

repository.ub.ac.id

**ANALISA GEN *CYTOCHROME B* PADA KURA KURA  
KAKI GAJAH (*Manouria emys emys*) UNTUK  
MENGETAHUI KEKERABATAN INDIVIDU  
DI PREDATOR FUN PARK BATU DENGAN  
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION***

**SKRIPSI**

Oleh:

**NUR JAUHARAH FITRIANI**

**145130101111016**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**



repository.ub.ac.id

**ANALISA GEN *CYTOCHROME B* PADA KURA KURA  
KAKI GAJAH (*Manouria emys emys*) UNTUK  
MENGETAHUI KEKERABATAN INDIVIDU  
DI PREDATOR FUN PARK BATU DENGAN  
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION***

**SKRIPSI**

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh:

**NUR JAUHARAH FITRIANI**

**145130101111016**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI****ANALISA GEN *CYTOCHROME B* PADA KURA KURA KAKI GAJAH  
(*Manouria emys emys*) UNTUK MENGETAHUI KEKERABATAN  
INDIVIDU DI PREDATOR FUN PARK BATU DENGAN  
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*****Oleh:****NUR JAUHARAH FITRIANI****145130101111016**

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji  
pada tanggal 29 Juni 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr.Ir.Gatot Ciptadi, DESS**  
NIP. 196005121987011001

**drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet**  
NIP. 19880518 201504 1 003

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nur Jauharah Fitriani  
NIM : 145130101111016  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul:

***Analisa Gen Cytochrome B Pada Kura Kura Kaki Gajah (*Manouria Emys Emys*) Untuk Mengetahui Kekekabatan Individu di Predator Fun Park Batu dengan Metode Polymerase Chain Reaction***

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar – benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 29 Juni 2018  
Yang menyatakan,

**(Nur Jauharah Fitriani)**  
**NIM. 145130101111016**

**Analisa Gen *Cytochrome B* Pada Kura Kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) Untuk Mengetahui Keekerabatan Individu di Predator Fun Park Batu dengan Metode *Polymerase Chain Reaction***

**ABSTRAK**

Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) merupakan salah satu hewan di Indonesia yang dilindungi dan masuk ke dalam *endangered species* IUCN *redlist* dan Apendik II CITES. Fragmen bukan penyandi protein yang sering digunakan dalam mengkaji hubungan kekerabatan di antara spesies adalah daerah Cyt-b (*Cytochrome b*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kekerabatan individual berdasarkan sekuen gen Cyt-b dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria meys emys*) dan dibandingkan dengan *database* NCBI Baning Coklat (*Manouria emys phayrei*). DNA didapatkan dari empat sampel *wholeblood* kura-kura Kaki Gajah, 2 kura-kura jantan dan 2 betina yang berada di PFP Batu yang kemudian diisolasi menggunakan *QIAamp DNA Mini Kit*. Primer yang digunakan dalam metode PCR adalah primer *forward* (CYTB\_F) 5'GTTATAGCCACCGCATTCGT-3' dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-GGCTGGTGTAAAGTTGTCTG -3'. Sekuens hasil PCR dilakukan dengan metode *Sanger*. Analisa sekuen gen menggunakan program Mega 7.0 dan pohon filogeni direkonstruksi menggunakan metode *neighbor-joining*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antara sampel 4BR Rara dan 7BR Rere tidak memiliki perbedaan basa nukleotida dengan *genetik distance* dan *sequence diversity* 0%. Sampel 4BR, 5BR, 6BR, dan 7BR memiliki perbedaan basa nukleotida terhadap *database genebank Monouria emys emys cyt-b*. *Genetic distance* sampel kura-kura Kaki Gajah 4BR Rara 0,0124%, 5BR Roro 0,0137%, 6BR Ruru 0,0118%, dan 7BR Rere 0,0124% dengan referensi *Manouria emys emys*. Sedangkan *sequence diversity* 4BR Rara 0,0398%, 5BR Roro 0,0484%, 6BR Ruru 0,0358%, dan 7BR Rere 0,0398% dengan persentase homologi di atas 95% dan variasi genetik di bawah 3%. Keempat sampel merupakan kerabat dekat dalam satu spesies yang sama. Kesimpulan dari penelitian ini adalah kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) di Predator Fun Park berkerabat dekat dalam satu spesies yang sama dan perbedaan morfologi tidak berpengaruh pada keturunan genetik dengan divergen sekuen 0,04%.

Kata kunci : Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*), MtDNA, Cyt-b, PCR.

**Analysis of Cytochrome B Gene of Asian Brown Tortoise (*Manouria emys emys*) Towards Individual Relationship in Predator Fun Park Batu Using Polymerase Chain Reaction Method**

**ABSTRACT**

Asian Brown Tortoise (*Manouria emys emys*) is one of Indonesia's protected animals and get into the endangered species of IUCN redlist and Appendix II of CITES. Study of genetic diversity through molecular data using mitochondrial DNA (mtDNA) helps in knowing the differences between species (intraspecies). In the mitochondrial genome, there are protein-coding fragments and non-coding proteins. The coding fragment of the protein that is often used in assessing genetic relationships among species is the Cytochrome B area. This research aims to know the level of the individual relationship based on Cyt-b genes by Polymerase Chain Reaction (PCR) method on the Asian Brown Tortoise (*Manouria emys emys*) compared to NCBI database of Indian Brown Tortoise (*Manouria emys phayrei*). The DNA is acquired from four whole blood samples of tortoise in Predator Fun Park then isolated using the QIAamp® DNA Mini Kit. The primer used in the PCR method is the forward primer (CYTB\_F) 5' GTTATAGCCACCGCATTCGT-3' and reverse primer (CYTB\_R) 5' -GGCTGGTGTAAAGTTGTCTG-3'. The sequencing of PCR results is done by Sanger method. The analysis of gene sequence is done by using Bioedit and NCBI BLAST. The result of this study shows that among a sample of 4BR Rara and 7BR Rere has 0% based on genetic distance and sequence diversity. The sample 4BR, 5BR, 6BR, and 7BR have different nucleotide bases compared to genbank database *Manouria emys emys* cyt-b. Genetic distance of 4BR Rara 0,0124%, 5BR Roro 0,0137%, 6BR Ruru 0,0118%, and 7BR Rere 0,0124% compared to genbank database *Manouria emys emys*. Sequence diversity of 4BR Rara 0,0398%, 5BR Roro 0,0484%, 6BR Ruru 0,0358%, and 7BR Rere 0,0398%. The Conclusion of this study is the Asian Brown Tortoise (*Manouria emys emys*) in the Predator Fun Park named Rara, Roro, Ruru, and Rere are closely related genetically but have different character of DNA sequence with *Manouria emys phayrei*.

Keywords : Asian Brown Tortoise (*Manouria emys emys*), MtDNA, Cyt-b, PCR.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas perkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Analisa Gen *Cytochrome B* Pada Kura Kura Kaki Gajah (*Manouria Emys Emys*) Untuk Mengetahui Kekerabatan Individu di Predator Fun Park Batu dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya proposal skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

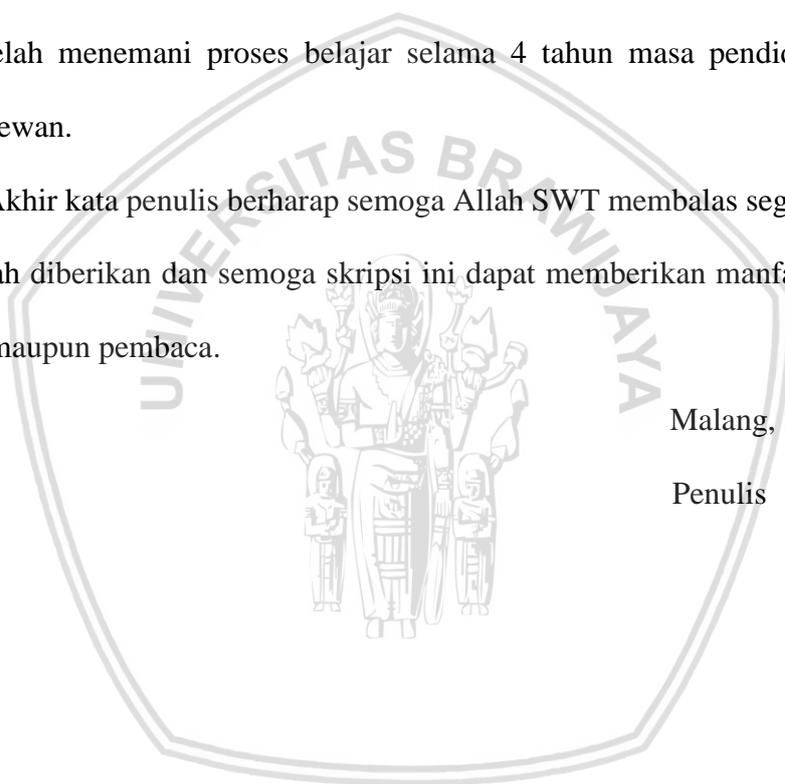
1. Dr.Ir.Gatot Ciptadi, DESS., dan drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet., sebagai dosen pembimbing atas bimbingan, nasihat, saran dan segala perhatian yang telah diberikan selama penyusunan skripsi ini.
2. Drh. Aulia Firmawati, M.Vet., dan drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si., sebagai dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran selama pelaksanaan ujian skripsi.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Drh. Irwanda Kusuma Wardhana sebagai dokter hewan Predator Fun Park atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada penulis.
5. Keluarga penulis, Ayah Baso Marannu, Ibunda Triana Karyawati, dan Adik Syawal Kurnia Putra atas segala pengorbanan, doa, materi dan kasih sayang yang tak terhingga kepada penulis.

6. Keluarga besar Improve KELAWAR yang telah memberi masukan, dorongan, semangat, dan pengetahuan tentang satwa liar, teman sejawat yaitu Seruni Ummi Aziizalita, Andi Citra Septaningsih, Ahmad Ikhwani, Rifqi Rahman, dan Dinul Hamdi yang telah memberi masukan, motivasi, dan semangat selama proses penulisan skripsi kepada penulis, drh. Muhammad Abdillah yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan selama menjalankan penelitian dan anggota kelas AMAZE yang telah menemani proses belajar selama 4 tahun masa pendidikan dokter hewan.

Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca.

Malang, 29 Juni 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

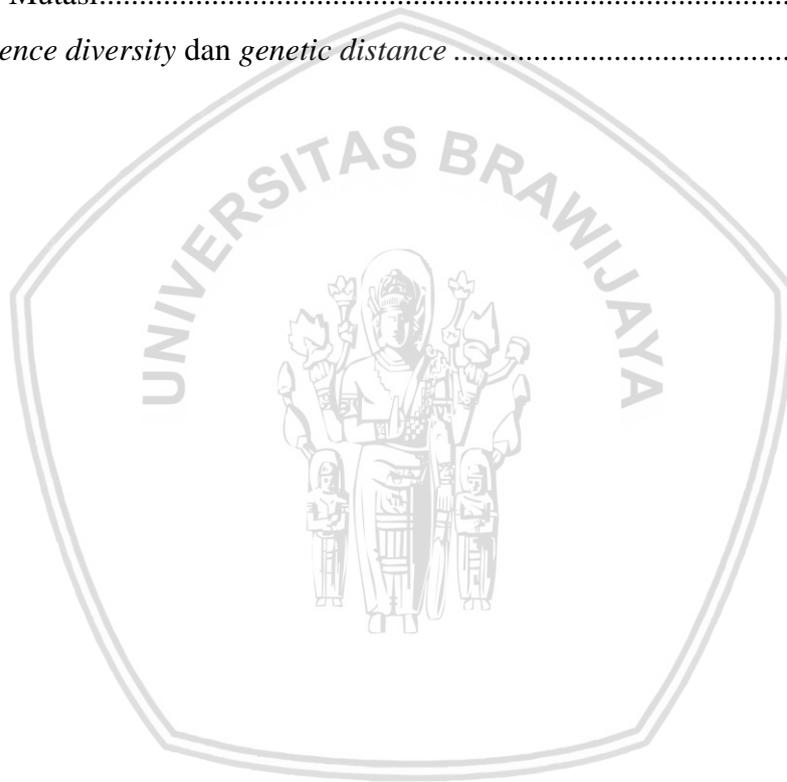
	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>ABSTRAK</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG</b> .....	xiv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Batasan Masalah .....	7
1.4 Tujuan Penelitian .....	8
1.5 Manfaat Penelitian.....	8
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	9
2.1 Kura-kura Baning ( <i>Manouria</i> ).....	9
2.2 Morfologi dan Klasifikasi Kura-kura Kaki Gajah.....	11
2.3 DNA mitokondria (mtDNA) .....	12
2.4 Gen <i>Cyt-b</i> ( <i>Cytochrome B</i> ).....	13
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	14
2.5.1 Teknik Dasar Amplifikasi PCR.....	16
2.5.5.1 Denaturasi Untai Ganda DNA.....	17
2.5.5.2 Primer <i>Annealing</i> .....	18
2.5.5.3 DNA <i>Polymerase Extension</i> .....	19
2.6 Sekuensing DNA .....	20
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> ..	23

3.1 Kerangka Konseptual .....	23
3.2 Hipotesis Penelitian.....	25
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>26</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	26
4.2 Materi dan Metode Penelitian.....	26
4.3 Alat dan Bahan .....	29
4.4 Tahapan Penelitian .....	28
4.5 Rancangan Penelitian .....	31
4.6 Prosedur Kerja .....	31
4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Kura-kura Kaki Gajah.....	31
4.6.2 Isolasi DNA .....	32
4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA.....	32
4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA.....	32
4.6.3.2 Uji Kualitas DNA.....	33
4.6.5 Desain Primer .....	34
4.6.6 Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	34
4.6.7 Uji Kuantitas Produk PCR.....	34
4.6.8 Sekuensing DNA .....	35
4.6.9 Analisa Data .....	35
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>36</b>
5.1 Hasil Isolasi DNA Kura-kura Kaki Gajah.....	36
5.2 Amplifikasi Gen Cyt-b dengan Metode PCR .....	40
5.3 Sekuensing DNA .....	42
5.4 Analisa Sekuen Gen Cyt-b .....	44
5.5 Hubungan Kekerabatan Berdasarkan Pohon Filogenetik.....	47
<b>BAB 6. PENUTUP</b> .....	<b>57</b>
6.1 Kesimpulan.....	57
6.2 Saran .....	57
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>58</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>63</b>



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1 Informasi Individu Sampel Kura-kura Kaki Gajah .....	27
5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA sampel .....	36
5.2 <i>Query coverage</i> dan <i>ident Sampel</i> .....	43
5.3 Perubahan Basa Nukleotida .....	45
5.4 Jenis Mutasi .....	47
5.5 <i>Sequence diversity</i> dan <i>genetic distance</i> .....	53



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Scute <i>Manouria emys</i> .....	9
2.2 Pectoral Scute <i>Manouria emys emys</i> dan <i>phayrei</i> .....	10
2.3 Perbedaan Kura-kura Baning .....	10
2.4 Karapas <i>Manouria emys emys</i> .....	11
2.5 DNA Mitokondria .....	13
2.6 Skema Satu Siklus PCR .....	20
2.7 Skema Sekuensing DNA Metode Sanger .....	22
3.1 Kerangka Konseptual .....	24
4.1 Kerangka Operasional .....	29
5.1 Elektroforesis DNA Total .....	39
5.2 Origin Oligo Nukleotida Gen Cyt-b.....	41
5.3 Elektroforesis Produk PCR.....	42
5.4 Pohon Filogeni dengan Metode <i>Neighbor-Joining</i> .....	50

## DAFTAR LAMPIRAN

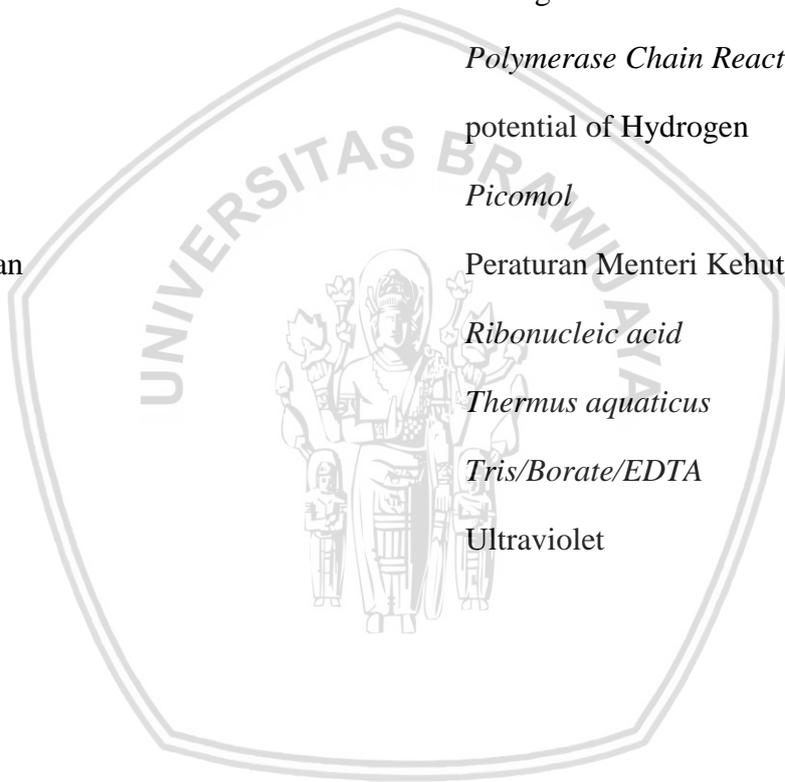
<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Protokol Isolasi DNA .....	61
2. Desain Primer .....	62
3. Hasil Uji Kuantitas Sampel .....	66
4. Perhitungan Pita Fragmen DNA .....	67
5. BLAST Sekuen DNA .....	68
6. Pembacaan Hasil Sekuensing dengan BioEdit .....	71
7. Grafik Elektogram Sekuen Sampel .....	73
8. <i>Pairwise distance</i> Sampel dengan Referensi .....	75



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
µL	Mikroliter
AE	<i>Eluted buffer</i>
AIDS	Acquired Immunodeficiency syndrome
AL	<i>Lysis buffer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	<i>Base Pair</i>
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
CITES <i>Endangered</i>	<i>Convention on International Trade in Species of Wild Fauna and Flora</i>
Cm	Sentimeter
ddH <sub>2</sub> O	<i>Doubele distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Triphospat deoxynucleoside</i>
ddNTPs	<i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
EtBr	<i>Etidium bromida</i>
g	Gram
HCl	<i>Hydrochloric acid</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
kb	<i>Kilobase</i>
Kg	Kilogram

Mg	Magnesium
mL	Mililiter
mM	Milimolar
mRNA	messenger-RNA
mtDNA	DNA Mitokondria
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogram
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potential of Hydrogen
Pmol	<i>Picomol</i>
Permentan	Peraturan Menteri Kehutanan
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
UV	Ultraviolet



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kura-kura dalam evolusi tidak banyak berubah dibanding kelompok hewan lain hingga periode 85.000 tahun yang lalu dan menjadi bagian penting dalam konteks religius dan sosial. Dalam mitologi Yunani, kura-kura digunakan sebagai simbol kepastian, kestabilan, dan kebijaksanaan (Klemens and Swingland, 1989). Kepentingan terkait nilai-nilai tersebut menjadikan harga jual kura-kura tinggi untuk para kolektor dunia. Kelangkaan kura-kura ini didukung oleh eksploitasi berlebihan dan merusak habitat. Kura-kura ini kemudian dijual sebagai makanan, obat, dan hewan peliharaan (Moll, 1989). Dalam perekonomian, kura-kura dijadikan makanan di sebagian besar dunia (Klemens and Swingland, 1989).

Salah satu genus dari kura-kura primitif ini adalah *Manouria*. *Manouria* merupakan kura-kura terbesar di Asia tropis (*Indo-Malayan tortoises*). *Manouria* dibedakan menjadi *Manouria impressa* dan *Manouria emys* dilihat dari ukuran tubuh, tinggi kubah pada karapas, rigi *marginal scute* di posterior, dan panjang *supracaudal scute*. *Manouria emys* memiliki tubuh berwarna coklat kehitaman dengan *scute* yang berwarna lebih cerah pada tepi. Memiliki dua subspecies yaitu *Manouria emys emys* dan *Manouria emys phayrei*. *Manouria e. emys* (Kura-kura Kaki Gajah) lebih kecil (Panjang karapas hingga 50cm dan berat 20kg) dan memiliki *pectoral scute* yang terpisah. *Manouria e. phayrei* (Kura-kura Bening Coklat) lebih besar (panjang mencapai 60cm dan berat 37kg) dengan *pectoral scute* yang menyatu, berwarna lebih gelap dan cenderung berwarna hitam pada individu dewasa (Moll, 1989).

*Manouria emys emys* (Kura-kura Kaki Gajah) merupakan salah satu fauna yang banyak ditemukan di Indonesia. Jenis kura-kura ini merupakan satwa endemik pulau Sumatra dan Kalimantan. Kura-kura sebagai salah satu jenis satwa liar sering dimanfaatkan untuk kebutuhan manusia seperti makanan, obat-obatan, satwa peliharaan atau penangkaran herpetofauna, barang kerajinan dan pelepasan untuk tujuan keagamaan (Sinaga, 2008). *M. emys* dewasa bisa dijual dengan harga \$200 US di Amerika Serikat atau bahkan mencapai \$500 US di Jepang hingga membuat bisnis ini sangat menguntungkan. Amerika Serikat dan Jerman adalah negara importir utama kura-kura ini (Moll, 1989). Ancaman paling utama adalah perburuan liar untuk diperdagangkan serta kerusakan habitat. Hal inilah yang menyebabkan kepunahan jenis kura-kura menjadi meningkat (Sinaga, 2008).

Saat ini *red list* IUCN memasukkan kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) ke dalam daftar merah dengan status konservasi *endangered species*. Sedangkan CITES mengkategorikan kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) dalam kelompok apendik II (Kurniati, 2007). Apendik II yaitu boleh diperdagangkan, namun perdagangan harus dikontrol untuk menghindari pemanfaatan yang membahayakan kelangsungan hidup makhluk tersebut (Stanford *et al*, 2015). Bentuk upaya perlindungan juga bisa dilakukan dengan mengajukan saran untuk meningkatkan status menjadi Appendix I CITES, melindungi kura-kura beserta habitat, dan memperkuat legislasi untuk melindungi kura-kura di negara asal (Moll, 1989). Dalam UU perlindungan satwa di Indonesia, jenis ini belum dilindungi karena keberadaan di alam dianggap masih banyak dan baru diusulkan untuk masuk dalam daftar spesies dilindungi di Indonesia tahun 2016 lalu. Jumlah populasi spesies ini terus menurun akibat ancaman yang terus meningkat (Kurniati,

2007). Penelitian-penelitian terkait kura-kura ini sangat diperlukan untuk menentukan dan meningkatkan tindakan konservasi yang akan diambil (Klemens and Swingland, 1989).

Metode molekuler untuk menentukan hubungan taxonomi merupakan upaya konservasi dengan membantu mengumpulkan data variasi genetik pada taxa yang memiliki morfometri yang ambigu. Data genetik berupa filogeni ini nanti akan membantu dalam membedakan spesies dilihat dari garis keturunan dalam hubungan evolusi. Sumber karakterisasi molekuler untuk mendapatkan kesimpulan filogenetik adalah sekuensi DNA (Kayani, 2015).

Keragaman genetik dapat dikaji dengan penandaan molekuler menggunakan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) baik pada DNA inti maupun DNA mitokondria (mtDNA). Perbedaan struktur, komposisi, dan organisasi genom ini dapat diketahui dengan melihat perbedaan yang akurat (Faizah, 2009). DNA mitokondria adalah sebuah molekul DNA berantai ganda yang memiliki bentuk sirkuler dan ditransmisikan secara maternal (Susmiarsih, 2010). Analisa mtDNA (DNA Mitokondria) dapat digunakan untuk mengetahui variabilitas genetik suatu populasi. Analisa tersebut dapat diketahui sebab di dalam genom mitokondria terdapat fragmen-fragmen penyandi protein salah satunya Cyt-b (*Cytochrome b*) (Dewanti, 2017). Penelitian Kayani (2015) menunjukkan bahwa urutan mtDNA dapat digunakan untuk menentukan filogenetik dan taksonomi kura-kura tanpa ambiguitas. Menurut penelitian Guillon *et al* (2012), mtDNA sangat sering digunakan dalam studi filogenetik dibandingkan nuDNA karena relatif lebih mudah, urutan gen ini mudah disejajarkan dan berkembang lebih cepat terutama pada beberapa spesies kura-kura. Tingkat evolusi gen ini tinggi sehingga

memungkinkan terjadinya homoplasy dan dengan demikian menyebabkan kesalahan dalam rekonstruksi filogenetik. Oleh karena itu perlu dilakukan pendekatan berbasis molekuler untuk melihat hubungan filogeni.

Informasi morfologi yang kurang membuat metode molekuler untuk identifikasi paling banyak dipakai. Gen Cyt-b (*Cytochrome b*) merupakan bagian yang terlibat transportasi elektron dalam mitokondria. Gen *cyt b* dikode oleh DNA mitokondria dan memiliki delapan transmembran heliks yang dihubungkan oleh domain ektramembran atau intramembran. Gen ini memiliki variasi urutan yang dapat digunakan untuk membandingkan spesies dalam genus atau famili yang sama. Gen ini juga memiliki bagian yang bersifat kekal di dalam tingkat spesies sehingga dapat digunakan untuk pengelompokan dalam penentuan hubungan kekerabatan antar jenis hewan (Widowati, 2013). *Protein coding* gen Cyt-b diketahui rutin diaplikasikan untuk memecahkan filogeni dan filogeografi pada tingkat taxa (Ramirez *et al*, 2008). Penelitian Shaffer *et al* (1997) sebelumnya telah menguji 23 kura-kura berbagai jenis dan 7 fosil beda taxa menggunakan 1 kilobase sekuen Cyt-b dan 115 karakter morfologi hingga menghasilkan berbagai informasi filogenik. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Parham *et al* (2006) diperoleh sekuens genom mitokondria lengkap dari *Manouria emys*.

Penelitian spesies kura-kura sebelumnya telah dilakukan memakai mtDNA dan sangat sedikit menggunakan DNA nukelus. Gen Cyt-b merupakan lokus yang paling sering digunakan untuk uji spesies, *control region* pada mtDNA juga telah diuji untuk studi populasi (Lee *et al*, 2009). Menurut Prusak *et al* (2008), gen Cyt-b pada mtDNA telah ditemukan sebagai indikator yang kuat untuk identifikasi spesies pada analisa DNA dan terbukti mampu digunakan untuk mempelajari

evolusi molekuler. Hsieh *et al* (2006) juga menunjukkan bahwa gen Cyt-b sesuai untuk inter-spesies dan studi filogenetik *intrafamily* pada kura-kura. Penelitian Hsieh *et al* (2001) menunjukkan bahwa *sequence diversity range* pada intra-spesies berada di antara 0,25 sampai 2,74% dan *inter-spesies range* berada pada 5,97 sampai 34,83%. Sedangkan *genetic distance* pada hewan yang berbeda spesies berada di antara 6,33 sampai 40,59. Diversitas sekuens ini diperoleh dari hasil uji seluruh spesies menggunakan gen Cyt-b.

Upaya konservasi kura-kura Kaki Gajah dilakukan di dalam lembaga konservasi *ex-situ* maupun *in-situ*. Salah satu lembaga konservasi *ex-situ* adalah Predator Fun Park di kota Batu, Malang, Jawa Timur. Tempat tersebut memiliki empat ekor kura-kura Kaki Gajah. Kura-kura tersebut belum memiliki data yang jelas terkait masing-masing individu. Observasi pendahuluan telah dilakukan sebelumnya dan diperoleh informasi bahwa saat ini di Predator Fun Park sedang dilakukan upaya konservasi berupa peningkatan jumlah populasi satwa.

Identifikasi level spesies yang akurat adalah cara yang tepat sebelum dilakukan pengembangan konservasi. Data identitas ini membantu dalam memahami sejarah hidup perkembangan dalam evolusi spesies tersebut dan lokasi distribusi (penyebaran). Sesuai dengan penelitian Kundu *et al* (2013), hasil jarak pada *clade* yang dibentuk mampu mengidentifikasi spesies dengan benar dibanding melihat kesamaan dari luar. Menurut Spinks *et al* (2004), spesies kura-kura bisa saja *hybrid* karena terjadi *interbreeding* di antara dua spesies yang sangat dekat. *Interbreeding* seperti ini dapat mengakibatkan kesalahan hasil identifikasi jika menggunakan mtDNA. Jika sampel yang dianalisa merupakan hasil *hybrid* dan dilanjutkan untuk

terus dilakukan breeding, maka spesies tersebut tidak akan diakui dan tidak masuk dalam kandidat spesies yang dilindungi.

Sebuah upaya dalam konservasi dapat dilakukan terhadap kura-kura Kaki Gajah di Predator Fun Park apabila telah memiliki data molekuler masing-masing individu yang jelas. Berdasarkan hal-hal yang telah dipaparkan di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan informasi berupa data molekuler individu kura-kura Kaki Gajah. Informasi ini selanjutnya digunakan untuk mengetahui tingkat kekerabatan individual kura-kura Kaki Gajah berdasarkan sekuen gen *Cytochrome B*. Hubungan taksonomi intra-spesies membantu melengkapi data variasi genetik pada tingkat taxa yang memiliki morfometri yang ambigu seperti kura-kura ini. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang hubungan kekerabatan intra-spesies kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) di Predator Fun Park Batu dalam menunjang upaya pengembangan konservasi. Selanjutnya dibandingkan dengan data subspecies kura-kura Bening Coklat (*Manouria emys phayrei*) yang telah tersedia di GenBank untuk melihat karakterisasi molekuler inter-spesies.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana tingkat kekerabatan individual berdasarkan sekuen gen *Cytochrome B* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) dewasa di Predator Fun Park Batu?

### 1.3 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah darah empat ekor kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) dewasa dengan kesamaan morfologi di Predator Fun Park Batu Jawa Timur.
2. Gen *Cytochrome B* diisolasi dari darah kura-kura Kaki Gajah menggunakan *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* (50). Pengambilan sampel darah dilakukan melalui *vena subcarapas*.
3. Primer gen *Cytochrome B* didesain menggunakan gen *Cytochrome B* dari *Manouria emys* menggunakan program Primer 3plus.
4. Amplifikasi DNA gen *Cytochrome B* kura-kura Kaki Gajah dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GTTATAGCCACCGCATTCGT-3' dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-GGCTGGTGTAAGTTGTCTG -3'.
5. Metode PCR dilakukan dengan mesin *SensoQuest Thermocycler* dengan program: predenaturasi 94°C selama tiga menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 51°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama satu menit, dan *post extension* 72°C selama tujuh menit.
6. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode *dye terminator labelling* dengan menggunakan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-GGCTGGTGTAAGTTGTCTG -3'.
7. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen DNA dan tingkat kekerabatan antar individu kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys*

*emys*) di Predator Fun Park Batu dan dibandingkan dengan Kura-kura Baning Coklat (*Manouria emys phayrei*) menggunakan program Bioedit dan *Basic Local Aligment Search Tool* (BLAST) dari NCBI serta program MEGA.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui tingkat kekerabatan individual berdasarkan sekuen gen *Cytochrome B* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) di Predator Fun Park.
2. Membandingkan karakter molekuler kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) dengan kura-kura Baning Coklat (*Manouria emys phayrei*).

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi genetik berupa perpustakaan gen untuk keperluan pengembangan konservasi berupa *breeding* untuk menambah populasi satwa dengan menjaga kemurnian genetik tanpa *hybrid* dengan spesies lain agar tetap termasuk dalam satwa dilindungi berdasarkan karakter molekuler, selain itu juga dapat digunakan untuk melengkapi data variasi genetik intra maupun inter-spesies.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kura-kura Baning (*Manouria*)

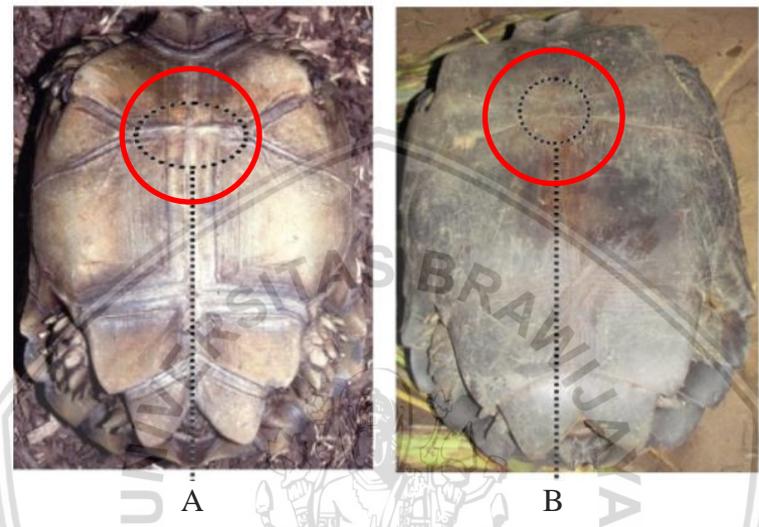
Kura-kura Baning (*Manouria emys*) famili Testudinidae merupakan kura-kura terbesar di daratan Asia dengan panjang karapas mencapai 60 cm dan berat badan 37 kg. Kura-kura ini memiliki 2 subspecies yaitu *Manouria emys emys* dan *Manouria emys phayrei* yang dapat dibedakan dari distribusi secara geografi, warna, motif *scute* pada plastron, dan ukuran maksimal yang mampu dicapai. *Manouria* secara umum termasuk ke dalam kura-kura primitif yang ada. Spesies ini hidup pada hutan basah dengan vegetasi hijau, jamur, daun bambu, dan buah-buah yang jatuh. Individu ini lebih suka iklim yang sejuk dan sering ditemukan berendam di air, lumpur atau mencari makan di sekitar habitatnya. Habitat alami yang masih ditemukan kura-kura ini adalah di Indonesia, tetapi habitat lebih banyak habis dihancurkan, spesies ini lalu dijadikan makanan dan diselundupkan sebagai hewan peliharaan (Stanford *et al*, 2015). *Manouria emys* memiliki tubuh berwarna coklat kehitaman dengan *scute* yang berwarna lebih cerah pada tepi (**Gambar 2.1**).



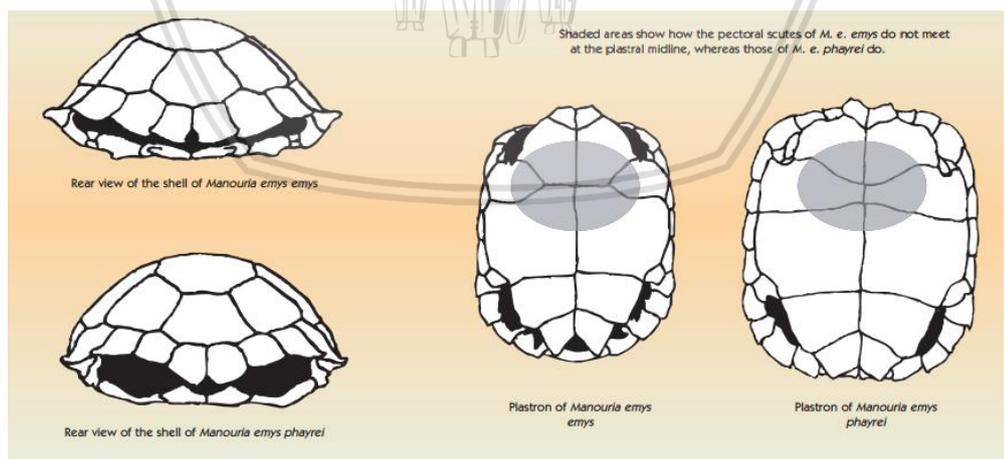
**Gambar 2.1** Scute pada Karapas kura-kura Baning (*Manouria emys*) terlihat lebih cerah di tepi (Ahmed and Das, 2010).

*Manouria emys emys* lebih kecil (Panjang karapas hingga 50cm dan berat 20kg) dan memiliki pectoral scute yang terpisah (**Gambar 2.2**). *Manouria emys phayrei* lebih besar (panjang menjangapai 60cm dan berat 37kg) dengan pectoral scute

yang menyatu, berwarna lebih gelap dan cenderung berwarna hitam pada individu dewasa (Moll, 1989) (**Gambar 2.2**). Distribusi kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) adalah pulau Kalimantan dan Sumatera. Sedangkan kura-kura Baning Coklat (*Manouria emys phayrei*) tersebar di Bangladesh, India, Myanmar dan Thailand (Stanford *et al*, 2015).



**Gambar 2.2** Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) dengan *pectoral scute* yang terpisah (A) dan Kura-kura Baning Coklat (*Manouria emys phayrei*) dengan *pectoral scute* menyatu (B) (Kundu *et al*, 2013).



**Gambar 2.3** Perbedaan kura-kura Baning (*Manouria*) (Eggenschwiler, 2012).



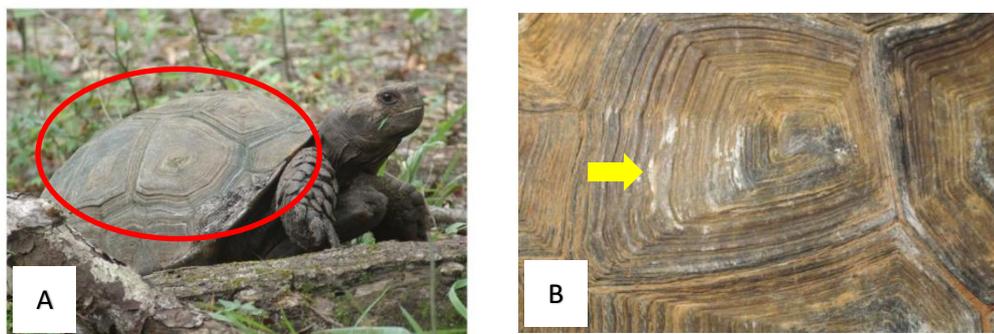
## 2.2 Morfologi dan Klasifikasi Kura-kura Kaki Gajah

Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) merupakan kura-kura darat terbesar keempat di dunia. Ciri khas sub-spesies ini yaitu karapas individu dewasa berbentuk kubah (**Gambar 2.4**), berwarna coklat gelap, sedangkan bagian tengah sisik berwarna lebih terang atau coklat muda pada individu pradewasa. Mereka memiliki *tubercular scale* seperti taji pada kaki belakang paha atau supracaudal *scute* sehingga sering juga disebut kura berkaki enam (Stanford *et al*, 2015).

Menurut Kurniati (2007), klasifikasi dari kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Reptilia
Ordo	: Testudinata
Familia	: Testudinidae
Genus	: <i>Manouria</i>
Species	: <i>Manouria emys</i>
Sub species	: <i>Manouria emys emys</i>

*Manouria emys phayrei*



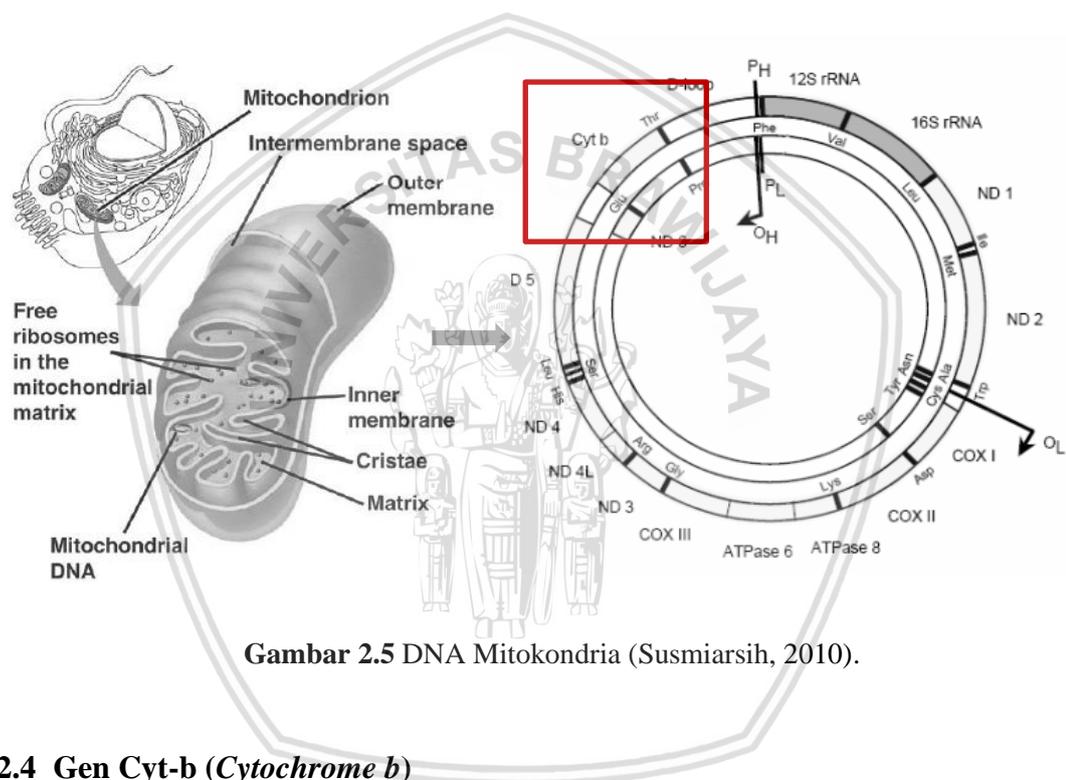
**Gambar 2.4** Karapas yang Berbentuk Kubah (A) (Stanford *et al*, 2015) dan Bentuk cincin pada *scute* (B) (Utah Wildlife Resources, 2015)

Usia kura-kura perlu diketahui karena penting dalam menentukan langkah-langkah yang harus diambil untuk mengurangi penurunan populasi yang hampir punah seperti kura-kura ini. Menurut Duffy (2009), menghitung pertumbuhan cincin pada karapas kura-kura merupakan metode yang populer dalam menentukan umur kura-kura. Tetapi menurut Utah Wildlife Resources (2015), akurasi dalam menentukan umur kura-kura yang hidup di alam liar atau penangkaran itu tidak mungkin, kecuali tanggal telur menetas diketahui. Sehingga perhitungan yang dilakukan hanya berupa estimasi. Pertumbuhan yang beragam pada tiap individu juga mengurangi akurasi metode perhitungan cincin pada *scute* kura-kura (**Gambar 2.4**). Penambahan cincin pada tiap *scute* berkisar 0-7 per tahun. Angka penambahan ini tergantung pada ketersediaan pakan dan lingkungan habitat. Oleh karena itu belum ada metode perhitungan umur kura-kura yang akurat. Umur kura-kura dapat diketahui secara akurat apabila diketahui waktu tepat kura-kura tersebut menetas.

### 2.3 DNA mitokondria (mtDNA)

DNA mitokondria (mtDNA) adalah DNA berantai ganda yang berbentuk sirkuler dan terdiri dari DNA utas ringan (*light strand*) yang kaya dengan sitosin dan utas berat (*heavy strand*) yang kaya dengan guanin. MtDNA adalah DNA yang padat dan hampir tidak mempunyai Intron dengan ukuran 16.569 pasang basa yang membentuk 37 gen (**Gambar 2.5**) (Susmiarsih, 2010). Berdasarkan fungsi yang dimiliki, mtDNA terdiri dari daerah penyandi (*coding region*) dan daerah bukan penyandi (*non coding region*). Daerah penyandi (*coding region*) memiliki 13 gen penyandi protein, 2 gen penyandi rRNA, dan 22 gen penyandi tRNA. Daerah bukan penyandi memiliki daerah kontrol untuk proses transkripsi dan replikasi genom.

Utas ringan (*light strand*) terdiri dari 1 gen penyandi protein (ND 6) dan 8 gen penyandi tRNA (*glutamic acid, proline, serine, cysteine, asparagine, alanine, tyrosine, dan glutaminae*). Utas berat (*heavy strand*) terdiri dari 12 gen penyandi protein (NADH *dehydrogenase* (ND)1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND 4L, COI, COII, COIII, *Cytochrome-b*, ATPase 6, dan ATPase 8), 2 gen penyandi rRNA (16 S dan 12 S), 1 daerah bukan penyandi (*dloop*), dan 14 gen penyandi tRNA (Rahman, 2010).



Gambar 2.5 DNA Mitokondria (Susmiarsih, 2010).

#### 2.4 Gen Cyt-b (*Cytochrome b*)

Gen Cyt-b pada mtDNA merupakan transmembran protein yang berperan dalam rantai respirasi seluler pada organisme. Nilai mutasi pada gen ini berbeda berdasarkan posisi kodon sehingga bisa digunakan untuk parameter klasifikasi pada berbagai tingkat taksa. Namun, kemampuan gen ini masih diragukan untuk menghasilkan pohon filogeni yang akurat apabila fragmen yang digunakan berukuran pendek. Basa nitrogen atau kodon pertama dan kedua pada gen Cyt-b

mtDNA memiliki nilai *gamma* yang rendah yaitu berarti memiliki nilai substitusi yang rendah (tidak bervariasi) antar individu. Sedangkan sebaliknya, kodon ketiga memiliki nilai *gamma* yang tinggi yaitu berarti memiliki nilai substitusi yang tinggi (bervariasi) antar individu. Tetapi, walaupun memiliki nilai *gamma* yang tinggi, sebagian besar substitusi pada kodon ketiga bersifat *saturation effect* yaitu perubahan basa nukleotida tidak diikuti dengan translasi untuk perubahan asam amino (Rahman, 2010). Gen Cyt-b dipakai karena memiliki sifat yang lebih conserve (lestari) dibandingkan dengan gen lain sehingga dapat digunakan untuk merekonstruksi hubungan individu pada tingkat spesies (Wirdatei, 2016).

Gen penyandi protein terdapat substitusi nukleotida yang dapat menghasilkan asam amino yang sama (substitusi *silent/sinonim*), maupun asam amino yang berbeda (substitusi *non sinonim*). Substitusi nukleotida terdiri atas substitusi transisi dan transversi. Substitusi transisi merupakan substitusi basa nitrogen sejenis yaitu purin menjadi purin atau pirimidin menjadi pirimidin. Substitusi transversi merupakan perubahan nukleotida dari basa purin menjadi pirimidin atau sebaliknya. Sebagian besar substitusi sinonim ditemukan pada kodon ketiga, walaupun dapat terjadi pada kodon pertama. Substitusi non sinonim dominan ditemukan akibat pada kodon kedua dan pertama, walaupun dapat terjadi pada kodon ketiga (Rahman, 2010).

## **2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Reaksi polimerase berantai atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah metode enzimatik yang dapat melipatgandakan secara eksponensial pada sekuen nukleotida secara *in vitro*. Metode ini sangat sensitif dalam melipatgandakan satu molekul DNA (Widowati, 2013). Metode PCR ini mengamplifikasi menggunakan

enzim *Taq Polymerase*. Hal ini dapat meningkatkan jumlah urutan DNA hingga  $10^6$  -  $10^7$  kali. Dalam satu siklus PCR, akan diperoleh  $2^n$  kali banyaknya DNA target. PCR merupakan metode untuk memaksimalkan amplifikasi DNA target dan bukan urutan non-target (Fatchiyah dkk., 2009).

Penggunaan PCR telah berkembang secara cepat seiring dengan perkembangan biologi molekuler. PCR digunakan untuk identifikasi penyakit genetik, infeksi oleh virus, diagnosis dini penyakit seperti AIDS, *Genetic profiling in forensic, legal and bio-diversity applications*, biologi evolusi, *site-directed mutagenesis of genes* dan mRNA *Quantitation* di sel ataupun jaringan (Fatchiyah dkk, 2009).

PCR memiliki syarat bahwa bagian tertentu sekuen DNA yang akan dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu. Sekuen yang diketahui tersebut untuk menyediakan primer, yaitu sekuen oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai polimerase. Komponen reaksi PCR terdiri atas pasangan primer berupa oligonukleotida spesifik untuk target gen yang dipilih, enzim (umumnya *Taq polymerase*, enzim *thermostable* dan *thermoactive* yang berasal dari *Thermus aquaticus*) dan *triphosphat deoxynucleoside* (dNTP) yang digunakan untuk amplifikasi target gen secara eksponensial dengan hasil replikasi ganda dari target awal. Reaksi ini dilakukan dalam suatu mesin pemanas yang diprogram secara otomatis disebut *thermocycler*. Mesin tersebut menyediakan kondisi termal yang diperlukan untuk proses amplifikasi (Widowati, 2013).

Keberhasilan reaksi PCR ditentukan oleh beberapa faktor yaitu, *deoksiribonukleotida triphosphat* (dNTP), oligonukleotida primer, DNA *template* (cetakan), komposisi larutan buffer, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan, dan faktor teknis dan non-teknis lainnya, misalnya kontaminasi. Oligonukleotida primer (desain primer) memegang peranan penting untuk spesifisitas maksimal dan efisiensi PCR (Sasmito dkk., 2014).

Primer yang baik ditentukan oleh beberapa karakter primer yang baik menurut Sasmito dkk. (2014) antara lain: Panjang primer berkisar 16-28 basa, *Temperature melting* ( $T_m$ ) atau suhu leleh yang tepat untuk disosiasi dalam melepas ikatan, *Temperature annealing* ( $T_a$ ) atau suhu penempelan yang stabil untuk berikatan dengan template DNA, Selisih suhu leleh yang rendah dengan suhu maksimum 5°C agar tidak terjadi penurunan proses amplifikasi, *GC Content* atau jumlah total GC dalam satu untai primer yang berkisar 40% sampai 60%, karena basa G dan C memiliki tiga ikatan hidrogen sehingga dianggap lebih stabil dalam mengikat templat dibandingkan basa A dan T yang hanya memiliki 2 ikatan hidrogen, dan *GC Clamp* yaitu kondisi ujung 3' pada primer memiliki basa GC agar hibridasi lebih stabil.

### 2.5.1 Amplifikasi PCR

Menurut Handoyo dan Ari (2000), dasar siklus PCR ada 30-35 siklus meliputi denaturasi (93-95°C) selama 30-90 detik, *Annaeling* (37-60°C) selama 30 detik untuk panjang primer 18-22 basa, dan *Extension* (72°C) dengan waktu tergantung panjang fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Menurut Widowati (2013), proses yang terjadi dalam mesin PCR meliputi tiga tahap utama yaitu denaturasi (pemisahan untai ganda DNA), *annealing* (penempelan primer) dan ekstensi

(pemanjangan primer). Proses yang dimulai dari denaturasi, penempelan dan ekstensi disebut sebagai satu siklus. Produk PCR dapat langsung divisualisasikan melalui proses elektroforesis dan digunakan untuk analisa lebih lanjut. Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel yang diwarnai dengan bromida dan divisualisasikan dengan sinar ultraviolet.

Menurut Handoyo dan Ari (2000), Amplifikasi urutan yang diinginkan dilakukan menggunakan sepasang primer oligonukleotida yang spesifik untuk membuat hibrid dengan ujung -5' menuju ujung -3'untai DNA target.

#### 2.5.1.1 Denaturasi DNA

Denaturasi DNA adalah proses menjadikan DNA untai tunggal dari DNA untai ganda yang dibuka. Denaturasi awal ini dilakukan sebelum enzim *taq polymerase* ditambahkan (Yusuf, 2010). Menurut Fatchiyah (2008), denaturasi merupakan langkah yang kritis selama proses PCR. Pemisahan untai ganda DNA akan terjadi pada temperature tinggi di awal proses. Temperatur tahap ini berada pada kisaran 92-95°C. Suhu 94°C merupakan pilihan yang standar.

Menurut Handoyo dan Ari (2000), Suhu denaturasi berbeda tergantung pada panjang fragmen DNA target. Suhu yang terlalu rendah menyebabkan proses belum sempurna, sedangkan suhu yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas polimerase DNA yang berdampak pada efisiensi PCR. Waktu denaturasi yang terlalu pendek menyebabkan proses belum sempurna, sedangkan waktu denaturasi yang terlalu lama akan merusak *template* DNA dan sekaligus dapat menurunkan aktivitas polimerase DNA. Menurut Fatchiyah (2008), Temperatur denaturasi yang

tinggi membutuhkan kandungan GC yang tinggi pula dari *DNA template*, tetapi *half-life* dari *taq DNA Polymerase* menekan secara tajam pada temperature 95°C.

Suhu denaturasi dipengaruhi oleh sekuen target pada untai ganda DNA, jika diperlukan suhu yang lebih tinggi jika sekuen target kaya akan Guanin-Sitosin. Aktivitas enzim *taq* polimerasi akan hilang atau berkurang aktifitasnya akibat suhu denaturasi yang terlalu tinggi dan waktu denaturasi yang terlalu lama. Waktu paruh aktivitas enzim *taq polymerase* adalah >2 jam pada suhu 92,5°C, 40 menit pada suhu 95°C dan lima menit pada suhu 97,5°C (Sulistyaningsih, 2007).

#### 2.5.1.2 Primer Annealing

Primer *annealing* berkaitan dengan pengenalan suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer itu sendiri. Optimalisasi suhu yang digunakan dimulai dengan menghitung *Temperature Melting (Tm)* dari ikatan pada primer dan DNA template. Cara mudah menghitung bisa menggunakan rumus  $T_m = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$ . Suhu *annealing* biasanya 5°C di bawah *Tm* primer yang sebenarnya. Secara sederhana *Tm* dipengaruhi oleh DNA template, komponen buffer, dan konsentrasi primer (Fatchiyah, 2008).

Panjang primer berkaitan dalam penentuan waktu untuk proses *annealing*. Panjang primer 18-22 basa membutuhkan waktu 30 detik, sedangkan untuk panjang primer lebih besar dari 22 basa membutuhkan waktu *annealing* 60 detik. Suhu *annealing* secara umum yang digunakan berkisar antara 37-60°C. Pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan *Tm* primer yang digunakan untuk proses PCR. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan  $(T_m - 5)^\circ\text{C}$  sampai dengan

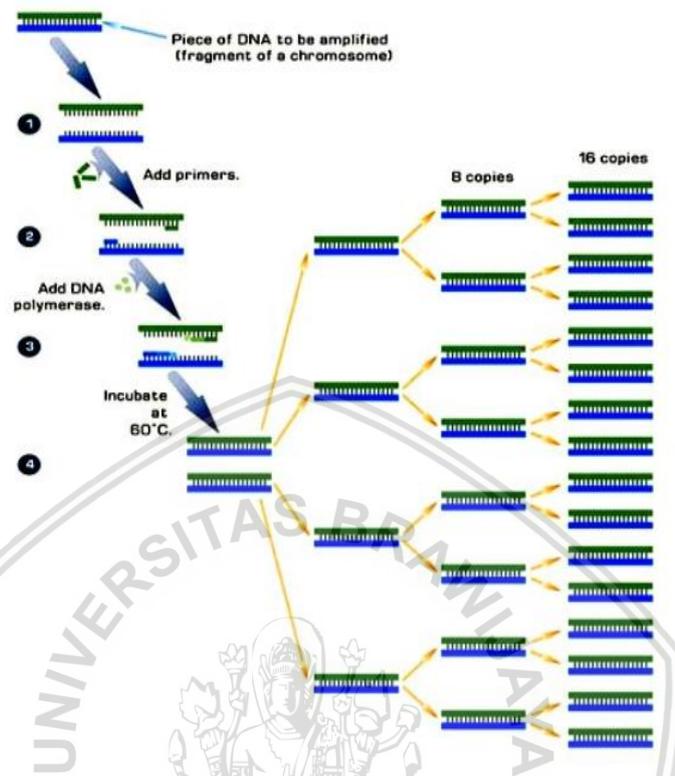
$(T_m+5)^0$ . Keberhasilan suatu proses PCR ditentukan oleh eksperimen dalam menentukan suhu *annealing* yang digunakan serta perlu memperhatikan *mispriming* pada daerah target dan non-target (Handoyo dan Ari, 2000).

### 2.5.1.3 DNA Polymerase Extension

Proses pemanjangan untai baru DNA terjadi pada proses ini, posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Pada tiap kilobase (1000bp) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit (Fatchiyah, 2008).

Panjang fragmen DNA menentukan pemilihan waktu ekstensi primer yang akan diamplifikasi. Secara umum untuk mengamplifikasi setiap satu kilo basa DNA diperlukan waktu 30-60 detik. Proses ekstensi primer pada proses PCR selalu dilakukan pada suhu 72°C karena suhu tersebut merupakan suhu optimum polimerase DNA yang biasa digunakan untuk proses PCR (Handoyo dan Ari, 2000).

Siklus PCR terjadi rangkaian proses denaturasi (1), *annealing* (2), dan elongasi (3) hingga terhitung siklus pertama selesai (4) (**Gambar 2.6**). Reaksi-reaksi tersebut diulangi lagi dari 25 – 30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru dan merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi (Yusuf, 2010).



Gambar 2.6 Skema satu siklus PCR (Yusuf, 2010).

## 2.6 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dilakukan untuk mengetahui urutan basa nukleotida suatu fragmen DNA (Widowati, 2013). DNA dapat diurutkan dengan prosedur kimia yang menghancurkan molekul DNA yang diberi label pada sebagian pengulangan basis. Panjang fragmen yang berlabel merupakan identifikasi dari posisi dasar tersebut. Metode ini menggambarkan reaksi yang membelah DNA secara khusus pada Guanin, Adenin, Timin, dan Sitosin itu sendiri. Bila produk dari keempat reaksi ini diproses secara elektroforesis pada gel poliakrilamida untuk melihat berdasarkan ukuran, urutan DNA dapat dibaca dari pola pita radioaktif. Teknik Sequencing DNA pada metode ini diaplikasikan paling tidak untuk 100

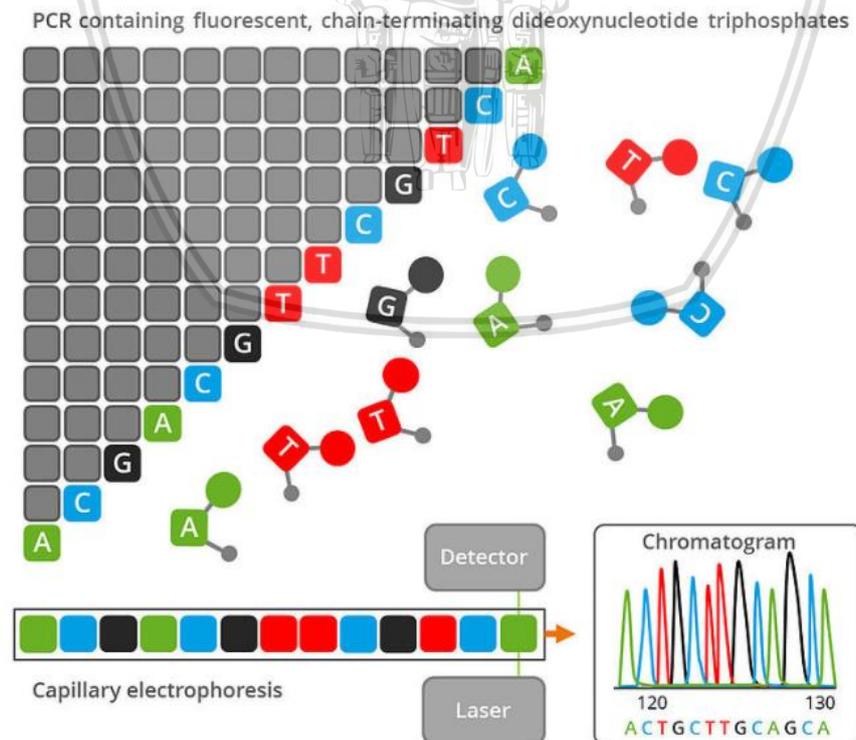
basis dari titik pelabelan. Reagen spesifik purin adalah dimetil sulfat; dan pereaksi spesifik pirimidin adalah hidrazin (Kumar, 2012).

Metode yang umum digunakan adalah metode Sanger (*chain termination method*) (**Gambar 2.7**). Proses awal metode ini menggunakan satu primer dengan tambahan dideoxynukleotida yang dilabel *fluorescent*. Warna *fluorescent* berbeda untuk setiap basa, oleh karena itu urutan basa suatu DNA yang tidak diketahui bisa ditentukan (Widowati, 2013).

Prinsip utama metode Sanger adalah penggunaan trifosfat dideoksinukleotida (ddNTPs) sebagai terminator rantai DNA (**Gambar 2.7**). Metode penghentian pemanjangan untai rantai DNA membutuhkan templat DNA beruntai tunggal, primer DNA, DNA polimerase, radioaktif atau fluoresen dengan label nukleotida, dan nukleotida termodifikasi. Sampel DNA dibagi menjadi empat urutan reaksi terpisah yang mengandung keempat standar deoxynukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) dan DNA polimerase. Untuk setiap reaksi ditambahkan hanya satu dari empat *dideoxinukleotida* (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) yang merupakan rantai yang menghentikan nukleotida. Fragmen DNA yang baru disintesis dan diberi label dan dipisahkan oleh ukuran dengan elektroforesis gel pada gel *polyacrylamide-urea denaturing* dengan masing-masing dari empat reaksi berjalan di salah satu dari empat jalur individu (jalur A, T, G, C), pita DNA saat itu divisualisasikan dengan autoradiografi atau sinar UV, dan urutan DNA dapat dibaca secara langsung pada film sinar-X atau gambar gel. Sebuah band gelap di jalur menunjukkan fragmen DNA yang merupakan hasil dari penghentian rantai setelah penggabungan dideoxinukleotida (ddATP, ddGTP, ddCTP, atau ddTTP). Posisi relatif dari pita

yang berbeda di antara keempat jalur tersebut kemudian digunakan dan dibaca (dari bawah ke atas) sesuai urutan DNA (Gatc-biotech.com, 2017).

Variasi teknis sekuensing pemutusan rantai termasuk pemberian tag dengan nukleotida mengandung fosfor radioaktif untuk pelabelan, atau menggunakan primer yang diberi label pada ujung 5' dengan pewarna fluoresen. Sekuensing pewarna primer memudahkan pembacaan dalam sistem optik agar lebih cepat, mudah dianalisa dan lebih ekonomis. Metode penghentian rantai sangat mempermudah sekuensing DNA. Keterbatasan pengikatan primer yang tidak spesifik terhadap DNA mempengaruhi pembacaan urutan DNA secara akurat dan struktur sekunder DNA (Gatc-biotech.com, 2017). Panjang sekuen yang dihasilkan berkisar antara 1.000–1.200 pasang basa (bp) dan tidak mampu mencapai lebih dari 2.000 bp (Obenrader and College, 2003).



**Gambar 2.7** Skema sekuensing DNA metode Sanger (Gatc-biotech.com, 2017)

## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

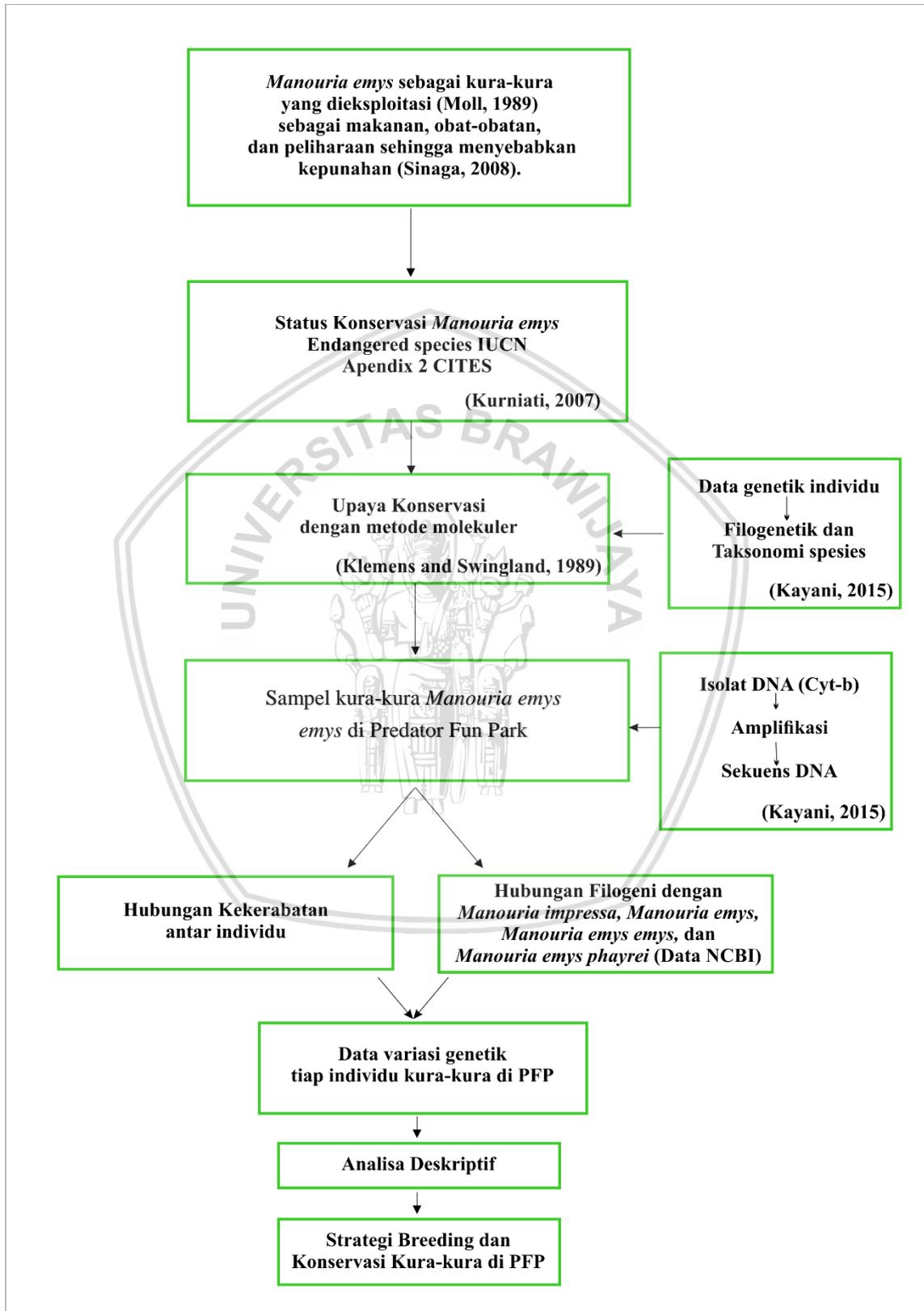
### 3.1 Kerangka Konseptual

*Manouria emys* merupakan kura-kura dengan status konservasi IUCN *endangered spesies* dan appendix 2 CITES (Kurniati, 2007). Kura-kura ini banyak dieksploitasi (Moll, 1989) sebagai makanan, obat-obatan, dan peliharaan (Sinaga, 2008). Upaya konservasi berupa penelitian terkait kura-kura ini perlu dilakukan untuk menentukan tindakan tepat yang akan diambil (Klemens and Swingland, 1989). Metode molekuler merupakan salah satu upaya konservasi dengan membantu mengumpulkan data variasi genetik. Data genetik berupa filogeni dan karakter molekuler diperoleh dari sekuens DNA (Kayani, 2015).

Kura-kura Kaki Gajah di Predator Fun Park Batu belum memiliki data molekuler sehingga belum mampu menentukan tindakan konservasi yang tepat sebagai salah satu lembaga konservasi *ex-situ*. Menurut Kayani (2015), analisa kekerabatan Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) dapat diketahui dengan melihat ekspresi gennya. Hubungan filogeni berdasarkan gen Cyt-b sesuai untuk studi *inter-spesies* dan *intrafamily* (Hsieh *et al*, 2006) dan merupakan indikator yang kuat untuk identifikasi spesies pada kura-kura (Prusak *et al*, 2008).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Parham *et al* (2006) diperoleh sekuens genom mitokondria lengkap dari *Manouria emys*. Analisa

dilakukan dengan menyajajarkan sekuens DNA yang diperoleh dengan data *genebank* pada NCBI (**Gambar 3.1**).



**Gambar 3.1** Bagan Kerangka Konseptual

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut : Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) di Predator fun Park berkerabat dekat satu sama lain (hubungan taxa yang dekat secara filogenetik) dan memiliki variasi genetik tersendiri dengan sub-spesies kura-kura Baning Coklat (*Manouria emys phayrei*) berdasarkan sekuen gen Cyt-b dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) untuk persiapan bahan dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang untuk pemesanan primer, Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Ibrahim untuk pelaksanaan nanodrop, serta Laboratorium ADD (*Animal diagnostic disease*) FKH UB untuk pelaksanaan PCR pada bulan Januari 2018-Maret 2018.

### 4.2 Materi dan Metode Penelitian

Total sebanyak empat kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) sengaja dipilih di Predator Fun Park berdasarkan plastral scute humeral yang terpisah, warna karapas yang hitam kecoklatan dengan scute kekuningan di tengah, ada supracaudal scute, dan panjang di atas 30 cm. Sampel diseleksi berdasarkan kesamaan morfologi dan morfometri. Sampel darah diisolasi dari kura-kura melalui vena subcarapas dengan tetap memperhatikan kesejahteraan dan kenyamanan satwa menggunakan jarum berukuran 23G. Sampel kemudian dimasukkan dalam tabung EDTA sebagai antikoagulan sebanyak 2ml dan disimpan dalam suhu 4°C. Sampel yang telah diambil segera dianalisa dengan metode molekuler. Kura-kura yang diambil memiliki *supracaudal scute* dan *pectoral scute* yang terpisah. Memiliki karapas yang berbentuk kubah dan berwarna kecoklatan. Sampel darah diambil karena kura-kura, seperti reptil lain, memiliki eritrosit yang berinti sehingga volume yang kecil sekalipun bisa didapatkan DNA genom yang berkualitas baik (Feria, 2015). Keempat kura-kura diambil darah langsung melalui vena *sub-carapas* sebab

paling mudah dibanding melalui vena *jugularis* atau *coccygea* pada *tortoise*. Vena *sub-carapas* terletak pada pertemuan antara *vertebrae Cervicalis* yang menempel pada karapas yang berhubungan langsung dengan *os intercostal* dan merupakan cabang dari vena *jugularis external* dari cabang vena *cervicalis caudal*. Darah diperoleh dari plexus pada vena *occipital* di *dorsal vertebrae cervicalis* tepat di belakang *protuberantina occipital* tulang kepala kura-kura (Rohilla, 2008). Darah diambil sebanyak 2 ml menggunakan *syringe* volume 3 ml dengan *needle* berukuran 23G dan disimpan pada suhu 4°C di dalam tabung yang mengandung EDTA untuk mencegah *clotting* (Kayani, 2015). Tabel 4.1 menunjukkan informasi individu sampel kura-kura Kaki Gajah yang diperoleh dari data pribadi Predator Fun Park.

**Tabel 4.1 Informasi Individu Sampel Kura-kura Kaki Gajah**

Nama	Usia (Tahun)	Sex	Asal	Berat Badan	Panjang karapas	Simbol
Rara	7-15	Jantan	Kalimantan	26,5 kg	50 cm	4BR
Roro	7-8	Jantan	Kalimantan	8 kg	35 cm	5BR
Ruru	7-10	Betina	Kalimantan	20 kg	47 cm	6BR
Rere	7-10	Betina	Kalimantan	20 kg	47 cm	7BR

DNA total diekstraksi dari darah menggunakan QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) dengan mengikuti prosedur yang telah tertera pada kit. MtDNA gen Cyt-b diamplifikasi dengan primer yang telah didesain sendiri: CYTB\_F 5'-GTTATAGCCACCGCATTCGT-3' dan CYTB\_R 5'-GGCTGGTGTAAGTTGTCTG-3'. Selanjutnya DNA dievaluasi kualitasnya dengan dirunning 2 µl pada 1% agarose gel. DNA total juga dilakukan uji kuantitas dengan metode specto-photometry

pada alat NanoDrop Spectrophotometer ND-100. PCR running menggunakan predenaturation waktu 4 menit pada 94°C, denaturation 30 detik pada 94°C, annealing 30 detik pada 50°C, extension 1 menit pada 72°C, and post extension 7 menit pada 72°C, seluruhnya dilakukan dalam 35 siklus. Hasil amplifikasi lalu diuji kualitas dengan running 2 µl pada 1,7% agarose gel. Seluruh sekuen disejajarkan dan diedit oleh sekuenser. Selanjutnya hasil sekuensing dikalkulasi menggunakan MEGA7.0. Substitusi sekuen dapat dilihat dengan menggunakan BioEdit. Analisa filogenetik diestimasi menggunakan metode Neighbor-joining dengan 1000 bootstrap. Metode ini berbasis 25 gugus algoritma untuk matriks jarak.

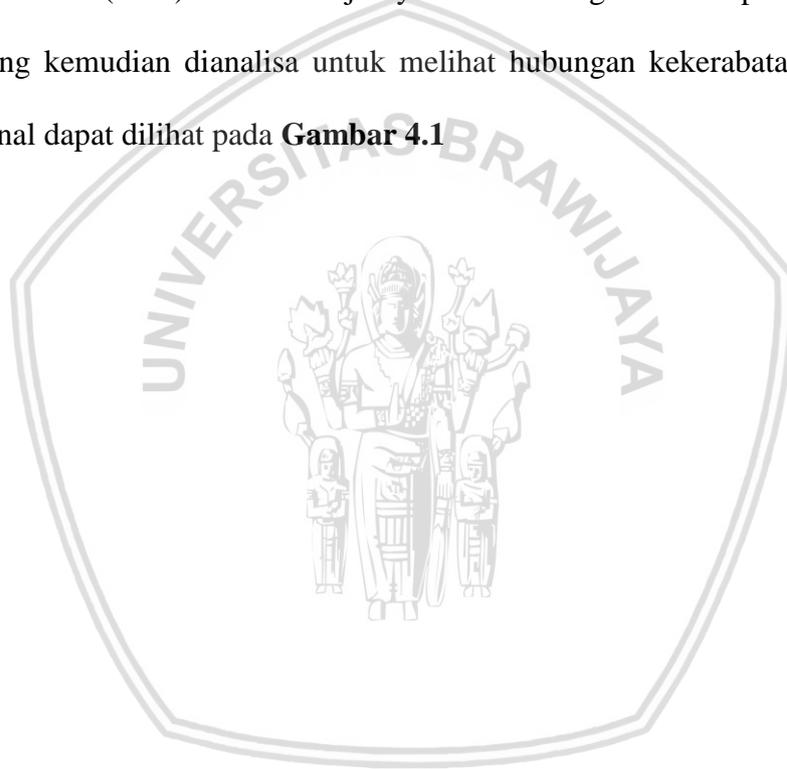
#### 4.3 Alat dan Bahan

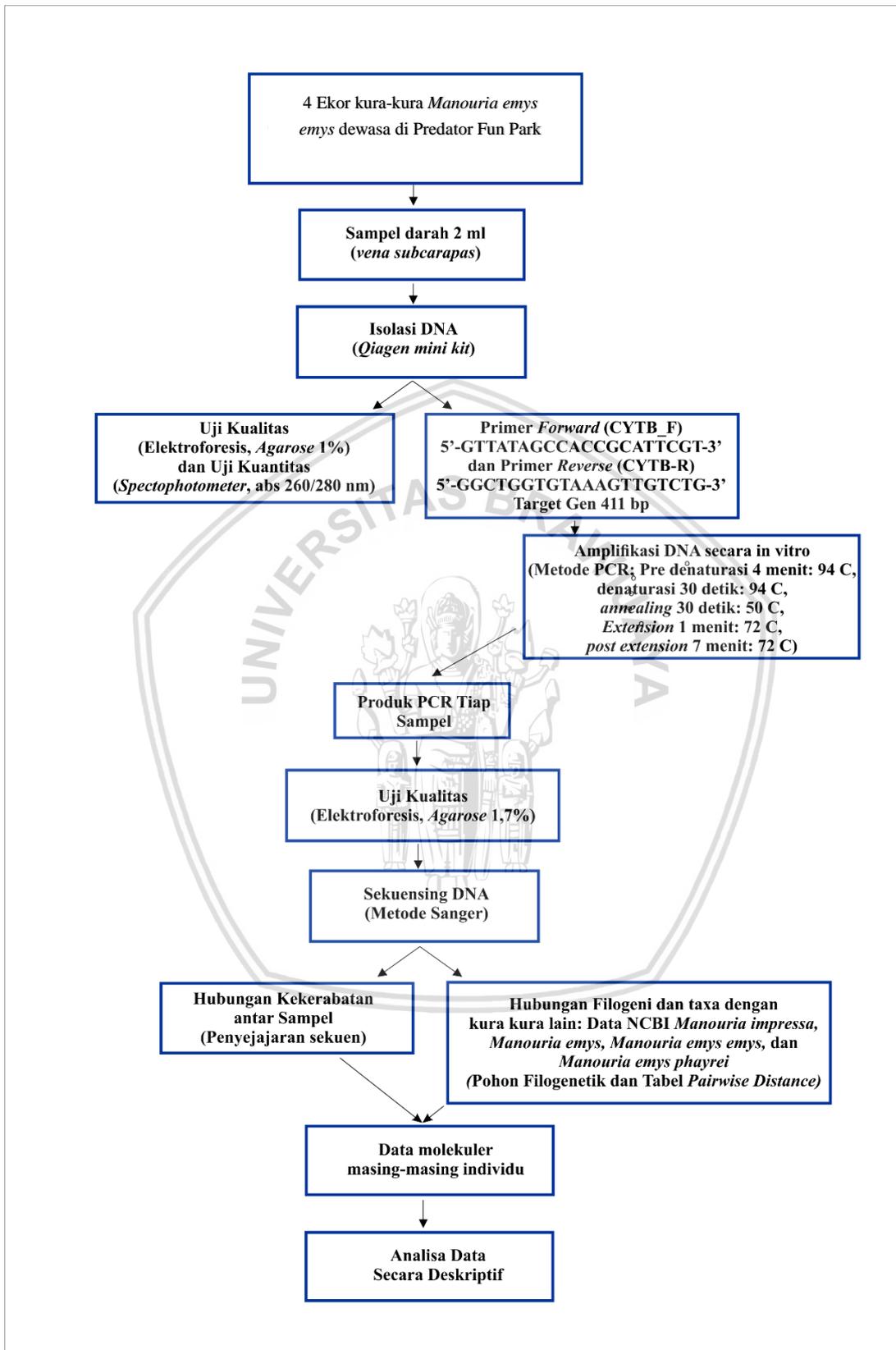
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain *disposable syringe*, sarung tangan, masker, *ice box*, kertas label, tabung EDTA, *microcentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), mikropipet, *white tip*, *yellow tip*, mesin vortex, sentrifugator, mesin penangas, inkubator, *freezer*, timbangan analitik digital, *thermocycler*, mesin *sequencing*, komputer, *Bio Step UV-Transilluminator* DH-40, ND-1000 *Spectrophotometer*, Mupid-Exu *Electrophoresis*, kamera dan tisu.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian yaitu 4 sampel darah Kura-kura Kaki Gajah yang berasal dari Kalimantan, *QIAamp*<sup>®</sup> *DNA Mini Kit* (50), ddH<sub>2</sub>O, primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GTTATAGCCACCGCATTCGT-3' dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-GGCTGGTGTAAGTTGTCTG -3', PCR *mix* (Promega *Gotaq Green Master Mix*), DNA *ladder* 100 bp dan 1 kb, Tris Borat EDTA (TBE 1 x), agarosa 1% dan 2%, *loading dye*, ethanol absolut, alkohol 70%, aluminium foil, larutan etidium bromida (EtBr) dan natrium asetat 3M.

#### 4.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan dimulai dengan pemilihan sampel Kura-kura Kaki Gajah di Predator Fun Park, Batu Jawa Timur. DNA selanjutnya diisolasi dari darah menggunakan *Qiagen kit extraction*. DNA selanjutnya diuji kuantitas dan kualitas dengan nanodrop. Desain primer disiapkan sesuai gen yang diinginkan. Selanjutnya produk DNA dilakukan amplifikasi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk selanjutnya disekuensing setelah dipurifikasi. Hasil sekuensing kemudian dianalisa untuk melihat hubungan kekerabatan. Kerangka operasional dapat dilihat pada **Gambar 4.1**





Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian



## 4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian studi kasus pada kura-kura Kaki Gajah di Predator Fun Park yang dianalisa secara deskriptif, yaitu dengan mendeskripsikan hasil analisa data. Data diperoleh dari sekuen DNA Cyt-b untuk merekonstruksi pohon filogenetik dalam menentukan kekerabatan individual antara Kura-kura Kaki Gajah dan Kura-kura Bening Coklat. Sebanyak empat sampel darah yang diuji merupakan darah dari 8 spesies Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) sebanyak 2 cc setiap individu (**Gambar 4.1**). Kemudian dilakukan isolasi DNA melalui sampel darah tersebut dengan menggunakan *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* (50). Hasil isolasi DNA tersebut kemudian diukur konsentrasinya menggunakan nanospektrofotometri dan ukurannya dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Setelah itu, sampel DNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GTTATAGCCACCGCATTCGT-3' dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-GGCTGGTGTAAAGTTGTCTG -3'. Untuk mengetahui ukuran fragmen produk PCR diukur dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Produk PCR kemudian di sekuensing. Hasil sekuensing fragmen DNA kemudian dianalisa dengan menggunakan program *BioEdit*, BLAST NCBI dan MEGA versi 7.0 serta dianalisa secara deskriptif.

## 4.6 Prosedur Kerja

### 4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Kura-kura Kaki Gajah

Lokasi pengambilan sampel darah dilakukan pada *vena subcarapas*. Volume sampel darah yang diambil sebanyak 2cc dari masing-masing pada empat individu Kura-kura Kaki Gajah. Sampel darah dimasukkan ke dalam EDTA *vacutainer tube*

dan dilabel sesuai nama individu Kura-kura Kaki Gajah. Sampel kemudian disimpan pada suhu 4<sup>0</sup>C. Penyimpanan sampel *whole blood* pada suhu 4<sup>0</sup>C dipilih karena jarak antara pengambilan sampel dan proses isolasi DNA tidak terlalu lama (Bulla *et al*, 2016).

#### 4.6.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dari sampel darah kura-kura Kaki Gajah Kalimantan menggunakan *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* mengikuti protokol isolasi DNA. Terdapat 3 prinsip pada langkah dalam isolasi DNA, yaitu merusak dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, dan pemurnian DNA (Surzycki, 2000).

#### 4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

##### 4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan mesin ND-1000 *Spectrophotometer*. Blanko yang digunakan adalah ddH<sub>2</sub>O. ddH<sub>2</sub>O ditetaskan langsung diatas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1μL, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutupkan. Panjang gelombang yang digunakan adalah 260 nm dan 280 nm. Sebanyak 1 μL sampel ditetaskan diatas pedestal *submicroliter cell* yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup diatas sampel yang telah ditetaskan dan ditekan tombol *sample* kemudian ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor (Nanodrop Technologies, 2007).

#### 4.6.3.2 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen Cyt-b. Uji kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan mesin Mupid-Exu *Electrophoresis*. Elektroforesis gel agarosa 1% dilakukan sesuai Sambrook *and* Russel (2001). Dibersihkan cetakan agarosa dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 ml dan gel agarosa 1% (0,15 g) hingga mendidih atau agarosa larut.

Menurut Fatchiyah dkk., (2009) campuran selanjutnya ditambahkan larutan EtBr sebanyak 1 $\mu$ l dan didinginkan (tidak sampai memadat), kemudian disiapkan sisir dan *plate* untuk membentuk sumuran. Campuran agarosa, TBE 1x dan EtBr kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel didiamkan selama 20-30 menit pada suhu kamar hingga memadat baru kemudian diambil sisir secara perlahan. Gel dengan sumuran yang telah terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* Mupid-Exu *Electrophoresis*. Kemudian larutan buffer elektroforesis (*running* TBE 1x) dituangkan kedalam *chamber* hingga menutupi seluruh bagian gel. *Marker* (DNA *ladder*) dan *loading dye* (1:1) dimasukkan ke dalam salah satu sumuran.

Campuran larutan *loading dye* dan DNA (1:1) kemudian dimasukkan kedalam sumur selanjutnya. *Chamber* dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah *running* gel elektroforesis selesai arus listrik diputuskan dan gel diangkat dari *chamber*. Gel selanjutnya dipindahkan ke *UV-transilluminator gel doc* dan diamati hasilnya. Hasil

didokumentasikan dan diekspos dengan *gel doc imaging* sehingga memudahkan analisa (Fatchiyah dkk, 2009).

#### 4.6.4 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di desain menggunakan NCBI *Genebank* : AY434563.1. Primer *forward* dan primer *reverse* diperoleh melalui *primer3plus* dengan menggunakan data AY434563. 1.140 bp *linear DNA. Manouria emys cytochrome b (cytb) gene, partial cds: mitochondrial.* Sepasang sekuen primer yang didapatkan adalah primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GTTATAGCCACCGCATTCGT-3' 3' (*start*: 370; *length* : 20 bp; *Tm* : 55,3°C; *GC* : 50,0%) dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-GGCTGGTGTAAAGTTGTCTG (*start*: 780; *length* : 20 bp; *Tm* : 53,7°C; *GC* : 50 %) dengan target produk PCR 410 bp (**Lampiran 2**).

#### 4.6.5 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sampel DNA dari Kura-kura Kaki Gajah diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (CYTB\_F) dan *reverse* (CYTB\_R). Amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1µL DNA, 1µL primer *forward* 10pmol, 1µL primer *reverse* 10pmol, 5µL PCR mix dan 2 µL ddH<sub>2</sub>O ke dalam mikrotube 200µL. Tahapan amplifikasi dimulai dari predenaturasi 94<sup>0</sup>C selama empat menit, denaturasi 94<sup>0</sup>C selama 30 detik, kemudian *annealing* pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 30 detik. *Extension* pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 1 menit dan *post extension* pada 72<sup>0</sup>C selama 7 menit. Proses akan berulang selama 35 siklus.

#### 4.6.6 Uji Kuantitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA. Untuk memvisualisasikan produk PCR gen Cyt-b dari darah Kura-kura Kaki Gajah, kemudian dilanjutkan dengan *running* elektroforesis gel agarosa. Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas isolat DNA. Sebanyak 2 $\mu$ L produk PCR ditambahkan 2  $\mu$ L *loading dye* dan dicampurkan homogen di dalam PCR tube. Produk PCR tersebut dipipet ke dalam sumur gel agarosa 1,7% dengan TBE 1x pada voltase 100V, selama 30 menit. Kemudian didokumentasikan hasil elektroforesis dengan kamera digital pada UV-transiluminator.

#### 4.6.6 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen Cyt-b dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer CYTB\_F 10pmol dan CYTB\_R 10pmol untuk melihat sekuen Gen Cyt-b sebesar 410 bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50ng/ $\mu$ L untuk dapat dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs.

#### 4.6.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini kemudian dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikan kekerabatan antara empat Kura-kura Kaki Gajah dan Bening Coklat melalui homologi gen Cyt-b dengan menggunakan software *BioEdit* dan BLAST NCBI. Tahap analisa sekuensing DNA dilakukan

dengan penyejajaran sekuen DNA dengan membandingkan antara sampel 4BR, 5BR, 6BR, dan 7BR dengan database NCBI *Genebank* : AY434563.1. Penyejajaran menggunakan algoritma *ClustalW multiple allignment*. Analisa filogeni menggunakan perangkat lunak MEGA versi 7.0 dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* (NJ) memakai 1000 kali pengulangan. Hasil analisa program MEGA tersebut akan diperoleh matriks jarak genetik persamaan basa nukleotida.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Hasil Isolasi DNA kura-kura Kaki Gajah

Gen Cyt-b di mtDNA pada kura-kura telah digunakan untuk identifikasi spesies dalam taksonomi dan studi filogeni. Tingginya jumlah salinan pada mtDNA dibanding DNA nukleus membuat lokus ini ideal untuk analisa pada DNA yang mungkin terdegradasi (Hsieh, 2001). Isolasi DNA dilakukan menggunakan sampel *wholeblood* yang diekstrak dengan *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* sesuai protokol (**Lampiran 1**). Hasil yang diperoleh merupakan DNA total. Telah didapatkan sekuen lengkap gen Cyt-b pada penelitian Hsieh (2001) dengan ukuran 1140 bp. Isolat DNA digunakan sebagai DNA template untuk proses amplifikasi gen Cyt-b pada genome mitokondria dari kura-kura Kaki Gajah menggunakan metode PCR untuk mengetahui kekerabatan individu kura-kura di Predator Fun Park.

**Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Kura-kura Kaki Gajah**

Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (Absorbansi 260/280)
4BR Rara	95,05	0,88
5BR Roro	837,09	1,48
6BR Ruru	162,33	1,68
7BR Rere	1646,8	1,64

Analisa molekuler (DNA) merupakan alat standar dalam taksonomi dan studi filogenetik. Studi ini biasanya fokus pada gen di mitokondria. Gen yang paling populer adalah Cyt-b. Gen ini pada penelitian sebelumnya juga terbukti untuk studi

inter maupun *intrafamily* pada kura-kura (Hsieh, 2006). Hasil isolasi bertujuan mendapatkan isolasi DNA total yang kemudian dilakukan uji kuantitas menggunakan *Implen NanoDrop® Spectrophotometer ND-100* dengan panjang gelombang 260 nm. Konsentrasi dan kemurnian DNA total dari darah kura-kura Kaki Gajah ditunjukkan pada **Tabel 5.1 (Lampiran 3)**. Hasil konsentrasi dan kemurnian DNA berdasarkan uji kuantitas tersebut dapat digunakan untuk menguji gen Cyt-b dengan teknik PCR.

Menurut PROMEGA (2017), kualitas DNA yang baik memiliki rasio absorbansi 260/280 berkisar 1,7-2,0. Nilai absorbansi dibawah rasio tersebut bukan berarti DNA tidak dapat dibaca menggunakan aplikasi apapun, tetapi nilai absorbansi yang rendah mengindikasikan adanya kontaminan protein berlebih yang dapat mempengaruhi hasil pembacaan. Absorbansi rendah ini tidak mempengaruhi kerja DNA polymerase. Hasil yang ditunjukkan pada semua sampel berada di bawah nilai 1,7.

Faktor penentu proses isolasi dan purifikasi DNA menurut Syafaruddin dan Santoso (2011) diantaranya adalah: penghomogenan jaringan, komposisi dalam penambahan larutan buffer serta penghilangan enzim-enzim penghambat. Konsentrasi DNA yang rendah dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yakni; disosiasi jaringan dan presipitasi DNA dari jaringan sel yang kurang maksimal sehingga menyebabkan ekstraksi DNA dari dalam sel hanya sedikit. Selain itu juga dapat disebabkan oleh pengikatan DNA yang kurang maksimal saat tahap *binding* DNA.

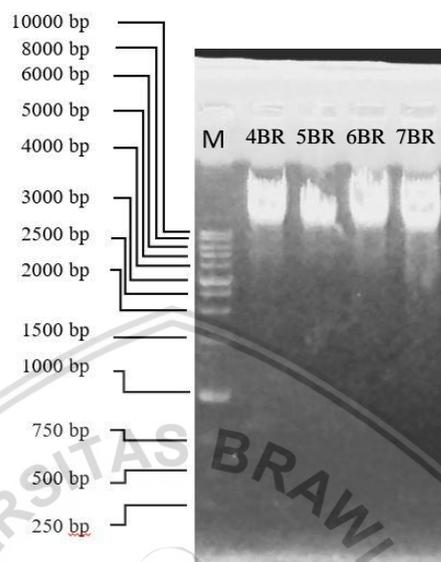
Menurut Santella (2006), nilai absorbansi pada panjang gelombang 260/280 yang lebih besar dari 2,0 menunjukkan kontaminasi RNA, sedangkan rasio di

bawah 1,8 menunjukkan masih terdapat kontaminasi protein. Konsentrasi DNA yang rendah pada hasil isolasi tidak mempengaruhi amplifikasi DNA (4BR, 5BR, 6BR, dan 7BR), sebagaimana yang dijelaskan oleh Chen *and* Janes (2002) amplifikasi DNA dengan teknik PCR dapat dilakukan dengan menggunakan sampel (DNA) dengan konsentrasi yang rendah. Hasil isolasi DNA dengan kemurnian rendah dapat diamplifikasi apabila setidaknya terdapat satu untai utuh DNA target amplifikasi, selain itu pengotor atau kontaminan tidak mampu untuk menghambat aktivitas enzim polimerase (Chen *and* Janes, 2002)

DNA yang mengandung basa-basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau phenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm. Adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini, maka kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm, dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0 (Fatchiyah dkk., 2011). Menurut Jong *et al.* (2002) menjelaskan bahwa PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi regio genome DNA yang tidak diketahui, sehingga dalam DNA konsentrasi rendah dapat diamplifikasi.

Elektroforesis adalah teknik memigrasikan partikel bermuatan di bawah pengaruh medan listrik dalam kondisi yang konstan. Elektroforesis DNA akan memisahkan sampel DNA berdasarkan ukuran dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan adalah agarose yang merupakan polisakarida turunan yang berasal dari alga merah. Elektroforesis gel agarose dapat dilakukan untuk memisahkan sampel DNA yang berukuran 200-50.000 bp, sedangkan untuk

memisahkan DNA dengan ukuran lebih pendek yang berkisar 5-500 bp dapat digunakan gel poliakrilamid (Sambrook and Green, 2012).



**Gambar 5.1** Hasil Elektrofesis DNA Total (Agarose 1%)  
Keterangan : M : Marker 1 kb, 4BR: Rara, 5BR: Roro, 6BR: Ruru, 7BR: Rere. Keempat sampel hasil isolasi menggunakan kit Qiagen menunjukkan pita lebih dari 10.000 bp.

Molekul DNA bermuatan negatif, sehingga di dalam medan listrik akan bermigrasi melalui matriks gel menuju kutub positif (anoda). Semakin besar ukuran molekulnya, semakin rendah laju migrasinya. Ukuran atau berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan cara membandingkan laju migrasi fragmen DNA dengan laju migrasi DNA *ladder* yang telah diketahui ukurannya. Fragmen DNA hasil elektroferesis dapat divisualisasikan dengan beberapa cara, yaitu dengan penambahan etidium bromida ke dalam gel sewaktu pembuatannya atau dengan cara gel direndam di dalam larutan etidium bromida sebelum divisualisasikan di bawah UV transluminator. Etidium bromida merupakan pewarna mutagenik yang akan berikatan dengan bagian basa dari DNA dan menyebabkan transmisi sinar UV dapat dilihat (Ocvania, 2015).

Hasil gel elektroforesis (**Gambar 5.1**) menunjukkan fragmen DNA memiliki kualitas yang baik. Hal ini ditandai dengan pita yang tebal dan utuh. Pita DNA yang tebal menunjukkan konsentrasi DNA total yang diperoleh cukup tinggi (Ocvania, 2015). Hasil menunjukkan adanya *band* di atas marker 10.000 bp sehingga DNA yang terisolasi memiliki ukuran lebih dari 10.000 bp. DNA mitokondria total (genome mitochondrion) *Manouria emys* yang ada pada Genbank memiliki ukuran 16.455 bp sehingga hasil elektroforesis pada **Gambar 5.1** berada di atas marker yaitu di atas 10.000 bp. Pada studi Lee (2009), mtDNA genome telah diperoleh secara keseluruhan pada *tortoise* dan memiliki ukuran 16.455 hingga 19.438 bp. Hasil isolasi DNA total dilakukan uji kualitas dengan elektroforesis menggunakan konsentrasi agarose 1%. Ukuran pita sampel secara akurat dapat diketahui dengan marker lebih besar nilainya.

## 5.2 Amplifikasi Gen Cyt-b dengan Metode PCR

Amplifikasi gen Cytb dilakukan untuk mendapatkan fragmen gen Cyt-b yang banyak sehingga dapat digunakan untuk melihat similaritas antara sekuen DNA kura-kura Kaki Gajah di Predator Fun Park dengan kura-kura Baning Coklat.

```

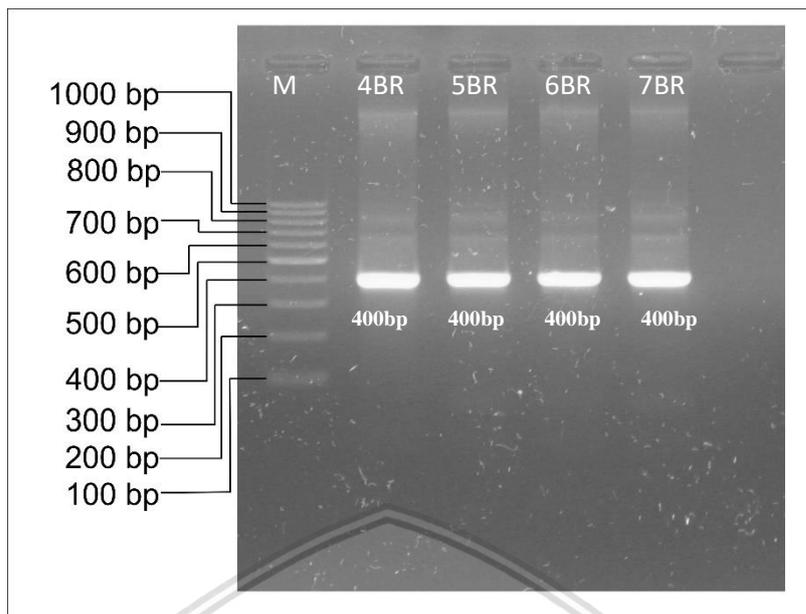
351  AATCATTCTT CTATTCCTAG TTATAGCCAC CGCATTCGTA GGTTACGTCC
401  TGCCATGAGG CCAAATGTCA TTCTGAGGCG CTACTGTTAT CACCAACCTG
451  CTCTCAGCCA TCCCCTACAT CGGCAACACT CTAGTACAAT GAATTTGAGG
501  TGGATTCTCG GTAGACAGTG CCACCCTAAC CCGATTCTTT ACTTTCCACT
551  TCATATTGCC CTTCACTATT ATCGGCTTAG CAGCCGTACA CCTACTCTTC
601  CTCCATGAAA CAGGATCAAA CAACCCAACT GGGTTAAACT CAAACACCGA
651  CAAAATCCCA TTCCACCCGT ATTTCTCCTA CAAAGACTTA TTAGGACTTA
701  TACTAATACT AACTATTTTA CTGACCCTAA CACTATTCTC CCCAAACCTT
751  CTTGGCGACC CAGACAACCTT TACACCAGCC AATCCCCTAT CAACTCCCCC
801  TCACATCAAA CCAGAATGAT ACTTCCTATT CGCCTACGCA ATCCTCCGAT

```

**Gambar 5.2** Origin Oligo Nukleotida Gen Cyt-b,

Keterangan : Biru: Primer *forward* Cyt-b, Kuning: Primer *reverse* Cyt-b, Abu-abu : *Region of interest* (National Center for Biotechnology Information, 2018).

Primer yang digunakan dalam program PCR didesain dari *genebank* NCBI dengan *reference sequence* : AY434563.1 menggunakan *Primer3plus*, sehingga didapatkan sepasang primer *forward* dan *reverse*. Susunan basa nitrogen dari gen Cyt-b dengan primer yang telah di desain ditunjukkan pada **Gambar 5.2**. Primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GTTATAGCCACCGCATTCGT-3' 3' (*start*: 370; *length* : 20 bp; *Tm* : 55,3°C; *GC* : 50,0%) dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-GGCTGGTGTAAGTTGTCTG (*start*: 780; *length* : 20 bp; *Tm* : 53,7°C; *GC* : 50 %) dengan target produk PCR sebesar selisih dari kedua primer yaitu 410 bp.



**Gambar 5.3** Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 1,7%

Keterangan : M: Marker 100 bp, 4BR: Rara, 5BR: Roro, 6BR: Ruru, 7BR: Rere. Empat sampel produk PCR menunjukkan adanya pita marker 400 bp (**Lampiran 4**).

Produk PCR di uji secara kualitatif dan didapatkan adanya pita DNA dengan ukuran 410 bp sesuai dengan target amplifikasi menggunakan primer *forward* dan *reverse* yang telah didesain. Hasil elektroforesis produk PCR konsentrasi agarose 1,7% dapat dilihat pada **Gambar 5.3**.

Pada **Gambar 5.3** terlihat adanya visualisasi pita dengan ukuran fragmen 400 bp pada hasil elektroforesis purifikasi produk PCR, pita tersebut sesuai dengan target gen Cyt-b yang diinginkan. Hal ini membuktikan bahwa gen Cyt-b telah berhasil di amplifikasi secara spesifik dan hasil purifikasi produk PCR siap di sekuensing.

### 5.3 Sekuensing Gen Cyt-b

Sampel yang dipilih untuk sekuensing adalah sampel kura-kura Kaki Gajah 4BR Rara, 5BR Roro, 6BR Ruru, dan 7BR Rere. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode dideoksi Sanger menggunakan *Automatic DNA sequencer* yang berdasarkan pada metode *dye terminator labelling*. Hasil sekuensing dibaca

menggunakan software Bioedit 7.2.5 dengan menggunakan sistem operasi Windows 10.

Hasil sekuensing DNA berupa grafik elektroferogram (grafik yang menunjukkan basa-basa yang terekam pada hasil sekuensing) dan data berupa *fasta* (urutan basa-basa hasil sekuensing). Hasil tersebut menunjukkan adanya fragmen basa nukleotida yang memiliki kesamaan basa nukleotida terhadap *database* NCBI (daerah *conserved*). Menurut Jegga and Aronow (2006), daerah *conserved* merupakan suatu daerah sekuen basa nukleotida yang mengalami sedikit perubahan atau mutasi pada segmen DNA yang disejajarkan.

Hasil sekuensing DNA berupa grafik elektroferogram (grafik yang menunjukkan basa-basa yang terekam pada hasil sekuensing) dan data dalam format *fasta* (urutan basa-basa hasil sekuensing) (**Lampiran 7**). Masing-masing hasil sekuensing sampel dimasukkan ke program BLAST NCBI untuk mengetahui kesejajaran basa nitrogen hasil sekuensing dengan database NCBI (**Lampiran 5**).

**Tabel 5.2. Query coverage dan ident sampel**

Sampel	Query coverage	ident
4BR Rara	96%	97%
5BR Roro	96%	99%
6BR Ruru	96%	99%
7BR Rere	96%	97%

Pada **Tabel 5.2**, sampel kura-kura Kaki Gajah 4BR Rara memiliki *query coverage* 96% dan *ident* 97% terhadap NCBI Genebank : DQ497315 *Manouria emys emys*, sampel kura-kura Kaki Gajah 5BR Roro memiliki *query coverage* 96% dan *ident* 99%, sampel kura-kura Kaki Gajah 6BR Ruru memiliki *query coverage* 96% dan *ident* 99%, dan sampel kura-kura Kaki Gajah 7BR Rere memiliki *query*

*coverage* 96% dan *ident* 97%. Keempat sampel memiliki nilai di atas 95% sehingga kualitas sekuen dinyatakan baik sesuai dengan pernyataan Wiley (2011) bahwa sekuen DNA yang memiliki nilai *ident* dan *query cover* pada kisaran 95%, maka kualitas yang dimiliki adalah baik untuk dilakukan analisa. Sedangkan menurut Lee (2009), nilai di atas 98% memiliki hubungan yang sangat dekat secara genetik, namun perlu kajian lebih lanjut dengan tambahan lokus gen untuk mengetahui seberapa dekat hubungan kekerabatan yang dimiliki.

Persentasi *query cover* adalah persen dari panjang segmen DNA yang sejajar, sedangkan *ident* adalah persentasi identitas satu segmen DNA yang disejajarkan dengan urutan subjek yang sama (NCBI, 2006). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sekuen DNA sampel 4BR Rara, 5BR Roro, 6BR Ruru, dan 7BR Rere memiliki kemiripan yang sangat dekat dengan sekuen DNA yang diinginkan yaitu spesies *Manouria emys emys* (Kura-kura Kaki Gajah).

Urutan hasil sekuen pada sampel kura-kura Kaki Gajah 4BR Rara menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 370 sampai 736 dari database NCBI, sampel kura-kura Kaki Gajah 5BR Roro menunjukkan adanya kesejajaran dari basa ke 370 sampai 738 dari database NCBI, sampel kura-kura Kaki Gajah 6BR Ruru menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 370 sampai 736 dari database NCBI, sedangkan sampel kura-kura Kaki Gajah 7BR Rere menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 370 sampai 736 dari database NCBI (**Lampiran 5**).

Kesamaan atau similaritas sekuen setelah disejajarkan rata-rata 96%, sehingga menunjukkan keempat sampel berada dalam spesies yang sama, hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya Lee (2009) yang menyatakan bahwa homologi dengan similaritas sekuen di atas 90% menunjukkan bahwa individu masih dalam satu

spesies atau intra-spesies jika disesuaikan dengan identifikasi morfologi. Sampel yang diambil memiliki kesamaan morfologi sehingga keempat kura-kura di Predator Fun Park merupakan spesies yang sama.

#### 5.4 Analisa Sekuen DNA Gen Cyt-b

Sekuen gen Cyt-b dari empat sampel kura-kura Kaki Gajah disejajarkan dengan tiga referensi yaitu gen Cyt-b *Manouria impressa* Database NCBI Locus DQ497317, Cyt-b *Manouria emys* Database NCBI Locus AY434563, Cyt-b *Manouria emys phayrei* Database NCBI Locus KR014231, dan Cyt-b *Manouria emys emys* Database NCBI Locus DQ497315. Urutan sekuen sampel yang dapat disejajarkan dimulai dari basa 116 sampai 386 dengan total target gen yaitu 270 bp (**Gambar 5.8** dan **Lampiran 6**). Menurut Hsieh *et al* (2001), panjang fragment gen di atas 200bp tersebut cukup untuk membedakan antara dua spesies yang sangat dekat.

**Tabel 5.3 Perubahan basa Sekuen Sampel**

Mutasi	<i>Manouria impressa</i>	Persentase	<i>Manouria emys</i>	Persentase
1. <i>Manouria impressa</i>	-	-	27 basa	10%
2. <i>Manouria emys</i>	27 basa	10%	-	-
3. <i>M. emys phayrei</i>	24 basa	8%	9 basa	3,3%
4. <i>M. emys emys</i>	25 basa	9%	9 basa	3,3%
5. 4BR Rara	33 basa	12%	12 basa	4%
6. 5BR Roro	36 basa	13%	10 basa	3,7%
7. 6BR Ruru	32 basa	11,8%	8 basa	2,9%
8. 7BR Rere	33 basa	12%	12 basa	4%

Berdasarkan **Tabel 5.3**, Referensi gen Cyt-b *Manouria impressa* memiliki 27 basa nukleotida yang berbeda dengan referensi Cyt-b *Manouria emys*, memiliki 24 basa nukleotida yang berbeda dengan referensi Cyt-b *Manouria emys phayrei*, dan memiliki 25 basa nukleotida yang berbeda dengan referensi *Manouria emys emys*. *Manouria emys* memiliki perbedaan 9 basa nukleotida dengan *Manouria emys phayrei* dan *Manouria emys emys*. *Manouria emys phayrei* sendiri memiliki perbedaan 6 basa nukleotida terhadap *Manouria emys emys*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa *Manouria impressa* merupakan spesies yang berbeda dengan *Manouria emys*. *Manouria emys* lebih dekat dengan *Manouria emys emys*, *Manouria emys phayrei*, dan keempat sampel. Menurut Hsieh (2001), range perbedaan sekuen sampel berbeda spesies adalah 5,97-34,83%. Hasil menunjukkan keempat sampel memiliki perbedaan tidak lebih dari 5,97% sehingga berada dalam spesies yang sama yaitu *Manouria emys* dan bukan *Manouria impressa*.

Hubungan kekerabatan dari referensi tersebut dapat diketahui melalui pembuatan pohon filogenetik dari sekuen gen Cyt-b. Sampel 4BR Rara memiliki perbedaan 11 basa nukelotida, sampel 5BR Roro memiliki perbedaan 10 basa nukelotida, sampel 6BR Ruru memiliki perbedaan 6 basa nukelotida, dan sampel 7BR Rere memiliki 9 perbedaan basa nukleotida terhadap empat gen referensi *Cytb Manouria* (**Lampiran 6**).

Tabel 5.4 Jenis Mutasi pada Sampel

Sampel	Jenis Mutasi	Daerah Mutasi	Jumlah	Total	Persentase
4BR Rara	Transversi	Basa ke-383, 384, 385	3	7	1,8%
	Transisi	Basa ke-380,386	2		
	Inseri-Delesi	Basa ke-339,359	2		
5BR Roro	Transversi	Basa ke 380,381,382,383,384,385,386	7	8	2,1%
	Transisi	Basa ke-359	1		
	Inseri-Delesi	-	-		
6BR Ruru	Transversi	Basa ke-383,384,385	3	5	1,3%
	Transisi	Basa ke-380	1		
	Inseri-Delesi	Basa ke-359	1		
7BR Rere	Transversi	Basa ke-383,384,385	3	7	1,8%
	Transisi	Basa ke-380,386	2		
	Inseri-Delesi	Basa ke-359,387	2		

**Tabel 5.4** menunjukkan jenis mutasi terhadap referensi DQ497315 *Manouria emys emys*. Perubahan atau mutasi genetik sampel terhadap referensi ada dua jenis, yaitu transversi dan transisi. Transversi adalah suatu pergantian antara purin dengan pirimidin pada posisi yang sama. Transisi adalah suatu pergantian basa purin dengan basa purin lain atau pergantian basa pirimidin dengan basa pirimidin lain atau disebut juga pergantian suatu pasangan basa purin-pirimidin dengan pasangan purin-pirimidin lain. Selain itu menurut Lemey (2009), terdapat juga mutas berupa penambahan basa nukleotida (insersi), dan pengurangan basa nukleotida (delesi). Namun, mutasi yang mempengaruhi pada gen Cyt-b hanya berupa substitusi silent yaitu transversi dan transisi sesuai dengan pernyataan Rahman (2010) bahwa perbedaan urutan basa nukleotida (transversi dan transisi) tidak diikuti dengan perubahan asam amino.

Keseluruhan data persentase mutasi (**Tabel 5.4**) yang telah dianalisa menunjukkan bahwa keragaman genetik dibawah 3%. Data ini sama dengan data yang telah dilaporkan Su *et al* (1999), bahwa heteroplasmy bernilai di bawah 3%, sehingga substitusi basa yang menyebabkan heteroplasmy atau keragaman variasi genetik tersebut tidak menyebabkan perubahan kodon yang diikuti dengan perubahan asam amino.

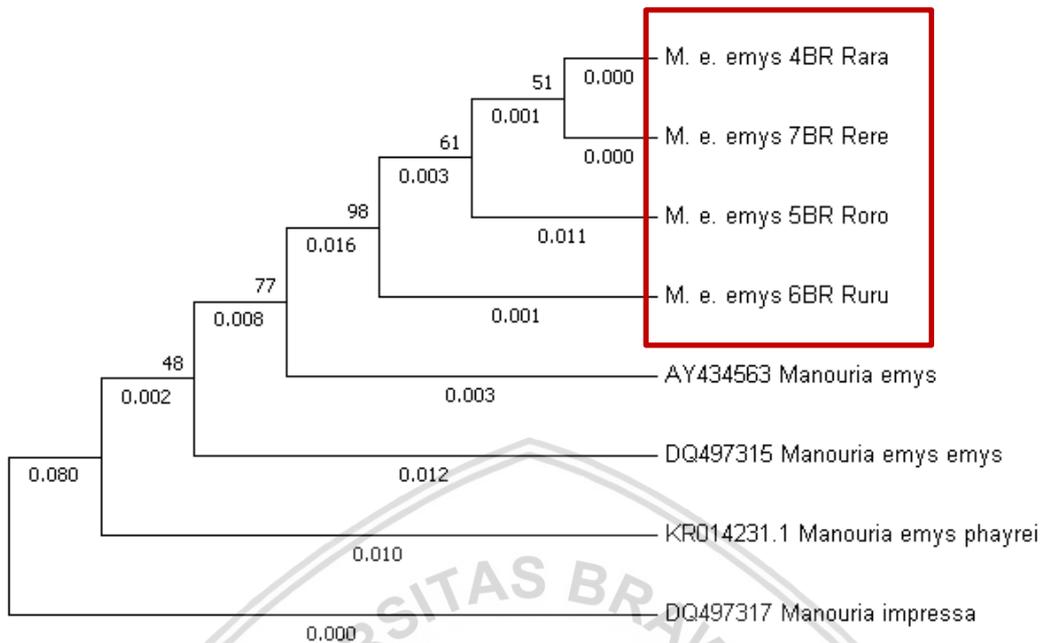
Berdasarkan jenis mutasi yang mempengaruhi gen Cyt-b pada kura-kura Kaki Gajah, sesuai dengan **Tabel 5.4** maka sampel 4BR Rara mengalami 5 perubahan basa nukleotida, sampel 5BR Roro mengalami 8 perubahan basa nukleotida, sampel 6BR Ruru mengalami 4 perubahan basa nukleotida, dan sampel 7BR Rere mengalami 5 perubahan basa nukleotida jika dibandingkan dengan referensi Database NCBI Locus DQ497315 *Manouria emys emys*. Hal ini menunjukkan kedekatan sampel dengan referensi tersebut.

### **5.5 Hubungan Kekerabatan Kura-kura Kaki Gajah Berdasarkan Pohon Filogenetik**

Filogeni penting untuk mengetahui hubungan antar spesies atau gen. Analisa filogenetik berkaitan erat dengan peristiwa evolusi biologis, evolusi adalah proses gradual suatu organisme yang memungkinkan spesies sederhana menjadi lebih kompleks. Keturunan suatu organisme akan memiliki perbedaan dengan nenek moyangnya sebab berubah dalam proses evolusi. Selain mempelajari tentang evolusi, analisa filogenetik dapat digunakan untuk mempelajari variasi dan diferensiasi genetik antar populasi dengan menghitung jarak genetik dari jumlah perbedaan basa polimorfik suatu lokus gen berdasarkan urutan DNA. Analisa

filogenetik biasanya direpresentasikan sebagai sistem percabangan seperti diagram pohon yang dikenal sebagai pohon filogenetika (Brinkman and Leipe, 2001).

Pohon filogeni memiliki nodes yang terhubung dengan cabang. Tiap cabang ini merepresentasikan persisten dari keturunan genetik. Pohon filogeni ini tidak langsung diamati dan harus didukung oleh data lain. Rekonstruksi filogeni yang baik disusun berdasarkan jarak atau karakter. Pohon filogenetik dapat dibuat menggunakan software Mega 7. Perhitungan jarak genetik menggunakan metode *pairwise distance* yang hasilnya ditunjukkan pada **Lampiran 8**. Metode yang digunakan untuk mendesain pohon filogenetik adalah *Neighbor-Joining* dengan replikasi bootstrap 1000 kali. Metode ini berbasis 25 gugus algoritma untuk matriks jarak. Penelitian Hsieh (2001) juga merekonstruksi pohon filegoenetik dengan metode *neighbor-joining* dengan bootstrap 1000 kali yang hasilnya sama jika dikomparasikan dengan klasifikasi dengan identifikasi morfologi. Metode tradisional menggunakan karakter morfologi sebagai tolak ukur, sedangkan metode molecular menggunakan urutan DNA, homologi, dan evolusi jarak jauh untuk memperoleh data. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik pada sampel ditunjukkan pada **Gambar 5.4**.



**Gambar 5.4** Pohon filogenetik kura-kura Kaki Gajah menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan replikasi *bootstrap* 1000x.

Hasil yang ditunjukkan pada **Gambar 5.4** nilai bootstrap terhadap sampel 6BR Ruru adalah 98. Nilai bootstrap pada pohon filogenetik dikatakan stabil jika nilai bootstrap di atas 95% dan dikatakan tidak stabil jika nilai bootstrap berada di bawah 70% (Osawa., 2004). Sedangkan menurut Ritz *et al.* (2000) terdapat tiga kategori nilai bootstrap yaitu *low bootstrap* (29%), *moderate bootstrap* (55%), dan *high bootstrap* (76%). Bootstrap pada sampel adalah tinggi (98%) menunjukkan bahwa posisi sampel pada pohon filogenetik yang telah direkonstruksi adalah stabil pada *clade* spesies *Manouria emys*.

Bootstrap adalah prosedur statistika yang melakukan sampling dari sebuah populasi yang dikerjakan dengan cara resampling dari sampel. Dalam analisa filogenetik, metode bootstrap diaplikasikan dengan *resample* data, dengan secara acak memilih kolom vertikal dari sekuen yang dijejerkan untuk menghasilkan penjejeran dan dalam pengaruh sebuah penjejeran baru dengan panjang yang sama.

Masing masing kolom digunakan lebih dari satu kali dan beberapa kolom mungkin tidak digunakan pada semua penjejeran yang baru. Sebagai contoh validitas penyusunan cabang dalam prediksi pohon filogenetik dapat diuji dengan *resampled* dari kolom dalam *multiple sequence alignment* untuk membentuk beberapa penjejeran baru (Dharmayanti, 2011).

Nilai *bootstrap* menjadi tolak ukur penentu tingkat kepercayaan pohon didasari pada kenyataan bahwa distribusi karakter dalam data dipengaruhi oleh efek acak. Dengan sejumlah replikasi data yang dihasilkan oleh metode *bootstrap* dimungkinkan dilakukan penaksiran tentang seberapa besar efek acak tersebut berpengaruh terhadap pohon, terutama pada topologinya. Semakin besar nilai *bootstrap*, maka semakin tinggi pula tingkat kepercayaan topologi hasil rekonstruksi tersebut (Sulandari dan Syamsul, 2008).

Metode yang digunakan adalah *neighbor joining*. Metode ini merupakan metode yang paling umum digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik berbasis metode jarak (*distance method*). Kombinasi *neighbor joining* dengan analisa *bootstrap* dapat menjadi pilihan untuk mengevaluasi pohon filogenetik berbasis jarak. *Neighbor joining* memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberi estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen (Dharmayanti, 2011). Penelitian Kundu *et al* (2013) menunjukkan bahwa *Neighbor joining phylogeny* mampu membedakan jenis kura-kura pada tingkat spesies. Tingkat evolusi molekuler yang rendah pada kura-kura memungkinkan hibridisasi tertunda pada evolusi genetik saat reproduksi. Hal ini juga dikarenakan gen mitokondria pada kura-kura lebih lambat dalam mengakumulasi perbedaan molekuler dibanding vertebrata lain.

Pohon filogenetik pada **Gambar 5.4** menunjukkan adanya 4 clade besar berdasarkan *nodes* yang ada. Nodes merupakan hipotesis leluhur atau *ancestor* yang sama. Sedangkan cabang merupakan hipotesis taxa. Clade yang terbentuk berdasarkan nodes yaitu clade *Manouria impressa*, clade *Manouria emys emys*, clade *Manouria emys phayrei*, dan *Manouria emys* yang didalamnya terdapat sampel kura-kura Kaki Gajah. Hal tersebut menyatakan bahwa *Manouria impressa* dengan *Manouria emys phayrei* dan *Manouria emys emys* merupakan spesies yang berbeda. Menurut Hsieh *et al* (2001), *cluster* atau *clade* terdekat pada pohon filogeni secara urut untuk hewan adalah yang berada pada satu spesies, kemudian satu genus, satu family, dan yang paling jauh adalah yang berada pada satu ordo yang sama.

Keempat sampel memiliki jarak genetik sebesar 0,107 terhadap referensi DQ497317 *Manouria impressa*, jarak genetik sebesar 0,037 terhadap referensi KR014231 *Manouria emys phayrei* dan DQ497315 *Manouria emys emys* yang diperoleh dari hasil BLAST NCBI, sedangkan jarak genetik terhadap referensi AY434563 *Manouria emys* lebih kecil yaitu 0.02. Berdasarkan pohon filogenetik pada **Gambar 5.4**, diketahui bahwa sampel kura-kura Kaki Gajah 4BR Rara dan 7BR Rere berada dalam *clade* yang sama dengan jarak genetik 0,000 sesuai dengan Parham (2005) yang menunjukkan bahwa kedua individu tersebut berkerabat dekat yang memiliki *common ancestor* yang sama. Keempat sampel sangat dekat dengan spesies *Manouria emys* berdasarkan jarak genetik pada pohon filogenik.

Menurut Kayani (2015), analisa filogenetik dilihat dari sekuen gen Cyt-b tidak menunjukkan variasi berarti pada intraspesifik manapun pada kura-kura, yaitu hanya berupa substitusi silent yang tidak diikuti dengan perubahan asam amino.

Hasil studi Chiari *et al* (2005) juga menunjukkan bahwa variasi genetik *tortoise* tingkat subspecies memiliki perbedaan pada geografi dan bentuk plastronnya. Sekuen yang ditunjukkan memang memiliki hubungan yang dekat secara intraspesifik. Hasil ini juga disetujui oleh Rohilla *et al* (2008) yang melaporkan bahwa estimasi jarak genetik memang akan menghasilkan hubungan kekerabatan yang dekat pada kura-kura bercangkang keras. Menurut studi Kundu (2018), tidak ditemukan korelasi yang tepat antara pola *scute* pada plastron dengan keragaman genetik, sehingga tidak ada bukti kedua subspecies tersebut berbeda secara keturunan genetik. Hal ini berarti kura-kura di Predator Fun Park *Manouria emys emys* dengan *Manouria emys phayrei* memiliki kedekatan dalam hubungan taksonomi dalam satu spesies.

**Tabel 5.5** Persentase Data Perhitungan *Genetic distance* dan *Sequence diversity (Pairwise Distance Method)* dengan referensi DQ497315 *Manouria emys emys*

Sampel	<i>Sequence diversity</i>	<i>Genetic distance</i>
4BR Rara	0,0398	0,0124
5BR Roro	0,0484	0,0137
6BR Ruru	0,0358	0,0118
7BR Rere	0,0398	0,0124

Pohon filogenetik tersebut dibuat berdasarkan jarak genetik dari perhitungan *pairwise distance* yang ditunjukkan pada **Tabel 5.5**. *Sequence diversity* sampel terhadap referensi NCBI locus DQ497315 *Manouria emys emys* sampel 4BR Rara adalah 0,0398%, sampel 5BR Roro bernilai 0,0484%, sampel 6BR Ruru bernilai 0,0358%, dan sampel 7BR Rere bernilai 0,0398%. *Genetic distance* terhadap referensi NCBI locus DQ497315 *Manouria emys emys* sampel 4BR Rara bernilai

0,0124%, sampel 5BR Roro bernilai 0,0137%, sampel 6BR Ruru bernilai 0,0118%, dan sampel 7BR Rere bernilai 0,0124%.

*Sequence diversity* sampel 4BR Rara, 5BR Roro, 6BR Ruru, dan 7BR Rere dengan locus DQ497317 *Manouria impressa* secara urut adalah 0,1083, 0,1183, 0,1128, dan 0,1083%. Sedangkan *Genetic distance* sampel 4BR Rara, 5BR Roro, 6BR Ruru, dan 7BR Rere dengan locus DQ497317 *Manouria impressa* secara urut adalah 0,0237, 0,0250, 0,0242, dan 0,0237% (**Lampiran 8**).

*Sequence diversity* sampel 4BR Rara, 5BR Roro, 6BR Ruru, dan 7BR Rere terhadap locus KR014231 *Manouria emys phayrei* secara urut bernilai 0,0397, 0,0483, 0,0356, dan 0,0397%. Sedangkan *Genetic distance* sampel 4BR Rara, 5BR Roro, 6BR Ruru, dan 7BR Rere terhadap locus KR014231 *Manouria emys phayrei* secara urut bernilai 0,0124, 0,0137, 0,0117, dan 0,0124% (**Lampiran 8**).

Data sebelumnya pada studi Kundu (2013) menunjukkan bahwa perbedaan sekuen *Manouria emys* terhadap *Manouria impressa* memiliki nilai 0,013-10,05%. Sedangkan *Manouria emys* dengan spesies yang sama memiliki nilai 0,004-1,86%. *Manouria emys emys* dan *Manouria emys phayrei* dibedakan menjadi subspecies yang berbeda berdasarkan analisa morfometri dan populasi secara geografi. *Query* sekuen benar ditemukan adanya similaritas, namun status subspecies masih berdasarkan studi morfologi.

Menurut Hsieh *et al* (2001) *sequence diversity* intra-spesies *range* menggunakan gen *cyt-b* berada di antara 0,25 sampai 2,74% dan inter-spesies berada pada *range* 5,97 sampai 34,83%. Sedangkan *genetic distance* pada hewan yang berbeda spesies berada di antara 6,33 sampai 40,59. Diversitas sekuens ini

diperoleh dari hasil uji seluruh spesies menggunakan gen Cyt-b. Dengan homologi (*Query* dan *ident*) sampel di atas 95% dan *sequence diversity* berada di range 0,25%-2,74%, maka kura-kura Kaki Gajah di Predator Fun Park merupakan spesies yang sama. Hasil perhitungan pada **Tabel 5.6** juga menunjukkan bahwa sampel kura-kura Kaki Gajah 4BR Rara dan 7BR Rere memiliki perbedaan sebesar 0% yang menunjukkan bahwa kedua individu tersebut masih memiliki hubungan kekerabatan karena memiliki *ancestor* yang sama. Sedangkan masing-masing individu merupakan kerabat yang dekat dalam satu spesies yang sama.



## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Kura-kura Kaki Gajah (*Manouria emys emys*) di Predator Fun Park memiliki keragaman molekuler antara 0,004-1,86% dengan gen Cyt-b sehingga merupakan satu spesies yang sama. Homologi di atas 95% dengan mutasi di bawah 3% menunjukkan kura-kura di PFP memiliki hubungan kekerabatan yang dekat. Kura-kura PFP 4BR Rara dan 7BR Rere memiliki jarak genetik 0% yang menunjukkan bahwa kedua individu tersebut berkerabat sangat dekat. *Manouria emys emys* di PFP diversitas sekuen 0,04% dengan *Manouria emys phayrei*.

### 6.2 Saran

Dalam upaya menjaga keragaman genetik, diperlukan penelitian kekerabatan lanjutan untuk kura-kura Kaki Gajah yang berada di lembaga konservasi eksitu maupun insitu yang menjalankan program konservasi seperti Predator Fun Park terutama untuk satwa yang belum memiliki data berupa informasi genetik dan silsilah keturunan yang jelas.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, M. F., and Das A.. 2010. Tortoises and Turtles of Northeast India Saving them from Extinction. *Technical Report, Aaranyak*, HRCP01/2010 36pp. <http://www.conservationleadershipprogramme.org> [16 Juli 2018]
- Bulla A, De Witt B, Ammerlaan W, Betsou F and Lescuyer P. 2016. Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage. *Biopreservation and Biobanking* 14(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812548> [16 Juli 2018]
- Brinkman, F. and D. Leipe. 2001. *Phylogenetic Analysis*. In : *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Gene and Protein*. Baxevanis, A.D. and B.F.F. Ouellette (Eds). John Willey & Sons. <https://onlinelibrary.wiley.com> [16 Juli 2018]
- Eggenschwiler, Ursula. 2012. Success at Keeping and breeding the little-known Burmese Brown Tortoise. *Reptilia*. <http://www.reptilia.net>. [16 Juli 2018]
- Chen, B. Y. and Janes H. W. 2002. *Methods in Biomolecular Biology*. PCR Cloning Protocol 2<sup>nd</sup> Ed. Rutgers University. <https://www.springer.com>. [16 Juli 2018]
- Chiari Y, Thomas M, Pedrono M, Veites DR. 2005. Preliminary data on genetic differentiation within the Madagascar spider tortoise, *Pyxisarachnoides* (Bell, 1827). *Salamandra* 41, 35-43. <http://vieites.berkeley.edu>. [16 Juli 2018]
- Dewanti AC, Oktavianie DA, Aulanni'am A. 2017. Analisa Kekerabatan Sapi Jaliteng (Jawa Bali Banteng) Berdasarkan Sekuen Gen Cyt-B (*Cytochrome B*) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction (Pcr)* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Malang.
- Dharmayanti, Indi NLP. 2011. *Filogenetika Molekuler*. Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. Bogor : Balai Besar Veteriner.
- Duffy K, Omar A. 2009. Testing the Reliability of Age Determination in the Egyptian Tortoise. *Seventh Annual Symposium on the Conservation and Biology Tortoises and freshwater turtles*. USA. <http://www.turtlesurvival.org> [16 Juli 2018]
- Gatc-biotech. 2017. *Sanger sequencing*. <https://www.gatc-biotech.com/en/expertise/sanger-sequencing.html>. [22 Desember 2017].
- Faizah, Ulfi. 2009. *Karakteristik Marka Genetik Daerah D-Loop Bagian Hvs-I Sebagai Acuan Konservasi Genetik Harimau Sumatera*. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA. Yogyakarta.



- Fatchiyah. 2008. *Buku Praktis: Mengenal Polymerase Chain Reaction Dasar Teknik Amplifikasi DNA & Aplikasinya*. UB. Malang.
- Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2009. *Dasar-Dasar Analisa Biologi Molekuler*. LSIH Press. Malang.
- Fatchiyah, E. L. Arumningtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler. Prinsip Dasar Analisa*. Jakarta. Penerbit Erlangga.
- Guillon, JM, Guery L, Vincent H, and Marc G. 2012. A Large Phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contribution to Zoology*. 81 (3) 147-158. <http://repository.naturalis.nl/document/447171>. [16 Juli 2018]
- Handoyo D dan Ari R. 2000. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Unitas, Vol.9, No 1.
- Hsieh, HM, Chiang HL, Tsai LC, Shu YL, Nu-En H, Adrian L, and James CI Lee. 2001. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic science international*. 122 (7-18). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587860> [16 Juli 2018]
- Hsieh, HM, Huang LH, Tsai LC, Chia-Ling L, Yi-Chen K, Chu-Ting H, and Adrian L. 2006. Species identification of *Kachuga tecta* Using the Cytochrome b gene. *Journal Forensic Science*. Vol. 51. No. 1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423223>. [16 Juli 2018]
- Jegga, A. G. and B. J. Anorow. 2006. Evolutionarily Conserved Noncoding DNA. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Jong, A., T'ang A., Liu, D., and S. Huang. 2002. *Inverse PCR: Genomic DNA Cloning in PCR Cloning Protocols*. Human Press Inc. New Jersey.
- Kayani SB, Anwar M, M Ashfaq, Iftikhar H, and Thariq M. 2015. Cytochrome b gene based phylogenetic studies of *Pangshura smithii* from Pakistan. *International Journal of Biosciences*. IJB. Vol. 6, No. 10, p. 57-63. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153218476> [16 Juli 2018]
- Klemens, MW, and Swingland IR,. 1989. *The Conservation Biology of Tortoise*. Occasional Papers of IUCN Species Survival Commission. Switzerland. IUCN. <https://portals.iucn.org> [16 Juli 2018]
- Kumar, Bharti Rajendra. 2012. *DNA Sequencing -Method and Application: DNA Representation*. Croatia. InTech.
- Kundu S, Kulendra C., and Sankar KG,. 2013. Taxonomic rank of Indian tortoise revisit with DNA barcoding perspective. *DNA Barcodes Versita* p. 39-45. <https://www.researchgate.net/publication/264702250> [16 Juli 2018]
- Kundu S, Vikas K, Boni AL, Kaoumud T, and Kailash C,. 2018. Morphology and genetic variation in the endangered tortoise *Manouria emys* distinct lineages or plastron anomalies. *Mitochondrial DNA Part B Resources*. p. 166-170

- Kurniati, Hellen. 2007. Banning Hutan, Manouria emys emys Satwa Liar Penghuni Asli Hutan yang Perlu Dilindungi. *Fauna Indonesia* Vol 7 Juni. Biologi LIPI.
- Lee JC, Tsai LC, Liao SP, Adrian L, and Hsing-Mei H. 2009. Species identification using the cytochrome b gene of commercial turtle shells. *Forensic science international. Genetics* 3. 67-73. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497308001464> [16 Juli 2018]
- Lemey P, Marco S, and Anne-Mieke V. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press., United Kingdom.
- Moll, Edward O.,. 1989. *The conservation biology of tortoise: Manouria emys, Asian Brown Tortoise*. IUCN.
- Nanodrop Technologies, Inc. 2007. *260/280 and 260/230 Ratios Nanodrop ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. Wilmington (US): Nanodrop Technologies, Inc.
- [NCBI] National Center for Biotechnology Information .2018. *Manouria emys emys cytb Partial CDS*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY434563.1>. [14 April 2018].
- Obenrader Sa, and College D. 2003. *The Sanger Method*. Davidson College. North Carolina.
- Ocvania N, Roslim, Dewi I, dan Herman. 2015. Teknik Isolasi dan Elektroforesis DNA Total Pada Tanaman Ubi Kayu (Manihot esculenta Crantz) Genotipe Roti dan Menggalo. Pekanbaru. Repository FMIPA University of Riau.
- Osawa, S. 2004. *Molecular Phylogeny and Evolution of Carabid Ground Beetles*. Springer-Verlag Tokyo: SNP Best- set Typesetter Ltd.
- Parham JF, Macey JR, Papenfuss TJ, Feldman CR, Turkozan O, Polymeni R, and Boore J. 2005. The Phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. *Journal Mol. Phylogenet. Evol.* 38 (1), 50-64.
- Parham JF, Feldman CR, and Boore J. 2006. The complete mitochondrial genome of the enigmatic bigheaded turtle (Platysternon) description of unusual genomic features and the reconciliation of phylogenetic hypotheses based on mitochondrial and nuclear DNA. *Biomed Central Evolutionary Biology*. 1471-2148.
- PROMEGA. 2017. How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample? <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/?activeTab=0>. [20 Februari 2018].

- Prusak B, Grzybowski T, and Jaroslaw B. 2005. Cytochrome b gene (cytb) in analysis of anonymous biological traces and its application in veterinary diagnostic and animal conservation. *Animal science Papers and reports* vol. 23. No. 4, 229-236. <https://www.researchgate.net/publication/233732736> [16 Juli 2018]
- Rahman, Abdul. 2010. *Keberagaman Struktur Morfologis dan Gen Cytochrome b DNA Mitokondria Kryptopus di Das Batang Hari Jambi* [Tesis]. Bogor: IPB Press.
- Ramirez MV, Mora OVC, and Uwe F. 2008. Molecular phylogeny and divergence times of ancient south American and Malagasy river turtles (Testudines Pleudira Podocnemididae). *Organism, Diversity and evolution*. 388-398.
- Ritz L, Glowatzki-Mullis M, McHugh D, and C. Gaillard. 2000. Phylogenetic Analysis of the Tribe Bovini Using Microsatellites. *Animal Genetics* 31: 178-185.
- Rohilla MS and Pramod KT. 2008. Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic studies. *Acta herpetologica*. 65-66.
- Sambrook J, and Green MR,. 2012. *Molecular Cloning A Laboratory Manual. Fourth edition*.
- Sambrook J and Russell. 2001. *Molecular Cloning 3<sup>rd</sup> ed. New York* : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santella RM. 2006. Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genom Amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers*.
- Sasmito DEK, Rahadian K, dan Izzati M. 2014. *Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA : Mini Review*. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V 2014.
- Shaffer B, P Meylan, and Mark LM. 1997. Test of Turtle phylogeny molecular, morphology, and paleontological approaches. *Systematic Biology*. 46(2):235-268.
- Sinaga, Hans Nico Agustinus. 2008. *Perdagangan Jenis Kura-kura Darat dan Kura-kura Air Tawar di Jakarta* [Skripsi]. Bogor. IPB Press.
- Stanford CB, Pratyaporn W, et Chuck S. 2015. *Manouria emysAsian Giant tortoises, giant a loan forest tortoises*. USA. University of Southern California.
- Su, Y.-X. Wang, H. Lan, W. Wang, Y. Zhang. 1999. Phylogenetic Study of complete cytochrome b genes in musk deer (Genus Moschus) using museum samples. *Molecular Phylogenetic. Evol.* 12. 241-249. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790399906164> [16 Juli 2018]

- Sulandari SM, Syamsul AZ., 2008. Keragaman Genetik Ayam Lombok Berdasarkan Sekuen D-LOOP DNA Mitokondria. Pusat Penelitian Biologi. *Cibinong Science Center*.
- Sulistyaningsih, E. 2007. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi. J. Biomedis*, Vol 1.
- Spinks PQ, Schaffer B, John I, and W McCord. 2004. Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geomididae. *Molecular phylogenetics and evolution*. 32. 164-182.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.
- Susmiarsih, T. 2010. *Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa*. Majalah Kesehatan PharmaMedika, 2010 Vol.2, No.2.
- Syafaruddin dan Santoso, J. T. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Littri*. 17 (1): 11-17.
- Utah Wildlife Resources. 2015. *Utah's Desert Tortoise Adoption Booklet*. Utah Devision of wildlife resources (UDWR). North Temple. UT.
- Widowati, Esti. 2013. *Desain Primer Sitokrom b Sebagai Salah Satu Komponen PCR untuk Deteksi DNA Babi*. Yogyakarta: LP Universitas Kalijaga.
- Wiley. E. O. and Bruce S. L. 2011. *Phylogenetics: Theory and Practise of Pylogenetic Systematics*. Second Edition. Wiley-Blackwell., USA.
- Wirdateti I, Eka, dan Handayani. 2016. Analisis DNA Mitokondria Cytochrome Oxidase I mtDNA pada Kukang Indonesia (*Nyticebus spp*) sebagai penanda guna pengembangan Identifikasi spesies. *Jurnal Biologi Indonesia*. P. 119-128.
- Yusuf, Zuhriana. 2010. Polymeras Chain Reaction. *Saintek Vol 5 No.6*. Gorontalo. Universitas Negeri Gorontalo.