

# Identifikasi dan Analisis Filogenetik *Portunus trituberculatus* Dari Perairan Cirebon Menggunakan Barcode Gen COI Mitokondrial

Subagiyo<sup>1\*</sup>, Ch. Retna Handayani<sup>2</sup>, Rahayu<sup>2</sup> dan Triandala Mada Sibero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. Soedarto, SH. Tembalang, Semarang 50275 Indonesia

<sup>2</sup>Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau  
Jl. Cik Lanag Bulu Jepara 59418 Indonesia  
Email: subagiyo.kelautan13@gmail.com

## Abstract

### Phylogenetic Identification and Analysis *Portunus trituberculatus* from Cirebon Coast Using the COI Barcode Mitochondrial

*Portunus trituberculatus* spesimen from Cirebon coast were successfully identified using mitochondrial DNA cytochrome c oxydase subunit I (COI) genes. Analysis of haplotype distribution of *P. trituberculatus* along with the same species from China, Korea, India and the Philippines obtained from NCBI gene banks resulted 17 haplotypes from 25 specimens. Haplotype diversity was  $0.943 \pm 0.031$  and nucleotide diversity was  $0.04821 \pm 0.0139$ . The Cirebon specimen is in separated haplotype from the others. The results of phylogenetic analysis showed that the 25 specimens were clustered into 3 clusters in 2 different lineages with percentages genetic distance were 12.76%, 14.24% and 14.33% respectively. The genetic distance within each cluster ranges from 0 - 2.92%. The Cirebon crab specimen is in the same cluster as the Philippine specimen with 1% genetic distance.

**Keywords** : crab; *Portunus trituberculatus*; barcoding; gen COI

## Abstrak

Spesimen rajungan *Portunus trituberculatus* dari perairan Cirebon berhasil diidentifikasi menggunakan gen mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI). Analisis distribusi haplotipe dengan data *P. trituberculatus* yang berasal dari China, Korea, India dan Filipina yang diperoleh dari data genbank NCBI didapatkan 17 haplotipe dari 25 spesimen, dengan keragaman haploid  $0,943 \pm 0,031$  dan keragaman nukleotida  $0,04821 \pm 0,0139$ . Spesimen Cirebon merupakan haplotipe yang terpisah dari yang lainnya. Hasil kajian filogenetik menunjukkan 25 spesimen mengelompok ke dalam 3 kluster dari 2 garis keturunan yang berbeda dengan jarak genetik berturut turut 12,76 %, 14,24 % dan 14,33 %. Jarak genetik di dalam masing-masing kluster berkisar antara 0 – 2,92 %. Spesimen rajungan Cirebon berada pada garis keturunan dan kluster yang sama dengan spesimen Filipina dengan jarak genetik 1%.

**Kata kunci** : rajungan; *Portunus trituberculatus*; barcoding; gen COI

## PENDAHULUAN

*Portunus. trituberculatus* dikenal dengan nama lain *gazami crab*, *Japanese blue crab* atau *horse crab*. Spesies ini memiliki distribusi geografis di Samudera Hindia dan Samudera Pasifik Barat: Asia Tenggara dan Timur (dari Jepang, Korea, Cina dan Formosa dan Teluk Bengala), ke Barat, Utara dan Timur

Australia (FAO, 2018). Menurut Liu *et al.* (2013) *P. trityberculatus* merupakan hasil perikanan tangkap terbesar di dunia (menempati sekitar seperempat tangkapan komersial di seluruh dunia). Sebagian besar dari total tangkapan kepiting ini (95%) terjadi di Cina di tiga daerah penangkapan utama: Laut Cina Timur, Laut Kuning, dan Laut Bohai. Di Indonesia *P. trituberculatus* merupakan

\*) Corresponding author  
www.ejournal2.undip.ac.id/index.php/jkt

spesies yang jarang ditemukan (Irawan dan Soegiarto, 2006).

*P. trituberculatus* secara umum memiliki penampilan yang mirip dengan *Portunus pelagicus*. *P. trituberculatus* dibedakan dari *P. pelagicus* karena memiliki 3 gigi frontal (4 di *P. pelagicus*) dan memiliki 4 duri di merus cheliped (3 di *P. pelagicus*) (FAO (2018), sehingga dapat dengan mudah diidentifikasi secara fenotipik. Selanjutnya untuk mengetahui adanya variasi atau keragaman intraspesik diperlukan pendekatan molekuler diantaranya adalah menggunakan urutan gen mtDNA (Habib, *et al.*, 2011) yang dikenal dengan nama *DNA barcoding* (Raupach & Radulovici, 2015). Data *barcoding* *P. trituberculatus* di Indonesia masih belum ada. Oleh karena itu spesimen *P. trituberculatus* yang tertangkap di perairan Cirebon pada tahun 2016 ini akan dilakukan analisis *barcoding* dan membandingkannya dengan data spesies yang sama yang ada di database BOLD (*The Barcode of Life Data System*) dan *gene bank* NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*).

DNA *barcoding* merupakan *tool* yang kuat untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasi spesies (Shen *et al.*, 2013). Marka gen DNA mitokondria yang mengkodekan gen sitokrom oksidase (COI) umum digunakan untuk *barcoding*. Variasi intraspesifik biasanya kurang dari 2,0% dan dalam banyak kasus kurang dari 1,0% (Shen *et al.*, 2013). Penggunaan gen COI sebagai marka untuk *barcoding* dan identifikasi jenis-jenis kepiting telah memberikan banyak hasil seperti *Portunus sanguinolentus*, *Charybdis natator*, *P. pelagicus*, *P. trituberculatus* dan *Travancoriana napaea* (Umamaheswari *et al.*, 2016), fiddler crabs *Uca annulipes* dan *U. perplexa* (Abbas *et al.*, 2016). Selain itu DNA *barcoding* juga digunakan untuk studi keragaman genetic *Portunus pelagicus* (Klinbunga, *et al.*, 2010; Sienes *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2017), *P. trituberculatus* (Guo *et al.*, 2012), *Portunus sanguinolentus* (Naz *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2017). Pada penelitian ini DNA *barcode* juga digunakan untuk mengevaluasi perbedaan intraspesifik dari berbagai lokasi tangkap di dunia yang datanya diperoleh dari *gene bank* (NCBI)

yang selanjutnya digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan jalur keturunannya. Penelitian mengenai filogenetik rajungan menggunakan gene penanda COI juga telah berhasil dilakukan (Mantelatto *et al.*, 2007; Fujaya, *et al.*, 2016).

## MATERI DAN METODE

Spesimen rajungan diperoleh dari tangkapan nelayan Cirebon yang melakukan kegiatan penangkapan di perairan Cirebon (*one day fishing*). Satu spesimen yang diperoleh langsung diidentifikasi secara fenotipik dan diambil bagian capit kemudian diawetkan menggunakan ethanol 96 % sampai dilakukan analisis molekuler.

### Ekstraksi DNA

DNA genom rajungan diekstraksi dengan metode menggunakan Chelex 5% menurut Aranishi & Okimoto (2006) yang dimodifikasi. Sampel capit depan rajungan diambil bagian ototnya menggunakan pinset steril dan dihancurkan dengan mortar dalam lumpang porselin. Homegenat yang diperoleh ditambahkan buffer TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris: pH 8.0), dihomogenkan dan dibiarkan selama 15 menit pada suhu ruangan. Suspensi homogenate ini disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm untuk mendapatkan massa sel. Massa sel yang diperoleh kemudian ditambahkan Chelex 5 % dan proteinase K selanjutnya divortex. Suspensi sel ini diinkubasi pada suhu 56 °C selama 15-30 menit, Selanjutnya dimasukkan ke dalam penangas air yang mendidih selama 8 menit. DNA genom diperoleh dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit. Debris sel mengendap dan DNA ada di supernatant.

### Amplifikasi dan Sekuensing

Gen COI diamplifikasi menggunakan kit PCR dan primer universal gen COI : LCOI 1490-5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' dan HCOI 2198-5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' (Gebhardt & Knebelberger, 2015). Siklus thermal yang digunakan adalah hasil

optimasi yang dilakukan di laboratorium manajemen kesehatan hewan akuatik (MKHA) Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. Amplifikasi dilakukan pada *Hotstart* 94 °C (5 menit), denaturasi 94 °C (5 menit) diikuti 35 siklus 94 °C (1 menit), annealing 56 °C 1 menit, ekstensi 72 °C (1.5 menit) dan ekstensi akhir 72 °C (5 menit) serta Hold 12 °C. Kegiatan amplifikasi ini dilakukan di laboratorium Hasil amplifikasi gen COI di sekuensing melalui Genetika Science Indonesia.

**Analisis data**

Sekuens gen COI dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA 5.20 meliputi edit/alignment menggunakan ClustalW. Sekuens diidentifikasi

menggunakan *BOLD system* ([http://www.boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)) dan BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Analisis filogenetika dilakukan dengan perangkat lunak MEGA 5.2 menggunakan metode statistik *Neighbor-joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML). *Test phylogeny* dengan *bootstrap methods* dan model Kimura 2-parameter. Jarak genetik, dihitung menggunakan fasilitas yang ada di MEGA 5.2. Data yang digunakan dalam rekonstruksi filogenetik meliputi spesimen rajungan *P. trituberculatus* yang diperoleh dari perairan Cirebon dan data FASTA gen COI spesimen rajungan *P. trituberculatus* yang diperoleh dari database NCBI (Tabel 1). Analisis haplotipe dan polimorfisme dilakukan menggunakan perangkat lunak DnaSP v.5.

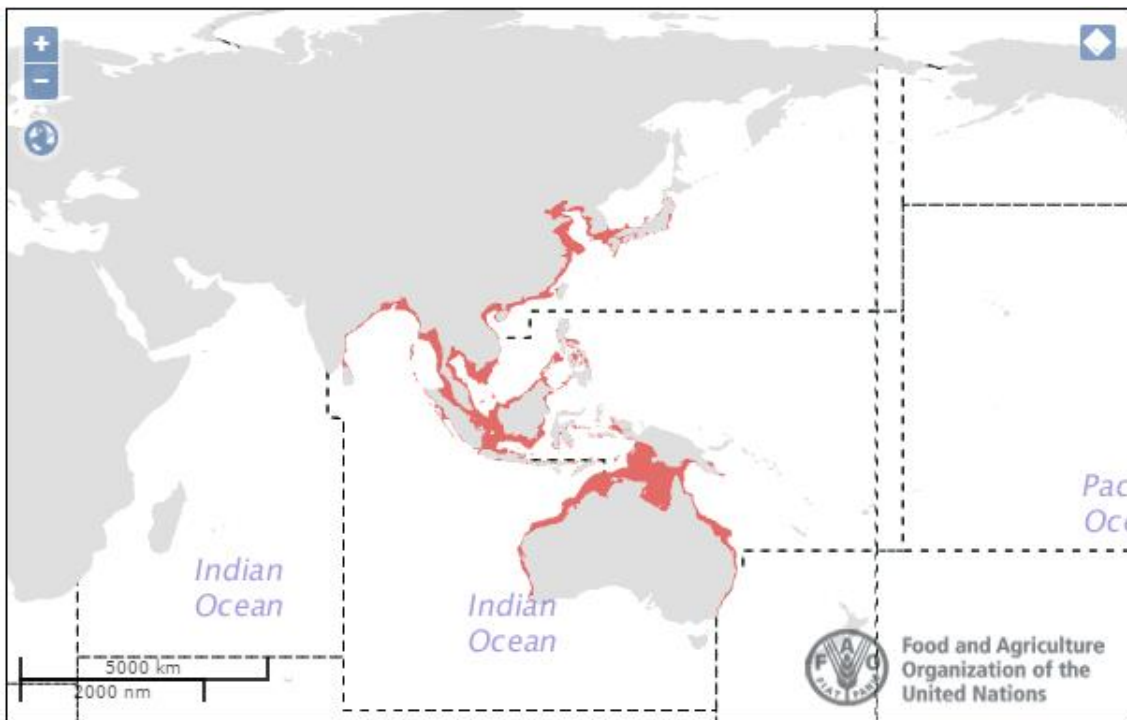
**Tabel 1.** Data fasta sekuens gen COI spesimen rajungan *P. pelagicus* yang diambil dari database NCBI untuk rekonstruksi filogenetik (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Spesimen	Asal spesimen	Acc. number
<i>P. trituberculatus</i> voucher CrP10	Philippines: Pangasinan, Region 1	KF604898.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher CrP12	Philippines: Pangasinan, Region 1	KF604899.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher ihb201306720	China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket	KP976344.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher ihb201306725	China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket	KP976352.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher ihb201306722	China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket	KP976349.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher ihb201306727	China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket	KP976354.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher ihb201306728	China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket	KP976355.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher ihb201306729	China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket	KP976356.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher ihb201306733	China: Hubei, Wuhan, Huanan supermarket	KP976343.1
<i>P. trituberculatus</i> isolate De172910-1-1	Korea	JX502944.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher CASMBGM-1PR	Tamil Nadu, India	MG753565.1
<i>P. trituberculatus</i> voucher CASMBGM-PR3	Tamil Nadu, India	MG753567.1
<i>P. trituberculatus</i> isolate Potr2	China	GQ180780.1
<i>P. trituberculatus</i> isolate Potr3	China	GQ180781.1
<i>P. trituberculatus</i> isolate Potr4	China	GQ180782.1
<i>P. trituberculatus</i> isolate Potr5	China	GQ180783.1
<i>P. trituberculatus</i> haplotype 1	China	GU321229.1
<i>P. trituberculatus</i> haplotype 15	China	GU321240.1
<i>P. trituberculatus</i> haplotype 16	China	GU321241.1
<i>P. trituberculatus</i> haplotype 18	China	GU321243.1

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil identifikasi spesimen rajungan CR 2 yang ditangkap di perairan Cirebon menggunakan *barcoding bold system* menunjukkan sebagai spesies *P. trituberculatus* dengan nilai kesamaan sebesar 99.67% demikian juga menggunakan analisis BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) NCBI menunjukkan kemiripan dengan *P. trituberculatus* sebesar 99% (Tabel 2). Berdasarkan tingkat kesamaan dan identity yang sangat tinggi ( $\geq 99\%$ ) menunjukkan bahwa *DNA barcoding* berdasarkan gen cytochrome c oxidase I (COI) mitokondrial dapat digunakan untuk identifikasi spesimen rajungan CR2. Hal ini sesuai dengan Hebert *et al.* (2003) bahwa *DNA barcoding* menggunakan fragmen pendek mitokondria efektif untuk diagnosis spesies. Informasi mengenai *P. trituberculatus* di Indonesia sangat sedikit sekali. Menurut FAO (2018) perairan Indonesia merupakan daerah distribusi jenis rajungan tersebut (Gambar 1).

Analisis filogenetik menggunakan data gen COI *P. trituberculatus* yang ada di database NCBI (21 dari China, 1 dari Korea, 2 dari India ) dan 1 spesimen yang berasal dari tangkapan di perairan Cirebon menggunakan *Neighbor-joining (NJ) methods* (Saitou & Nei 1987) dan *Maximum Likelihood method (ML)* menggunakan model Kimura 2-parameter Kimura M. (1980) dengan *bootstrap* 1000 kali (Felsenstein 1985) dengan menunjukkan secara konsistensi pola garis keturunan yang sama (Gambar 2 dan Gambar 3). Penggunaan 2 spesies *out group* yaitu *Octopus vulgaris* (accession FN24381.1) dan *Uroteuthis duvauceli* (accession KC951889.1) pada pohon filogenetik menggambarkan semua garis percabangan *P. trituberculatus* berasal dari *ancestor* yang sama. Hal ini menunjukkan garis keturunan monofiletik (Baum *et al.*, 2008). Berdasarkan hasil analisis filogenetik dengan 2 metode ini semua data set mengelompok kedalam 2 garis keturunan (*lineage*) yang berbeda yang berasal dari 1 *ancestor* yang sama. Pengelompokan ini



**Gambar 1.** Distribusi geografi *P. trituberculatus*

Keterangan  : pasti;  : tidak pasti;  : area tangkapan FAO  
 Sumber : FAO (2018)

**Tabel 2.** Hasil identifikasi menggunakan BOLD system dan analisis blast NCBI

Spesimen	Similaritas	Spesies	Max score	Query cover	Identity	Spesies	Accession
CR2	99.67%	<i>Portunus trituberculatus</i>	1094	100 %	99 %	<i>Portunus trituberculatus</i>	KF604898

**Tabel 3.** Jarak genetik tiga klaster *P. trituberculatus*. Diagonal kekanan merupakan nilai jarak genetic intra garis keturunan, nilai dibawah diagonal merupakan jarak genetic inter garis keturunan. Nilai diatas diagonal adalah standard deviasi jarak genetik inter garis keturunan

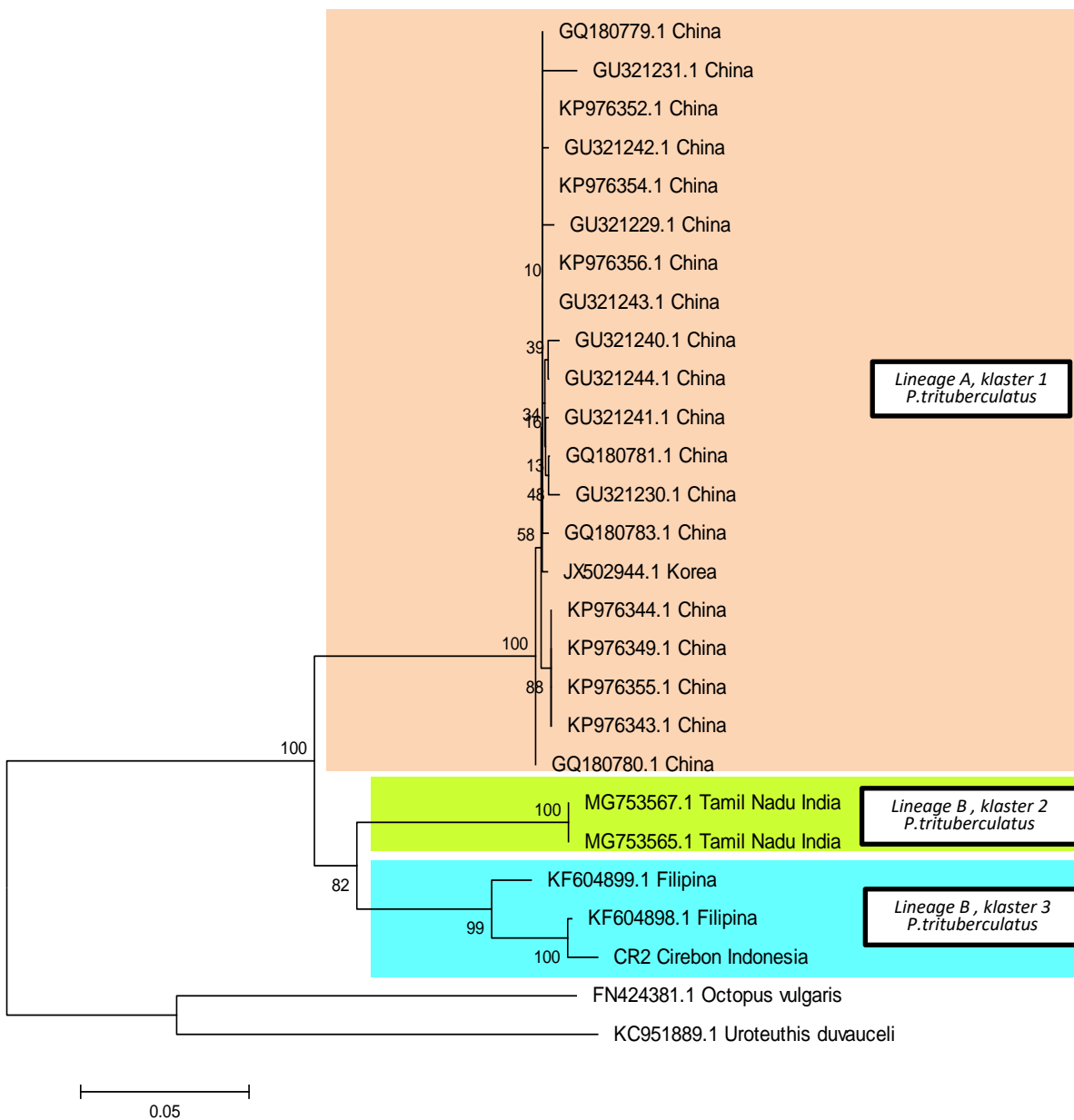
	Lineage C	Lineage A	Lineage B
	Klaster 3	Klaster 1	klaster 2
Lineage C, klaster 3	0,0292	0,0155	0,0149
Lineage A, klaster 1	0,1424	0,0046	0,0158
Lineage B, klaster 2	0,1276	0,1433	0

**Tabel 4.** Distribusi haplotipe<sup>25</sup> spesimen *P. trituberculatus*. Jumlah urutan yang digunakan: 25, Wilayah terpilih: 1-615 Jumlah situs: 615, Jumlah total situs (tidak termasuk situs dengan kesenjangan / data yang hilang): 610, Situs dengan kesenjangan penjajaran: tidak dipertimbangkan.

Haplotipe	Spesimen	Asal spesimen
Hap_1: 1	KF604898.1	Filipina
Hap_2: 1	KF604899.1	Filipina
Hap_3: 4	KP976344.1 KP976349.1 KP976355.1 KP976343.1	China
Hap_4: 5	KP976356.1 KP976354.1 KP976352.1 GU321243.1 GQ180779.1	China
Hap_5: 1	JX502944.1	Korea
Hap_6: 2	MG753567.1 MG753565.1	India
Hap_7: 1	GQ180780.1	China
Hap_8: 1	GQ180781.1	China
Hap_9: 1	GQ180783.1	China
Hap_10: 1	GU321241.1	China
Hap_11: 1	GU321240.1	China
Hap_12: 1	GU321229.1	China
Hap_13: 1	CR2_Cirebon	Indonesia
Hap_14: 1	GU321230.1	China
Hap_15: 1	GU321244.1	China
Hap_16: 1	GU321242.1	China
Hap_17: 1	GU321231.1	China

didukung dengan nilai bootstrap sebesar 81 – 100 %. Spesimen yang berasal dari China dan Korea berada dalam 1 garis keturunan yang sama (*lineage A*), spesimen India, Filipina dan Cirebon berada dalam 1 garis keturunan yang sama (*lineage B*). Selanjutnya garis keturunan B terbagi menjadi 2 kluster yaitu kluster yang terdiri dari spesimen India dan kluster yang terdiri dari spesimen Filipina dan spesimen Cirebon. Pengelompokan ke dalam 3 kluster ini juga

diperkuat oleh analisis jarak genetik antar kelompok (Tabel 3). Jarak genetik antara lineage A dan B sebesar 12,76 %, antara A dan B kluster 2 sebesar 14,24 % dan antara B kluster 2 dan B kluster 3 sebesar 14,33 %. Sedangkan jarak genetik *intra*lineage antara 0 – 2,92 %. Spesimen Cirebon karena berada di dalam kluster yang sama dengan spesimen Filipina menunjukkan adanya hubungan kekerabatan yang dekat terutama dengan spesimen KF604898.1. Hal ini diukung



**Gambar 2.** Analisis hubungan filogenetika diantara *P. trituberculatus* berdasarkan gen COI sepanjang 602bp dengan metode *Neighbor-Joining* (model Kimura-2 parameter). Bootstrap (1000 replikan). Analisis menggunakan MEGA 5.2.



dengan nilai bootstrap sebesar 100 %. Kedekatan ini juga ditunjukkan oleh jarak genetik antara spesimen Filipina KF604898.1 dengan spesimen Cirebon sebesar 1%.

Hasil analisis haplotipe menggunakan DnaSP v 5 menunjukkan bahwa lineage A terdapat 20 sekuens yang terdistribusi dalam 13 haplotipe, pada lineage B kluster 2 terdapat 2 sekuens yang terdistribusi dalam 2 haplotipe dan pada lineage B kluster 3 terdapat 3 sekuens yang terdistribusi ke dalam 3 haplotipe (Tabel 4 ). Keragaman haplotipe tertinggi terdapat di lineage B kluster 3 yaitu sebesar 1 dan terendah di lineage B kluster 2 sebesar 0. Keragaman nucleotide tertinggi terjadi di lineage B kluster 3 yaitu sebesar 2,842 % dan terendah di lineage B kluster 2 sebesar 0 (Tabel 5). Analisis keragaman terhadap 25 sekuens menunjukkan semua data tersebar kedalam 17 haplotipe dan spesimen rajungan Cirebon merupakan satu haplotipe tersendiri yang terpisah dengan data rajungan lainnya (Tabel 4). Hasil analisis keragaman seluruh data *P. trituberculatus* yang ada teridentifikasi sebanyak 128 situs polimorfik dan jumlah mutasi sebanyak 144, keragaman haploid sebesar  $0,943 \pm 0.031$  dan keragaman nukleotida sebesar  $0,04821 \pm 0.0139$  (Tabel 6). Kelompok garis keturunan A beranggotakan spesimen dari China dan Korea. Hasil penelitian Guo *et al.* (2009) terhadap *P. trituberculatus* di sepanjang pantai China didapatkan 53 mtDNA haplotipes dari 72 individu dan 102 situs mutasi terdeteksi di 617 bp. Keragaman haplotipik dan keanekaragaman nukleotida berkisar antara 0,733-1,00 dan 0,00759-0,02614. Hasil yang lain didapatkan oleh Xu *et al.*, (2009) melalui studi menggunakan metode *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLPs) terhadap 213 samples *P. trituberculatus* yang diperoleh di 3 area tangkap East China Sea, Yellow Sea, dan Bohai Sea terdistribusi ke dalam 25 haplotipe dengan 22 *variable sites*.

## KESIMPULAN

*DNA barcoding* menggunakan gen Cytochrom oxidase sub unit I mitokondrial dapat digunakan untuk identifikasi spesies

rajungan. Pada penelitian ini spesimen rajungan *P. trituberculatus*, dari perairan Cirebon dapat diidentifikasi secara akurat dengan tingkat similaritas sebesar 99,67 %. Hasil analisis filogenetik dengan 24 spesies yang sama yang berasal dari China, Korea, India dan Filipina (data diambil dari gen bank NCBI) menunjukkan bahwa spesimen Cirebon secara genetik masuk ke dalam kelompok garis keturunan yang sama dengan spesies Filipina. Sedangkan berdasarkan analisis distribusi haplotipe menunjukkan spesimen Cirebon merupakan haplotipe tersendiri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas E.M., Abdelsalam K.M., Mohammed-Geba K, Ahmed H.O, and Kato M., 2016, Genetic and morphological identification of some crabs from the Gulf of Suez, Northern Red Sea, Egypt, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42, 3:319-329
- Apreshgi, K. P., K. V. Dhaneesh, Radhakrishnan T. and Kumar A.B, 2016, DNA barcoding of fiddler crabs *Uca annulipes* and *U. perplexa* (Arthropoda, Ocypodidae) from the Southwest coast of India, *J. Mar. Biol. Ass. India*, 58 (1), doi: 10.6024/jmbai.2016.58.1.1865-13
- Aranishi, F., T. Okimoto, 2006, A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle *J Appl Genet* 47(3):251–254
- Baum, D. (2008) Reading a phylogenetic tree: The meaning of monophyletic groups. *Nature Education* 1(1):190
- Fisheries and Aquaculture Department, 2018, Eshragh, R. & B. S. Leander, 2014, Molecular contributions to species boundaries in dicyemid parasites from eastern Pacific cephalopods, *Marine Biology Research.*, doi : 10.1080/17451000.2014.943241
- FAO, 2018, Species Fact Sheets *Portunus trituberculatus* (Miers, 1876), <http://www.fao.org/fishery/species/2630/en>
- Fujaya, Y., Asphama, A. I., Hidayani, A. A., Parenrengi, A. & Tenriulo, A. (2016). High genetic variation of *Portunus pelagicus* from Makassar Straits revealed by RAPD



- markers and mitochondrial 16S rRNA sequences. *African Journal of Biotechnology*, 15(7), 180-190
- Gebhardt, K. & T. Kneibelsberger, 2015, Identification of cephalopod species from the North and Baltic Seas using morphology, COI and 18S rDNA sequences, *Helgol Mar Res*, 69:259–271, DOI 10.1007/s10152-015-0434-7
- Guo E, Liu Y, Cui Z, Li X, Cheng Y, Wu X., 2012, Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. *Mol Biol Rep*. 39(2):1453–63. doi: 10.1007/s11033-011-0882-3. .
- Habib, M., W. S. Lakra, V. Mohindra, P. Khare, A. S. Barman, A. Singh, K. K. Lal, P. Punia, A. A. Khan, 2011, Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes), *Mol Biol Rep*, 38:841–846 DOI 10.1007/s11033-010-0175-2.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512) : 313–321. <http://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Irawan, B dan Soegiarto, A., 2006, Kekayaan Jenis Portunidae Di Sisi Shipping Line Selat Madura, Berk. Penel. Hayati, 11:93–96.
- Klinbunga, S., Thamniemdeec, N., Yuvanatemiya, V., Khetpu, K., Khamnamtong, B., Menasveta, P., 2010, Species identification of the blue swimming crab *Portunus pelagicus* in Thai waters using mtDNA and RAPD-derived SCAR markers, *Aquaculture* 308:S39–S46
- Liu, S., Sun, J., Hurtado, L.A., 2013, Genetic differentiation of *Portunus trituberculatus*, the world's largest crab fishery, among its three main fishing areas, *Fisheries Research* 148: 38– 46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2013.08.003>
- Mantelatto, F.L., Robles, R. and Felder, D.L., 2007, Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea, Brachyura, Portunidae), *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150: 211–220
- Naz, F., Saher, N.U., And Kama, M., 2016, Genetic Diversity Of The *Portunus Sanguinolentus* (Herbst, 1783) (Decapoda, Brachyura, Portunidae) In Indo West Pacific Region Based On Mitochondrial Dna 16s Gene, *Pakistan Journal of Marine Sciences*, 25 (1&2), 59-68,
- Raupach, M.J., Radulovici A.E., 2015, Looking back on a decade of barcoding crustaceans. *ZooKeys* 539: 53–81. doi: 10.3897/zookeys.539.6530
- Ren G., Ma H., Ma C., Wang W., Chen W., & Ma L, 2017, Genetic diversity and population structure of *Portunus sanguinolentus* (Herbst, 1783) revealed by mtDNA COI sequences, *Journal Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 28 (5) : 740-746
- Ren G, Ma H, Ma C, Wang W, Chen W, Ma L., 2017, Genetic diversity and population structure of *Portunus sanguinolentus* (Herbst, 1783) revealed by mtDNA COI sequences. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 28(5):740-746. doi: 10.1080/24701394.2016.1177040.
- Shen Y-Y, Chen X, Murphy R.W. , 2013, Assessing Dna Barcoding As A Tool For Species Identification And Data Quality Control. *Plos One* 8(2): E57125. Doi:10.1371/Journal.Pone.0057125
- Sienes, P.M.Q, Willette, D.A., Romena, L.R., Alvior, C. G. and Estacion J.S. 2014, Genetic diversity and the discovery of a putative cryptic species within a valued crab fishery, *Portunus pelagicus* (Linnaeus 1758), in the Philippines, *Philippine Science Letters*, 7 (2):317-323.
- Umamaheswari, S., P. S. Bhavan, R. Udayasuriyan, C. Vadivalagan and R. Kalpana, 2016, Discrimination of four marine crabs and one freshwater crab through mt-COI gene, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(5): 766-782
- Xu, Q., Liu, R., Liu Y., 2009, Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East

China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences, *Journal of Experimental*

*Marine Biology and Ecology* 371:121–129. doi:10.1016/j.jembe.2009.01.014