

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Danau Matano telah diidentifikasi sebagai salah satu sumber utama untuk spesies endemik dalam ekosistem kompleks Danau Malili (Chadijah et al., 2022). Menurut (Adhityatama et al., 2017), Danau Matano merupakan danau terdalam di Asia Tenggara dan kedelapan di dunia yang berfungsi sebagai bukti ekologi global yang memiliki usia sekitar 5 juta tahun. Selain itu, danau ini merupakan situs ekologi yang sangat penting secara global dengan ekosistem yang kaya akan flora dan fauna endemik (Achmad et al., 2020). Oleh karena itu, pemerintah telah menetapkan Danau Matano sebagai cagar wisata alam sesuai dengan Keputusan Menteri Pertanian No. 274/Kpts-UM/1979 (Triwurjani & Adhityatama, 2020). Keunikan spesies endemik yang terdapat di Danau Matano yang telah terisolasi selama jutaan tahun, menegaskan pentingnya perlindungan ekosistem tersebut (Sentosa et al., 2017). Namun, keberadaan dan keberlanjutan ekosistem ini terancam oleh degradasi yang disebabkan oleh alih fungsi lahan yang dapat mempengaruhi habitat organisme endemik secara signifikan (Chadijah et al., 2022). Selain itu, Danau Matano dikelilingi oleh beberapa daerah tangkapan air yang berfungsi sebagai sumber kehidupan bagi ekosistem di sekitarnya (Hadiaty & Wirjoatmodjo, 2002).

Daerah tangkapan air (DTA) merupakan komponen utama dalam sistem perairan karena berperan penting dalam mengumpulkan air hujan yang kemudian dialirkan menuju sungai, danau atau badan air lainnya (Gultom et al., 2022). Keberadaan DTA yang relatif kecil dengan luas 436 km² dengan titik tertinggi 1.400–1.700 meter di atas permukaan laut serta permukaan danau 382 meter di atas permukaan laut (Crowe et al., 2008). Proses ini terjadi di Danau Matano, dimana air dari DTA berperan dalam proses masuk dan keluarnya air di badan air utama termasuk dalam siklus hidrologi yang berlangsung. Selain itu, DTA juga berfungsi sebagai kawasan penting untuk mendukung aktivitas penelitian dan eksplorasi organisme akuatik yang hidup di ekosistem tersebut (Dawidek & Ferencz, 2024). Hasil kajian menunjukkan bahwa aktivitas seperti penambangan, pemukiman, dan pertanian di sekitar DTA Danau Matano yang akan berdampak pada penurunan kualitas air dan merusak ekosistem perairan di wilayah tersebut (Hatta et al., 2022). Salah satu organisme akuatik yang menjadi perhatian khusus di DTA Danau Matano adalah kepiting air tawar endemik yang memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem perairan dan menjadi indikator kualitas lingkungan di wilayah tersebut (Junardi et al., 2020).

Spesies kepiting yang dilaporkan dari Danau Matano mencakup *Nautilothelphusa zimмери* (Balss, 1933), *Parathelphusa pantherina* (Schenkel, 1902), *P. pallida* (Schenkel, 1902), *P. ferruginea* (Chia & Ng, 2006), *Syntripisa matannensis* (Schenkel, 1902), *S. flavichela* (Chia & Ng, 2006). Dari jumlah tersebut, lima spesies diketahui endemik di kompleks danau purba Malili dan telah dinilai sebagai spesies terancam punah menurut daftar merah IUCN sedangkan satu spesies yakni *P. pallida* endemik di wilayah Sulawesi yang lebih luas dan

dinilai dalam kategori risiko rendah (*least concern*) (C. Schubart 2018a; C. Schubart 2018b; C. Schubart 2018c; C. Schubart 2018d; C. Schubart 2018e; Esser & Cumberlidge 2008). Spesies kepiting endemik yang terdapat di Danau Matano menunjukkan penurunan yang signifikan setiap tahunnya. Tahun 2012 telah dilaporkan terdapat empat spesies endemik yang teridentifikasi yaitu: *P. pantherina*, *P. ferruginea*, *S. flavichela*, dan *N. zimmeri*. Namun, pada tahun 2017 jumlah spesies tersebut berkurang menjadi tiga dengan spesies yang masih teridentifikasi mencakup *P. pantherina*, *S. matanensis* dan *N. zimmeri*. Penurunan jumlah spesies ini menunjukkan adanya ancaman serius terhadap keberlanjutan ekosistem perairan di Danau Matano yang kemungkinan disebabkan oleh faktor lingkungan serta aktivitas manusia (Rintelen et al., 2012; Sentosa et al., 2017).

Parathelphusa merupakan salah satu genus kepiting air tawar yang memainkan peran penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem perairan dan berfungsi sebagai indikator kualitas lingkungan, terutama di daerah tangkapan air (DTA) Danau Matano (Wulandari et al., 2023). Namun, penelitian menunjukkan bahwa populasi *Parathelphusa* di Danau Matano mengalami penurunan yang signifikan akibat berbagai ancaman ekologis (Hilgers et al., 2018; Kusumadewi et al., 2024). Salah satu faktor utama penurunan populasi *Parathelphusa* adalah kehadiran ikan invasif seperti ikan louhan (*Cichlasoma*) yang dilepaskan ke Danau Matano antara tahun 2005 hingga 2010. Sebagai hibrida dari ikan cichlid asal Amerika Selatan, ikan ini dengan cepat menyebar dan menjadi spesies dominan di kompleks Danau Malili, khususnya Danau Mahalona dan Danau Towuti pada tahun 2012 (Haase et al., 2023; Rintelen et al., 2012). Ikan louhan ini diduga memangsa ikan kecil dan invertebrata termasuk kepiting dan udang sehingga mengancam keberlangsungan hidup spesies endemik di ekosistem Danau Matano (Hilgers et al., 2018). Faktor lain yang diduga turut berkontribusi terhadap penurunan populasi *Parathelphusa* di DTA Danau Matano adalah degradasi lingkungan yang ditandai oleh menurunnya kualitas air dan berkurangnya ketersediaan sumber makanan (Sentosa et al., 2018). Keberlangsungan hidup *Parathelphusa* sangat bergantung pada stabilitas kondisi lingkungan, terutama kualitas air dan ketersediaan sumber daya makanan di DTA Danau Matano (Ng et al., 2016). Genus *Parathelphusa* memiliki banyak spesies yang secara morfologi mirip yang dapat diidentifikasi menggunakan taksonomi klasik serta DNA barcoding.

Taksonomi klasik merupakan metode sistematis yang mengelompokkan organisme ke dalam kategori atau taksa tertentu berdasarkan kesamaan sifat morfologi yang dapat diamati seperti bentuk, warna dan karakter fisik lainnya (Suranto, 2000). Namun, pendekatan ini memiliki keterbatasan karena kemiripan antarspesies sering kali menyulitkan identifikasi dan ciri-ciri morfologi khas dapat hilang akibat adaptasi terhadap lingkungan (Prehadi et al., 2015). Untuk mengatasi keterbatasan tersebut diperlukan metode identifikasi yang lebih akurat seperti DNA barcoding. Teknik DNA barcoding memungkinkan identifikasi spesies yang morfologinya serupa baik di lingkungan laut maupun air tawar (Hikam et al., 2021). Contohnya yang telah berhasil diterapkan pada berbagai organisme seperti udang

air tawar (Jurniati et al., 2020), kepiting air tawar (Sinaga et al., 2024) dan gastropoda (Saleky et al., 2020). Namun, penggunaan DNA barcoding secara khusus pada kepiting endemik di DTA Danau Matano belum pernah dilakukan. Penelitian sebelumnya tentang kepiting endemik di Danau Matano (Rintelen et al., 2012; Sentosa et al., 2017) terbatas pada spesies *Parathelphusa* dan tidak mencakup wilayah DTA yang lebih luas. Oleh karena itu, penelitian ini merupakan laporan pertama yang mengintegrasikan taksonomi klasik dengan DNA barcoding untuk mengidentifikasi kepiting endemik di DTA Danau Matano. Pendekatan gabungan tersebut menghasilkan identifikasi spesies yang akurat, memberikan pemahaman lebih mendalam tentang keanekaragaman hayati, dan menjadi dasar ilmiah bagi upaya konservasi berkelanjutan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a) Bagaimana karakteristik morfologi dan molekuler (DNA barcode) *Parathelphusa* sp. di daerah tangkapan air Danau Matano, Sulawesi Selatan?
- b) Bagaimana hubungan kekerabatan *Parathelphusa* sp. (berdasarkan hasil DNA barcoding) dengan kepiting lainnya yang ada di Genbank (pohon filogenetik)?
- c) Bagaimana kesesuaian identifikasi *Parathelphusa* sp. di daerah tangkapan air Danau Matano secara morfologi dan berdasarkan DNA barcoding (COI)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a) Mengidentifikasi karakteristik morfologi dan molekuler (DNA barcode COI) *Parathelphusa* sp. yang ditemukan di daerah tangkapan air Danau Matano, Sulawesi Selatan.
- b) Menganalisis hubungan kekerabatan *Parathelphusa* sp. (berdasarkan hasil barcoding) dengan kepiting lainnya yang ada di GenBank (pohon filogenetik).
- c) Mengevaluasi kesesuaian identifikasi *Parathelphusa* sp. di daerah tangkapan air Danau Matano secara morfologi dengan identifikasi berdasarkan DNA barcoding (COI).

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan informasi/referensi dasar dalam merancang strategi pengelolaan yang lebih efektif untuk menjaga kelestarian spesies kepiting *Parathelphusa* sp. dan mencegah terjadinya kepunahan spesies endemik yang ada di daerah tangkapan air Danau Matano.

1.5 Teori

1.5.1 Morfologi Kepiting Air Tawar

Kepiting merupakan salah satu hewan makrobentos yang berperan penting dalam ekosistem perairan. Menurut Kusumaningsari et al. (2015), keberadaan makrobentos, termasuk kepiting, dapat mempercepat proses dekomposisi material organik, sehingga berkontribusi terhadap siklus nutrisi di perairan. Secara morfologi, kepiting memiliki ciri khas berupa bagian pereopod yang mengalami modifikasi menjadi sepasang capit, sementara kaki jalan terletak di bagian samping tubuhnya. Identifikasi spesies kepiting dapat dilakukan dengan mengamati beberapa karakter morfologis utama, seperti bentuk dan struktur *carapace*, *front*, *carapace margin*, *orbits*, *eyes*, *antenna*, *pereiopods*, *thoracic* serta *sternites* (Eprilurahman et al., 2015). Selain itu, kepiting air tawar memiliki dimorfisme seksual yang dapat dibedakan berdasarkan bentuk luar tubuhnya. Secara morfologi, kepiting air tawar betina memiliki abdomen berbentuk lonceng dengan ujung yang agak tumpul dan lebar, sedangkan kepiting air tawar jantan memiliki abdomen berbentuk huruf "T" terbalik dengan ujung yang meruncing (Idola et al., 2018). Karakteristik bagian anterolateral tepi karapaks yang memiliki tiga duri yang jelas merupakan ciri khas dari genus *Parathelphusa* (Ng, 2004; Ng, 1997). Perbedaan ini penting dalam studi ekologi dan reproduksi kepiting, karena bentuk abdomen berkaitan erat dengan fungsi biologis, seperti perlindungan telur pada betina.

1.5.2 Klasifikasi *Parathelphusa* sp.

Kepiting *Parathelphusa* sp. merupakan spesies kepiting yang menjalani seluruh siklus hidupnya di perairan tawar. Sebagai makroinvertebrata, kepiting ini memiliki peran ekologis penting dalam ekosistem perairan tawar, berfungsi sebagai omnivora dan detritivor dalam rantai makanan. Selain itu, beberapa spesies kepiting air tawar yang hanya ditemukan di perairan bersih dapat digunakan sebagai indikator biologis pencemaran (Cumberlidge, 2009). Kepiting air tawar juga memiliki potensi ekonomi, antara lain sebagai pakan ternak dan bahan untuk pengobatan penyakit hati pada ayam broiler (Wibosono, 2008).

Berdasarkan (DeMan, 1879) bahwa spesies *Parathelphusa* sp. memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Subfilum	: crustacea
Class	: Malacostaca
Order	: Dekapoda
Family	: Gacarcinucidae
Genus	: Parathelphusa



Gambar 1. *Parathelphusa* sp.
(Dokumentasi pribadi)

1.5.3 DNA Barcoding

Barcoding DNA merupakan salah satu teknik taksonomi yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi organisme dengan penanda genetik spesifik yang mengacu pada penamaan spesies (Lima et al., 2018; DeSalle & Goldstein 2019). Sebagai dasar untuk mengidentifikasi perbedaan antar makhluk hidup, barcoding DNA menggunakan perbedaan nukleotida yang terdapat pada lokus gen tertentu, yang dapat diamplifikasi dengan mudah dan unik untuk tiap spesies (Maloukh et al., 2017; Hashim et al., 2020). Selain itu, spesies dapat diidentifikasi melalui barcoding DNA, baik dalam stadium telur, larva, atau dewasa (Briski et al., 2011).

Berdasarkan Kress (2017), barcoding DNA dapat digunakan untuk menjawab banyak pertanyaan penting tentang sistematika, ekologi, biologi, dan konservasi evolusioner. Ini termasuk perakitan komunitas, jaringan interaksi spesies, penemuan taksonomi, menilai area prioritas untuk perlindungan lingkungan, sebagai botani forensik dalam pengaturan lalu lintas spesies yang terancam punah, dan memantau produk komersial, seperti makanan dan suplemen herbal. Ada beberapa tahap proses DNA barcoding diantaranya adalah isolasi sampel, ekstraksi DNA, Amplifikasi DNA barcode menggunakan PCR, Elektroforensis, dan sequencing DNA (Sunaryo et al., 2015).

1.5.4 COI (*cytochrome Oxidase Subunit I*)

Gen *cytochrome oxidase subunit I* (COI) adalah penanda genetik mitokondria yang berkembang pesat, digunakan secara luas untuk memeriksa hubungan antara populasi dan spesies yang berkerabat dekat. (Kononov et al. 2016; Cock et al. 2017; Otim et al. 2018). Sekitar 650 pasang basa dari segmen gen *cytochrome oxidase subunit I* (COI) mitokondria digunakan untuk mengidentifikasi atau menunjukkan DNA barcoding (Hebert et al., 2003). COI diambil langsung dari indukan betina tanpa proses rekayasa dan memiliki peran dalam respirasi tingkat seluler dan metabolisme energi. Karena itu, COI memiliki sifat konservasi dan dianggap mampu menunjukkan keberadaan suatu organisme. Selain itu, gen COI merupakan bagian dari bahan genetik mitokondria yang sering digunakan sebagai penanda spesies (Permadi et al., 2022).

Gen terstandar 655-bp gen cytochrome C oxidase I (COI), yang dapat mengidentifikasi spesies dengan tingkat kesesuaian tinggi, adalah salah satu genom testandarisasi yang paling umum digunakan (Abdullah et al., 2019). Dua keunggulan utama dari gen COI yaitu (1) primer-primer universal untuk gen ini memiliki kemampuan sangat kuat, sehingga mampu mencakup ujung 5' dari sebagian besar atau keseluruhan filum hewan (2) gen COI memiliki rentangan sinyal filogenetik yang lebih besar dibandingkan dengan gen mitokondrial lainnya. Evolusi pada gen ini cukup cepat untuk menunjukkan perbedaan tidak hanya untuk spesies yang berkerabat dekat, tetapi juga antara kelompok geography dalam suatu spesies tunggal (Rasmussen et al., 2009).

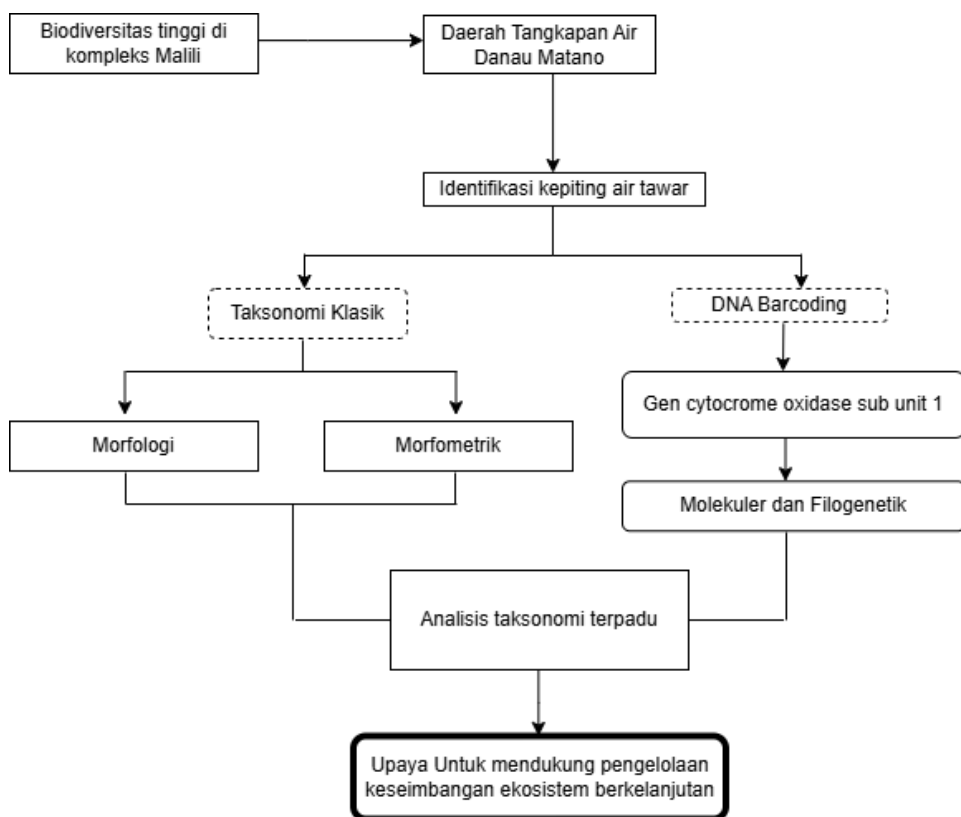
1.5.5 Filogenetik

Filogenetik merupakan suatu metode yang umum digunakan dalam mengetahui keanekaragaman suatu organisme melalui rekonstruksi hubungan kekerabatan. Proses evolusi organisme digambarkan dalam sistem percabangan yang dikenal sebagai pohon filogenetik. Karakter yang sama digunakan untuk menganalisis hubungan antar spesies yang diamati (Dharmayanti, 2011). Filogenetik didefinisikan sebagai model untuk merepresentasikan sekitar hubungan nenek moyang organisme, sekuen molekul, atau keduanya. Tujuan penyusunan filogenetik adalah untuk mengonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi antara satu nenek moyang dan keturunannya (Zhou et al., 2020; Wu et al., 2020).

Untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan, filogenetik molekuler menggunakan biologi molekuler dan statistik. Analisis filogenetik molekuler adalah proses bertahap yang melibatkan pengolahan data sekuen DNA atau protein. Hasilnya menunjukkan perkiraan hubungan evolusi antara kelompok organisme tertentu. Topologi pohon filogenetik memiliki nilai bootstrap yang rendah, tetapi memberikan klarifikasi yang lebih besar daripada pengelompokan dengan karakter morfologi, menurut Chatrou dkk. (2012). Berbagai masalah yang terkait dengan tingkat evolusi dalam karakter morfologi dapat diselesaikan dengan menggunakan topologi pohon filogenetik. Jika digunakan bersama dengan penanda molekuler DNA lainnya, penanda molekuler DNA biasanya memberikan topologi dan signal yang lebih baik dalam pengelompokan pohon filogenetik (Pirie et al., 2007).

1.6 Kerangka Pikir

Informasi tentang spesies dari genus *Parathelphusa* masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dalam penelitian ini diperlukan untuk melakukan identifikasi spesies *Parathelphusa* yang berasal dari daerah tangkapan air (DTA) Danau Matano menggunakan teknik taksonomi dan DNA barcoding. Hasil dari penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi untuk pengelolaan ekosistem yang berkelanjutan. Rician sistematisnya dapat dilihat pada Gambar 1.

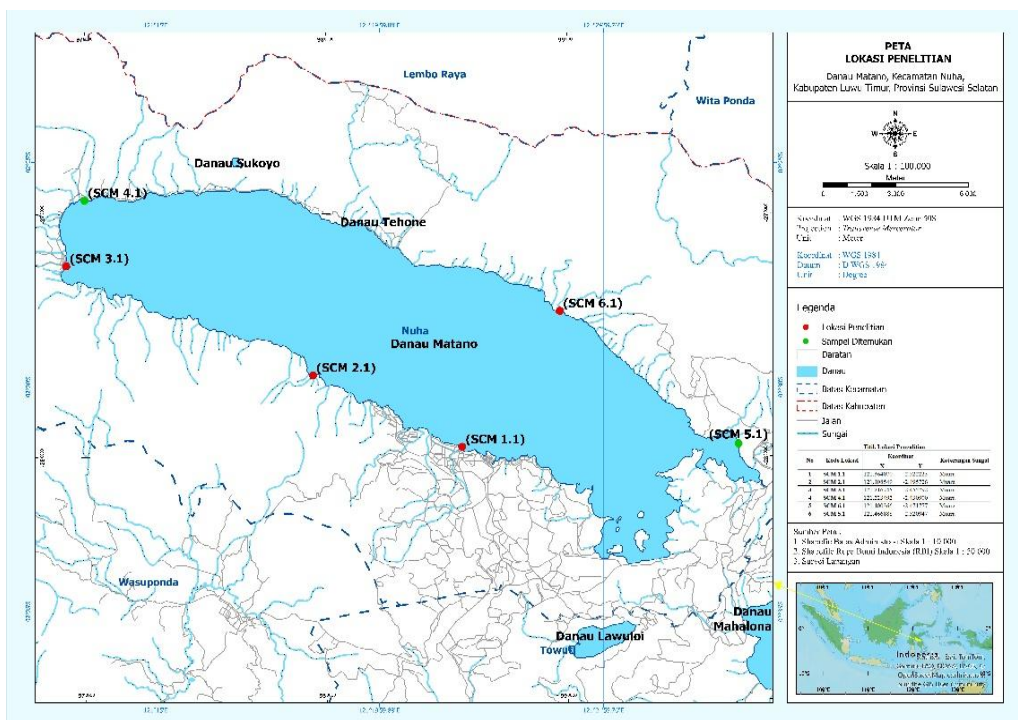


Gambar 2. Kerangka Pikir Penelitian

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Juni hingga September 2024. Pengambilan spesimen dilakukan di enam sungai di daerah tangkapan air Danau Matano, Sulawesi Selatan (Gambar 2). Analisis morfologi dilakukan di Laboratorium Biologi Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. Pengujian sampel untuk ekstraksi DNA dan PCR dilakukan di Laboratorium Biodiversitas Indonesia (BIONESIA), Ubung Kaja, Kota Denpasar, Bali. Sekuensing DNA dilakukan di PT Genetika Science di Jakarta.



Gambar 3. Lokasi Penelitian di Danau Matano

Lokasi (SCM 1) dan lokasi (SCM 3) memiliki karakteristik lingkungan yang serupa yaitu kedekatan dengan pemukiman warga. Di area tersebut ditemukan banyak sampah rumah tangga termasuk plastik serta nutrien yang melimpah sehingga kehadiran ikan invasif dibagian muara sungai yang dominan. Perbedaan antara kedua lokasi ini terletak pada (SCM 1) yang digunakan sebagai tempat bersandarnya kapal nelayan, sedangkan (SCM 3) memiliki substrat yang didominasi oleh lumpur berpasir. Sementara itu, lokasi (SCM 2) terletak dekat dengan perkebunan, dengan aliran sungai yang tidak deras dan ikan invasif yang juga ditemukan di kawasan muara. Sebaliknya, lokasi (SCM 4) dan lokasi (SCM 5)

menunjukkan kondisi lingkungan yang hampir identik yaitu arus deras dan air yang jernih yang memiliki suhu relatif stabil, jauh dari pemukiman warga serta ikan invasif tidak terlihat di kawasan muara. Lokasi (SCM 6) memiliki air yang jernih dan aliran sungai yang deras. Namun, di muara air mengalir cukup tenang dan dekat dengan peternakan warga. Dokumentasi kondisi lingkungan di setiap lokasi sampling dapat dilihat pada Lampiran 2.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah jangka sorong digital ketelitian 0,1 mm yang digunakan untuk mengukur karakter-karakter morfometrik spesimen, buku identifikasi untuk petunjuk identifikasi berdasarkan morfologi, spidol *permanent marker* untuk labeling wadah dan label sampel, plastik klip/ziplock untuk menyimpan organisme yang ditemukan yang telah diberikan etanol 96%, *coolbox* untuk menyimpan spesimen agar suhu tetap terjaga, dan kamera digital untuk dokumentasi. Alat yang digunakan untuk preparasi sampel yaitu: tube ukuran 1,5 ml, etanol 96%, pisau, pinset, gunting, styrofoam, sarung tangan/*gloves*, tissu towel, dan parafilm. Alat untuk proses molekuler yaitu: vortex, sentrifuge, heating block, gelas beker, meja kerja steril, PCR tube (*thermocycler*), alat elektroforesis dan UV transilluminator. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: jaringan otot/daging kepiting, etanol 96%, QIAGEN Kits, Tris- EDTA (TE) Buffer, gel agarose 1%, pewarnaan *Nucleic Acid Gel Stain (GelRed®)*, aquades, dan primer universal yaitu: primer *forward* LCO1490 (5'-GGTCA ACAA TCATA AAGAT ATTGG-3') dan primer *reverse* HCO2198 (5'-TAAAC TTCAG GGTGA CCAA AAATC A-39) (Folmer et al., 1994).

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Pengambilan Spesimen

Pengambilan spesimen kepiting endemik dilakukan di enam lokasi sungai yang berada di sekitar Danau Matano yang tercantum dalam Lampiran 2. Berdasarkan hasil pengamatan, ditemukan tiga spesimen *Parathelphusa* sp. di dua lokasi pengambilan spesimen yaitu, dua spesimen di SCM 4 dan satu spesimen di SCM 5 (Gambar 2). Spesimen diperoleh dengan bantuan nelayan lokal. Setiap spesimen yang dikumpulkan kemudian didokumentasikan, diberi label penanda dan ditempatkan dalam plastik klip/ziplock yang berisi etanol 96% untuk menjaga kualitas dan stabilitas spesimen. Spesimen tersebut kemudian disimpan dalam kotak pendingin/*coolbox* agar suhu pada spesimen tetap terjaga hingga proses preparasi dan pengukuran morfologi di laboratorium.

Setibanya di Laboratorium Biologi Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan diambil sampel jaringan dari setiap spesimen untuk analisis genetik. Jaringan tubuh diambil secukupnya dari sisi kanan abdomen menggunakan penjepit steril kemudian ditempatkan dalam microtube 1,5 ml yang berisi etanol 96%. Sampel jaringan

tersebut kemudian dikirim ke Laboratorium Bionesia Denpasar Bali untuk proses DNA barcoding.

2.3.2 Morfologi dan Morfometrik

Analisis karakteristik morfologi spesimen *Parathelphusa*, mengacu pada (Chia & Ng, 2006). Pengukuran morfometrik dilakukan di Laboratorium Biologi Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, Makassar. Identifikasi morfometrik mengikuti referensi (Junardi et al., 2020 dan Keenan et al., 1998) Karakteristik morfometrik yang diukur (menggunakan pengukur digital/ jangka sorong, ketelitian 0,1 mm) dapat dilihat pada (Gambar 3). Data morfometrik dianalisis secara deskriptif untuk setiap spesimen *Parathelphusa* yang ditemukan.



Gambar 4. Parameter morfometrik dari *Parathelphusa* sp. dari DTA Danau Matano
Ket : PK = panjang karapaks; LK = lebar karapaks; LKP = lebar karapaks posterior; LF = lebar frontal; PS = panjang sternum; LS = lebar sternum; PC = panjang carpus; LP = lebar propodus; PH = panjang chela; PP = panjang propodus mayor; dan PT = panjang total.

2.3.3 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA adalah proses yang bertujuan untuk memisahkan materi genetik dari sel termasuk membran sel, RNA, dan protein lainnya. Prosedur ini merupakan metode dasar yang sangat penting dan berperan besar dalam menentukan keberhasilan serangkaian aktivitas molekuler (Sari & Restanto, 2022). Metode ekstraksi yang digunakan mengikuti protokol Geneaid. Pertama, jaringan kepiting sebanyak 30 mg diambil menggunakan pinset, lalu dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi berukuran 1,5 ml, dan ditambahkan 200 µl *GT Buffer*. Selanjutnya, ditambahkan 20 µl *proteinase*, lalu di-vortex selama 15 detik, dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Tahap berikutnya adalah lisis (penghancuran), dimana sampel yang sudah diinkubasi, ditambahkan 200 µl *GBT Buffer* lalu di-vortex selama 5 detik. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit dengan vortex setiap 10 menit sehingga pada waktu bersamaan larutan 200 µl *Elution Buffer* (EB) per-sampel dipanaskan pada suhu 60°C yang

akan digunakan untuk langkah elusi DNA. Tahap binding (pengikatan) dimulai dengan menambahkan 200 μ l etanol *absolut* ke dalam lisat lalu di-vortex selama 10 detik kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Jika presipitat/endapan muncul maka endapan tersebut dihancurkan dengan pipet. Selanjutnya, *GS column* ditempatkan pada tabung koleksi 2 ml kemudian campuran tersebut (termasuk presipitat/endapan) dipindahkan ke dalam *GS column*, lalu dicentrifuge pada 14.000 rpm selama 2 menit. *Collection tube* yang berukuran 2 ml yang telah digunakan dibuang lalu *GS column* dipindahkan ke 2 ml *collection tube* yang baru. Tahap ketiga adalah wash (pencucian), 400 μ l buffer dimasukkan ke *GS column* lalu dicentrifuge 14.000 rpm selama 30 detik. Selanjutnya cairan dibuang, kemudian *GS column* dimasukkan kembali ke dalam tabung koleksi 2 ml. Selanjutnya, ditambahkan 600 μ l *wash buffer* (etanol sudah ditambahkan) ke dalam *GS column* lalu dicentrifuge pada 14.000 rpm selama 2 menit 30 detik. Selanjutnya, cairan dibuang lalu diletakkan kembali *GS column* ke dalam tabung koleksi 2 ml. Kemudian, dicentrifuge selama 3 menit pada 14.000 rpm untuk mengeringkan *column matrix*. Tahap keempat adalah *DNA Elution*, *GS column* yang kering dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi yang baru berukuran 1,5 ml lalu ditambahkan 100 μ l *Elution Buffer/TE* yang telah dipanaskan ke bagian tengah *column matrix*. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 60°C selama 25 menit. Kemudian dicentrifuge pada 14.000 rpm selama 1 menit untuk elusi DNA murni.

2.3.4 Amplifikasi DNA/ *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Hasil ekstraksi kemudian dianalisis ke tahapan selanjutnya yaitu PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Proses PCR menggunakan protokol laboratorium BIONESIA. Primer yang digunakan pada proses amplifikasi untuk sampel kepiting adalah LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3') dan HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'). Total reaksi PCR adalah 26 μ L yang terdiri dari campuran: 2 μ L *template* DNA dari hasil ekstraksi, 1,25 μ L setiap primer dalam konsentrasi 10 mM, 9 μ L ddH₂O, dan 12,5 μ L *Ready mix* (dntp, mgcl, larutan buffer, dan taq polimerase). Campuran reaksi tersebut kemudian diamplifikasi menggunakan mesin Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler machine. Proses PCR dimulai dengan tahap denaturasi awal: pada suhu 94°C selama 3 menit. Selanjutnya, dilakukan siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, diikuti dengan tahap *annealing* pada suhu 55-61°C selama 30 detik, dan tahap *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit. Siklus denaturasi, *annealing*, dan *extension* ini diulang sebanyak 38 kali. Kemudian, tahap terakhir yaitu *final extension* dilakukan pada suhu 72°C selama 2 menit. Hasil PCR divisualisasikan melalui elektroforesis pada 1% gel agarose dengan pewarnaan *nucleic acid gel stain* (*GelRed®*).

2.3.5 Sekuensings DNA

Sampel PCR yang telah teramplifikasi yang menghasilkan sampel positif (memendarkan pita DNA) kemudian dilakukan proses pembacaan DNA

(sequencing) di PT. Genetics Science Jakarta melalui kerja sama dengan Yayasan Biodiversitas Indonesia (BIONESIA). Proses sekuensing DNA dilakukan menggunakan metode Sanger dideoksi (Sanger et al., 1977)

2.4 Analisis Data

Data morfometrik ditabulasi dan dianalisis secara deskriptif menggunakan Microsoft Excel 2021. Hasil sequencing dianalisis menggunakan MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Urutan nukleotida untuk setiap spesimen dibersihkan, disejajarkan dan digabungkan untuk menghasilkan barcode DNA untuk setiap spesimen. Urutan homolog terdekat untuk setiap barcode kepiting diperoleh dari database nukleotida GenBank NCBI melalui BLASTn (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan *highly similar sequences*. Urutan nukleotida spesimen kepiting dari DTA Matano dan aksesori homolog GenBank yang diperoleh (Lampiran 3) kemudian disejajarkan (ClustalW) dan dibuatkan pohon filogenetik menggunakan metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi bootstrap (Kimura, 1980). Pohon filogenetik kemudian diedit menggunakan alat daring Interactive Tree of Life (IToL) Versi 5 (Letunic & Bork, 2021).