

KARAKTERISASI GENETIK SIPUT CINCIN (*Monetaria annulus* Linnaeus, 1758) DARI PANTAI NUNUHU, PROVINSI MALUKU UTARA BERDASARKAN SEKUENS GEN CYTOCHROME OXIDASE SUBUNIT I

GENETIC CHARACTERIZATION OF THE GOLD RINGED COWRY (*Monetaria annulus* Linnaeus, 1758) FROM NUNUHU BEACH, NORTH MOLUCCAS PROVINCE BASED ON CYTOCHROME OXIDASE SUBUNIT I SEQUENCE GENE

Indana Nurul Khoiriza¹, Dwi Anggorowati Rahayu¹, Ayu Savitri Nurinsiyah^{2*}

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya
Jalan Ketintang, Ketintang, Gayungan, Surabaya, Jawa Timur 60231

²Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi, Badan Riset dan Inovasi Nasional
Jalan Raya Jakarta-Bogor KM 46, Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat 16911

E-mail: ayus001@brin.go.id

(diterima Maret 2024, direvisi Mei 2024, disetujui Juli 2024)

ABSTRAK

Monetaria annulus (Gastropoda: Cypraeidae) atau dikenal juga dengan siput cincin memiliki penyebaran di perairan Indo-Pasifik dan kerap dimanfaatkan oleh masyarakat dari masa sebelum Masehi sebagai alat pembayaran, perhiasan, dan bahan konsumsi. Penelitian *Monetaria annulus* ini bertujuan untuk mendapatkan karakteristik genetik spesies tersebut, yaitu dari nilai similaritas data BOLDsystems, komposisi basa nukleotida, jarak genetik, dan analisis filogenetik yang didasarkan pada sekuens gen COI. Sampel *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu dilakukan tahapan ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis, hingga sekuensing. Analisis genetik dilakukan dengan software bioinformatika, yaitu MEGA 7.0, BOLDsystems, Jupyter Notebook, Microsoft Excel, dan digunakan data pembandingan dari Genbank. Hasil karakterisasi genetik dari tiga sampel segar, lima *ingroup* dan dua *outgroup* diperoleh sekuens dengan panjang 606 bp dan nilai similaritas 99,5-99,83%. Komposisi basa nukleotida menunjukkan kombinasi GC lebih rendah daripada AT dengan persentase berurutan 42,02% dan 57,98%. Rata-rata jarak genetik *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu dengan *ingroup* adalah 2,69%. Hal ini menunjukkan bahwa sampel dari Pantai Nunuhu teridentifikasi satu spesies dengan *Monetaria annulus* *ingroup*. Dari pohon filogenetik dihasilkan satu kluster besar yang membagi *Monetaria annulus* Pantai Nunuhu dengan *ingroup*nya yang berasal dari China dan Papua. Hasil penelitian ini dapat dipergunakan sebagai dasar penelitian mengenai biogeografi *Monetaria annulus* terutama di kawasan Wallacea.

Kata kunci: filogenetik, Gastropoda, Indonesia, Moluska, Pulau Morotai.

ABSTRACT

Monetaria annulus (Gastropoda: Cypraeidae) or also known as the gold-ringed cowry is distributed throughout Indo-Pacific waters and utilized by local people for centuries as money, jewelry, and food. The research on *Monetaria annulus* aims to obtain the genetic characteristics of the species, namely the similarity value on the BOLDsystems data, nucleotide base composition, genetic distance, and phylogenetic analysis based on the COI gene sequence. The samples from Nunuhu Beach underwent extraction, amplification, electrophoresis, and sequencing. Genetic analysis was carried out using bioinformatics software, namely MEGA 7.0, BOLDsystems, Jupyter Notebook, Microsoft Excel, with data comparison extracted from Genbank. The results of genetic characterization from three fresh samples, five *ingroup*s and two *outgroups* resulted sequence with a length of 606 bp and similarity value of 99.5-99.83%. The nucleotide base composition shows that the GC combination is lower than AT with 42.02% and 57.98% respectively. The average genetic distance of *Monetaria annulus* from Nunuhu Beach with the *ingroup* is 2.69%. It shows that the samples from Nunuhu Beach were identified as one species with the *Monetaria annulus* *ingroup*. From the phylogenetic tree, a large cluster were identified, dividing *Monetaria annulus* from Nunuhu Beach with its *ingroup*s originating from China and Papua. The result of this research is beneficial as the basis for biogeography research on *Monetaria annulus*, especially in the Wallacea region.

Keywords: phylogenetic, Gastropoda, Indonesia, Mollusk, Morotai Island.

PENDAHULUAN

Siput cincin atau *Monetaria annulus* merupakan salah satu spesies dari Famili Cypraeidae yang menyebar dari wilayah perairan tropis hingga iklim sedang di wilayah

Indo-Pasifik (Ma *et al.* 2023). Spesies ini mendapatkan julukan *gold-ringed cowry* karena memiliki cincin berwarna emas pada bagian dorsal cangkangnya (Villamor & Yamamoto 2015a).

Spesies ini memiliki eksistensi yang tinggi sejak sebelum Masehi untuk dijadikan sebagai alat pembayaran. Hal ini karena cangkang *Monetaria annulus* memenuhi standar pembayaran di masa tersebut, yaitu seragam dalam bentuk dan struktur, mudah dibawa, tahan lama, mudah dihitung, dan sulit untuk dipalsukan. Pembayaran menggunakan cangkang spesies ini telah dilakukan mulai 1600 hingga 770 SM di Tiongkok, India, dan Afrika dengan perantara sistem perdagangan antarnegara seperti Portugis, Arab, Belanda, Prancis, dan Inggris (Heller 2015). Hal tersebut yang membuat *Monetaria annulus* menjadi salah satu spesies yang dijuluki *cowrie shell money* (Foo 2019).

Secara ekologis, *Monetaria annulus* berperan dalam rantai makanan sebagai detritivor dan mangsa di ekosistem perairan dangkal, area pasang surut, bawah bebatuan, padang lamun, dan area terumbu karang (Irie 2006; Wendri *et al.* 2019; Wake *et al.* 2022). Selain itu, masyarakat kerap mengambil spesies ini untuk dikonsumsi atau dijadikan perhiasan (Haour & Christie 2019). Keong ini dapat ditemukan di wilayah Indonesia seperti: Pantai Krakal-Yogyakarta (Febiansi *et al.* 2018), Kepulauan Nusa Tenggara (Dharma 2005), Kepulauan Maluku (Laimheheriwa 2017; Laimheheriwa *et al.* 2018; Kusnadi *et al.* 2008), dan Papua (Sujarta *et al.* 2022; Aji & Widyastuti 2017).

Penelitian mengenai *Monetaria annulus* telah banyak dilakukan seperti deskripsi morfologi ukuran, bentuk, warna cangkang (Latupeirissa & Leiwakabessy 2020), hubungan fenetik (Laimheheriwa *et al.* 2018), anatomi (Simone 2004), pola pertumbuhan (Wake *et al.* 2022), karakteristik populasi (Villamor & Yamamoto 2015a), reproduksi (Villamor &

Yamamoto 2015b), hingga filogenetik molekulernya (Fukumori *et al.* 2019).

Karakteristik genetik antara organisme yang berbeda sangat penting dalam kajian biologi, salah satunya bertujuan untuk menganalisis urutan basa nukleotida untuk memahami sejarah evolusi makhluk hidup (Podsiadlo & Polz-Dacewicz 2013). Selain itu, kajian genetika molekuler dapat memperjelas hubungan antar organisme, seperti pada *Monetaria annulus* (Sigwart & Lindberg 2015). Pengungkapan *whole genome sequence* dari satu individu *Monetaria annulus* yang dikoleksi dari Pulau Okinawa telah dilakukan oleh (Fukumori *et al.* 2019) dan digunakan untuk menganalisa hubungan filogenetik untuk kelompok sistematika pada di atasnya/subklas (Qu *et al.* 2024). Hingga saat ini, informasi karakteristik genetik *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu, Pulau Morotai, Maluku Utara belum tersedia. Penelitian ini berfokus pada karakteristik genetik *Monetaria annulus* tersebut dari nilai similaritas data BOLDsystems, komposisi basa nukleotida, jarak genetik, dan analisis filogenetiknya dibandingkan dengan *Monetaria annulus* dari wilayah yang berbeda berdasarkan sekuens gen COI.

METODE PENELITIAN

Lokasi dan Waktu Penelitian

Sampel siput cincin merupakan bagian dari hasil ekspedisi yang dilakukan oleh penulis (ASN) dan tim dari Pusat Riset Biosistematika dan Evolusi. Sampel tersebut dikoleksi pada 15 Agustus 2022 dari Pantai Nunuhu, yang terletak di Desa Bido, Kecamatan Morotai Utara, Kabupaten Pulau Morotai, Provinsi Maluku Utara dengan



Gambar 1. Peta Lokasi Pantai Nunuhu.

koordinat $2^{\circ}17'39.9''\text{N}$ $128^{\circ}38'44.7''\text{E}$
(Gambar 1).

Penelitian karakterisasi genetik dilaksanakan pada bulan Januari-Maret 2024 di Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi, Kawasan Sains dan Teknologi Soekarno, Badan Riset dan Inovasi Nasional.

Kondisi Sampel

Siput cincin yang didapatkan dari hasil ekspedisi berjumlah tiga sampel dengan kode MT6_8 (MZB Gst 23.840), MT6_9 (MZB Gst 23.841), dan MT6_10 (MZB Gst 23.842).

Telah dilakukan pemotongan sampel kaki pada ketiga sampel tersebut untuk dilakukan analisis molekuler. Ketiga sampel memiliki gambaran morfologi yang sama, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.

Bagian kaki sampel segar disimpan pada vial 2 ml yang telah diisi isopropanol dan diletakkan di dalam freezer dengan suhu -20°C . Bagian cangkang dan tubuh lunak juga telah dilakukan preservasi menggunakan tabung koleksi yang berisikan alkohol 70% untuk dimasukkan ke daftar koleksi Museum Zoologicum Bogoriense.



Gambar 2. Spesimen *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu, Maluku Utara. Skala bar: 1 cm .

Isolasi dan Ekstraksi DNA

Isolasi dan ekstraksi DNA menggunakan kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (50). Sampel kaki siput cincin diambil sebesar 0,05 gram dan dicacah kasar menggunakan gunting bedah lalu dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Selanjutnya tabung mikrosentrifugasi yang telah disusun di atas rak divakum selama 10-15 menit untuk menghilangkan kadar alkohol pada jaringan. Setelah itu sampel dikeluarkan dan dicacah hingga halus menggunakan gunting bedah. Selanjutnya sampel diperlakukan sesuai dengan protokol yang terdapat pada Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (50) dilakukan penambahan beberapa buffer seperti buffer ATL, proteinase K, dan AL untuk melisiskan jaringan kaki keong, buffer AW1 dan AW2 yang digunakan untuk mencuci DNA dan memastikan DNA bersih dari biomolekuler lain, dan terakhir ditambahkan buffer AE sebagai pelarut DNA dan menjaga DNA agar tidak mudah rusak.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi gen COI dilakukan dengan teknik PCR, yaitu mencampurkan beberapa bahan menjadi satu, yaitu 1 µl template DNA; 2,5 µl Buffer Taq (NH₄)₂SO₄; 0,5 µl dNTP; 3,5 µl MgCl₂; 0,2 µl Taq DNA Polimerase; 0,4 µl BSA; sepasang primer gen COI, yaitu LCO 1490: (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') dan HCO 2198: (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer *et al.* 1994) sebanyak 1 µl masing-masing primer, dan Nuclease Free Water sebanyak 14,9 µl. Mix dan sampel dimasukkan ke dalam

tabung mikrosentrifugasi 0,2 ml dan dimasukkan ke dalam mesin PCR type Eppendorf Mastercycler Nexus. Sampel diamplifikasi dengan *pra-denaturasi* pada suhu 95 °C selama 2 menit, kemudian diikuti 35 siklus yang mencakup tahap *denaturasi* pada suhu 95 °C selama 1 menit, tahap *annealing* pada suhu 40 °C selama 1 menit, dan tahap *ekstensi* pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik. Proses diakhiri dengan tahap *post-ekstensi* pada suhu 72 °C selama 7 menit dengan tujuan menghasilkan untai ganda (modifikasi dari Djoemharsjah *et al.* 2023; Ramses *et al.* 2024).

Elektroforesis

Gel agarose dipindahkan ke mesin elektroforesis Mupid-2Plus yang telah diisi buffer TAE 1x hingga gel agarose tenggelam. Hasil PCR sebanyak 3 µl dimasukkan ke dalam sumuran agarosa dan pada sumur bagian ujung dimasukkan ladder sebanyak 3 µl. Mesin Mupid-2Plus dihidupkan menggunakan trafo dengan output 100V dan diatur full voltase selama 25 menit (Amirulloh *et al.* 2018). Visualisasi DNA dilakukan untuk melihat kualitas pita DNA yang dihasilkan menggunakan transluminator UV.

Sekuensing dan Visualisasi Kromatogram

Sekuensing DNA menggunakan metode Sanger dengan bantuan jasa sekuensing 1st Base, Malaysia. Hasil sekuensing berupa kromatogram yang kemudian dianalisis dengan aplikasi MEGA 7.0 (Kumar *et al.* 2018). Analisis sekuens DNA dilakukan untuk mengetahui jarak genetik, dan analisis kekerabatannya.

Analisis Sekuens DNA

Identifikasi urutan DNA menggunakan *Barcode of Life Data System* atau BOLDsystems (<https://www.boldsystems.org/>) dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil identifikasi sekuens gen COI dan mengetahui nilai similaritasnya jika dibandingkan dengan data BOLDsystems. Selanjutnya, sekuens ditranslasi dengan bantuan software ExPasy dan kemudian disubmit ke Genbank NCBI.

Hasil pengurutan DNA juga dilakukan perhitungan komposisi basa nukleotida dengan bantuan aplikasi Jupyter Notebook dan Microsoft Excel. Kode skrip yang dipergunakan dalam perhitungan basa nukleotida pada penelitian ini merupakan modifikasi dari https://github.com/lanadomin/kovic/rosalind/blob/main/counting_dna_nucleotides/counting_dna_nucleotides.ipynb?short_path=abba206 (terlampir pada *supplementary material*). Kemudian, untuk menunjukkan seberapa dekat kekerabatan, dicari gen pembanding dari Genbank NCBI (Tabel 1) dan dianalisis jarak genetiknya menggunakan aplikasi MEGA 7.0 dengan perhitungan *pairwise distance*, *bootstrap method* replikasi 1000x dan model *p-distance*.

Pembuatan Pohon Filogenetik

Rekonstruksi pohon filogenetik bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan

antara satu individu dengan individu lain. Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan bantuan aplikasi MEGA 7.0 dengan model *Neighbor Joining tree* perhitungan Kimura-2-Parameter (Rahayu *et al.* 2019) dan *p-distance* (Srivathsan & Meier 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi BOLDsystems

Hasil analisis kromatogram sekuensing menggunakan Mega 7.0 menghasilkan urutan basa nukleotida dengan panjang 606 bp. Basa nukleotida dari ketiga sampel penelitian diidentifikasi menggunakan BOLDsystems untuk mengetahui nilai similaritas tertinggi pada *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu Maluku Utara (Tabel 2). Semakin tinggi similaritas, maka tingkat kesamaan dan kekerabatan antar individu semakin tinggi.

Hasil dari ketiga sampel *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu menunjukkan nilai similaritas tertinggi dengan data sekuen yang ada di BOLDsystems dengan kisaran 99,5% hingga 99,83%. Sampel kode MT6_8 memiliki nilai similaritas tertinggi, yaitu 99,83% diikuti dengan sampel MT6_9 (99,5%) dan MT6_10 (99,66%).

Dari data tersebut sampel MT6_8, MT6_9, dan MT6_10 telah teridentifikasi pada lingkup spesies. Hal ini dikarenakan suatu individu dikatakan satu spesies ketika similaritas basa nukleotidanya berada pada

Tabel 1. Sampel ingroup dan outgroup yang diambil dari Genbank.

Sampel ingroup/outgroup	Acc number NCBI
<i>Monetaria annulus</i> China	DQ324060
<i>Monetaria annulus</i> China	MN389075
<i>Monetaria annulus</i> Papua	MZ560054
<i>Monetaria annulus</i> Papua	MZ559397
<i>Monetaria annulus</i> Papua	MZ560055
<i>Notadusta punctata</i>	AY161822
<i>Notadusta punctata</i>	KP259441

Tabel 2. Tiga nilai similaritas tertinggi dari identifikasi menggunakan BOLDsystems.

Nama sampel	Identifikasi BOLD (3 tertinggi)	Nilai similaritas (%)	Status	Acc number NCBI	Referensi
MT6_8	<i>Monetaria annulus</i>	99,83	Terpublikasi	PP892046	(Meyer & Paulay 2005)
	<i>Monetaria annulus</i>	99,67	Terpublikasi		
	<i>Monetaria annulus</i>	99,5	Terpublikasi		
MT6_9	<i>Monetaria annulus</i>	99,5	Terpublikasi	PP893195	(Meyer & Paulay 2005)
	<i>Monetaria annulus</i>	99,5	Terpublikasi		
	<i>Cypraea annulus</i>	99,5	Baru rilis		
MT6_10	<i>Monetaria annulus</i>	99,66	Terpublikasi	PP892047	(Meyer & Paulay 2005)
	<i>Monetaria annulus</i>	99	Terpublikasi		
	<i>Monetaria annulus</i>	98,99	Terpublikasi		

Tabel 3. Komposisi basa nukleotida dari *Monetaria annulus* asal Pantai Nunuhu Maluku Utara dan sampel *ingroup* dari NCBI.

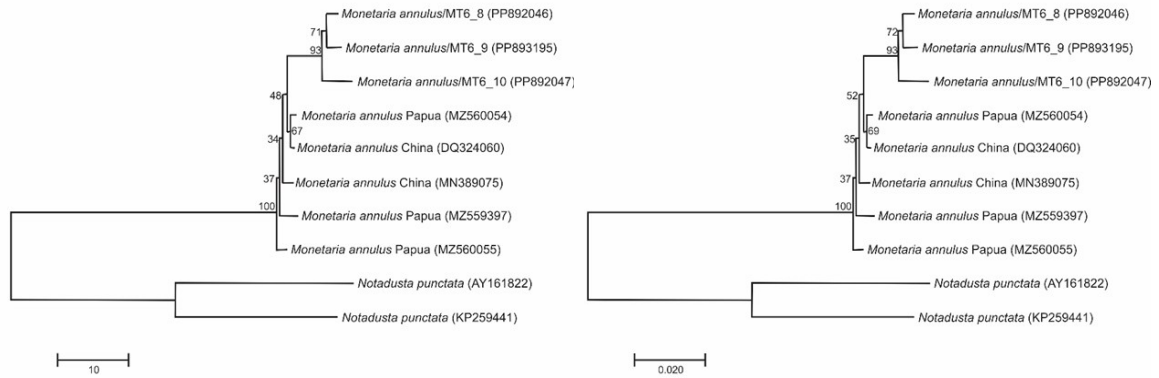
Sampel	A (%)	T (%)	C (%)	G (%)	G+C (%)	A+T (%)
MT6_8 (PP892046)	25,58	32,67	23,10	18,65	41,75	58,25
MT6_9 (PP893195)	25,58	32,67	23,10	18,65	41,75	58,25
MT6_10 (PP892047)	25,25	32,18	23,43	19,14	42,57	57,43
DQ324060	25,12	33,44	22,80	18,64	41,45	58,55
MN389075	25,54	33,59	22,60	18,27	40,87	59,13
MZ560054	25,53	33,59	22,80	18,09	40,88	59,12
MZ560055	25,53	33,59	22,80	18,09	40,88	59,12
MZ559397	25,38	33,43	22,95	18,24	41,19	58,81
Rata-rata sampel Nunuhu	25,47	32,51	23,21	18,81	42,02	57,98
Rata-rata Keseluruhan	25,44	33,15	22,95	18,47	41,42	58,58

Keterangan: A = adenin; T = timin; C = sitosin; G = guanin.

Tabel 4. Jarak genetik *Monetaria annulus* dengan referensi beberapa gen NCBI menggunakan model perhitungan *p-distance* (dalam persentase) dan standar deviasi (dalam desimal).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Monetaria annulus</i> Papua (MZ559397)		0,005	0,005	0,006	0,005	0,008	0,008	0,008	0,021	0,020
<i>Monetaria annulus</i> Papua (MZ560055)	1,3		0,004	0,005	0,004	0,008	0,008	0,008	0,021	0,020
<i>Monetaria annulus</i> China (MN389075)	1,0	0,8		0,004	0,003	0,008	0,008	0,007	0,021	0,020
<i>Monetaria annulus</i> Papua (MZ560054)	1,3	1,0	0,8		0,002	0,006	0,008	0,007	0,021	0,020
<i>Monetaria annulus</i> China (DQ324060)	1,0	0,8	0,5	0,3		0,007	0,008	0,007	0,021	0,020
<i>Monetaria annulus</i> (MT6_8/PP892046)	3,1	2,8	2,6	1,8	2,1		0,006	0,005	0,021	0,021
<i>Monetaria annulus</i> (MT6_9/PP893195)	3,3	3,1	2,8	3,1	2,8	1,0		0,007	0,021	0,021
<i>Monetaria annulus</i> (MT6_10/PP892047)	3,1	2,8	2,6	2,3	2,1	1,8	1,8		0,021	0,020
<i>Notadusta punctata</i> (KP259441)	22,6	22,3	22,6	22,8	22,8	24,1	24,1	24,6		0,015
<i>Notadusta punctata</i> (AY161822)	22,1	21,8	22,1	22,3	22,3	23,6	23,8	23,8	12,3	

Keterangan : hitam (jarak genetik); biru (standar deviasi); *cell shading* kuning (perhitungan rata-rata *Monetaria annulus* Pantai Nunuhu dengan *ingroup*); *cell shading* abu-abu (perhitungan rata-rata *Monetaria annulus* Pantai Nunuhu).



Gambar 3. Topologi filogenetik *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu, Maluku Utara menggunakan konstruksi *Neighbor Joining Tree* analisis Kimura-2-Parameter (kiri) dan *p-distance* (kanan) dengan kelompok ingroup dan outgroup dari NCBI.

kisaran 97% hingga 100% (Holostenco *et al.* 2022). Dengan ini, ketiga sampel yang ditemukan di Pantai Nunuhu merupakan spesies yang sama, yaitu *Monetaria annulus*.

Komposisi Basa Nukleotida

Perhitungan rata-rata basa nukleotida kombinasi GC pada ketiga sampel *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu menunjukkan angka 42,02% dan kombinasi AT dengan angka 57,98%. Selain itu, dari data keseluruhan *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu dan kelompok *ingroup*, komposisi AT juga lebih tinggi (58,58%) dari GC (41,42%). Dari data tersebut dapat diketahui bahwa kombinasi basa nukleotida G (guanine) dan C (sitosin) memiliki persentase yang lebih rendah dibandingkan dengan kombinasi A (adenine) dan T (timin) (Tabel 3).

Data tersebut selaras dengan kombinasi basa nukleotida AT pada *Monetaria annulus* dari Pulau Hainan, China yang mencapai 64,2% yang mana nilainya lebih tinggi jika dibandingkan dengan kombinasi GC (Ma *et al.* 2023). Persentase GC lebih rendah daripada AT disebabkan oleh tingginya variabilitas pada komposisi basa nukleotida

dan tingkat substitusinya pada gen-gen yang teramplifikasi (Ismail *et al.* 2020). Perbedaan komposisi kombinasi AT dan GC ini terjadi akibat mutasi. Proses mutasi menjadi bukti bahwa suatu spesies mengalami evolusi (Dailami *et al.* 2018).

Jarak Genetik

Suatu kedekatan antarspesies, intraspesies, maupun antarindividu dapat digambarkan melalui jarak genetik. Dalam penelitian ini, jarak genetik *Monetaria annulus* dihitung menggunakan model *p-distance* dengan aplikasi MEGA 7.0 untuk menentukan jarak genetik *Monetaria annulus* Pantai Nunuhu dan kelompok *ingroup* yang diambil dari Genbank.

Pada sampel penelitian diketahui bahwa MT6_8 dan MT6_10 memiliki jarak genetik 1,8%. Sedangkan MT6_9 juga berjarak 1,8% terhadap MT6_10. Hal ini berbeda dengan sampel MT6_8 dan MT6_9 yang memiliki jarak yang lebih kecil, yaitu 1,0%. Hal ini dapat diartikan bahwa MT6_8 dan MT6_9 lebih berkerabat dekat dibandingkan dengan MT6_10 (Tabel 4). Salah satu hal yang menyebabkan MT6_8 dan MT6_9 lebih berkerabat dekat karena

memiliki komposisi basa nukleotida lebih mirip dibandingkan dengan MT6_10 (Tabel 3). Rata-rata jarak genetik yang dihasilkan oleh *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu dengan *ingroup*-nya adalah 2,69%. Dengan ini, *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu memiliki susunan basa nukleotida yang lebih bervariasi. Salah satu penyebabnya adalah mutasi. Angka tersebut menunjukkan tingkat keragaman genetik *ingroup* rendah karena bernilai kurang dari 3% namun menunjukkan bahwa individu tersebut dan pembandingnya dikatakan identik (Bhattacharjee *et al.* 2012). Perbedaan antarindividu yang sedikit hingga variasi alel terbatas pada gen akan menyebabkan keragaman genetik menjadi rendah dan dapat dikelompokkan menjadi spesies yang sama.

Angka yang dihasilkan pada matriks jarak genetik merupakan pengaruh dari variasi basa nukleotida (Sari *et al.* 2021). Jarak genetik ditentukan oleh banyaknya perubahan basa nukleotida sehingga semakin sering terjadi mutasi yang menandakan semakin jauhnya jarak gen satu dengan yang lain (Strimmer *et al.* 2009).

Hubungan Kekerabatan Melalui Pohon Filogenetik

Konstruksi topologi pohon filogenetik antara sampel penelitian dengan kerabat dekatnya yang merupakan referensi dari Genbank NCBI memperlihatkan bahwa sampel *Monetaria annulus* baik sampel penelitian maupun *ingroup* berkelompok pada satu kluster. Pohon filogenetik yang direkonstruksi dengan metode Neighbour Joining menggunakan dua analisis, yaitu *p-distance* dan Kimura-2-Parameter (K2P). Walaupun terdapat argumentasi bahwa

penggunaan *p-distance* dapat menunjukkan hasil yang lebih baik dari K2P (Srivathsan & Meier 2012), hasil penelitian kami menunjukkan bahwa hasil kekerabatan filogenetik berdasarkan kedua analisis tersebut menunjukkan kesimpulan yang sama. Hasil rekonstruksi filogenetik menghasilkan satu kluster *Monetaria annulus* (Gambar 3). *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu berkelompok menjadi satu kluster kecil. Kemunculan kluster *Monetaria annulus* Pantai Nunuhu ini menunjukkan adanya variasi dari basa nukleotida yang menyebabkan diferensiasi genetik yang direkonstruksi dalam pohon filogenetik.

Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon kekerabatan yang dihasilkan, semua sampel *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu berkumpul menjadi satu clade. *Monetaria annulus* dari China dan Papua tidak mengelompok dengan *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu. Hal ini terjadi karena adanya variasi basa nukleotida, pola diferensiasi, divergensi, jarak genetik, dan laju mutasi yang tinggi. Cytochrome oxidase subunit I memiliki laju perubahan basa nukleotida yang tinggi dan memperlihatkan adanya divergensi sekuens intraspesies sebesar 11,10% pada Filum Moluska (Bucklin *et al.* 2003; Nuryanto & Solihin 2006).

Informasi karakter genetik *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut terutama terkait biogeografi dan evolusi spesies dan kelompok Cypraeidae di kawasan Wallacea. Penelitian yang menggunakan marka DNA mitokondria lainnya atau bahkan melakukan analisis *whole genome sequence* dapat dilakukan untuk memperkaya informasi genetik keong tersebut.

KESIMPULAN

Karakterisasi genetik *Monetaria annulus* dari Pantai Nunuhu, Maluku Utara menggunakan data sekuens gen COI dengan panjang 606 bp memiliki nilai similaritas 99,5% hingga 99,83% dengan data sekuens *Monetaria annulus* pada BOLDsystems. Komposisi basa nukleotida GC memiliki persentase yang lebih rendah, yaitu 42,02% dibandingkan AT yang memiliki persentase 57,98%. Rata-rata jarak genetik dari *Monetaria annulus* Pantai Nunuhu dengan *Monetaria annulus* yang berasal dari China dan Papua adalah 2,69%. Rekonstruksi pohon filogenetik menghasilkan satu kluster yang membagi *Monetaria annulus* Pantai Nunuhu dengan kelompok ingroupnya. Hasil penelitian menunjukkan tingginya variasi genetik pada *Monetaria annulus* asal Pantai Nunuhu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada Heryanto, Nova Mujiono, dan Ibnu W. Laitupa yang telah membantu penulis dalam melakukan ekspedisi di Maluku Utara. Kami juga berterima kasih kepada BKSDA Maluku yang telah memberikan izin penelitian dan SATSDN. Penelitian ini didukung oleh Pendanaan Ekspedisi dan Eksplorasi Gelombang I 2022 (SK Deputi FRI No. 373/II/FR/3/2022) dan Pendanaan *Joint Collaboration Riset Rumah Program Pengungkapan dan Pemanfaatan Biodiversitas Nusantara* (HPPBN), Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan BRIN Gelombang II tahun anggaran 2023 dengan tema khusus Hasil Riset Koleksi Ilmiah (HRKI) sub tema Biosistemika dan Evolusi (SK No. 18/III.5/HK/2023).

DAFTAR PUSTAKA

- Aji, L. P. & Widyastuti, A. (2017). Molluscs Diversity in Coastal Ecosystem of South Biak, Papua. *OLDI (Oseanologi dan Limnologi Di Indonesia)*, 2(1), 25-37.
- Amirulloh, D., Widyaningtyas, S. T. & Bela, B. (2018). Konstruksi Plasmid Pengekspresi Antigen Rekombinan HCV Berbasis Multiepitop untuk Deteksi Antibodi Anti-HCV. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, 28(3), 175-182.
- Bhattacharjee, M. J., Laskar, B. A., Dhar, B. & Ghosh, S. K. (2012). Identification and Re-Evaluation of Freshwater Catfishes Through DNA Barcoding. *Plos One*, 7(11), 1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0049950
- Bucklin, A., Frost, B., Bradford-Grieve, J., Allen, L. & Copley, N. (2003). Molecular Systematic and Phylogenetic Assessment of 34 Calanoid Copepod Species of the Calanidae and Clausocalanidae. *Marine Biology*, 142, 333-343. DOI: 10.1007/s00227-002-0943-1
- Dailami, M., Santi, D., Abubakar, H. & Toha, A. H. A. (2018). Genetic Analisis of Cytochrome Oxidase Subunit 1 Gene Fragment from *Cirrhilabrus cf. ryukyuensis* (Labridae) from Cenderawasih Bay and Raja Ampat. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 18(3), 209-222.
- Dharma, B. (2005). *Recent and Fossil Indonesian Shells*. Hockenheim: ConchBooks.
- Djoemharsjah, I. S., Ambarwati, R. & Rahayu, D.A. (2023). DNA Barcoding *Clithon* sp. (Gastropoda: Neritidae) from Badur Beach, Madura, Indonesia, Based on COI Gene Molecular Marker.

- Biodiversitas*, 24(5), 2779-2787. DOI: 10.13057/biodiv/d240531
- Febiansi, D., Rahmayanti, F., Kurnia, R. N., Silmi, M. A., Dewi, A. K., Millaty, I. N. K. & Trijoko, T. (2018). Species Diversity of Gastropods (Cypraeidae and Conidae) at Krakal Beach, Gunungkidul, Yogyakarta, Indonesia. *Indo Pacific Journal of Ocean Life*, 2(1), 27-32. DOI: 10.13057/oceanlife/o020104
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). On the Pseudoscorpionidea of Australia. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3 (5), 294-299, DOI: 10.1071/ZO9660275
- Foo, S.T. (2019). Ancient Money in Southeast Asia-Part 2. *NSC Highlight*, 12, 11-13.
- Fukumori, H., Itoh, H. & Irie, T. (2019). The Mitochondrial Genome of the Gold-Ringed Cowry *Monetaria annulus* (Mollusca: Gastropoda: Cypraeidae) Determined by Whole-Genome Sequencing. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2), 2305-2307. DOI: 10.1080/23802359.2019.1627946
- Haour, A. & Christie, A. (2019). Cowries in the Archaeology of West Africa: The Present Picture. *Azania: Archaeological Research in Africa*, 54(3), 287-321. DOI: 10.1080/0067270X.2019.1648726
- Heller, J. (2015). Magic, Status and Money. *Sea Snails: A Natural History*, 5(2), 267-283. DOI: 10.1007/978-3-319-15452-7_11
- Holostenco, D. N., Ibram, O., Taflan, E., Ambrosimov, A. & Porea, D. (2022). A Glance on The Molecular Identification of Danube Delta Aquatic Macro-invertebrates. *Scientific Annals of the Danube Delta Institute*, 27(1), 35-40. DOI: 10.7427/DDI.27.04
- Irie, T. (2006). Geographical Variation of Shell Morphology in *Cypraea Annulus* (Gastropoda: Cypraeidae). *Journal of Molluscan Studies*, 72(1), 31-38. DOI: 10.1093/mollus/eyi043
- Ismail, M., Ahmad, A., Nadeem, M., Javed, M.A., Khan, S.H., Khawaish, I., Sthanadar, A.A., Qari S.H., Alghanem, S.M., Khan, K.A., Khan, M.F. & Qamer, S. (2020). Development of DNA Barcodes for Selected Acacia Species by Using rbcL and matK DNA Markers. *Saudi Journal Biological Science*, 27(12), 3735-3742.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. DOI: 10.1098/molbev/msy096
- Kusnadi, A., Triandiza, T. & Hernawan, U. E. (2008). Inventarisasi Jenis dan Potensi Moluska Padang Lamun di Kepulauan Kei Kecil, Maluku Tenggara. *Biodiversitas*, 9(1), 30-34. DOI: 10.13057/biodiv/d090108
- Laimeheriwa, B. M. (2017). Phenetic Relationship Study of Gold Ring Cowry, *Cypraea annulus* (Gastropods: Cypraeidae) in Mollucas Islands Based on Shell Morphological. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 8(3), 1-15. DOI: 10.4172/2150-3508.1000215
- Laimeheriwa, B. M., Khouw, A. S., Natan, Y. L., Limmon, G. V. & Hiariey, J. (2018). Phenotypic Classification of Moluccas Ring Cowrie, *Cypraea annulus* Linn., 1758 (Gastropod: Cypraeidae), Based on Shell Meristical. *Journal of Aquaculture*

- Marine Biology*, 7(2), 80-90. DOI: 10.15406/jamb.2018.07.00189
- Latupeirissa, L. N. & Leiwakabessy, F. (2020). Species Density and Shell Morphology of Gold Ring Cowry (*Monetaria annulus*, Linnaeus, 1758) (Mollusca: Gastropoda: Cypraeidae) in the Coastal Waters of Ambon Island, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(4), 1391-1400. DOI: 10.13057/biodiv/d210417
- Ma, Q., Li, F., Zheng, J., Liu, C., Wang, A., Yang, Y. & Gu, Z. (2023). Mitogenomic Phylogeny of Cypraeidae (Gastropoda: Mesogastropoda). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1-13. DOI: 10.3389/Fevo.2023.1138297
- Nuryanto, A. & Solihin, D. D. (2006). Variasi Sekuens Gen Mitokondrial Sitokrom C Oksidase I dari Siput Lola (*Trochus niloticus*). *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera: A Scientific Journal*, 23(1), 31-37. DOI: 10.20884/1.mib.2006.23.1.143
- Podsiadlo, L. & Polz-Dacewicz, M. (2013). Molecular Evolution and Phylogenetic Implications in Clinical Research. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(3), 455-459.
- Qu, J., Yang, W., Teng, X., Xu, L., Zhang, D., Xing, Z., Wang, S., Liu, X., Wang, L. & Wang, X. (2024). Gene Characterization and Phylogenetic Analysis of Four Mitochondrial Genomes in Caenogastropoda. *Acta Oceanologica Sinica*, 43(2), 137-150. DOI: 10.1007/s13131-023-2258-7
- Rahayu, D. A., Nugroho, E. D. & Listyorini, D. (2019). DNA Barcoding Ikan Introduksi Khas Telaga Sari, Kabupaten Pasuruan. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 7(2), 51-62. DOI: <https://doi.org/10.21776/ub.biotropika.2019.007.02.2>
- Ramses, Thamrin, Nofrizal, Syakti, A. D. & Jhonnerie, R. (2024). DNA Barcoding of Gonggong Sea Snails (*Laevistrombus canarium* Linnaeus, 1758) from Batam Waters, Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation Bioflux*, 16(5), 2528-2537.
- Sari, S. Y., Ambarwati, R. & Rahayu, D. A. (2021). Molecular Characteristics of *Donax faba* (Bivalvia: Donacidae) from Nepa Beach, Madura, Based on Cytochrome Oxidase Subunit I Gene Sequences. *Aquarium, Conservation & Legislation Bioflux*, 14(4), 2416-2426.
- Sigwart, J. D. & Lindberg, D. R. (2015). Consensus and Confusion in Molluscan Trees: Evaluating Morphological and Molecular Phylogenies. *Systematic Biology*, 64(3), 384-395. DOI: 10.1093/sysbio/syu105
- Simone, L. (2004). *Morphology and Phylogeny of the Cypraeoidea (Mollusca, Caenogastropoda)*. Rio de Janeiro: Papel Virtual Editora. DOI:10.13140/2.1.3371.7448
- Srivathsan, A. & Meier, R. (2012). On the Inappropriate Use of Kimura-2-Parameter (K2P) Divergences in the DNA-Barcoding Literature. *Cladistics*, 28, 190-194.
- Strimmer, K., Haeseler, A.V. & Salemi, M. (2009). Genetic Distances and Nucleotide Substitution Models. In P. Lemey, M. Salemi, and A-M. Vandamme (Editors), *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* (pp. 111-141). Cambridge: Cambridge University Press.

- Sujarta, P., Mailissa, M. G., Keiluhu, H. J., Hadisusanto, S. & Yuliana, S. (2022). Community Distribution and Utilization of Gastropods in The Coastal Area of Liki Island, Sarmi District, Papua, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(10), 5001-5011. DOI: 10.13057/biodiv/d231006
- Villamor, S. & Yamamoto, T. (2015a). Population Characteristics of *Monetaria annulus* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Cypraeidae) from Temperate to Tropical Areas. *Aquaculture Science*, 63(3), 273-282. DOI: 10.11233/aquaculturesci. 63.273
- Villamor, S. & Yamamoto, T. (2015b). Reproductive Seasonality of *Monetaria annulus* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Gastropoda: Cypraeidae) in a Temperate Area. *Molluscan Research*, 35(2), 95-101. DOI: 10.1080/13235818.2014.954660
- Wake, Y. W., Bawole, R., Manangkalangi, E., Sembel, L. & Sala, R. (2022). Pola Pertumbuhan Gastropoda *Monetaria annulus* di Teluk Doreri. *Jurnal Kelautan Tropis*, 25(1), 1-10. DOI: 10.14710/jkt.v25i1.12293
- Wendri, Y., Nurdin, J. & Zakaria, I.J. (2019). Komunitas dan Preferensi Habitat Gastropoda Pada Kedalaman Berbeda di Zona Litoral Danau Singkarak Sumatera Barat. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 6(1), 67-74. DOI: 10.24843/Metamorfosa.V06.I01.P11