pada sampel yang akan diteliti (Meilana *et al.*, 2016). Gen COI memiliki evolusi molekuler yang paling tinggi dibandingkan dengan gen-gen di mitokondria yang lain (Solichin *et al.*). Gen tersebut memiliki variasi yang sedikit sehingga dapat digunakan sebagai DNA *barcoding* serta sedikit mengalami mutasi atau perubahan dalam sekuennya. Pengetahuan mengenai identifikasi molekuler Bivalvia di Kawasan Mangrove Desa Tapak Kecamatan Tugu Kota Semarang masih sedikit. Oleh karena itu, penting untuk dilakukan identifikasi molekuler dan filogenetik Bivalvia menggunakan pendekatan DNA *barcoding* di Kawasan Mangrove Desa Tapak Kecamatan Tugu Kota Semarang.

METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September – Desember 2023. Lokasi pengambilan sampel pada tiga titik yaitu di daerah muara di kawasan mangrove Desa Tapak

Tugu Semarang, Jawa Tengah. Pelaksanaan analisis sampel dilakukan di Laboratorium *Tropical Marine Biotechnology* Gedung J, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro Semarang dan di Laboratorium Terpadu lantai 6, Universitas Diponegoro.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif kuantitatif. Metode ini sangat cocok digunakan untuk melakukan penelitian dengan tujuan tertentu. Metode kuantitatif dengan pendekatan deskriptif merupakan metode penelitian yang dapat digunakan untuk meneliti sampel tertentu, mengumpulkan data, dengan analisis data bersifat kuantitatif dengan tujuan menguji hipotesis yang telah ditetapkan dengan pendekatan deskriptif dilakukan dengan untuk mengetahui variabel bebas tanpa adanya perbandingan (Sugiyono, 2018). Penelitian ini menggunakan analisis morfologi dan molekuler *Bivalvia* di kawasan mangrove Desa Tapak Tugu Semarang, Jawa Tengah.

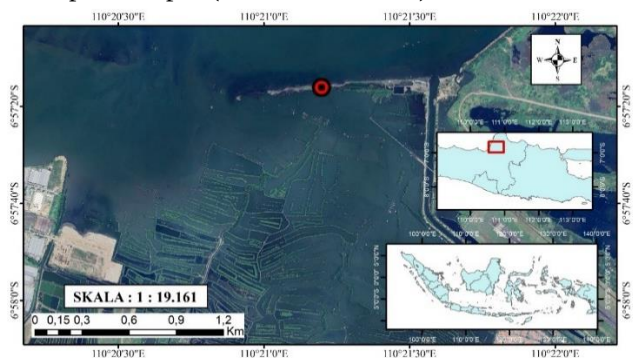
Cara Kerja

Pengambilan sampel

Penentuan lokasi pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan metode *purposive sampling* yaitu penentuan pengambilan sampel dengan pertimbangan tertentu mengikuti syarat yang sesuai dengan sampel yang diperlukan dengan asumsi bahwa sampel yang diambil mewakili populasi dari lokasi penelitian. Metode ini dipilih berdasarkan pertimbangan pertimbangan yang tertentu untuk menentukan lokasi sampling. *Purposive sampling* merupakan sebuah metode sampling *non-random* dengan memastikan tujuan riset sehingga diharapkan bisa menjawab kasus penelitian (Lenaini, 2021). *Bivalvia* banyak hidup di daerah muara atau zona intertidal. Zona intertidal pada saat air surut akan terpapar oleh sinar matahari langsung, sedangkan pada saat pasang akan tertutup air (Ardiansyah dan Kurnia, 2022). Lokasi pengambilan sampel di wilayah mangrove pada daerah muara. Langkah penentuan titik lokasi dapat dilakukan dengan mencatat titik lokasi pengambilan biota dan menyimpan dalam GPS.

Pengambilan sampel dalam penelitian diambil dari sedimen kawasan mangrove pada titik lokasi pengambilan seperti pada Gambar

3.1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel dengan titik koordinat 110°21'12.09" BT dan 06°57'15.85" LS. Sedimen diambil secara langsung menggunakan sekop pada lapisan sedimen, kemudian sampel disaring dan diambil biotanya yakni *Bivalvia* kemudian sampel dimasukkan ke dalam plastik *ziplock* dan disimpan di dalam *cool box* yang berisi es batu sebelum dilakukan proses lebih lanjut. Setelah selesai pengambilan sampel, *Bivalvia* yang disimpan di dalam *coolbox* selanjutnya dipisahkan dengan cangkangnya dan dibersihkan menggunakan ddH₂O, dan dimasukkan ke dalam falkon ukuran 15 ml dengan ditambahkan ethanol 96% dengan tujuan untuk menyimpan sampel biota. Alkohol dapat dimanfaatkan untuk mengawetkan sampel dalam keadaan steril yang dapat digunakan untuk memperpanjang daya simpan sampel (Failu *et al.*, 2021).



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel Ditunjukkan dengan Pin Warna Merah

Pengukuran Parameter Lingkungan

Pengukuran parameter lingkungan dilakukan secara langsung di lokasi sampling. Parameter yang diukur yaitu suhu, pH, DO dan salinitas. Pengukuran parameter lingkungan ini digunakan sebagai data pendukung penelitian. Pengukuran suhu dilakukan dengan cara memasukkan termometer air raksa secara langsung atau botol yang telah berisikan air dari tempat pengambilan di titik sampel hingga menunjukkan angka yang stabil. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dimasukkan ke dalam botol yang telah berisikan air dari tempat pengambilan di titik sampel. Pengukuran DO juga dapat dilakukan dengan langkah yang hampir sama dengan pengukuran suhu dan pH perairan yaitu dengan menggunakan DO meter. Pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer yaitu air sampel diteteskan ke dalam kacanya yang sudah dikalibrasi menggunakan akuades, kemudian ditutup dan diarahkan ke sumber cahaya matahari. Pengukuran salinitas perairan dapat

dilakukan dengan menggunakan refraktometer dengan cara mengkalibrasi sebelum penggunaannya agar data dapat terbaca dengan benar (Razaq et al., 2020).

Teknik Identifikasi Morfologi Bivalvia

Sampel Bivalvia diambil dari kawasan mangrove Desa Tapak Kecamatan Tugu Kota Semarang. Sampel difoto dengan menggunakan *handphone* sebelum dipisahkan dengan cangkangnya. Morfologi Bivalvia mangrove memiliki ciri-ciri bentuk cangkang, dan panjang lebar cangkang yang berbeda-beda. Identifikasi morfologi Bivalvia dapat dilakukan dengan cara mengamati bentuk cangkang spesies dari Bivalvia yang telah diperoleh, melihat struktur permukaan cangkang, melihat corak warna cangkang, serta mengukur kisaran panjang dan lebar cangkang Bivalvia (Bahri et al., 2020). Sampel kemudian dibawa ke Laboratorium *Tropical Marine Biotechnology* Gedung J, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro Semarang. Identifikasi Bivalvia dapat dilakukan berdasarkan ciri morfometri eksterior cangkang. Pengukuran cangkang meliputi panjang, lebar, dan tinggi cangkang (Apriliana dan Ambarwati, 2018). Berdasarkan foto yang telah didapatkan mampu membantu dalam identifikasi melalui *website* <http://www.marinespecies.org>.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat alat yang digunakan untuk pengujian harus dalam keadaan steril, sehingga harus dilakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave*. *Microtube* dimasukkan ke dalam *beaker glass* ditutup rapat dengan aluminium foil dan jika perlu diikat dengan karet gelang kemudian dimasukkan ke dalam plastik. *Microtip* yang digunakan juga perlu disterilisasi dengan cara dimasukkan dan ditata ke dalam kotak yang telah terdapat lubang *microtip*, diisi hingga penuh kemudian ditutup dimasukkan ke dalam plastik dan diikat seperti biasa. Semua alat di *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Autoklaf atau dikenal dengan metode sterilisasi panas basah biasanya sterilisasi yang menggunakan bantuan alat autoklaf dengan tekanan bersaturasi dengan suhu 121 °C selama 15 menit (Ni et al., 2016).

Identifikasi Molekuler

A. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan tahapan awal dari DNA barcoding, yang merupakan proses

pemisahan DNA dari komponen sel lainnya seperti protein, karbohidrat, lemak dan lainnya. Prinsip ekstraksi DNA terdiri dari beberapa tahapan, yaitu lysis, binding, washing dan elute. Lysis adalah proses pemecahan sel dengan penambahan enzim membran sel dan inti sel sehingga dapat mengakses DNA di dalamnya. Binding adalah proses pengikatan DNA sehingga dapat terpisah dari protein dan zat pengotor lainnya dengan menggunakan senyawa seperti fenol-kloroform atau zat lainnya untuk memisahkan DNA dari protein, lipid, dan RNA. Washing adalah proses pemurnian DNA melalui teknik seperti sentrifugasi, filtrasi atau bahan kimia lainnya agar terpurifikasi. Langkah terakhir elute, yaitu proses resuspensi dengan penambahan larutan buffer sebagai pelarut dari materi DNA/RNA. Ekstraksi DNA memiliki prinsip dasar yakni bagaimana menghancurkan jaringan dan memperoleh DNA murni yang tidak terkontaminasi oleh komponen sel, tanpa menyebabkan kerusakan pada DNA tersebut (Nugroho et al., 2019). Ekstraksi DNA dilakukan dengan dua metode Chelex 10% dan *Kit Extraction*.

B. Pengujian Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Hasil ekstraksi DNA sebelum dilakukan amplifikasi menggunakan PCR perlu dilakukan pengukuran konsentrasi serta kemurnian dari DNA *template* dengan menggunakan Nanodrop. Tujuan dari nanodrop adalah untuk mengetahui bahwa hasil dari proses ekstraksi sudah mengandung DNA *template* yang murni. Hasil uji nanodrop adalah berupa nilai kemurnian DNA pada A260/A280 (Hikmatyar et al., 2015).

C. Amplifikasi Gen COI

Amplifikasi Gen COI yang dilakukan yaitu menggunakan volume satu reaksi yaitu 25 µl dengan kombinasi bahan yang dimasukkan ke dalam tube yaitu master mix (My Red Taq Bioline) sebanyak 12 µl, ddH₂O 8,5 µl, primer *forward* LCO1490 sebanyak 1 µl, Primer *reverse* (HCO2198) sebanyak 1 µl, Memasukkan DNA *template* sebanyak 2 µl, setelah itu goyang dan kocok. Urutan primer yang digunakan dalam amplifikasi adalah primer *forward* LCO1490 (GGTCAAATCATAAAGATATTGG) dan primer *reverse* HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer et al. 1994). Sampel yang tidak langsung dilakukan elektroforesis dapat disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20 °C. Proses PCR dilakukan dengan *thermal cycler* dengan menggunakan program 1 siklus 94 °C 3 menit,

35 siklus 94 °C, 48 °C- 52 °C 1 menit, 72 °C 1 menit, 72 °C 7 menit (Ni *et al.*, 2012).

D. Visualisasi Produk PCR

Elektroforesis dapat dilakukan dengan menggunakan gel agarose 1% (agarose 0,4 gr + SB Buffer 40ml) lalu panaskan dalam *microwave* selama 5 menit. Gel agarose yang telah dipanaskan kemudian ditambahkan dengan Floro Safe 2 µl ke dalam larutan agarose di campur kemudian di vortek. Cetakan sumuran yang telah berisi gel agarose kemudian di tunggu hingga mengeras selama 30 menit, kemudian dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah terisi SB Buffer hingga terendam. DNA Ladder dimasukkan ke dalam salah satu sumuran sebagai penanda kontrol dan sampel larutan dimasukkan ke tiap sumuran. Tegangan listrik diatur (100V, 400A) selama 30 menit dan di tunggu hingga proses selesai. Elektroforesis memiliki prinsip kerja memanfaatkan muatan listrik yang ada pada DNA yang bermuatan negatif. DNA yang dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Hikmatyar *et al.*, 2015).

E. Sekuensing DNA

Sekuensing merupakan tahap akhir dalam melakukan identifikasi molekuler di mana analisis sekuensing merupakan hasil dari amplifikasi. Hasil uji DNA yang baik dengan elektroforesis ditunjukkan dengan pita DNA yang tebal dan tampak sedikit atau tidak ada smear jika divisualisasikan di atas sinar UV (Hikmatyar *et al.*, 2015). Hasil dari PCR yang telah dikirim ke PT. Genetika Science kemudian dapat dianalisis dengan menggunakan *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) X untuk mengetahui hasil yang diperoleh.

Analisis Filogenetik

Hasil kemiripan sekuens nukleotida sampel DNA kemudian dibandingkan dengan bank gen *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) secara online pada website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> melalui sistem BLAST. Perbandingan sekuens DNA menjadi alat yang kuat untuk memahami proses dan pola substitusi nukleotida yang berpengaruh dalam penelusuran filogenetik (Nuha *et al.*, 2016). Hasil sekuens yang telah diolah kemudian dilakukan tahap pencarian spesies serupa dengan GENBank. Kekerabatan yang dilihat melalui

tingkatan taksonomi, misalnya famili, marga dan spesies. Kemiripan dari hasil sekuens terhadap *database* pada bank gen dapat dilihat dari nilai *max score*, *total score*, *query coverage*, *E-value* dan persen *identification* pada setiap *database*. Apabila hasil sekuens dan referensi pada NCBI memiliki kemiripan kemudian dilanjutkan dengan pembuatan pohon filogenetik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran Parameter Lingkungan

Hasil pengukuran parameter lingkungan pada lokasi pengambilan sampel diketahui bahwa pengukuran yang dilakukan adalah suhu air, pH, salinitas, dan DO. Nilai suhu permukaan perairan adalah 36,7 °C yang dilakukan pada kisaran jam 11.00 WIB. Nilai salinitas yang diperoleh adalah 29 ‰ dan nilai *dissolved oxygen* 13,334 ppm sedangkan hasil pengukuran pH perairan yaitu 7,47.

Identifikasi Bivalvia yang Ditemukan

Sampel yang ditemukan yaitu dua sampel yang digunakan untuk analisis laboratorium. Hal ini dilakukan karena melihat ketersediaan sampel sehingga dapat memungkinkan adanya pengulangan apabila terjadi kesalahan. Sampel yang digunakan ada 2 yaitu kode BM1 dan BM2 seperti pada gambar 2 Berdasarkan pengamatan morfologi dan bantuan identifikasi sampel spesies dengan website <http://www.marinespecies.org> pada *World Register of Marine Species* (WORMS). Diketahui bahwa BM1 memiliki ciri-ciri cangkangnya berwarna coklat kehitaman dengan garis garis pucat kehitaman margin antero-dorsal panjang dan lurus, dengan ujung anterior membulat dan ditemukan terkubur di substrat berpasir. Diduga bahwa ciri-cirinya sampel BM1 merupakan Bivalvia spesies *Donax sp.* dengan panjang cangkang 1,9 cm, dan lebar 2,4 cm. Bivalvia dengan kode BM2 merupakan Bivalvia dengan ciri-ciri berwarna hijau kehitaman memiliki kaki pipih seperti kapak kecil dan memiliki bysus. Berdasarkan karakteristiknya diduga mirip dengan *Perna viridis* dengan panjang cangkang 5,4 cm, dan lebar 3,2 cm. Gambar sampel dapat dilihat pada Gambar 2 sebagai berikut:



Gambar 2. Sampel Bivalvia (a) Sampel BM 1 (b) Sampel BM2

Hasil Molekuler

a. Konsentrasi dan Kemurnian DNA

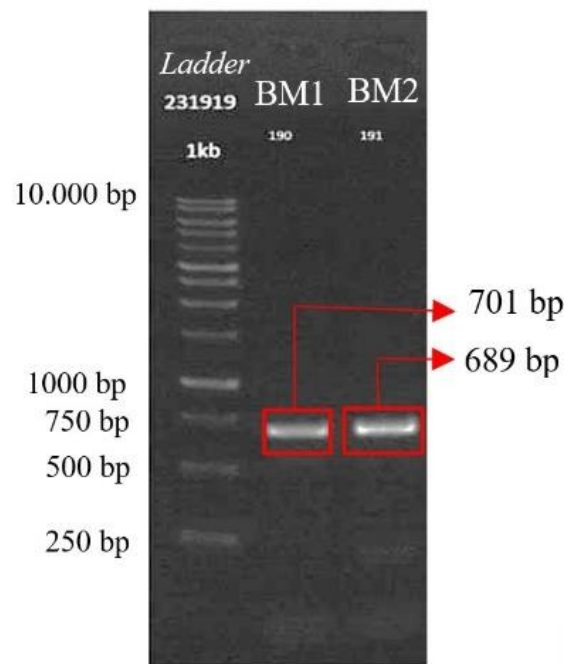
Pengecekan konsentrasi DNA (*deoxyribonucleic acid*) dilakukan setelah melakukan ekstraksi sampel. Alat yang digunakan dalam mengukur konsentrasi DNA adalah Nanodrop. Pengukuran menggunakan Nanodrop dilakukan pada kedua sampel yaitu BM1 dan BM2 sebelum dilakukan amplifikasi. Informasi mengenai konsentrasi DNA sangat penting untuk mengetahui kemurnian dari DNA genom hasil ekstraksi, mengetahui derajat kontaminasi suatu sampel dari RNA, protein atau fenol dan untuk melanjutkan ke tahap selanjutnya. Hasil uji nanodrop dapat dilihat pada Tabel 1. Konsentrasi dan Kemurnian DNA

No	Kode Sampel	Konsentrasi DNA (ng/μl)	260/280
1.	BM1	4378.8	2,5
2.	BM2	13,5	2,38

Sumber: Hasil Penelitian 2024

b. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan hasil amplifikasi gen COI yang selanjutnya dianalisis menggunakan teknik elektroforesis pada agarose. Berikut adalah Gambar 3 hasil elektroforesis DNA sampel BM1 dan BM2 dengan menggunakan primer *forward* LCO1490 dan primer *reverse* HCO2198.



Gambar 3. Elektroforesis DNA Sampel BM1 dan BM2 menggunakan Primer Forward LCO1490 dan Primer Reverse HCO2198

c. Sekuensing DNA

Hasil sekuens yang diolah menggunakan software MEGA XI dapat dilihat dari Tabel 2 diatas yang diperoleh dengan menggunakan analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) secara online dengan mengakses <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

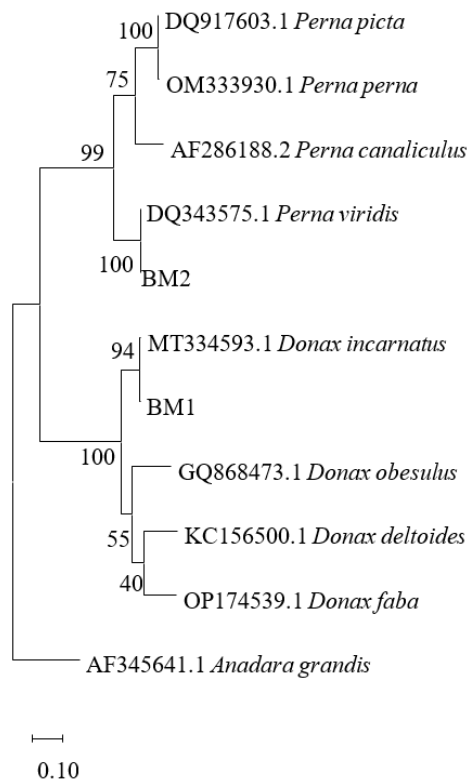
Tabel 2. Hasil BLAST

No	Kode Sampel	Hasil BLAST	No. Refrensi	Per.Ident
1.	BM1	<i>Donax incarnatus</i>	MT334593.1	99,00%
2.	BM2	<i>Perna viridis</i>	DO343575.1	99,85%

Sumber: Hasil Penelitian 2024

d. Pohon Filogenetik

Pembuatan pohon filogenetik digunakan untuk menunjukkan adanya pengelompokan antar spesies yang didapatkan dengan spesies lain dengan tingkat kekerabatan terdekat hingga terjauh. Hasil sekuens yang dibuat dalam format FASTA untuk rekonstruksi pohon filogenetik dengan menggunakan MEGA XI dengan metode *maximum likelihood* dan analisis *bootstrap* (1000 replicates). Berikut hasil rekonstruksi pohon filogenetik BM1 dan BM2 dengan menggunakan software MEGA XI yang dapat dilihat pada Gambar 4



Gambar 4. Hasil Rekonstruksi Pohon Filogenetik BM1 dan BM2 dengan menggunakan Software MEGA XI

Pembahasan

Pengukuran Parameter Lingkungan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Pengukuran parameter lingkungan perairan yang digunakan sebagai penunjang data penelitian adalah pengukuran suhu air, salinitas, DO dan pH. Suhu merupakan salah satu parameter yang penting di perairan dalam mengendalikan kondisi ekosistem perairan (Saraswati *et al.*, 2017). Nilai yang diperoleh dalam pengukuran suhu air perairan adalah 36,7°C yang dilakukan pada kisaran jam 11.00 WIB. Suhu yang baik untuk kehidupan Bivalvia berkisaran antara 28-35 °C (Bahri *et al.*, 2020). Salinitas merupakan tingkat keasinan atau kadar garam yang terlarut dalam air. Salinitas adalah kadar garam terlarut dalam air yang dapat menjadi faktor penentu terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup organisme laut (As-Syakur dan Wiyanto, 2016). Berdasarkan hasil pengukuran diperoleh nilai salinitas adalah 29 ‰ yang termasuk dalam kisaran normal. Selain itu oksigen berperan dalam dekomposisi bahan organik (Safitri *et al.*, 2021). Nilai *dissolved oxygen* yang diperoleh dari pengukuran pada saat sampling adalah 13,334 mg/l. Hasil pengukuran pH perairan di titik penelitian adalah

yaitu 7,4. Nilai pH yang terlalu asam atau basa yang dapat berpengaruh terhadap keberlangsungan hidup mikroorganisme karena akan mengganggu suatu proses metabolisme dan respirasi (Octavina *et al.*, 2016).

Identifikasi Morfologi Bivalvia

Identifikasi morfologi Bivalvia dapat dilihat dengan cara mengamati bentuk cangkang spesies dari Bivalvia yang diperoleh, melihat struktur permukaan cangkang dan corak warna cangkang, serta mengukur kisaran panjang dan lebar cangkang. Berdasarkan pengamatan morfologi dan bantuan identifikasi sampel spesies dengan website <http://www.marinespecies.org> pada WORMS. Diketahui bahwa BM1 memiliki ciri-ciri cangkangnya berwarna coklat kehitaman dengan garis-garis pucat kehitaman margin antero-dorsal panjang dan lurus, dengan ujung anterior membulat dan ditemukan terkubur di substrat berpasir. Berdasarkan bahwa ciri-cirinya sampel BM1 merupakan Bivalvia spesies *Donax* sp. dengan panjang cangkang 1,9 cm, dan lebar 2,4 cm. Cangkang kecil kosong memiliki ukuran (15 hingga 25 mm). *Donax* sering terlihat di mana ombak mencuci pasir di bagian paling dangkal zona littoral ketika tingkat pasang surut berubah (Sitompul, 2020). Cangkangnya bercirikan bentuk segitiga dan warna ungu kehitaman sering ditemukan di zona intertidal, terkubur di substrat berpasir (Wijaya *et al.*, 2023).

Bivalvia dengan kode BM2 merupakan Bivalvia dengan ciri-ciri berwarna hijau kehitaman memiliki kaki pipih seperti kapak kecil dan memiliki *bysus*. *P. viridis* termasuk famili Mytilidae memiliki cangkang yang tipis, keduanya simetris dengan umbonya melengkung kedepan (Rudianto *et al.*, 2023). Berdasarkan karakteristiknya diduga mirip dengan *P. viridis* panjang cangkang 5,4 cm, dan lebar 3,2 cm. Genus *Perna* memiliki anatomi dengan panjang tubuh antara 6,5 – 8,5 cm dan diameter sekitar 1,5 cm (Sitompul 2020). Adanya perbedaan ukuran cangkang dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Faktor biologi yang memengaruhi diantaranya yaitu, ketersediaan makanan, zat organik tersuspensi, serta makhluk hidup disekitarnya (Indraswari *et al.*, 2014). Faktor abiotik yang mempengaruhi perbedaan ukuran cangkang yaitu, suhu, salinitas, pH, serta pasang surut air laut (Apriliana dan Ambarwati, 2018).

Identifikasi Molekuler Bivalvia

Moluska merupakan filum biota laut yang memiliki tingkat keanekaragaman spesies yang

tinggi dan persamaan bentuk morfologi sehingga seringkali menyebabkan kesulitan dalam identifikasi (Appeltans *et al.*, 2012). Identifikasi molekuler telah menjadi metode yang dapat digunakan dalam identifikasi spesies secara tepat dan akurat (Simbolon *et al.*, 2021). Salah satu cara untuk meningkatkan keakuratan identifikasi adalah menggunakan pendekatan DNA *barcoding* (Larasati *et al.*, 2021). Proses identifikasi molekuler terdapat tiga tahapan utama yang diterapkan dalam penelitian sebagai dasar yaitu ekstraksi, amplifikasi dan elektroforesis. Tahap awal ekstraksi DNA pada *Bivalvia* ini dilakukan untuk terjadi pemisahan antara DNA dengan komponen penyusun lainnya sehingga diharapkan hanya DNA saja yang didapatkan. Ekstraksi DNA pada penelitian ini menggunakan dua metode yaitu Chelex 10% dan menggunakan *Kit Extraction*.

Metode Chelex (*Chelating Ion Exchange*) merupakan metode ekstraksi berbasis bahan pengikat untuk memurnikan senyawa lain melalui mekanisme pertukaran ion. Metode Chelex relatif sederhana dan cepat. Tahapan dalam metode Chelex menggunakan sedikit tube transfer dan tidak melibatkan pelarut organik toksik (Sweet *et al.*, 1996). Sampel *Bivalvia* yang diekstraksi menggunakan metode Chelex adalah sampel dengan kode BM1. Metode Chelex digunakan untuk ekstraksi DNA dipanaskan pada suhu tertentu, pada penelitian kali ini menggunakan *heating block* selama 45 menit dengan suhu 95°C. Selama proses ekstraksi resin Chelex mampu melindungi dari enzim DNAase yang mungkin tetap aktif selama proses ekstraksi. Adapun kelebihan penggunaan metode ini adalah membutuhkan waktu yang relatif singkat, proses pembuatan larutan resin Chelex yang sangat praktis, biaya yang cukup ekonomis. Namun kelemahan menggunakan metode ini adalah konsentrasi DNA yang dihasilkan tinggi namun memiliki kemurnian yang rendah, selain itu juga hasil yang kurang stabil selama proses penyimpanan dalam rentang waktu yang lama (Marwayana, 2015).

Proses ekstraksi menggunakan kit ekstraksi memiliki beberapa tahapan utama yaitu lisis sel, pengikatan DNA (*binding*), pencucian DNA (*wash*), dan elusi dengan menggunakan reagen-reagen yang telah disediakan oleh produsen *Extraction Kit*. Awal proses lisis dilakukan dengan cara memecahkan dinding sel dengan dengan cara menghaluskan dengan alu dan mortar hingga benar benar halus. Proses pengikatan (*binding*) DNA adalah tahapan pengikatan dengan penambahan buffer bertujuan

untuk pemisahan DNA menjadi DNA murni. Sampel *Bivalvia* yang diekstraksi menggunakan metode *Extraction Kit* adalah sampel dengan kode BM2. Metode ekstraksi menggunakan kit, waktu pengerjaannya lebih singkat, sederhana, non toksik dan menghasilkan panen DNA dengan kemurnian yang tinggi, namun dengan biaya yang sedikit lebih tinggi (Arianti dan Sianturi, 2019).

Hasil ekstraksi DNA diuji konsentrasinya menggunakan spektrofotometer NanoDrop. Ekstrak DNA diambil sebanyak 1 µl dan dibaca pada panjang gelombang λ 260 nm dan 280 nm (Safitri *et al.*, 2018). Berdasarkan sampel yang diteliti diperoleh nilai kemurnian pada sampel BM1 adalah 2,5 dan nilai sampel BM2 adalah 2,56 sedangkan nilai konsentrasi pada BM1 adalah 4378,8 ng/µl dan BM2 13,5 ng/µl. Nilai ini jauh berada diatas nilai standar yaitu antara rasio 1,8-2,0. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh sampel DNA yang tidak murni disebabkan oleh adanya sisa-sisa etanol atau tercampurnya zat pengotor saat proses ekstraksi. Namun pada hasil dengan rasio di atas 2,0, selama visualisasi ekstrak DNA masih menunjukkan pita yang tebal, maka isolat DNA dapat digunakan sebagai templat PCR (Harun, 2018).

Percobaan penggunaan *master mix* dan primer untuk kedua sampel dengan kode BM1 dan BM2 menggunakan *master mix* (*My Red Taq Bioline*), ddH₂O dan primer. Amplifikasi Gen COI yang dilakukan yaitu menggunakan volume satu reaksi yaitu 25 µl dengan kombinasi bahan yang dimasukkan ke dalam tube yaitu *master mix* (*My Red Taq Bioline*) sebanyak 12,5 µl, ddH₂O 8,5 primer *forward* LCO1490 sebanyak 1 µl, Primer *reverse* (HCO2198) sebanyak 1 µl, dan sampel 2 µl. Urutan primer yang digunakan dalam amplifikasi adalah primer *forward* LCO1490 (GGTCAAATCATAAAGATATTGG) dan primer *reverse* HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al.* 1994). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen COI adalah; LCO 1490 (*forward*) dan HCO 2189 (*reverse*) pasangan primer ini merupakan pasangan primer universal yang memiliki kecocokan yang bagus dan memiliki ukuran pita sekitar 700 bp (Sahari *et al.*, 2017).

Keberhasilan proses amplifikasi gen COI dapat dilihat setelah melakukan proses elektroforesis. Elektroforesis dapat dilakukan dengan menggunakan gel agarose 1% yang dilarutkan ke dalam buffer ddH₂O dan dimasukkan DNA *Ladder* sebagai marker dan sampel yang akan diteliti ke setiap sumuran dengan 400 ampere

dan tegangan 100 volt selama 30 menit sehingga pita menempel pada gel. Pita yang telah mengandung DNA kemudian diamati menggunakan UV doc dan akan muncul pada pita seperti gambar 4.2 Amplifikasi DNA sampel BM1 dan BM2 dengan menggunakan primer *forward* LCO1490 dan primer *reverse* (HCO2198). Variasi pita DNA dapat diobservasi setelah dilakukan elektroforesis dan visualisasi di atas sinar Ultraviolet (UV) (Siddiq dan Mumpuni 2014). Hasil yang bagus akan muncul pita DNA yang tebal dan dapat dilanjutkan proses identifikasi sekuensing yang akan dikirim ke PT. Genentika Science Indonesia. Hasil proses penelitian kedua sampel diperoleh nilai BM1 701 bp dan BM2 689 bp. Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan cukup bagus, beberapa faktor yang dapat mempengaruhi adalah konsentrasi DNA yang dihasilkan berbeda-beda.

Berdasarkan hasil sekuens yang diterima diolah menggunakan *software* MEGA XI selanjutnya dianalisis menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada website NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) secara online pada website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Hasil yang didapatkan pada program BLAST dari sampel Bivalvia BM1 adalah *D. incarnatus* dan sampel Bivalvia dengan kode BM2 adalah *P. viridis*. *D. incarnatus* memiliki kemiripan paling tinggi karena memiliki nilai *Max Score* dan *Total Score* sama besarnya yaitu 1251 dan *P. viridis* 1258. *Query Coverage* dari kedua spesies ini memiliki kesamaan keduanya, untuk *D. incarnatus* dan *P. viridis* adalah 99% dengan *E-value* keduanya sama yaitu 0. *Percent Ident* 99,00% untuk *D. incarnatus* dan untuk *P. viridis* 99,85% sehingga hasil tersebut dapat dikatakan sesuai karena hampir mendekati sempurna. Kemiripan tertinggi pada Genbank, dapat dicirikan dengan nilai *Max Score* dan total score yang sama, nilai *E-value* yang bernilai 0, serta nilai *Query Coverage* dan nilai *Per. Ident* yang mendekati 100 % (Rahim dan Maduppa 2020). Berdasarkan hasil penelusuran taksonomi pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) klasifikasi *Donax incarnatus* adalah sebagai berikut:

Filum: Moluska

Kelas: Bivalvia

Ordo: Cardiida

Famili: Donacidae

Genus: *Donax*

Spesies: *Donax incarnatus*

D. incarnatus merupakan Bivalvia umumnya ditemukan di zona *swash* atau daerah

yang terbentang oleh garis batas tertinggi naiknya gelombang dan batas terendah turunnya gelombang di pantai daerah tropis dan beriklim sedang. Bivalvia dari genus ini menghuni zona intertidal pantai berpasir, hidup di antara garis pasang surut di zona pantai berpasir (Tenjing 2019). *D. incarnatus* memiliki masa hidup di atas 1 tahun namun kurang dari 15 bulan (Lamine *et al.*, 2020). *D. incarnatus* dapat digunakan sebagai indikator dari suatu kondisi lingkungan. Spesies ini merupakan salah satu jenis makanan hasil laut yang digemari masyarakat karena rasanya yang lezat dan juga memiliki kandungan gizi tinggi (Srimarina *et al.*, 2015).

Berdasarkan hasil penelusuran taksonomi pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) klasifikasi *Perna viridis* adalah sebagai berikut:

Filum: Moluska

Kelas: Bivalvia

Ordo: Mytilida

Famili: Mytilidae

Genus: *Perna*

Spesies: *Perna viridis*

Kerang hijau Asia *P. viridis* tersebar luas di sepanjang pantai dan muara wilayah Asia-Pasifik (Siddal, 1980). Kebiasaan menyaring makanan *P. viridis* sering digunakan dalam pemantauan kualitas lingkungan laut sebagai kandidat *biomarker* (Wang *et al.*, 2018). Cangkang berwarna hijau terang hingga hijau kegelapan menghasilkan bysus sehingga dapat menempel pada substrat dengan usia Bivalvia mencapai 2 sampai 3 tahun (Rachmawati *et al.*, 2021).

Pohon Filogenetik

Berdasarkan analisis filogenetik membuktikan bahwa Bivalvia BM1 dan BM2 memiliki sepuluh kekerabatan terdekat dan terjauh. Sepuluh kekerabatan yang telah ditetapkan di NCBI akan dilakukan penyamaan *alignment* urutan basa pada *software* dengan program CLUSTAL W untuk mensejajarkan urutan basa. Analisis filogenetik dengan menggunakan metode *maximum likelihood* pada *software* MEGA XI. Pohon filogenetik diuji secara statistik menggunakan metode *bootstrap* sebanyak 1000 pengulangan. Nilai *bootstrap* sebanyak 100 sampai 1000 ulangan digunakan untuk memperkirakan tingkat kepercayaan sebuah pohon filogenetik (Pangestika *et al.*, 2015). Setelah dilakukan pengumpulan data NCBI, dilakukan *alignment* menggunakan MEGA XI dengan memilih *clustalW*, setelah disejajarkan dibuat rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *maximum likelihood*. Metode ini digunakan untuk membedakan

sekuens DNA berdasarkan jarak genetiknya. Kekurangan metode *maximum likelihood* adalah memerlukan banyak waktu untuk memprosesnya dikarenakan metode ini memiliki keakuratan rekonstruksi pohon yang tinggi (Maio *et al.*, 2023). Metode *maximum likelihood* diterapkan dianggap ideal untuk membuat filogenetik menggunakan data sekuens dengan menggunakan model evolusi (RoyChudhury *et al.*, 2015).

Konstruksi pohon filogenetik pada Gambar 4 Hasil rekonstruksi pohon filogenetik BM1 dan BM2 dengan menggunakan *software* MEGA XI menunjukkan bahwa Bivalvia dengan kode BM1 berkerabat dekat dengan *D. incarnatus* dengan memiliki nilai *bootstrap* 94%. Hasil ini sudah dikatakan bagus karena sudah mencapai 98% sehingga sudah terbukti bahwa identifikasi sesuai. Klad dua terdiri dari 5 spesies yaitu spesies sampel BM1, *Donax incarnatus*, *Donax deltoides*, *Donax faba*, dan *Donax obesulus*. Sedangkan Bivalvia BM2 mempunyai kekerabatan dengan spesies *P. viridis* dengan nilai *bootstrap* 100%. Klad satu terdiri dari 5 spesies yaitu spesies sampel BM2, *Perna picta*, *Perna perna*, *Perna canaliculus*, dan *Perna viridis*. Kedua sampel Bivalvia memiliki nilai tingkat kekerabatan yang bagus. Nilai *bootstrap* dengan rentang 70% - 100 % menunjukkan hasil yang bagus sedangkan nilai *bootstrap* kurang dari 70% menunjukkan kekerabatan yang kurang stabil (Rosidi *et al.*, 2013). Adanya hal ini dapat memberi pengetahuan bahwa klad satu dan dua terdiri dari genus yang sama. *Anadara grandis* merupakan kekerabatan yang paling jauh dengan kedua sampel yang diteliti (berbeda ordo antar kedua sampel) atau dapat disebut dengan *out group*. *Out grup* kekerabatan paling jauh dari sampel yang diteliti bahkan tidak memiliki hubungan dengan kedua sampel sehingga memiliki posisi paling bawah atau terjauh dalam pohon filogenetik. Analisis filogenetik memerlukan adanya kelompok *out grup* yang menyebabkan polarisasi terhadap karakter (Arbi, 2016).

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh pada penelitian yang telah diperoleh mengenai Identifikasi Molekuler DNA *Barcoding* pada Bivalvia di Kawasan Mangrove Desa Tapak Tugu Kota Semarang, Jawa Tengah adalah sebagai berikut:

1. Hasil identifikasi spesies Bivalvia di menggunakan analisis molekuler genetik dengan DNA *barcoding* dengan kode sampel BM1 *Donax incarnatus* sedangkan untuk BM2 adalah *Perna viridis*.
2. Hubungan filogenetik Bivalvia dengan kode BM1 berkerabat dekat dengan *Donax*

incarnatus dengan memiliki nilai *bootstrap* 94%. Sedangkan Bivalvia BM2 mempunyai kekerabatan dengan spesies *Perna viridis* dengan nilai *bootstrap* 100 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada pengelola kawasan mangrove Desa Tapak Kecamatan Tugu Kota Semarang atas ijin pengambilan sampel penelitian dan data serta kepada Departemen Sumber Daya Akuatik, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro yang telah memberikan pendanaan terhadap penelitian ini melalui Penelitian Dasar Kompetitif Nasional (PDKN) yang didanai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kemenristek Dikti melalui Tahun Anggaran 2023 pada hibah Kontrak Induk Nomor: 017/E5/PG.02.00.PL/2023 dan Kontrak Turunan Nomor: 345-06/UN7.D2/PP/IV/2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Appeltans, W., Ahyong, S. T. dan Anderson, G. I. 2012. *The Magnitude of Global Marine Species Diversity*. *Current Biology*, 22, 2189–2202.
- Apriliansa, D. U. dan Ambarwati, R. 2018. Karakter Morfologi dan Morfometri Kerang Eres dan Jubing (Bivalvia: *Pharidae*). *LenteraBio*. 7(3): 209–213.
- Arbi, U. Y. 2016. Analisis Kladistik Berdasarkan Karakter Morfologi untuk Studi Filogeni: Contoh Kasus Pada Conidae (Gastropoda: Mollusca). *Oseana*, 41(2), 54–69.
- Ardiansyah, F. Kurnia, T. I. D. 2022. Kelimpahan Populasi Moluska Kelas Bivalvia pada Wilayah Pasang surut Pantai Pulau Merah Bayuwangi. *Biosense*, 5(1):
- As-Syakur, A. R. dan Wiyanto, D. B. 2016. Studi Kondisi Hidrologis sebagai Lokasi Penempatan Terumbu Buatan Di Perairan Tanjung Benoa Bali. *Jurnal Kelautan*, 9(1): 85–92.
- Bahri, S., Kurnia, T. I. D. dan Ardiansyah, F. 2020. Kenanekaragaman Kelas Bivalvia Di Hutan Mangrove Pantai Bama Taman Nasional Baluran, BIONSE, 3(2): 56– 70.
- Chrisnawati, S. D., Sabdaningsih, A., Jati, O. E. Dan Ayuningrum, D. 2023. Isolasi dan Identifikasi Molekuler bakteri Rhizosfer dari Sedimen Mangrove Jenis *Rhiopora* sp. di Ekosistem Mangrove Tapak, Semarang. *Jurnal Kelautan*, 16(2): 117–124.
- Dinas Kelautan dan Perikanan Kota Semarang.

- (2015). Pemetaan potensi, kerusakan dan model rehabilitasi Kawasan Pesisir Kota Semarang. Semarang.
- Failu, I., Monica, A. A., Kasman, dan Sofyan. 2021. Keanekaragaman Jenis dan Kepadatan Zooplankton di Perairan Pulau Makassar Kota Baubau. *Jurnal Ilmiah Universitas Muhammadiyah Buton*, 7(4): 565-575.
- Geospasial untuk Negeri 2023. Rupa Bumi Indonesia dan Badan Informasi Geografis 2023.
<https://tanahair.indonesia.go.id/portal-web/>
- Harun, A. 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Proteasi *Staphylococcus hominis* pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 120 Jam. *Edusainstek, Seminar Nasional*, (2011), 23-30.
- Hikmatyar, M. F., Royani, J. I. dan Dasumiati. 2015. Isolasi dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) untuk Identifikasi Keragaman Genetik. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 2(2): 42-48.
- Indraswari A, Maulidiah G, Litaay G, dan Soekendarsi E, 2014. Morfometri Kerang Tahu Meretrix meretrix Linnaeus, 1758 di Pasar Rakyat Makassar. *Berita Biologi*, 13 (2): 137-142.
- Karimah. 2017. Peran Ekosistem Hutan Mangrove Sebagai Habitat Untuk Organisme Laut. *Jurnal Biologi Tropis*. 17(2): 51-58.
- Lamine, I., Alla, A. A., Hadad, M. B., Habouz, H. E., Nadir, M. dan Moukrim. 2020. *Population Dynamics of Donax trunculus on the Sandy Beach of Taghazout (southern Morocco). Regional Studies in Marine Science*, 33(100912): 1-14.
- Larasati, S. J. H., Sabdono, A. dan Sibero, M. T. 2021. Identifikasi Molekuler Kapang Asosiasi Spons menggunakan Metode DNA *Barcoding*. *Journal of Marine Research*, 10 (1):48- 54.
- Lenaini, I. 2021. Teknik Pengambilan Sampel Purposive dan Snowball Sampling. *Jurnal Kajian, Penelitian dan Pengembangan Pendidikan Sejarah*. 6(1)33-39.
- Maio, N. D., Kalaghatg, P., Turakhia, Y., Detig, R. C., Minh, B. Q. dan Goldman, N. 2023. *Maximum likelihood pandemic-scale phylogenetics*. *Nature Genetics*, 55: 746-752.
- Martuti, N. K. R., Susilowati, S. M. E., Sidiq, W. A. B. N. dan Mutiatari, D. P. 2018. Peran Kelompok Masyarakat dalam Rehabilitasi Ekosistem Mangrove di Pesisir Kota Semarang. *Jurnal Wilayah dan Lingkungan*, 6(2):100-114.
- Martuti, N. K. T. 2013. Keanekaragaman Mangrove Di Wilayah Tapak, Tugurejo, Semarang. *Jurnal MIPA*. 36(2):123-130.
- Marwayana, O. N. 2015. Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) dari Sampel Jaringan Otot. *Oseana*, 11 (2): 1-9.
- Meilana. L., Wardiatno, Y., Butet. N. A. dan Krisanti. M. 2016. Karakteristik Morfologi dan Identifikasi Molekuler Dengan Marka Gen COI Pada Mimi (*Tachypleus gigas*) Di Perairan Utara Pulau Jawa. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 8(1):145-158.
- Ni, L., Li, Q., Kong, L., Huang, S., dan Li, L. 2012. *DNA Barcoding and Phylogeny in The Family Mactridae (Bivalvia: Heterdonta): Evidence for Cryptic Species*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44: 164-172.
- Nugroho, K., Terryana R. T., Reflinur dan Lestari P. 2019. *A Simplified Plant DNA Extraction Protocol without Ethanol Precipitation for Polymerase Chain Reaction (PCR) Activities*. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 6(1): 29-38.
- Nuha, U., Amin. M. dan Lestari. U. 2016. Analisis Kebutuhan Buku Ajar Berbasis Penelitian Materi Filogenetik Molekuler untuk Mahasiswa S1 Pendidikan Biologi Universitas Jember Berdasarkan Model Pengembangan Addie Seminar Nasional Pendidikan dan Saintek. 753-757.
- Pangestika, Y., Budiharjo, A., Pancasakti, H. dan Kusumaningrum. 2015. Analisis Filogenetik *Curcuma zedoaria* (Temu Putih) berdasarkan Gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). *Jurnal Biologi*, 4 (4): 8-13.
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 22 Tahun 2021. Tentang Penyelenggaraan Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup.
- Rachmawati, R. C., Imtinan, I., Santoso, L. P., Puput. P. S., Setyaningrum, S. dan Asih, W. S. 2021. Identifikasi Kelimpahan Invertebrata di Pantai Marina Semarang, Kota Semarang, Jawa Tengah. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Entrepreneurship VII*, 1(1): 151-157.
- Rahim, S. dan Baderan. D. W. K. 2017. Hutan Mangrove dan Pemanfaatannya. Deepublish. Yogyakarta.
- Rahim, Z. dan Maduppa, H. 2020. Identifikasi Ikan Sardin Komersial (*Dussumieria elopoides*) yang Didaratkan Di Pasar Muara Angke,

- Jakarta Menggunakan Pengamatan Morfologi, Morfometrik dan DNA *Barcoding*. Jurnal Kelautan, 13(2):93-99.
- Razaq, I. A., Setyaningsih, N. Y. D. dan Gunawan, B. 2020. Pengkondisian Sinyal Sensor Salinitas DFR0300 Menggunakan Arduino Due. *Proceeding SENDIU*. 72 (6): 459- 463.
- Rudianto, Musa, M. dan Arifi, E. 2023. Cangkang Kerang Hijau (*Perna viridis*) dan Pemanfaatannya untuk Penahan Gelombang Ombak. Universitas Brawijaya Malang. 1-89.
- Safitri, A., Maelani, W. R. dan Muzammil, W. 2021. Komunitas makrozoobentos dan kaitannya dengan kualitas air aliran sungai Senggarang, Kota Tanjungpinang. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 8(2): 103-108.
- Safitri, R., Muchlissin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S. dan Ethica, S.N., 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim *Protease Bacillus Thuringiensis* Irodi Pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 24 Jam. In Prosiding Seminar Nasional & Internasional. 1,(1).
- Sahari, J. Rimper, J. dan Wullur, S. 2017. Identifikasi Molekuler Rotifer *Brachionus* sp. Asal Perairan Tumpaan, Minahasa Selatan. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. 1(1): 56-61.
- Saraswati, N. L. G. R. A., Artana, I. W. dan Hendrawan, I. G. 2017. Analisis Kualitas Perairan Pada Wilayah Perairan Pulau Serangan Bagian Utara Berdasarkan Baku Mutu Air Laut. *Journal of Marine and Aquatic Sciences* 3(2), 163-170.
- Siddal, S. E. 1980. *A Clarification of the Genus Perna (Mytilidae)*. *Bulletin of Marine Science*, 30(4):858-879.
- Siddiq, Y. Mumpuni, K. E. 2014. Identifikasi Variasi Genetik Parijato (*Medinilla Javanensis* (BL.) BL fan *Medinilla Verrucosa* (BL.) BL) dengan Penanda Molekuler sebagai Sumbet Belajar. *Proceeding Biology Education Converence*. 11(1):667-672.
- Simbolon, A. R., Masteria, Y. P. dan Ismiliana, W. 2021. Identifikasi Spesies Menggunakan DNA *Barcoding* dalam Menunjang Budidaya dan Konservasi Teripang Di Perairan Lampung. *Jurnal Riset Akuakultur*, 16(1): 31-37.
- Solichin, A., Saputra, S. W., Taufani, W. T. Dan Ayuningrum. D. 2020. Studi Molekuler Udang *Pennaeus (Fenneropenaeus) merguensis* di Perairan Pantai Utara Jawa. *Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, 16(4): 294-299.
- Srimarina, E. S., Silaban, B. B. R, Lokollo, E. 2015. Potensi Kerang Manis (*Gafrarium tumidum*) di Pesisir Pantai Negeri Laha, Teluk Ambon sebagai Sumber Mineral. Prosiding Seminar Masyarakat Biodiversitas Indonesia. 1 (4): 843-847.
- Sihombing, Y. H., Muskananfolo, M. R. dan A`in, C. 2017. Pengaruh Kerapatan Mangrove Terhadap Laju Sedimentasi di Desa Bedono Demak. *Journal of Maquares*, 6(4): 536-546.
- Sugiyono, 2018. Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D. Bandung Alfabeta.
- Sweet, D., Lorente, M., Valenzuela, A., Lorente, J. A. dan Alvarez, J. C. 1996. *Increasing DNA Extraction Yield form Saliva Stains with a Modified Chelex Method*. *Forensic Science Internasional*, 83:167-177.
- Tenjing, Y. S. 2019. *Population Dynamics of Edible Wedge Clam, Donax lubricus Hanley, 1845 (Bivalvia: Donacidae): A first Study in Asia*. *Regional Studies in Marine Science*. 32(100819): 1-9.
- Thu, P. T., Huang, W. C., Chou, T. K., Van Quan, N., Van Chien, P., Li, F., Shao, K. T., dan Liao, T. Y. 2019. *DNA barcoding of coastal ray-finned fishes in Vietnam*. *PloS ONE*, 14(9), 1–13.
- Wang, Y., Zeng, Z., Zhang, X., Shi, Q., Wang, C., Hu, Z. dan Li, H. 2018. *Identification and Characterization of a Novel Defensin from Asian Green Mussel Perna viridis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 74: 242–249.
- Wijaya, C. B., Ambarwati, R. dan Rahayu, D. A. 2023. *Morphological and molecular characteristics of Donaxincarnatus (Bivalvia: Donacidae) from Badur Beach, Madura Island, Indonesia based on the COX1 gene*. *Biodiversitas*, 24(5):2805-2813.
- Yanti, M., Susiana, dan Kurniawan. D. 2022. Struktur Komunitas Gastropoda dan Bivalvia di Ekosistem Mangrove Perairan Desa Pangkil Kabupaten Bintan. *Jurnal Akuatiklestari*, 5(2): 102-110

