

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Permintaan terhadap lobster air tawar (*Cherax* sp.) baik di pasar lokal maupun ekspor terus meningkat. Hal ini menjadikan budidaya lobster air tawar sebagai peluang bisnis yang sangat menguntungkan (Hakim, 2007; Miptah et al., 2024). Namun, ada beberapa tantangan utama dalam budidaya lobster air tawar, salah satunya adalah kompleksitas pemeliharaan. Masalah klasik yang sering dihadapi oleh pembudidaya adalah rendahnya sintasan terutama pada fase awal pertumbuhan yang disebabkan oleh berbagai faktor (Fahrudin et al., 2022). Salah satu penyebab utama masalah ini adalah minimnya informasi tentang indukan berkualitas (Ernawati dan Krisbiantoro, 2014).

Di Indonesia, keberadaan *Cherax* belum banyak dikenal di kalangan masyarakat (Budi, 2019). Sementara itu kebutuhan nasional lobster air tawar mencapai 6-8 ton perbulan dengan restoran penyerap utamanya (Miptah et al., 2024). Jumlah ketersediaan tidak sebanding dengan tingkat permintaan yang sangat tinggi, hal ini diakibatkan oleh banyaknya kendala dalam proses budidaya. Salah satunya adalah kurangnya informasi mengenai jenis *Cherax* membuat kegiatan budidaya belum berjalan secara optimal, terutama karena beberapa jenis lobster air tawar memiliki pertumbuhan yang lambat dan tingkat sintasan yang rendah (Jones et al., 2000). Selain itu, banyaknya jumlah spesies *Cherax* menjadi tantangan dalam menentukan strategi pengelolaan yang tepat di masa depan (Kurniasih, 2008). Oleh karena itu, sangat penting untuk mengetahui jenis *Cherax* yang akan dibudidayakan guna mencapai hasil budidaya yang optimal.

Salah satu upaya untuk mengoptimalkan budidaya *Cherax* di perairan Sulawesi Selatan adalah dengan mengidentifikasi spesies *Cherax* yang terdapat di wilayah tersebut. Langkah ini bertujuan untuk memperoleh indukan yang berkualitas secara genetik. Penentuan keragaman *Cherax* dapat dilakukan melalui pendekatan morfologi dan genetik. Beberapa jenis *Cherax* sulit dibedakan hanya berdasarkan morfologi, sehingga diperlukan identifikasi genetik menggunakan DNA. Identifikasi morfologi pada spesies krustasea sering kali rumit karena karakteristik morfologinya dipengaruhi oleh faktor lingkungan, perubahan siklus hidup, jenis kelamin, dan dominasi sosial (Hidayani et al., 2015; Page dan Hughes, 2011). Selain itu, karakter identifikasi yang tersedia terbatas, dan banyak diantaranya bersifat umum untuk spesies udang dan kepiting (Fransen et al., 2010). Oleh karena itu, pendekatan lain diperlukan untuk identifikasi yang lebih akurat. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah identifikasi DNA barcoding (Sharma et al., 2014; Chen et al., 2009). DNA barcoding merupakan metode yang efektif untuk memverifikasi spesies yang memiliki kemiripan morfologi tetapi berbeda secara genetis (Trivedi et al., 2016). Metode ini juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies pada berbagai tahap kehidupan, seperti telur, larva, dan dewasa (Briski, 2011).

Metode DNA barcoding yang berdasar pada urutan nukleotida parsial dari gen mitokondria 16S rRNA yang sering digunakan dalam studi filogenetik dan DNA

barcoding untuk mengidentifikasi berbagai organisme. Gen 16S rRNA mitokondria memiliki wilayah yang sangat terkonservasi dan wilayah variabel yang memungkinkan perbedaan antar spesies, sehingga sangat cocok digunakan untuk identifikasi spesies. Gen ini dapat digunakan sebagai penanda molekuler yang kuat untuk identifikasi spesies dan analisis filogenetik, terutama ketika sampel mungkin berasal dari berbagai taksa yang berbeda secara filogenetik (Vences et al., 2005). Keuntungan utama dari penggunaan gen 16S rRNA adalah kemampuannya untuk memberikan resolusi yang cukup untuk diskriminasi spesies yang berkerabat dekat. Tantangan termasuk desain primer yang dapat diterapkan secara luas dan kemampuan penanda genetik untuk memberikan resolusi tingkat spesies yang memadai (Chan et al., 2022) gen mitokondria 16S rRNA merupakan bagian dari bahan genetik mitokondria yang sering digunakan sebagai penanda spesies pada sistem ketertelusuran produk perikanan. Gen mitokondria 16S rRNA ini diperbanyak dari jaringan ikan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer universal (Nugraha et al., 2022). Gen mitokondria 16S rRNA merupakan salah satu gen mitokondria untuk membantu konstruksi dari pohon filogeni yang dapat bertindak sebagai gen marker. Gen mitokondria 16S rRNA memiliki keakuratan dalam mengidentifikasi spesies dan umumnya digunakan sebagai “DNA Barcoding” (Hidayani et al., 2020).

Kurangnya informasi mengenai keragaman *Cherax* di Indonesia, khususnya di Sulawesi Selatan, menjadikan penelitian ini sangat penting untuk menentukan keragaman secara morfologi dan genetik, guna memperoleh indukan yang berkualitas secara genetik untuk mendukung budidaya yang optimal. Saat ini, penentuan keragaman *Cherax* secara genetik di Sulawesi Selatan belum pernah dilakukan, sehingga diharapkan penelitian ini dapat menjadi sumber informasi yang mendukung budidaya yang lebih optimal, serta memberikan wawasan mengenai keragaman genetik *Cherax* yang dapat digunakan untuk memetakan distribusinya. Informasi mengenai keragaman morfologi dan genetik ini dapat digunakan untuk menyusun strategi pengelolaan yang tepat terkait spesies dan hubungan kekerabatan yang akurat secara molekuler.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dipaparkan di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana karakter morfologi dan molekuler lobster air tawar yang berada di lokasi budidaya Sulawesi Selatan.
2. Bagaimana hubungan kekerabatan lobster air tawar (berdasarkan hasil barcoding) dari lokasi budidaya Sulawesi Selatan dengan lobster air tawar sejenis yang ada di GenBank (pohon filogenetik)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menganalisis hasil identifikasi karakter morfologi dan molekuler lobster air tawar yang berada di lokasi budidaya Sulawesi Selatan.
2. Menganalisis hubungan kekerabatan lobster air tawar (berdasarkan hasil barcoding) dari lokasi budidaya Sulawesi Selatan dengan lobster air tawar sejenis yang ada di GenBank (pohon filogenetik)

1.4 Kegunaan Penelitian

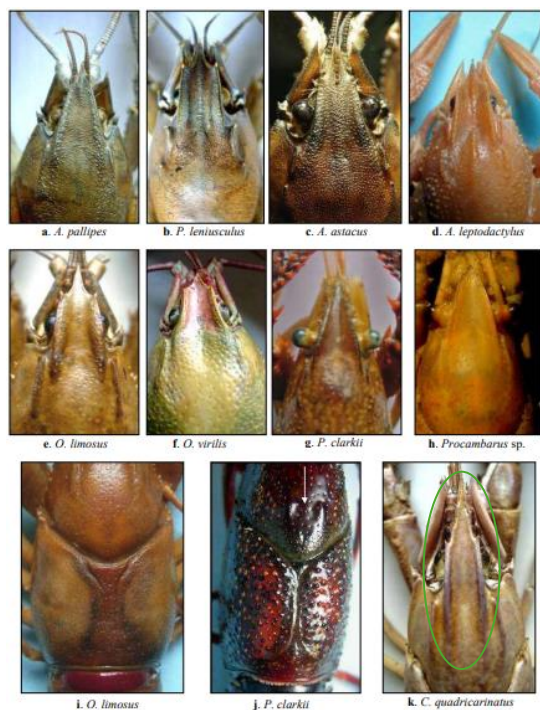
Menjadi sumber informasi pengembangan budidaya yang lebih baik berdasarkan dari informasi indukan yang berkualitas yang didapatkan dengan pendekatan metode pengamatan morfologi dan identifikasi DNA barcoding sebagai dasar dalam kegiatan pemuliaan.

1.5 Teori

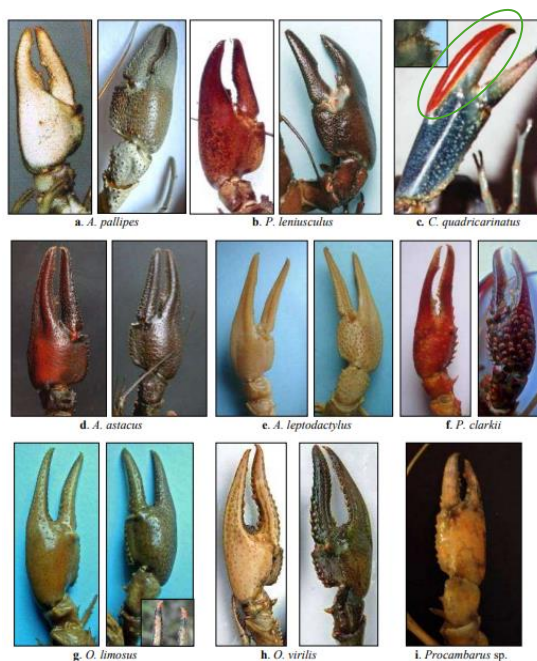
1.5.1 Morfologi Lobster Air Tawar

Lobster adalah *avertebrata* yang termasuk dalam filum *arthropoda* dan hidup di dalam air. Lobster air tawar lebih besar daripada jenis udang air tawar lainnya. *Cephalothorax* dan *pleon* atau *abdomen* adalah dua bagian utama tubuh lobster air tawar. *Cephalothoraks* merupakan bagian depan dari lobster air tawar atau umum disebut sebagai kepala. Bagian *cephalothorax* dilindungi oleh kulit cangkang luar yang sangat keras yang disebut karapaks. Bagian tersebut terdapat organ-organ luar dan dalam yang sangat penting yang memiliki berbagai fungsi tertentu. Pada *cephalothorax* terdapat lima pasang lengan (*appendages*) yang ada di bagian kepala yaitu *antennula*, antena, *mandible*, *maxillae* 1 dan *maxillae* 2. Selain itu terdapat tiga pasang *maxillopoda* dan lima pasang *periopod*. Secara ventral, *cephalothorax* terdiri dari lima *anterior somites* dan delapan *posterior thoracic somites*. Secara *anterior*, karapaks terdiri dari bagian dasar, tengah dan bagian memanjang pada kepala yang disebut *rostrum*. Garis batas pada *rostrum* menunjukkan duri suborbital. Struktur ini bersama dengan duri *orbital* merupakan struktur yang penting untuk identifikasi spesies (Gherardi et al. 2010).

Abdomen disebut juga bagian perut. Bagian *abdomen* terdiri dari beberapa segmen dan pada ujungnya terdapat ekor/*uropod* dan *telson*. Pada *abdomen* terdapat kaki renang (*pleopods*) yang berjumlah lima pasang. Kaki renang pada betina juga berfungsi sebagai substrat pada masa pengeraman telur. Umumnya telur menempel pada *setae* pada kaki renang pertama hingga kaki renang ketiga atau keempat. Lobster air tawar terkadang memperlihatkan *autotomi*, yaitu gerakan spontan yang diakibatkan adanya ancaman maupun luka. Pada *pleon/abdomen* terdiri dari enam bagian yang diakhiri dengan *telson*. Anus berlokasi di bagian ventral *telson*. Setiap segmen tubuh tertutup piringan *eksoskeleton* yang disebut *sclerites*. (Gherardi et al. 2010). Identifikasi spesies lobster air tawar dapat dilakukan dengan mengamati perbedaan bentuk *rostrum* dan capit. Berikut perbedaan bentuk *rostrum* dan capit pada beberapa spesies lobster air tawar (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Perbedaan bentuk *rostrum* pada beberapa spesies lobster air tawar (Holdich & Sibley, 2009).



Gambar 2. Perbedaan bentuk capit pada beberapa spesies lobster air tawar (Holdich & Sibley, 2009).

1.5.2 Klasifikasi *Cherax* sp.

Secara morfologi, *Cherax* sp. memiliki karakteristik khusus yang membedakannya dari genus lain dalam famili Parastacidae. Karapasnya lebih halus dan melengkung dibandingkan dengan *Astacus* atau *Procambarus*. Beberapa spesies, seperti *Cherax quadricarinatus*, memiliki empat lekukan (*carinae*) pada bagian dorsal karapasnya. Selain itu, capit (*chela*) pada *Cherax* sp. Umumnya berukuran besar dan memanjang, dengan permukaan yang halus atau sedikit berbintik. Ciri khas yang menonjol pada *Cherax quadricarinatus* adalah adanya benjolan merah di pangkal capitnya. Secara umum, capit pada jantan lebih besar dibandingkan betina. Selain itu *Cherax quadricarinatus* memiliki pertumbuhan yang lebih cepat dan ukuran yang lebih besar dibanding lobster air tawar yang lain. Abdomen *Cherax* sp. berbentuk panjang dan silindris, dengan segmen-segmen yang jelas dan fleksibel, sehingga mendukung pergerakannya yang lincah. Bagian ekornya, yang terdiri dari *telson* dan *uropod*, memiliki bentuk kipas lebar yang membantu dalam pergerakan mundur secara cepat. Dibandingkan dengan beberapa genus lain yang memiliki ekor lebih runcing, ekor *Cherax* sp. cenderung lebih bulat dan simetris (Horwitz 1995).

Klasifikasi *Cherax* sp. adalah sebagai berikut Horwitz (1995):

Kingdom : Animalia
 Filum : Arthropoda
 Kelas : Crustacea
 Ordo : Decapoda
 Famili : Parastacidae
 Genus : *Cherax*



Gambar 3. *Cherax quadricarinatus*
 (Dokumentasi pribadi) Skala bar= 2 cm

1.5.3 DNA Barcoding

DNA barcoding adalah metode yang banyak digunakan dalam penentuan taksonomi karena dinilai lebih mudah, cepat dan efektif dalam mengidentifikasi berbagai kondisi sampel. Metode ini diusulkan pertama kali oleh Hebert et al., (2003), yang menyatakan bahwa suatu organisme dapat diidentifikasi spesiesnya menggunakan sekuen pendek dari sebuah gen yang posisinya berada di dalam genom telah terstandarisasi atau telah disepakati bersama. Genom ini kemudian disebut sebagai “DNA Barcode” (Vences et al., 2005).

Teknik DNA barcoding digunakan guna memperoleh informasi genetik berupa urutan basa nukleotida pada molekul DNA organisme. DNA sekuensing juga menjadi satu-satunya metode untuk mengidentifikasi pasangan basa dengan tepat antara individu yang berbeda dan memungkinkan untuk menyimpulkan hubungan kekerabatan suatu populasi (Achmad et al., 2019). Identifikasi spesies menggunakan metode DNA barcoding memiliki beberapa keunggulan, yakni sebagai berikut (Virgilio et al., 2012):

- a. Dapat digunakan pada spesimen yang sangat sedikit/kecil
- b. Mampu mendokumentasikan keragaman taksonomi yang belum di kenal atau taksonomi yang berasal dari daerah yang belum pernah teridentifikasi
- c. Mampu mengungkapkan variasi spesies baru yang sebelumnya digolongkan pada satu spesies saja.

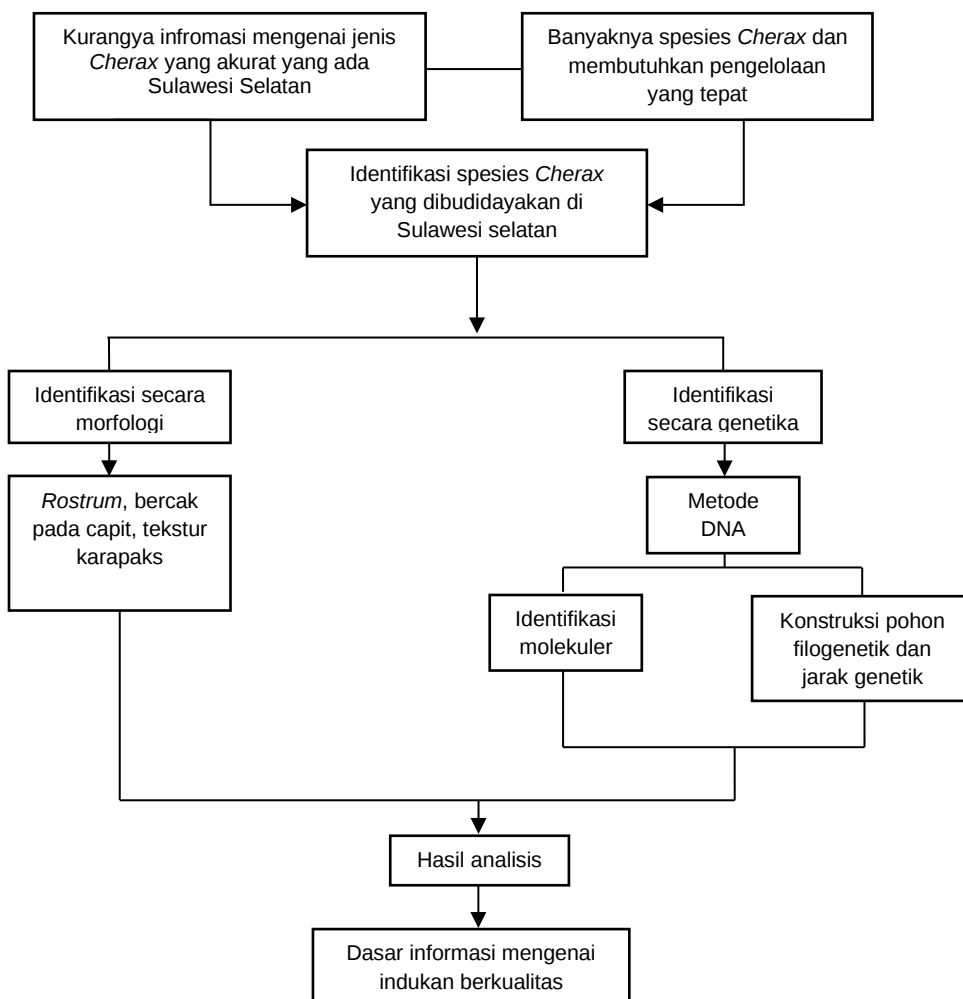
1.5.4. Gen 16s rRNA

Gen 16S rRNA mitokondria memiliki kombinasi wilayah yang sangat konservatif dan wilayah variabel, memungkinkan perbedaan antar spesies terdeteksi dengan jelas. Karakteristik ini menjadikannya sebagai penanda molekuler yang sangat efektif untuk identifikasi spesies dan analisis filogenetik, terutama dalam studi yang melibatkan sampel dari berbagai kelompok taksonomi yang memiliki hubungan filogenetik yang jauh (Vences et al., 2005). Salah satu keunggulan utama dari penggunaan 16S rRNA adalah kemampuannya dalam memberikan resolusi yang cukup tinggi untuk membedakan spesies yang memiliki hubungan kekerabatan dekat. Namun, ada beberapa tantangan dalam penggunaannya, seperti desain primer universal yang dapat mengamplifikasi sekuens gen ini di berbagai spesies tanpa bias. (Chan et al., 2022).

Dalam bidang perikanan, berbagai penelitian telah memanfaatkan gen 16S rRNA sebagai target utama, dengan hasil yang menunjukkan efektivitas tinggi dalam membedakan spesies ikan yang memiliki kemiripan morfologi. Analisis sekuens gen ini mampu mengidentifikasi 13 spesies ikan tuna, termasuk Bluefin tuna, Yellowfin tuna, dan jenis tuna lainnya, dengan mendeteksi 27 perbedaan nukleotida. Keunggulan tersebut menjadikan 16S rRNA lebih superior dibandingkan gen COI, yang selama ini digunakan sebagai standar, sehingga gen ini dapat diandalkan sebagai penanda molekuler dalam DNA barcoding ikan tuna (Kolondam, 2019). Untuk spesies *crustacea* penggunaan gen ini juga sering dilakukan untuk identifikasi. Seperti yang dilakukan oleh Parenrengi et al., (2020) pada kepiting bakau di Balikpapan.

1.6 Kerangka Pikir

Informasi mengenai jenis-jenis *Cherax* yang ditemukan di populasi budidaya Sulawesi Selatan masih terbatas. Identifikasi secara morfologi menjadi kurang efisien karena beberapa spesies memiliki kemiripan morfologi yang tinggi, sehingga membutuhkan waktu yang lama untuk proses identifikasi. Oleh karena itu, diperlukan metode identifikasi yang lebih cepat dan akurat, seperti DNA barcoding. Pendekatan molekuler bertujuan untuk meningkatkan akurasi identifikasi spesies, memberikan pemahaman yang lebih baik tentang biodiversitas, dan menjadi landasan awal untuk upaya budidaya yang lebih berkembang.



Gambar 4. Kerangka Pikir Penelitian

II. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli sampai Desember 2024. Pengambilan spesimen dilakukan di lokasi budidaya Sulawesi Selatan yaitu di Kabupaten Gowa, Soppeng, dan Maros. Ekstraksi DNA dan reaksi berantai polimerase (PCR) dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan (BRPBAP3), Maros, Sulawesi Selatan. Proses sequencing dilakukan di PT Genetics Science, Jakarta.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah buku identifikasi untuk petunjuk identifikasi morfologi, spidol permanen marker untuk penanda pada sampel, toples plastik untuk menyimpan spesimen yang diisi etanol 96%, *cool box* untuk menyimpan spesimen agar suhu tetap terjaga, dan kamera untuk dokumentasi. Alat yang digunakan untuk preparasi sampel yaitu, tube ukuran 15 ml, pisau, pinset, gunting, styrofoam, gloves, tissue towel dan parafilm. Alat untuk proses molekuler yaitu vortex, sentrifuge, heating block, gelas beker, meja kerja steril, PCR tube (*thermocycler*), dan UV transilluminator. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu; jaringan otot/daging pada bagian *abdomen*, etanol 96%, QIAGEN Kits, Tris-EDTA (TE) Buffer, gel agarose 1%, pewarnaan *Nucleic Acid Gel Stain (GelRed®)*, aquades, dan primer yaitu primer *forward*: 5'-GCC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3' dan primer *reverse*: 5'-CCG GTE TGA ACT CAG ATE ATG T-3' (Parenrengi et al., 2020)

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Pengambilan Sampel dan Pengamatan Morfologi

Pengambilan spesimen dilakukan di populasi budidaya Sulawesi Selatan yaitu di kabupaten Gowa, Soppeng dan Maros. Ketiga lokasi ini dipilih setelah memastikan bahwa lobster yang dibudidayakan berasal dari indukan yang berbeda beda. Menurut informasi yang didapatkan, Kab. Gowa indukannya berasal dari bantuan Dinas Perikanan setempat yang berasal dari Pulau Jawa, Kab. Soppeng berasal dari Australia dan Kab. Maros berasal dari Pulau Sumatera. Pada setiap lokasi budidaya dilakukan pengambilan spesimen sebanyak tiga ekor dengan total sembilan ekor spesimen dari tiga lokasi budidaya. Untuk memudahkan proses identifikasi morfologi, spesimen yang diambil dari semua lokasi budidaya diseragamkan pada usia yang sudah siap kawin/dewasa atau berusia sekitar tiga sampai empat bulan masa pemeliharaan. Setelah itu dilakukan identifikasi morfologi dengan mengamati langsung bagian tubuh lobster air tawar, bagian yang diamati seperti *rostrum*, bentuk tubuh, dan kelengkapan lainnya seperti bercak merah pada capit jantan dan tekstur

karapaks sesuai petunjuk identifikasi dari (Holdich & Sibley 2009). Setelah itu, sampel yang didapatkan dimasukkan ke dalam botol sampel yang berisikan etanol 96%, lalu botol sampel tersebut diberikan label penanda. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam *cool box* agar suhu pada sampel tersebut terjaga dan disimpan hingga proses identifikasi morfologi dan analisis molekuler.

2.3.2 Preparasi Sampel

Sampel yang telah dikoleksi dilakukan preparasi dengan cara mengambil jaringan daging pada bagian *abdomen* dengan menggunakan pinset lalu dimasukkan ke dalam tube/tabung yang berukuran 15 ml yang berisikan etanol 96%. Kemudian sampel dilakukan uji molekuler.

2.3.3 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan untuk memisahkan DNA dari protein, lemak, dan karbohidrat (Jayanti et al., 2021). Metode ekstraksi yang digunakan mengikuti protokol *geneaid*. Pertama, jaringan lobster 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 µl 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 dan campuran tersebut (termasuk presipitat/endapan) dipindahkan ke dalam *GS column*, lalu centrifuge pada 14.000 rpm selama 2 menit. *Collection tube* yang berukuran 2 ml yang telah digunakan dibuang dan transfer *GS column* ke 2 ml *collection tube* yang baru. Tahap ketiga adalah wash (pencucian), 400 µl buffer dimasukkan ke *GS column* lalu di centrifuge 14.000 rpm selama 30 detik. Selanjutnya cairan dibuang, kemudian *GS column* dimasukkan kembali ke dalam tabung koleksi 2 ml. Selanjutnya, ditambahkan 600 µl *wash buffer* (etanol sudah ditambahkan) ke dalam *GS column* lalu disentrifuge pada 14.000 rpm selama 2 menit 30 detik. Selanjutnya, cairan dibuang lalu diletakkan kembali *GS column* ke dalam tabung koleksi 2 ml. Kemudian, disentrifuge 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 µl *Elution Buffer/TE* yang telah dipanaskan ke bagian tengah *column matrix*. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 60°C selama 25 menit. Kemudian centrifuge 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*) dengan primer *forward*: 5'-GCC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3' dan primer *reverse*: 5'-CCG GTE TGA ACT CAG ATE ATG T-3' (Parenrengi et al., 2020) 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 polymerase). 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. Tahap *final extension* dilakukan pada suhu 72°C selama 2 menit. Hasil PCR kemudian divisualisasikan pada 1% gel agarose dengan pewarnaan *nucleic acid gel stain* (GelRed®).

2.3.5 Sekuensing DNA

Sampel PCR yang telah teramplifikasi yang menghasilkan sampel positif (memendarkan pita DNA) kemudian dilakukan proses pembacaan DNA (*sequencing*) di PT. Genetics Science Jakarta dengan menggunakan metode Sanger dideoksi. Agar suhu sampel tetap terjaga pada saat pengiriman, sampel dikirim dengan meletakkannya pada *gel ice packs*. Selain itu sampel harus sampai dalam waktu paling lambat 24 jam untuk menghindari kerusakan pada sampel.

2.4 Analisis Data

Hasil pengamatan morfologi dianalisis secara deskriptif. Kemudian, hasil Sekuensing diproses menggunakan model ClustalW (Tamura et al., 2021) menggunakan program MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) yang dimana data yang dihasilkan disejajarkan (*alignment*) dengan metode ClustalW. Data sekuen DNA dibandingkan dengan data GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) dengan aplikasi BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk menentukan spesies berdasarkan data pembandingan yang tersedia di GenBank. Sekuen yang telah terverifikasi sebagai spesies crustacea kemudian dilakukan analisis jarak genetik dan pohon filogenetik menggunakan metode Neighbor-Joining dengan bootstrap 1000x dengan menggunakan aplikasi MEGA 11. Pohon filogenetik kemudian diedit menggunakan alat daring Interactive Tree of Life (IToL) Versi 5 (Letunic & Bork, 2021).