

Analisa Genetika Gastropoda Nudibranchia dari Pulau Panjang, Jepara

Wilhelmina br Sinulingga, Diah Permata Wijayanti*, Munasik, Dwi Haryanti

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Jacob Rais, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

*Corresponding author, e-mail: diahpermata@lecturer.undip.ac.id,

ABSTRAK: Gastropoda Nudibranchia memiliki karakteristik insang telanjang atau insang berbulu atau tanduk di punggungnya merupakan anggota Ordo Opisthobranchia, kelompok Gastropoda terbesar dengan anggota lebih dari 3.000 species. Nudibranchia diketahui hidup di Pulau Panjang, salah satu destinasi wisata terkenal di Jepara. Pergerakannya yang lambat dan bentuknya yang menarik, dapat mengganggu keberadaannya di habitat alaminya. Penelitian mengenai Nudibranchia belum banyak dilakukan di Indonesia, termasuk analisa genetiknya. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keanekaragaman genetik Nudibranchia dari Perairan Pulau Panjang. Analisa DNA dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, dengan metode PCR-sequencing menggunakan mtDNA-COI (cytochrome oxidase subunit I gene dari DNA mitokondria). Primer yang digunakan pada penelitian yaitu primer forward: LCOI1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3 dan reverse: HCOI2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACC AAAAATCA-3'. Rekonstruksi pohon filogenetik dan keragaman genetik dilakukan menggunakan software MEGA 6.06 (Analysis of the Evolution of Molecular Genetics). Hasil analisis sampel Nudibranchia berdasarkan susunan DNA mitokondria, ditemukan 2 spesies dengan 8 individu yaitu, spesies *Jorunna funebris* dan *Chromodoris lineolata*. Tingkat kesamaan (homologi) dalam analisa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sebesar 98 % - 100 %. Hasil analisis filogenetik secara menyeluruh memperlihatkan pengelompokan yang terjadi berdasarkan kemiripan genetiknya.

Kata kunci: Nudibranchia; Keanekaragaman Genetik; *Jorunna funebris*; *Chromodoris lineolata*

Genetic Analysis of Nudibranch on Panjang Island, Jepara

ABSTRACT: Nudibranchia gastropods have the characteristics of naked gills or hairy gills or horns on their backs and are members of the Order Opisthobranchia, the largest group of Gastropods with more than 3,000 species. Nudibranchia are known to live on Panjang Island, one of the famous tourist destinations in Jepara. Its slow movements and attractive shape can disrupt its existence in its natural habitat. Not much research has been done on Nudibranchia in Indonesia, including genetic analysis. This research aims to analyze the genetic diversity of Nudibranchia from Panjang Island waters. DNA analysis was carried out at the Diponegoro University Integrated Laboratory, using the PCR-sequencing method using mtDNA-COI (cytochrome oxidase subunit I gene from mitochondrial DNA). The primers used in the research were forward primer: LCOI1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3 and reverse: HCOI2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACC AAAAATCA-3'. Phylogenetic tree reconstruction and genetic diversity were carried out using MEGA 6.06 (Analysis of the Evolution of Molecular Genetics) software. The results of analysis of Nudibranchia samples based on mitochondrial DNA structure found 2 species with 8 individuals, namely, *Jorunna funebris* and *Chromodoris lineolata* species. The level of similarity (homology) in BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analysis is 98% - 100%. The results of a comprehensive phylogenetic analysis show that grouping occurs based on genetic similarity.

Keywords: Nudibranchia, Genetic Diversity; *Jorunna funebris*; *Chromodoris lineolata*

PENDAHULUAN

Kekayaan hayati laut Indonesia dikenal sangat beragam, salah satunya adalah invertebrata laut. Invertebrata laut dalam sistem rantai makanan merupakan herbivora, predator dominan, dan

biota penentu dari sistem piramida makanan (Salanggon *et al.*, 2020; Dharmawan, 2018). Nudibranchia adalah moluska tidak bercangkang yang seringkali berwarna terang dan mencolok dan sangat beragam, dengan karakteristik utama berupa insang telanjang, atau insang berbulu, atau berupa tanduk di punggung darimana Siput Laut ini memperoleh namanya (Paulangan *et al.*, 2021; Permadani and Retnoaji, 2018). Rosyid *et al.*, (2022) dan Zhao *et al.*, (2015) mendata bahwa ada 2000 jenis Nudibranchia di perairan Indo-Pasifik, dengan keragaman jenis dapat bervariasi menurut lokasi. Nudibranchia pada umumnya memakan *algae*, *sponge*, karang keras dan lunak, *bryozoans* dan *hydroids* (Asrul *et al.*, 2021) dan biasanya tersedia di daerah yang memiliki terumbu karang.

Proses identifikasi spesies secara konvensional pada Nudibranchia menggunakan karakterisasi morfologi memiliki berbagai keterbatasan (Zhao *et al.* 2015; Waldchen *et al.*, 2018). Pertama, ciri fenotipik dan variasi genetik bisa menyebabkan kesalahan identifikasi. Kedua, masih banyak taksa yang belum jelas/samar (Mashar *et al.*, 2019). Ketiga, kunci morfologi hanya efektif di suatu tahap perkembangan makhluk hidup saja, sehingga banyak individu yang belum dapat diidentifikasi. Keempat, penggunaan kunci identifikasi sering kali memerlukan tingkat keahlian tertentu, sehingga bisa saja terjadi kesalahan pada saat proses identifikasi. Kelima membutuhkan waktu yang lama (Zhao *et al.*, 2015; Kowalska *et al.*, 2018; Waldchen *et al.*, 2018). Salah satu cara untuk mengidentifikasi nudibranchia dapat menggunakan metode molekular.

Salah satu penanda molekuler yang saat ini banyak digunakan identifikasi genetik adalah *DNA barcode* yang merupakan sekuen pendek DNA mitokondria yang dapat menunjukkan variasi genetik dalam suatu spesies (Martiansyah, 2021). *DNA barcoding* dapat digunakan untuk memecahkan keterbatasan proses identifikasi spesies secara konvensional (Waldchen *et al.*, 2018). Menggabungkan sekuen DNA dengan karakter morfologi yang ada dapat memfasilitasi identifikasi dan klasifikasi spesies (Kowalska *et al.*, 2018; Waldchen *et al.*, 2018). Penelitian ini menggunakan *DNA barcoding* untuk mengetahui jenis Nudibranchia dari Perairan Pulau Panjang, Jepara. Materi yang digunakan adalah beberapa individu Nudibranchia yang diambil dari Pulau Panjang, Jepara. Pengambilan sampel di kedalaman 1-2 meter menggunakan alat selam dasar atau *Skin Dive* dengan pengambilan sampel pada dua titik sampling. Pengambilan sampel dilakukan secara manual. Sampel yang diambil dimasukkan ke dalam botol sampel yang telah diberi label dan difiksasi *Ethanol* 96% untuk diproses lebih lanjut di laboratorium. Sampel yang didapatkan dari Pulau Panjang sebanyak 8 individu dengan kode label yaitu H1, H2, H3, J1, J2, J3, J4, dan J5. Sampel selanjutnya diekstraksi menggunakan dua metode yaitu, Chelex 10% dan *DNA extraction KIT ZymoResearch*.

MATERI DAN METODE

Proses PCR dilakukan dengan menggunakan alat *Thermocycler* yang diprogram untuk melakukan 35 siklus dengan setiap siklusnya terdiri dari peroses penempelan utas ganda (*pre denaturation*) pada suhu 95°C selama 3 menit, *denaturation* pada suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 45°C selama 45 detik, dan *extention* pada suhu 72°C selama 2 menit. Kemudian dilanjutkan dengan *final elongated* pada suhu 72°C selama 10 menit. Primer yang digunakan pada penelitian ini merupakan primer dengan target lokus CO1 yaitu HCO (5' - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3') dan primer LCO (5' - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA -3'). Sebelum melakukan elektroforesis, terlebih dahulu dibuat media elektroforesis yaitu agarosa 1% (*agarose* 0.8 g dan 80 mL *TAE Buffer*) dengan 2 µL *FloroSave* sebagai pewarna. Langkah selanjutnya adalah 2 µL sampel hasil PCR tersebut kemudian dimasukkan ke dalam sumur *agarose*. Elektroforesis menggunakan mesin elektroforesis tegangan 100 V dan arus 400 mA dengan waktu 30 menit. Panjang untaian basa DNA dapat diukur dengan menggunakan 2 µL *Lowmass ladder* yang dimasukkan pada sumur pertama pada *agarose*. Hasil elektroforesis berupa pita-pita yang dapat dilihat dengan menggunakan alat *UV transilluminator*.

Analisis data hasil sekuen dilakukan dengan menggunakan program MEGA 6.06 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*). Data selanjutnya diedit agar sejajar menggunakan program *ClustalW* yang terdapat pada MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Analisis hasil sekuen DNA terbaik

dibandingkan dengan sekuen DNA yang ada pada basis data (*database*) DNA. Penelusuran dilakukan dengan menggunakan internet melalui program pelacakan database *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov). Hasil data sekuen DNA yang sesuai menunjukkan *query cover* dan *identification* dengan persentase lebih dari 90%, sehingga menyatakan bahwa adanya kesamaan dari perbandingan data sekuen DNA dengan yang ada pada basis data DNA, kemudian dilakukan pembuatan pohon filogenik dari data tersebut. Data yang diperoleh dari hasil pengolahan data sampel nudibranchia dari Pulau Panjang sebanyak 7 hasil sekuen. Sekuen basa nitrogen dari sampel kemudian dicocokkan ulang untuk menyeleksi hasil sekuen yang akan dipilih guna melihat hubungan rekonstruksi pohon filogenetik lebih lanjut. Menurut Meilindo (2014), Analisa Filogenetik dipergunakan untuk mengetahui tingkat kekerabatan dan jarak genetik pada spesies makhluk hidup seperti Nudibranchia. Jarak genetik dipergunakan untuk mengetahui ukuran genetik yang berbeda antar populasi yang menyebabkan evolusi akibat adanya persilangan acak, seleksi, mutasi, dan hanyutan gen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang diambil dari Pulau Panjang, Jepara sebanyak 8 individu memiliki perbedaan bentuk, warna, dan ukuran. Perbedaan spesifik tersebut dapat disimpulkan seperti pada Tabel 1. Semua individu tersebut diambil pada 2 titik sampling dengan sampel H1, H2, dan H3 diambil pada titik yang sama dan sampel J1, J2, J3, J4, dan J5 diambil pada titik yang sama pula. Kedua titik sampling yang dimaksud memiliki parameter perairan pada Tabel 2. Sesuai dengan morfologi setiap individu Nudibranchia pada Tabel 1. dan Tabel 2., individu Nudibranchia terbagi menjadi 2 jenis spesies yang berbeda yaitu sampel H1, H2, dan H3 adalah sampel dengan spesies yang sama, sedangkan pada sampel J1, J2, J3, J4, dan J5 adalah sampel dengan spesies yang sama seperti pada Gambar 1.

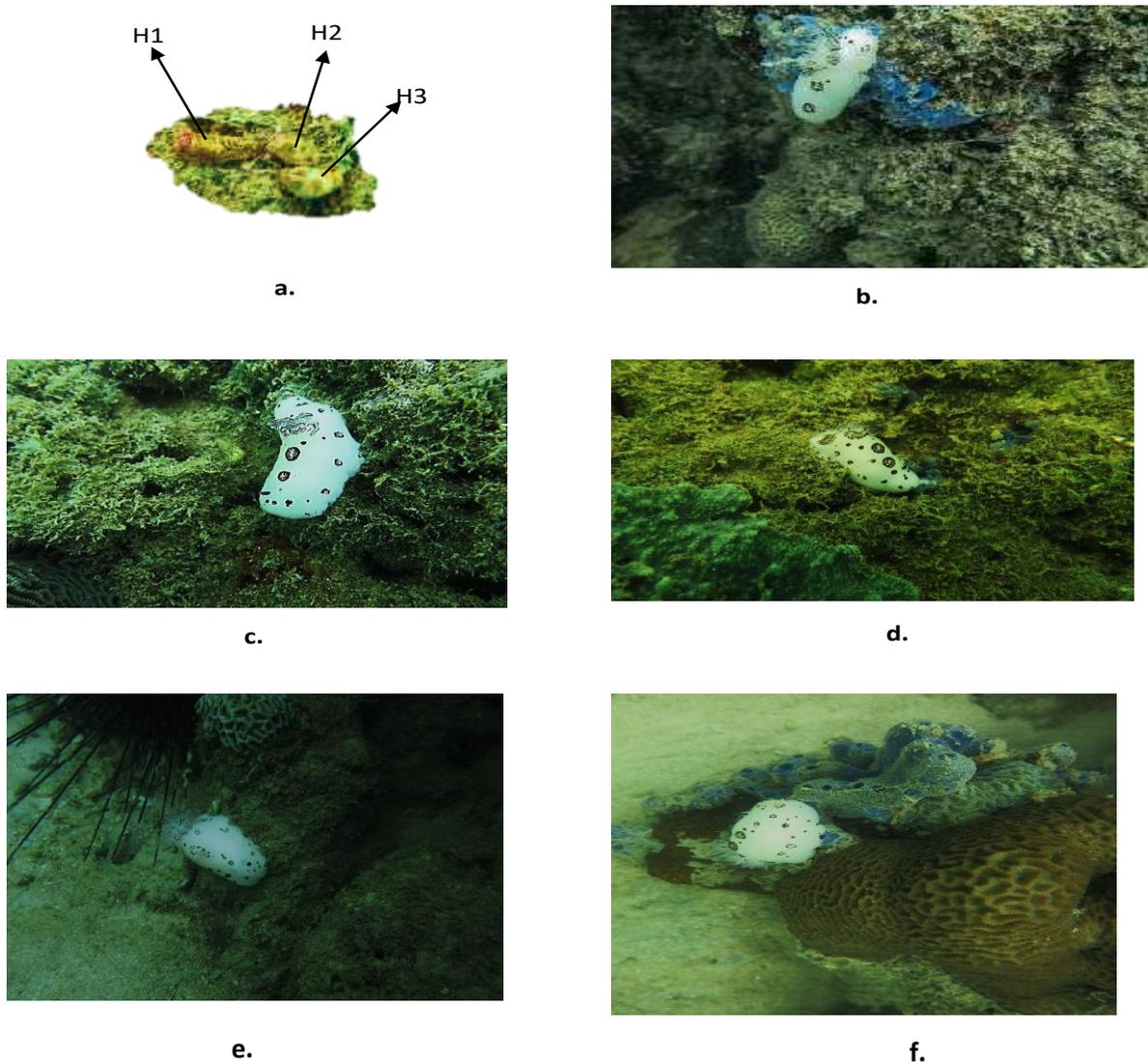
Sebanyak 8 individu sampel Nudibranchia yang diambil di Pulau Panjang, Jepara, hanya 7 individu yaitu sampel H1, H2, J1, J2, J3, J4, dan J5 yang berhasil diekstraksi dengan *KIT ZymoResearch* dan didapatkan DNA Nudibranchia-nya. Ketujuh sampel berhasil diamplifikasi dan menghasilkan pita tunggal pada setiap sampel. Hasil tersebut ditunjukkan dengan visualisasi menggunakan mesin elektroforesis. Hasil visualisasi elektroforesis pada ketujuh sample memiliki pita DNA berukuran 600-700 pasang basa (bp). Analisis homologi hasil sekuen selanjutnya

Tabel 1. Hasil morfologi Nudibranchia di Pulau Panjang, Jepara

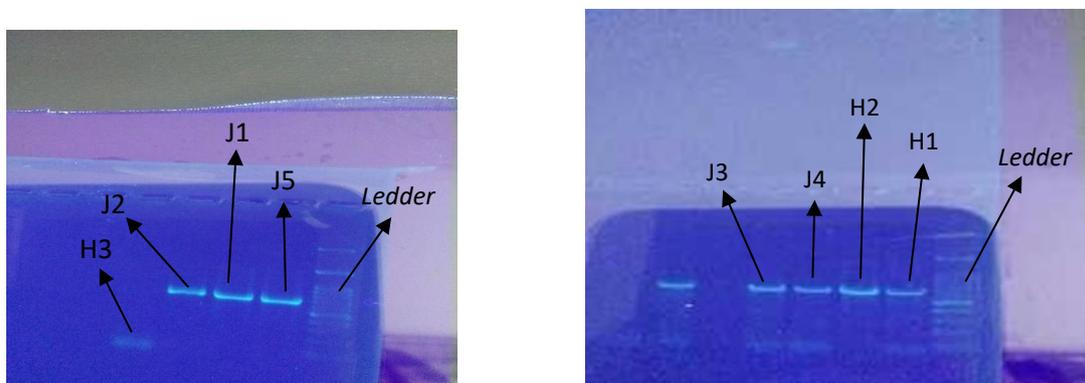
Keterangan	Sampel H1 – H3	Sampel J1 – J5
Panjang Rata-rata	± 2 cm	± 6,5 cm
Jumlah Tubernakel Rata-rata	0	0
Warna Mantel	Coklat, Hitam, Putih	Putih, Hitam
Rinotubernakel	Ada	Ada
Rinovor Bergelambir	Ada	Ada
Warna Rinovor	Coklta, Hitam, Putih	Hitam

Tabel 2. Parameter Perairan Habitat Nudibranchia di Pulau Panjang, Jepara

Sampling	Suhu (°C)	DO (ppm)	Salinitas (ppm)	Kecerahan (m)	Kec. Arus (m/s)	pH	Koordinat
Titik 1	29,43	7,65	35	3,33	4,5	7,89	110°37'51.62"
Tirik 2	29,13	7,65	36	3,4	4,5	7,67	110°37'51.10"



Gambar 1. Sampel Penelitian (a. Sampel H1, H2, dan H3; b. Sampel J1; c. Sampel J2; d. Sampel J3; e. Sampel J4; dan f. Sampel J5). Keterangan: sampel H1, H2, dan H3 berada pada titik sampling yang sama (berkoloni); Sampel J1, J2, J3, J4, dan J5 berada pada titik sampling yang sama (berpencar/individualis).



Gambar 2. Visualisasi DNA sampel menggunakan mesin elektroforesis

Tabel 3. Hasil BLAST sampel Nudibranchia di Pulau Panjang, Jepara

Kode Sampel	Panjang Basa	Nama Hasil BLAST	Query Cover (%)	Identify (%)	Accession Code
J1	681	<i>Jorunna funebris</i>	98	99,26	MN690307.1
J2	668	<i>Jorunna funebris</i>	98	99,85	MG883233.1
J3	668	<i>Jorunna funebris</i>	100	99,70	MN690307.1
J4	668	<i>Jorunna funebris</i>	100	100	MN690306.1
J5	668	<i>Jorunna funebris</i>	100	99,25	MN690307.1
H1	678	<i>Chromodoris lineolata</i>	96	99,24	MG883233.1
H2	673	<i>Chromodoris lineolata</i>	99	99,11	MN690306.1

Tabel 4. Sampel Data *Outgroup* dari *Database* GenBank

Accession Code	Panjang Basa	Nama Hasil BLAST	Lokasi
KU496481.1	656	<i>Nudibranchia</i> sp.	Jordania
MG883233.1	678	<i>Chromodoris lineolata</i>	Australia
MN690307.1	668	<i>Jorunna funebris</i>	Singapura

digunakan metode *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang menunjukkan bahwa seluruh sampel memiliki kesamaan dengan *database* GenBank dengan persentase yang beragam yaitu, 99,11-100%. Pada ketujuh sampel, 2 sampel memiliki kesamaan dengan *Chromodoris lineolata* dan 5 sampel memiliki kesamaan dengan *Jorunna funebris*. Hasil tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil sekuen selanjutnya dianalisis dengan merekonstruksi pohon filogenetik. Analisis ini dilakukan untuk menginterpretasikan kekerabatan antar Nudibranchia. Selain menginterpretasikan sampel, analisis filogenetik dilakukan untuk memverifikasi lebih lanjut dalam identifikasi spesies (Layton *et al.*, 2018) pada sampel Nudibranchia dan membandingkan dengan jenis yang sama pada *database* GenBank. Penyusunan pada pohon filogenetik dilakukan dengan penambahan data pembandingan *outgroup* Tabel 4.

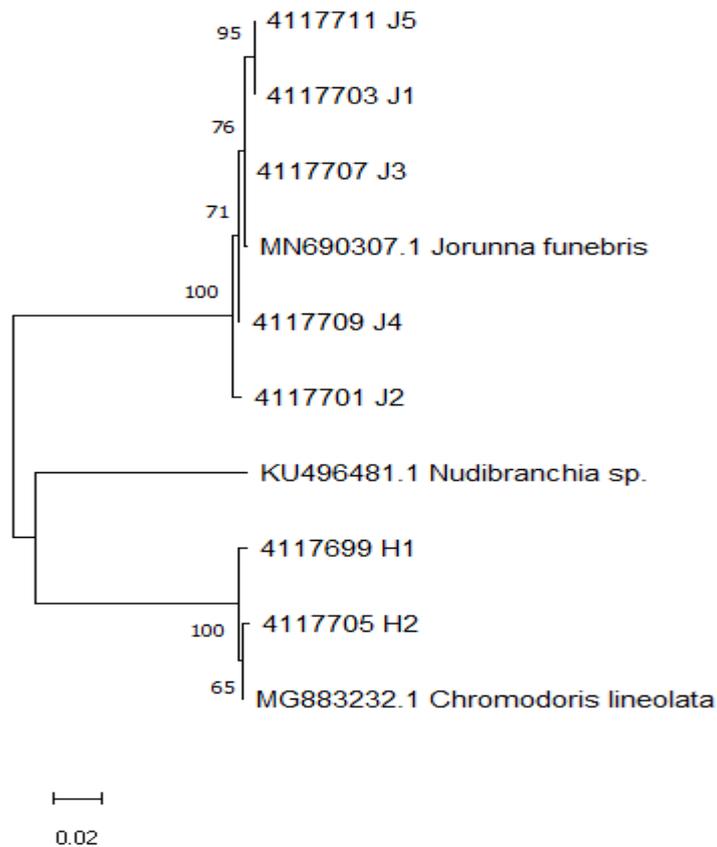
Hasil analisis pohon filogenetik pada sampel Nudibranchia membentuk *clade* yang terdiri dari 2 *sub-clade* (Gambar 3.). *Sub-clade* 1 terdiri dari 5 sampel, yaitu J1, J2, J3, J4, dan J5. Kemudian *sub-clade* 2 terdiri 2 sampel, yaitu H1 dan H2. Sampel Nudibranchia dari spesies *Jorunna funebris*, *Chromodoris lineolata*, dan *Nudibranchia* sp. diambil dari GenBank untuk digunakan sebagai *outgroup*. Dari ketiga sampel ini, hanya *Nudibranchia* sp. yang tidak masuk ke dalam *sub-clade* pada pohon filogenetik. Namun, sampel *Jorunna funebris* dan *Chromodoris lineolata* terdapat pada *sub-clade* tersebut. Sampel *Jorunna funebris* masuk ke dalam *sub-clade* yang pertama dan sampel J1, J2, J3, J4, dan J5 berada pada *sub-clade* yang sama. Pada sampel *Chromodoris lineolata*, sampel ini masuk ke dalam *sub-clade* yang kedua dengan sampel H1 dan H2 juga berada pada *sub-clade* yang sama. Hasil memverifikasi bahwa sampel J1, J2, J3, J4, dan J5 termasuk ke dalam spesies *Jorunna funebris* dan sampel H1 dan H2 juga termasuk ke dalam spesies *Chromodoris lineolata*.

Hasil morfologi pada setiap sampel, jika dianalisa morfologi setiap individu dapat dibedakan dengan jelas. Pada sampel H1, H2, dan H3, memiliki ciri morfologi yang sama. Pada sampel J1, J2, J3, J4, dan J5 juga terdapat ciri morfologi yang sama dan berbeda dengan sampel H1, H2, dan H3. Hasil tersebut secara sementara dapat dipastikan semua individu digolongkan menjadi 2 spesies yang berbeda. Menurut Zhao *et al.* (2015), tahap ini masih belum dapat dipastikan bahwa identifikasi ini belum tentu benar, sehingga diperlukan identifikasi yang lebih akurat dengan menggunakan identifikasi secara genetik.

Sampel yang didapatkan pada saat sampling di Pulau Panjang, Jepara adalah 8 individu, namun yang berhasil diekstraksi hanya 7 individu. Penamaan sampel pada setiap individu adalah H1, H2, H3, J1, J2, J3, J4, dan J5. Gagalnya sampel H3 untuk diekstraksi diakibatkan karena pada

saat diekstraksi, daging sampel yang dipilih masih memiliki lendir/selaput lendir Nudibranchia yang banyak. Hal ini sangat berpengaruh dalam proses ekstraksi dalam menghancurkan membrane dan dinding sel.

Gen *COI* memiliki panjang sekitar 1500 bp dan digunakan sebagai DNA *barcode* untuk identifikasi spesies juga sudah terstandarisasi untuk mempelajari variasi genetik. Adapun panjang DNA sampel Nudibranchia dari penelitian ini sekitar 600 – 700 bp, sudah dapat mengidentifikasi jenis spesies berdasarkan pada *database COI* pada GenBank. Persentase sampel juga tinggi dengan ragam 99,11 – 100% sama dengan *database* yang ada. Dari hasil BLAST dapat dilihat bahwa sampel H1 dan H2 99,11 – 99,24% memiliki nama BLAST yaitu *Chromodoris lineolata* dan sampel J1 – J5 99,25 – 100% memiliki nama BLAST yaitu *Jorunna funebris*.



Gambar 3. Pohon Filogenetik

	1	2	3	4	5	6	7
4117711_J5							
4117709_J4	0.007						
4117707_J3	0.004	0.003					
4117701_J2	0.013	0.006	0.009				
4117703_J1	0.000	0.007	0.004	0.013			
4117705_H2	0.193	0.193	0.193	0.192	0.193		
4117699_H1	0.192	0.192	0.192	0.190	0.192	0.007	

Gambar 4. Matrix Jarak Genetik Antar Sampel

Pada pohon filogenetik, terdapat dua *sub-clade* yang ditampilkan dimana pada *sub-clade* pertama sample J1 – J5 berada disana dengan sampel *outgroup* yaitu sample *Jorunna funebris* dimana ini menandakan bahwa sample J1 – J5 adalah satu spesies yang sama. Pada *sub-clade* yang kedua, sampel H1 dan H2 berada pada *sub-clade* yang sama dengan sample *outgroup* *Chromodoris lineolata* yang juga dapat diartikan bahwa sample-sample tersebut merupakan spesies yang sama. Berbeda dengan sample *outgroup* *Nudibranchia sp.* sample ini tidak berada pada kedua *sub-clade* yang ada, melainkan membentuk *sub-clade* tersendiri. Dari hasil ini diketahui bahwa, sample *outgroup* ini memiliki spesies yang berbeda dan belum diketahui spesiesnya. Pada hasil pohon filogenetik terdapat bahwa sampel data *outgroup* *Nudibranchia sp.* terpisah dari *sub-clade* sampel penelitian. Terpisahnya sampel dalam pohon filogenetik dapat disebabkan oleh perbedaan *sub-clade* atau jenis spesies.

Outgroup digunakan pada pohon filogenetik yang didapatkan dari GenBank untuk mendapatkan informasi yang meyakinkan dari sekuen sampel yang berhubungan (Dharmayanti, 2011). Adapun ketentuan sebagai data *outgroup* adalah memiliki kedekatan taksonomi dengan sampel. Hasil data *outgroup* yang terpisah dengan sampel pada pohon filogenetik merupakan verifikasi sampel bahwa sampel berada pada spesies yang sama.

KESIMPULAN

Hasil dari identifikasi molekuler dengan menggunakan teknik PCR pada *Nudibranchia* adalah rekonstruksi pohon filogenetik pada *Nudibranchia* memiliki 2 *sub-clade*. Kedua *sub-clade* terbagi berdasarkan spesies nudibranchia yaitu, *Chromodoris lineolata* dan *Jorunna funebris*. Kedua *sub-clade* memiliki data yang sama dengan data *outgroup* sehingga dapat dipastikan sampel dan data pada database NCBI adalah spesies yang sama. J1 – J5 berada pada *sub-clade* pertama adalah nudibranchia dengan spesies *Jorunna funebris*. Pada sampel H1 dan H2 yang berada pada *sub-clade* kedua adalah nudibranchia dengan spesies *Chromodoris lineolata*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Sebagian penelitian dibiayai oleh “Hibah Penelitian Riset Dasar” dengan No. Kontrak : 225 – 62/UN7.6.1/PP/2021

DAFTAR PUSTAKA

- Asrul, H.A., Bahar, A., Syafiuddin., & Yasir, I., 2021. *Nudibranchia* Density in Spermonde Islands, South Sulawesi. *Jurnal Kelautan Spermonde*, 7(2):1–11.
- Dharmawan, I.G.W.D., 2018. Karakterisasi Morfogenetik *Nudibranch* dari Beberapa Populasi di Indonesia. Institut Pertanian Bogor.
- Harahap, M.R., 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *Circuit: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1):21–26. DOI: 10.22373/crc.v2i1.3248
- Kowalska, Z., Pniewski F., & Latala, A., 2019. DNA Barcoding – A New Device in Phycologist’s Toolbox. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 19(3):417–427. DOI:10.1016/j.ecohyd.2019.01.002
- Layton, K.K.S., Gosliner, T.M., & Wilson, N.G., 2018. Flexible Colour Patterns Obscure Identification and Mimicry in Indo-Pacific *Chromodoris* *Nudibranchs* (Gastropoda: Chromodorididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 124:27–36. DOI:10.1016/j.ympev.2018.02.008
- Madduppa, H., 2014. Bioekologi dan Biosistematika Ikan Terumbu. IPB Press.
- Martiansyah, I., 2021. Mini Review: Pendekatan Molekuler DNA Barcoding: Studi Kasus Identifikasi dan Analisis Filogenetik *Syzygium* (Myrtaceae). *Journal UIN Alauddin*. Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya. LIPI.
- Mashar, M.V., Kusuma, P.D., & Ansori A.S.R., 2019. Pengembangan Motif Karang Jenis *Leptoseria Explanata* pada Aplikasi Batik Berbasis WEB. *E-Proceeding of Engineering*, 6(1):1508 – 1513.

- Meilindo, W., 2014. Variasi Genetik dan Morfologi serta Tingkat Kekerabatan Kelinci Laut (*Phyllidiidae*) antara Populasi Papua dan Australia. Institut Pertanian Bogor.
- Paulangan, Y.P., Kalor, J.D., & Supoyo, A.S., 2021. Indeks Keanekaragaman, Keseragaman, dan Dominasi Nudibranch di Perairan Teluk Humbolt Kota Jayapura Papua Indonesia. *Jurnal Pengolahan Perikanan Tropis*, 5(1):59–64. DOI:10.29244/jppt.v5i1.34406
- Permadani, K.G., & Retnoaji, B., 2018. Histological Study of *Phulidia coelestis* (Nudibranchia) Epidermal Tissue from Pasir Putih, Situbondo. *Indonesian Journal of Biology and Education*, 1(1):44–47. DOI:10.31002/ijobe.v1i1.1047
- Rosyid, A., Krisanti, M., & Yulianto, G., 2022. Kelimpahan dan Keanekaragaman Siput Laut *Opisthobranch* di Bangsring *Underwater* dan Pulau Tabuhan, Banyuwangi. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 11(1): 213– 222. DOI:10.23887/jst-undiksha.v11i1.45048
- Salanggon, A.M., Aswani, S., Hermawan, R., Dewanto, D.K., Tanod, W.A., Hasanuddin, A., & Riyadi, P.H. 2020. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak *Sinularia* sp. dengan Metode *Broth-Dilution*. *Jurnal Kelautan Nasional*, 15(3):153–164. DOI:10.15578/jkn.v15i3.9057
- Tallei, T.E., Irwan, P.D., & Kolondam, B.J., 2016. DNA Barcoding Analysis of matK Gene of Some *Syzygium* Spesies., Bioinformatics Workshop 2016: Developing Knowledge and Skill in Bioinformatics for Young Indonesian Scientists in Improving Research Quality in Life Science and Sustainable Exploration of Biodiversity in Indonesia. Al-Azhar University. Jakarta.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A., & Kumar, S., 2013. Mega6: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 6.0. *Molecular Biology And Evolution*, 30(12): 2725 – 2729. DOI:10.1093/molbev/mst197
- Waldchen, J., Rzanny, M., Seeland, M., & Mäder, P., 2018. Automated Plant Species Identification-Trends and Future Directions. *Plos Computational Biology*, 14(4):1–19. DOI:10.1371/journal.pcbi.1005993
- Zhao, C., Chan, S.S.F., Cham, W.K., & Chu, L.M., 2015. Plant Identification Using Leaf Shapes? A Pattern Counting Approach. *Pattern Recognition*, 48(10):3203–3215. DOI: 10.1016/j.patcog.2015.04.004