

ABSTRACT

Potamidae, Sesamidae, and Gecarcinucidae are the three families of freshwater crabs found in Indonesia. There are currently 12 species known as *Geosesarma* from Java are *G. bicolor*, *G. cikaniki*, *G. confertum*, *G. dennerle*, *G. garutense*, *G. hagen*, *G. lebak*, *G. noduliferum*, *G. robustum*, *G. rouxi*, *G. sekop*, and *G. sukabumi*. Molecular techniques have proven useful for detecting many non-native species and identifying the ongoing pet trade of threatened taxa. The commonly used empirical thresholds for the threshold-based species delimitation of the COI gene include 1%, 2%, 2.2%, and 3%. Sequence similarity thresholds is used for 16s RNA are (97%, 98%, 99%). The purpose of this research, create a DNA barcode library of Indonesian ornamental crabs especially *Geosesarma dennerle* and *G. hagen* by comparing the specimens from natural capture vs. commercial trades, look for variations among samples obtained by looking at the morphology and their morphometric and discovering the genetic diversity of *Geosesarma dennerle* and *G. hagen*. The methods used include taxonomic sampling, DNA extraction, PCR amplification, and sequencing and morphological identification. The analyzes used included DNA library, morphometric analysis, phylogenetic and genetic diversity analyses.

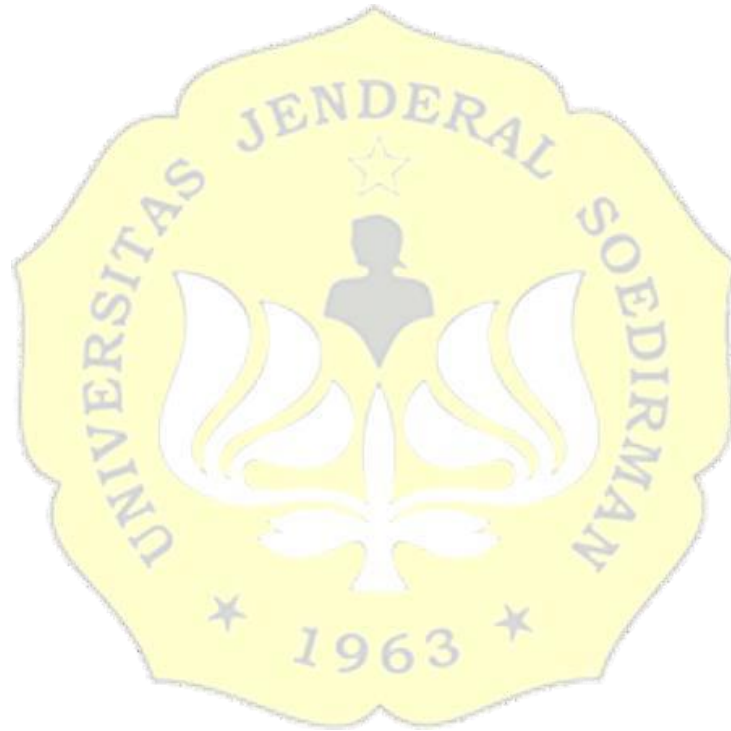
Geosesarma dennerle and *G. hagen* have similar characteristics based on square carapace, large outer orbit teeth, triangular, outwardly curved, tip extends beyond lateral carapace and completely freshwater species, but they can be distinguished by color variations on the carapace. The results show that the value of Asymp. sig in the Mann-Whitney U test table is 0.988. Based on the hypothesis ($0.988 > 0.05$), the results illustrate that there are no significant morphometric differences between *Geosesarma dennerle* and *G. hagen*. This means that the difference between the two groups may simply be coincidental or not statistically significant.

The sequence libraries of 948 bp for the COI and 423 bp for the 16s RNA have been built in Barcode of Life Datasystem (BOLD) which result in BINs (Barcode Index Number) BOLD:AFF8991 for outgroup and BOLD:AFF5248 for *Geosesarma hagen*, and BOLD:AFF6306, BOLD:AFF6307, and also have BOLD:AFF6308 for *Geosesarma dennerle* in BOLD System, and deposited in Genbank of the National Center of Biotechnology Information (NCBI) with accession number OR147199-OR147215 for COI and OR257785-OR257801 for 16s RNA.

The references of COI gene of *G. dennerle* and *G. hagen* were not available on GenBank and 16s RNA gene of *G. dennerle* as well. However, the 16s RNA sequences for *G. hagen* from natural catch, such as BIC-0552, BIC-0553, BIC-0554, BIC-0555, and BIC-0556, have pairwise identities about 99.6%, 99.6%, 99.4%, 99.6%, and 99.6%, respectively. Meanwhile, trade sample *G. hagen*, BIC-0565, has a pairwise identity of 99.6% compared to *G. hagen* on GenBank for 16s RNA gene. The phylogenetic trees show a two differences clade between *Geosesarma hagen* and *G. dennerle*, with supporting bootstrap value above 70. The results of the genetic distance analysis of COI gene using MEGA11 software was performed with bootstrap 1000 replications. The genetic distance threshold between *Geosesarma dennerle* and *G. hagen* is at 1.8%, while *Geosesarma sp.1* (BIC-0562) has a relatively larger range approximately 17.4-18.5% compared to *G. hagen* and around 17.6-19.8% compared to *G. dennerle*, whereas *Geosesarma sp.2* (BIC-0566) has lower ranges of genetic distance about 2.8-3.4% and 2.5-18.1% for *Geosesarma hagen* and *G. dennerle*, respectively. For *Geosesarma hagen*, the haplotype diversity (Hd) is obtained with 1.00000 and the nucleotide diversity is about 0.00400, whereas for *G. dennerle*

0.97222 and 0.03720, respectively. For overall values obtained 0.99048 for haplotype diversity and 0.02986.

Keywords: *16S, BOLD, bootstrap, cytochrome oxidase subunit I (COI), DNA, Genetic distance, Geosesarma, molecular, thresholds*



ABSTRACT

Potamidae, Sesarmidae, dan Gecarcinucidae adalah tiga famili kepiting air tawar yang terdapat di Indonesia. Saat ini ada 12 spesies yang dikenal sebagai *Geosesarma* dari Jawa yaitu *G. bicolor*, *G. cikaniki*, *G. confertum*, *G. dennerle*, *G. garutense*, *G. hagen*, *G. lebak*, *G. noduliferum*, *G. robustum*, *G. rouxi*, *G. sekop*, dan *G. sukabumi*. Teknik molekuler telah terbukti berguna untuk mendeteksi banyak spesies non-asli dan mengidentifikasi perdagangan hewan peliharaan taksa terancam yang sedang berlangsung. Ambang empiris yang umum digunakan untuk delimitasi spesies gen COI berbasis ambang meliputi 1%, 2%, 2,2%, dan 3%. Ambang kesamaan urutan yang digunakan untuk RNA 16s adalah (97%, 98%, 99%). Tujuan dari penelitian ini adalah membuat library barcode DNA kepiting hias Indonesia khususnya *Geosesarma dennerle* dan *G. hagen* dengan cara membandingkan spesimen tangkapan alam vs perdagangan komersial, mencari variasi antar sampel yang diperoleh dengan melihat morfologi dan morfometriknya serta menemukan keragaman genetik *Geosesarma dennerle* dan *G. hagen*. Metode yang digunakan meliputi pengambilan sampel taksonomi, ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, dan pengurutan dan identifikasi morfologi. Analisis yang digunakan meliputi DNA library, analisis morfometrik, analisis filogenetik dan keragaman genetik.

Geosesarma dennerle dan *G. hagen* memiliki karakteristik yang mirip berdasarkan karapas persegi, gigi orbit luar yang besar, segitiga, melengkung ke luar, ujung melampaui karapas lateral dan spesies air tawar sepenuhnya, tetapi mereka dapat dibedakan dengan variasi warna pada karapas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai Asymp. sig pada tabel uji *Mann-Whitney U* adalah 0,988. Berdasarkan hipotesis ($0,988 > 0,05$), hasil tersebut menggambarkan bahwa tidak terdapat perbedaan morfometrik yang signifikan antara *Geosesarma dennerle* dan *G. hagen*. Ini berarti bahwa perbedaan antara kedua kelompok mungkin hanya kebetulan atau tidak signifikan secara statistik.

Pustaka urutan 948 bp untuk COI dan 423 bp untuk 16s RNA telah dibangun di Barcode of Life Datasystem (BOLD) yang menghasilkan BIN (Barcode Index Number) BOLD:AFF8991 untuk outgroup dan BOLD:AFF5248 untuk *Geosesarma hagen*, dan BOLD:AFF6306, BOLD:AFF6307, dan juga memiliki BOLD:AFF6308 untuk *Geosesarma dennerle* dalam Sistem BOLD, dan disimpan di Genbank National Center of Biotechnology Information (NCBI) dengan nomor tambahan OR147199-OR147215 untuk COI dan OR257785-OR257801 untuk 16s RNA.

Referensi gen COI *G. dennerle* dan *G. hagen* tidak tersedia di GenBank dan juga gen 16s RNA dari *G. dennerle*. Namun, urutan RNA 16s untuk *G. hagen* dari tangkapan alam, seperti BIC-0552, BIC-0553, BIC-0554, BIC-0555, dan BIC-0556, memiliki identitas berpasangan sekitar 99,6%, 99,6%, 99,4%, 99,6%, dan 99,6%, masing-masing. Sementara itu, sampel perdagangan *G. hagen*, BIC-0565, memiliki identitas berpasangan sebesar 99,6% dibandingkan dengan *G. hagen* pada GenBank untuk gen RNA 16s. Pohon filogenetik menunjukkan dua perbedaan clade antara *Geosesarma hagen* dan *G. dennerle*, dengan nilai bootstrap pendukung di atas 70. Hasil analisis jarak genetik gen COI menggunakan software MEGA11 dilakukan dengan bootstrap 1000 ulangan. Ambang batas jarak genetik antara *Geosesarma dennerle* dan *G. hagen* adalah sebesar 1,8%, sedangkan *Geosesarma sp.1* (BIC-0562) memiliki rentang yang relatif lebih besar sekitar 17,4-18,5% dibandingkan dengan *G. hagen* dan sekitar 17,6-19,8% dibandingkan dengan *G. dennerle*, sedangkan *Geosesarma sp.2* (BIC-0566) memiliki rentang jarak genetik yang lebih rendah masing-masing sekitar 2,8-3,4% dan 2,5-18,1% untuk *Geosesarma hagen* dan *G. dennerle*. Untuk

Geosesarma hagen, keragaman haplotipe (Hd) diperoleh sebesar 1,00000 dan keragaman nukleotida sekitar 0,00400, sedangkan untuk *G. dennerle* berturut-turut 0,97222 dan 0,03720. Untuk nilai keseluruhan diperoleh nilai 0,99048 untuk keragaman haplotype dan 0,02986.

Keywords: *16S, BOLD, bootstrap, cytochrome oxidase subunit I (COI), DNA, Genetic distance, Geosesarma, molecular, thresholds*

