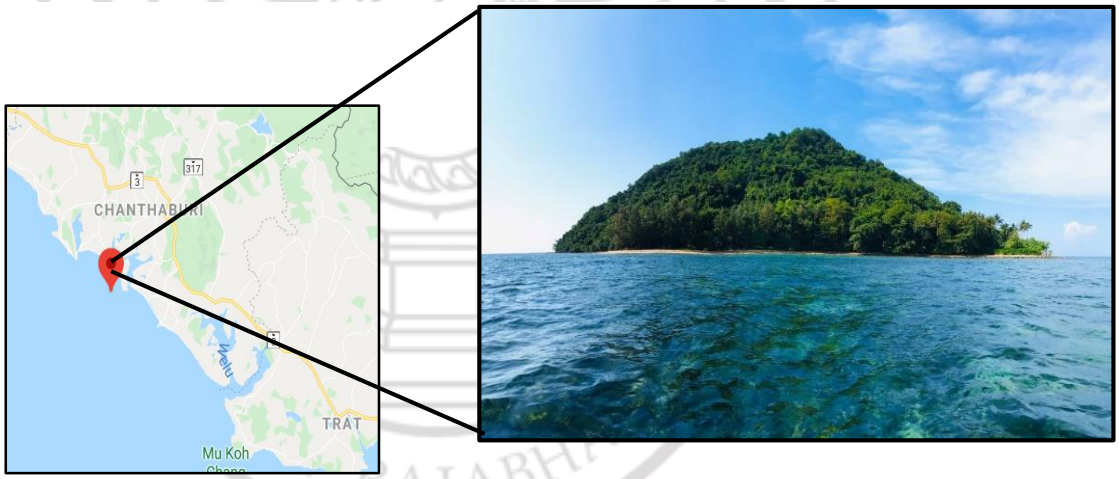
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

พื้นที่วิจัย

เกาะนมสาวตั้งอยู่ ตำบลบางกะไชย อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ห่างจากชายฝั่งประมาณ 2 กิโลเมตร ตัวเกาะกว้างประมาณ 300 เมตร ยาวประมาณ 500 เมตร พื้นที่ประมาณ 0.5 ตารางกิโลเมตร บริเวณพื้นที่หน้าเกาะมีชายหาด แนวปะการังที่สวยงาม เหมาะแก่การดำน้ำชมปะการัง ที่พบว่าปะการังในบริเวณนี้ มีลักษณะที่เฉพาะ และมีความสวยงามที่โดดเด่น เช่น กลุ่มปะการังก้อน (Massive coral) เป็นต้น และมีหาดหินที่ประกอบไปด้วยหินที่มีสีสันสวยงามขนาดต่าง ๆ ในบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลง และยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและหลบซ่อนตัวที่สำคัญของสัตว์ทะเลหลายชนิด รวมถึงทรัพยากรปูด้วย ปัจจุบันพื้นที่เกาะนมสาว ได้เป็นแหล่งท่องเที่ยวเชิงนิเวศ ซึ่งดำเนินการโดยองค์การบริหารส่วนตำบลบางกะไชย อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 บริเวณเกาะนมสาว ตำบลบางกะไชย อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างปูใบ้และปูน้ำเค็มชนิดอื่น ๆ มีดังนี้
   1.1 ขวดเก็บตัวอย่าง
   1.2 ป้าย Tag
   1.3 ถุงเก็บตัวอย่าง
   1.4 พลั่วมือ
   1.5 สวิง

1.6 กะละมัง

1.7 กล่องโฟม

1.8 ลอบปูขนาดพับได้ขนาด 2.5 นิ้ว ที่บริเวณท้องลอบ ส่วนด้านข้างและด้านบน มีขนาดตา 1.5 นิ้ว ความกว้าง 28 เซนติเมตร ยาว 46 เซนติเมตร และสูง 18 เซนติเมตร ดังภาพที่ 3.2

1.9. เครื่องวัดพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) ยี่ห้อ Garmin รุ่น Etrex 20 ดังภาพที่ 3.2

ภาพที่ 3.2 อุปกรณ์การเก็บตัวอย่างในบริเวณเกาะนมสาว จังหวัดจันทบุรี

ก. เครื่องมือวัดพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) ยี่ห้อ Garmin รุ่น Etrex 20

ข. ลอบปูขนาดพับได้ขนาด 2.5 นิ้ว ที่บริเวณท้องลอบ ส่วนด้านข้างและด้านบน มีขนาดตา 1.5 นิ้ว ความกว้าง 28 เซนติเมตร ยาว 46 เซนติเมตร และสูง 18 เซนติเมตร

ค. สวิง

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการสำหรับศึกษานิเวศวิทยาประชากรของปูใบ้ ได้แก่

2.1 เวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์แบบดิจิทัล

2.2 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 3.3

2.3 ขวดหรือโหลใส่ตัวอย่างปู

2.4 สารเคมีที่ใช้รักษาสภาพ ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70%

2.5 กลีเซอรรีน 20%

2.6 สมุดจดบันทึก

3. อุปกรณ์ถ่ายภาพทางวิทยาศาสตร์ ได้แก่

3.1 แท่นถ่ายภาพ

3.2 ปากคีบ

3.3 เข็มหมุด

3.4 กล้องดิจิตอล รุ่น Fujifilm XA5 ดังภาพที่ 3.4

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 3.3 อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ
ก. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
ข. เวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์แบบดิจิทัล

ภาพที่ 3.4 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล Fujifilm รุ่น Fujifilm XA5

4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการสำหรับศึกษาการจำแนกชนิดปูใบ้ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
4.1 หลอดไมโครเซนทริฟิวส์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
4.2 บีกเกอร์ (Beaker)
4.3 ขวดรูปชมพู่ (Flask)
4.4 ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip)
4.5 ปากคีบ (Forcep)
4.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
4.7 กรรไกรผ่าตัด (Operating scissor)
4.8 ถุงมือแพทย์ (Latex disposable gloves)
4.9 นาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)
4.10 กล้องถ่ายรูป (Camera)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4.11 กระดาษทิชชู่ (Tissue)

4.12 ที่ตั้งหลอดทดลอง (Rack)

4.13 กล่องใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก (Rack of microtube)

4.14 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Micropipette)

4.15 เครื่องชั่งสาร (Balance)

4.16 เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)

4.17 ตู้แสงสีขาวและแสงอัลตร้าไวโอเลต (UV transilluminator)

4.18 เครื่องแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแนวนอน (Electrophoresis)

4.19 เครื่องอุ่นสารในหลอดทดลอง (Heating block incubator)

4.20 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycler)

4.21 เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง (Vortex mixer)

4.22 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

4.23 เครื่องแยกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยงเซนทริฟิวส์ (Centrifuges)

4.24 เครื่องปั่นตกตะกอนชนิดตั้งโต๊ะ (Spin down centrifuge)

สารเคมีในการทดลอง ได้แก่ สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR การทำผลิตผล PCR ให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

1. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen, Taiwan) สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

1.2 เอนไซม์ Proteinase K

2. สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

2.1 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized distilled water)

2.2 สารละลาย 10X *Taq* buffer

2.3 สารละลาย 25 mM $MgCl_2$

2.4 10 mM dNTP

2.5 10 pmol Forward primer

2.6 10 pmol Reverse primer

2.7 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Biotechrabbit Gmbh, Germany)

2.8 DNA template

3. สารเคมีสำหรับการทำผลิตผล PCR ให้บริสุทธิ์

3.1 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan)

4. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

4.1 น้ำกลั่น (Distilled Water)

4.2 ผงวุ้น Agarose

4.3 0.5X TBE (Tris-borate EDTA) Buffer

สถาบันวิทยบริการมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4.4 สารละลาย Red Safe

4.5 100 bp DNA ladder (Biotechrabbit Gmbh, Germany)

4.6 1 Kb DNA ladder (Kapa Biosystems, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย เพื่อศึกษานิเวศวิทยาประชากรของปูใบ้

การสำรวจพื้นที่ศึกษาวิจัย

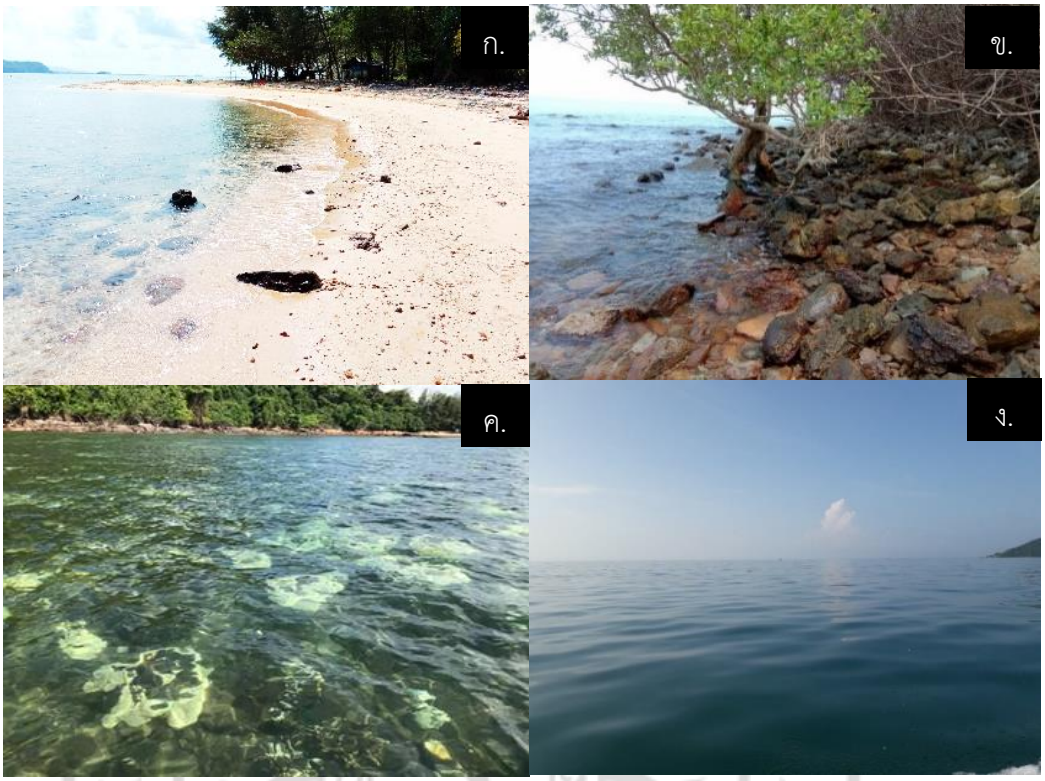
ทำการสำรวจพื้นที่บริเวณเกาะนมสาว ตำบลบางกะไชย อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ดังภาพที่ 3.5 เพื่อกำหนดจุดเก็บตัวอย่างในบริเวณหาดหิน หาดทราย แนวปะการัง และน้ำลึกที่ไม่มีแนวปะการัง วางแผนการเก็บตัวอย่าง และบันทึกพิกัดด้วย เครื่องมือวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ยี่ห้อ Garmin รุ่น Etrex 20

ภาพที่ 3.5 การสำรวจพื้นที่บริเวณเกาะนมสาว ตำบลบางกะไชย อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

การศึกษาภาคสนาม

1. ออกเก็บตัวอย่างปูทั้ง 4 ระบบนิเวศ ได้แก่ ระบบนิเวศหาดทราย ระบบนิเวศหาดหิน ระบบนิเวศปะการัง และระบบนิเวศบริเวณน้ำลึกที่ไม่มีแนวปะการัง ช่วงเดือนมกราคม 2562 – เดือนธันวาคม 2562 ดังภาพที่ 3.6

2. ในบริเวณหาดหิน และบริเวณหาดทราย จะวางเส้นทางการสำรวจตามแนวตั้งฉากกับชายหาด ทั้งหมด 3 แนว (Transect) โดยแต่ละแนว ประกอบไปด้วย 3 บริเวณ ได้แก่ บริเวณน้ำขึ้นสูง (High tide) น้ำขึ้นปานกลาง (Mid tide) และน้ำลงต่ำ (Low tide) ตามรายงานวิจัยของ Fetami และคณะ (2012 : pp. 115-120) ดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.6 ระบบนิเวศเกาะนมสาว ตำบลบางกะไชย อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี
ก. ระบบนิเวศหาดทราย ข. ระบบนิเวศหาดหิน
ค. ระบบนิเวศแนวปะการัง ง. ระบบนิเวศบริเวณน้ำลึกที่ไม่มีแนวปะการัง

ภาพที่ 3.7 พื้นที่การเก็บตัวอย่างในระบบนิเวศหาดหินและหาดทราย บริเวณเกาะนมสาว จังหวัดจันทบุรี

3. การเก็บตัวอย่างในบริเวณหาดหิน และบริเวณหาดทราย จะเก็บตัวอย่างปูทั้งเพศผู้และเพศเมีย จะใช้วิธีพลิกหินที่มีขนาดเล็กเพื่อค้นหาปู ซึ่งมักจะอาศัยใต้ก้อนหิน สังเกตตามรอยแยกของหิน และปูที่ว่ายน้ำอยู่ตามแอ่งน้ำขัง อาจจะใช้สวิงตักตัวอย่าง ค้นหาตามซากใบไม้ที่อยู่ตอนบนของหาด และใช้พลั่วขุดรูและจับด้วยมือ และในบริเวณน้ำลงต่ำ (Low tide) ของบริเวณหาดหิน และหาดทรายจะใช้การวางลอบปู ขนาดพับได้ขนาด 2.5 นิ้วที่บริเวณท้องลอบ ส่วนด้านข้างและด้านบนมีขนาดตา 1.5 นิ้ว ความกว้าง 28 เซนติเมตร ยาว 46 เซนติเมตร และสูง 18 เซนติเมตร ทั้งหมด 10 ลูก โดยการวางลอบลงในพื้นที่ประมาณ 4 ชั่วโมง โดยใช้เหยื่อคือ ปลาข้างเหลืองในการล่อปูให้เข้าลอบจากนั้นจะกู้ลอบขึ้นมา และปลดปูออกจากลอบ ในขณะเก็บตัวอย่างจะทำการบันทึกภาพตัวอย่างที่อยู่ในสภาพตามธรรมชาติไว้ด้วย ดังภาพที่ 3.8

ภาพที่ 3.8 การเก็บตัวอย่างปูในระบบนิเวศหาดหิน และหาดทราย
ก. การเก็บตัวอย่างปูโดยใช้สวิง ข. การเก็บตัวอย่างปูโดยวิธีการใช้มือ ค. การวางลอบ

4. ในบริเวณปะการัง และบริเวณน้ำลึกที่ไม่มีแนวปะการัง จะใช้วิธีการเก็บตัวอย่างปูโดยการวางลอบปูขนาดพับได้ขนาด 2.5 นิ้วที่บริเวณท้องลอบ ส่วนด้านข้างและด้านบน มีขนาดตา 1.5 นิ้ว ความกว้าง 28 เซนติเมตร ยาว 46 เซนติเมตร และสูง 18 เซนติเมตร บริเวณละ 25 ลูก โดยการวางลอบลงในพื้นที่ประมาณ 4 ชั่วโมง โดยใช้เหยื่อคือปลาข้างเหลืองในการล่อปูให้เข้าลอบจากนั้นจะกู้ลอบขึ้นมา และปลดปูออกจากรอบ ดังภาพที่ 3.9

5. ตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง นำไปรักษาสภาพด้วยน้ำแข็งแล้วนำกลับไปศึกษาการจำแนกชนิดของปูในห้องปฏิบัติการ

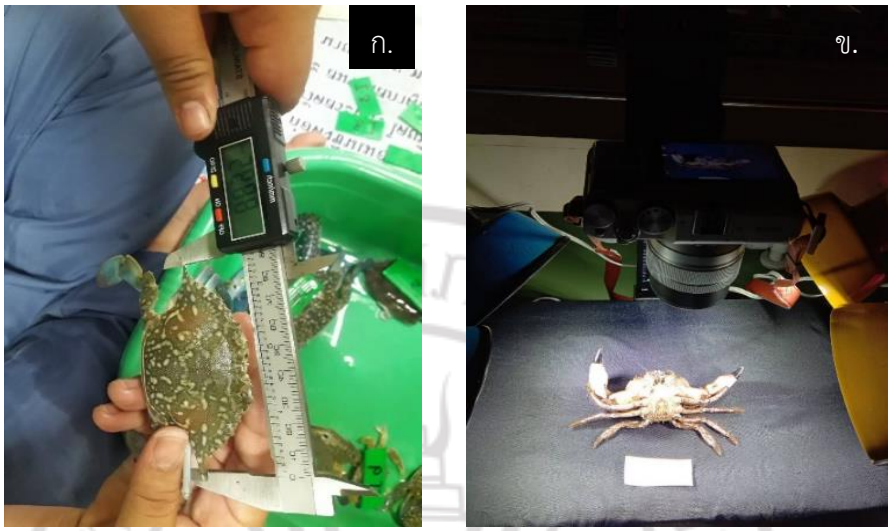
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 3.9 การเก็บตัวอย่างปูในบริเวณปะการัง และบริเวณน้ำลึกที่ไม่มีแนวปะการัง
ก. การวางลอบ ข. การกู้ลอบ ค. การปลดปูออกจากลอบ

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

1. นำตัวอย่างปูมาวัดขนาดความกว้างกระดองด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ เพื่อดูขนาดของปู ถ่ายรูปที่ยังคงมีสีสันเดิมพร้อมสเกลวัดความยาว โดยถ่ายรูปทั้งด้านกระดอง (Carapace) ด้านท้อง (Abdomen) ด้านหน้า (Anterior) และด้านหลัง (Posterior) ของตัวปู จากนั้นนำไปรักษาสภาพด้วยแอลกอฮอล์ 70% และเขียนป้ายติดฉลากบอกชนิดของปู ชื่อผู้เก็บ และระบบนิเวศที่เก็บมาได้ (ภาพที่ 3.10)

2. การจำแนกชนิดทาง อนุกรมวิธาน โดยการจัดลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานของปูจัดตาม Naiyanetr (2007) และจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานตามคู่มือ และรายงานของศรีสุภรี คงคาเย็น (2522 : หน้า 65-84); Ng (1998 : pp.1046-1155) และ Ng and Davie (2002 : pp. 369-384)



ภาพที่ 3.10 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ
ก. วัดขนาดความกว้างกระดองปู ข. การถ่ายภาพปูใต้กล้อง

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์โครงสร้างประชากรของปูใบ้ เช่น อัตราส่วนเพศ การกระจายขนาดความกว้างกระดอง ความชุกชุมในแต่ละระบบนิเวศ ความชุกชุมในแต่ละฤดูกาล จากนั้นทำการทดสอบทางสถิติความแตกต่างของประชากรด้วย One-Way ANOVAตามรายงานวิจัยของ Kunsook และ Dumrongrojwatthana (2017 : pp. 45-67)

2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกชุมของปูใบ้ และปัจจัยทางนิเวศวิทยาบางประการด้วยสถิติทดสอบ Pearson correlation

3. วิเคราะห์ความชุกชุมของปู โดยกำหนดสถานภาพของปูเพื่อเป็นข้อมูลในการกำหนดบริเวณที่มีความสำคัญทางความหลากหลายทางชีวภาพ และเพื่อที่จะดูแนวโน้มของปูใบ้ที่ถูกคุกคามภาวะเสี่ยงสูญพันธุ์ และภาวะที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์, วชิระ ใจงาม, และธรณ์ ธำรงนาวาสวัสดิ์, 2550 : หน้า 613-624) มีรูปแบบดังต่อไปนี้ โดยใช้สมการ ค่าปรากฏของปูน้ำเค็มได้ ดังนี้

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

$$Socc. = (Ni / N)\times 100$$

เมื่อ Socc = ดัชนีการปรากฏของปูน้ำเค็ม
N_i = จำนวนปูน้ำเค็มที่ได้ในแต่ละชนิด
N = จำนวนปูน้ำเค็มทั้งหมด

โดย

R (Rare species)	สปีชีส์ที่หายากมาก	โดยพบน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10%
U (Uncommon species)	สปีชีส์ที่หายาก	โดยพบได้ระหว่าง10 ถึง 25%
C (Common species)	สปีชีส์ที่พบทั่วไป	โดยพบได้ระหว่าง25 ถึง 50%
V (Very common species)	สปีชีส์ที่พบได้ง่าย	โดยพบมากกว่าหรือ เท่ากับ 50%

4. สร้างฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของปูใบ้ บริเวณเกาะนมสาว ด้วย Google application เช่น google site และจัดทำเป็นสื่อการเรียนรู้ (E-learning) ใน Google classroom

5. เผยแพร่ข้อมูลสู่ชุมชน เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ โปสเตอร์ และข้อมูลงานวิจัยเพื่อนำเสนอมาตรการเฝ้าระวังการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพของปู บริเวณเกาะนมสาว จังหวัดจันทบุรี ต่อองค์กรบริหารส่วนท้องถิ่น และชุมชน

วิธีดำเนินการวิจัย เพื่อศึกษาการจัดจำแนกชนิดปูใบ้ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปู

สุ่มตัวอย่างปูชนิดละ 1-9 ตัวอย่าง (บางชนิดเก็บตัวอย่างได้เพียง 1 ตัวอย่าง) มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เนื้อเยื่อจากบริเวณก้ามหรือขา ปริมาณ 0.07 กรัม สกัดด้วย ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Flavogen, Taiwan)

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของยีนไซโตโครม ออกซิเดส วัน หรือ COI

ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือพีซีอาร์ (PCR) ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในส่วนของยีน COI โดยปฏิกิริยาดังกล่าวจะประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ (PCR mixture) ซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร (µl) ดังนี้

น้ำกลั่นปราศจากไอออน	17.4	ไมโครลิตร
Forward primer (10 µM)	0.8	ไมโครลิตร
Reverse primer (10 µM)	0.8	ไมโครลิตร
Hot Start PCR Master Mix	25	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)	6.0	ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ที่ใช้เป็น Universal primer ซึ่งมีคุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน COI ในปูได้หลายชนิด คือ ไพรเมอร์ LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'; Forward primer) และ HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'; Reverse primer) (Folmer et al., 1994 : pp. 294-299)

สภาวะการทำงานของปฏิกิริยา PCR ได้แก่

- Intial denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C นาน 5 นาที	
- Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C นาน 30 วินาที	35 รอบ
- Annealing	ที่อุณหภูมิ	45 °C นาน 30 วินาที	
- Extention	ที่อุณหภูมิ	72 °C นาน 1 นาที	
- Final extention	ที่อุณหภูมิ	72 °C นาน 10 นาที	

การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน COI

ทำการตรวจสอบผลิตผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธี 1 % Agarose gel electrophoresis โดยชั่งผงวุ้นอะกาโรส 0.15 กรัม ต้มในสารละลาย 0.5X TAE Buffer จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 มิลลิลิตร สำหรับเจลขนาดเล็ก (เจลขนาดใหญ่ใช้ผงวุ้นอะกาโรส 0.30 กรัมและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 มิลลิลิตร) เติมสารละลาย Red Safe สำหรับเจลขนาดเล็กปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร (เจลขนาดใหญ่เติมสารละลาย Red Safe 1.5 ไมโครลิตร) จากนั้นเทใส่พิมพ์ เสียบหวีไว้ให้เกิดหลุม แล้วทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว วางถาดเจลที่เตรียมไว้ลงในเครื่อง Electrophoresis เติม 0.5X TAE Buffer ให้พอท่วมเจล นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading dye 1 ไมโครลิตร จากนั้นโหลดลงหลุมเจลจนครบทุกตัวอย่าง ปรับการทำงานเครื่อง Electrophoresis ที่ 100 โวลต์ นาน 25 นาที แล้วนำแผ่นเจลมาดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Ultraviolet-visible Transilluminator เพื่อตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และถ่ายภาพเจล

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product

PCR product ที่ได้จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ (Purified) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlowTMGel/PCR kit (Geneaid, Taiwan) และส่ง PCR product ที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (Automated sequencer) ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่สมบูรณ์ ทำได้โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอทั้งสองสายของแต่ละตัวอย่างมาทำ Pairwise DNA alignment โดยใช้โปรแกรม MEGA v.7 (Kumar, Tamura & Stecher, 2016 : pp. 1870-1874)

2. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด Barcode of Life Data System (BOLD) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ Pairwise DNA alignment มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม Blast (Basic Local Aligment Search Tool) และนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด BOLD (http://www.bold systems.org) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างปูน้ำเค็มเป็นชิ้นส่วนของยีน COI ที่ต้องการหรือไม่ และรหัสพันธุกรรมที่ได้มีความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตชนิดใด

3. การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) โดยวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิด (Intraspecific genetic distance) และระหว่างชนิด (Interspecific genetic distance) โดยใช้โปรแกรม MEGA v. 7.0

4. การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างในส่วนของยีน COI ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบ (Multiple sequence alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่นำมาจากฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank และ BOLD ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างมากที่สุด มาทำ

การวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างปูน้ำเค็ม โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) โดยใช้โปรแกรม MEGA v. 7.0

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี