

repository.ub.ac.id

**KARAKTERISTIK GEN *Cytochrome C Oxidase subunit I* UNTUK
ANALISA KEKERABATAN OWA JAWA (*Hylobates moloch*)
JANTAN DENGAN MENGGUNAKAN METODE
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

SKRIPSI

Oleh:

ANNUR RIZKY AULIA

155130101111051



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

2019

repository.ub.ac.id

**KARAKTERISTIK GEN *Cytochrome C Oxidase subunit I* UNTUK
ANALISA KEKERABATAN OWA JAWA (*Hylobates moloch*)
JANTAN DENGAN MENGGUNAKAN METODE
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

SKRIPSI

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

Oleh:

ANNUR RIZKY AULIA

155130101111051



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN

KARAKTERISTIK GEN *Cytochrome C Oxidase subunit I* UNTUK ANALISA KEKERABATAN OWA JAWA (*Hylobates moloch*) JANTAN DENGAN MENGGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Oleh:

ANNUR RIZKY AULIA

155130101111051

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji
pada tanggal 14 Mei 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS
NIP. 196005121987011001

drh. Dyah Ayu OAP., M. Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Annur Rizky Aulia
NIM : 155130101111051
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Karakteristik Gen *Cytochrome C Oxidase subunit I* Untuk Analisa Kekerabatan Owa Jawa (*Hylobates moloch*) Jantan Dengan Menggunakan 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, 14 Mei 2019
Yang menyatakan,

(Annur Rizky Aulia)
NIM. 155130101111051

**Karakteristik Gen *Cytochrome C Oxidase subunit I* Untuk Analisa
Kekerabatan Owa Jawa (*Hylobates moloch*) Jantan
Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction***

ABSTRAK

Owa Jawa (*Hylobates moloch*) merupakan primata endemik yang hanya ditemukan di Pulau Jawa, Indonesia. Status owa Jawa di IUCN-World Conservation yaitu terancam punah (*Endangered*) dan Apendik II CITES. Penelitian mengenai analisa kekerabatan antar individu owa Jawa menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) pada gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* (COI) perlu dilakukan demi mendukung upaya pelestariannya. Gen COI berukuran 228 bp diperoleh dari sampel berupa rambut dari 3 individu owa Jawa jantan setelah melalui tahap isolasi DNA menggunakan *Geneaid DNA Mini Kit* dan amplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan sepasang primer *forward* (OJW_F) 5'-ATG TCG TAG CCC ACT TCC AC-3' dan *reverse* (OJW_R) 5'-TGT ATG CAT CGG GGT AGT CA-3'. Sekuens hasil PCR dilakukan dengan metode *Sanger*. Hasil sekuen gen dianalisa secara deskriptif kualitatif untuk memperlihatkan kekerabatan antar sampel individu owa Jawa (*Hylobates moloch*) dengan data dari NCBI dengan kode akses HQ622784.1 (intraspecies), lalu dibandingkan dengan owa Hoolock (*Hoolock hoolock*) kode akses KY250073.1 dan Siamang (*Symphalangus syndactylus*) kode akses HQ622798.1 (interspecies) menggunakan program BioEdit®, *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI, dan program *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kekerabatan owa Jawa yang berada di Javan Primate Rehabilitation Center (JPRC) Jawa Barat berhasil dideskripsikan berdasarkan Gen COI (*Cytochrome C oxidase subunit 1*) secara intraspecies maupun interspecies. Jarak genetik intraspecies sampel owa Jawa yang dibandingkan dengan sekuen gen COI owa Jawa *database* NCBI menunjukkan kekerabatan yang sangat dekat karena bernilai sama atau kurang dari 1%. Jarak genetik interspecies yang dibandingkan dengan Siamang (*Symphalangus syndactylus*) genus *Symphalangus* bernilai 8,6%, sedangkan jika dibandingkan dengan owa Hoolock (*Hoolock hoolock*) genus *Hoolock* bernilai 5,8% sampai 7,9%. Hal ini menunjukkan bahwa owa Jawa secara molekuler lebih dekat dengan genus *Hoolock* daripada genus *Symphalangus*.

Kata kunci : Owa Jawa, *Hylobates*, mtDNA, COI, PCR

**Characteristics of Cytochrome C Oxidase Subunit I Genes for
Kinship Analysis of Male Javan Gibbons (*Hylobates moloch*)
Using the Polymerase Chain Reaction Method**

ABSTRACT

Javan gibbon (*Hylobates moloch*) is an endemic primate found only on Java, Indonesia. Status of Javan gibbons at the IUCN-World Conservation, is endangered and Appendix II at CITES. Research on kinship analysis between Javan gibbon individuals using mitochondrial DNA (mtDNA) on the Cytochrome C Oxidase subunit 1 (COI) gene needs to be done to support its conservation efforts. The COI gene measuring 228 bp was obtained from hair samples of 3 male Javan gibbons after going through the DNA isolation stage using Geneaid DNA Mini Kit and amplification using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method using a pair of forward primers (OJW_F) 5'-ATG TCG TAG CCC ACT TCC AC-3' and reverse (OJW_R) 5'-TGT ATG CAT CGG GGT AGT CA-3'. The sequence of results of PCR was carried out by the Sanger method. The results of gene sequences were analyzed qualitatively to show the relationship between individual samples of Javan gibbons (*Hylobates moloch*) and data from NCBI with access codes HQ622784.1 (intraspecies), then compared to Hoolock gibbons (*Hoolock hoolock*) access codes KY250073.1 and Siamang (*Symphalangus syndactylus*) access code HQ622798.1 (interspecies) using the BioEdit® program, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) from NCBI, and programs Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). The results showed that the kinship of Javanese gibbons in the Javan Primate Rehabilitation Center (JPRC) of West Java was successfully described based on the COI gene (Cytochrome C oxidase subunit 1) both intraspecifically and interspecies. The genetic distance between the species of Javan gibbon compared to the COI gene sequences of Javanese gibbons in the NCBI database shows a very close relationship because it is worth the same or less than 1%. The interspecies genetic distance compared to the Siamang (*Symphalangus syndactylus*) genus *Symphalangus* is worth 8.6%, whereas when compared with the Hoolock (*Hoolock hoolock*) genus the Hoolock genus is worth 5.8% to 7.9%. This shows that Javan gibbons are molecularly closer to the genus Hoolock than the genus *Symphalangus*.

Keywords : *Hylobates*, *mtDNA*, *COI*, *PCR*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas perkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Karakteristik Gen *Cytochrome C Oxidase subunit I* Untuk Analisa Kekerabatan Owa Jawa (*Hylobates moloch*) Jantan Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction***” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS., dan drh. Dyah Ayu OAP., M. Biotech sebagai dosen pembimbing atas bimbingan, nasihat, saran dan segala perhatian yang telah diberikan selama penyusunan skripsi ini.
2. drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet., dan drh. Aulia Firmawati, M.Vet., sebagai dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran selama pelaksanaan ujian skripsi.
3. Prof. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc, sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. drh. Ida Junyati Masnur selaku dokter hewan Javan Primate Rehabilitation Centre, Jawa Barat atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada penulis.
5. Keluarga penulis, Ayah Suryadi, Ibunda tercinta Yunita, serta kakak kandung Miftah, dan Adik kandung Aisyiah dan Zahra atas segala

pengorbanan, kerja keras, doa, materi, dan kasih sayang yang tak terhingga kepada penulis.

6. Keluarga besar Improve KELAWAR dan KOMINFO yang telah memberi masukan, semangat, dan dorongan. Teman sejawat PCR yaitu Hazra Maulidina, Intan Pratiwi Budiman, Faris Rhamadanail dan Nur Haya 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, teman-teman seperjuangan Vava, Patrice, Melita, Talitha, Winona, Bakik dan Summertrois. Serta anggota Classy class yang telah menemani proses belajar selama 4 tahun masa pendidikan dokter hewan.

Tulisan ini jauh dari kesempurnaan, maka dari itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca agar lebih banyak manfaat yang dapat diambil. Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca.

Malang, 14 Mei 2019

Penulis

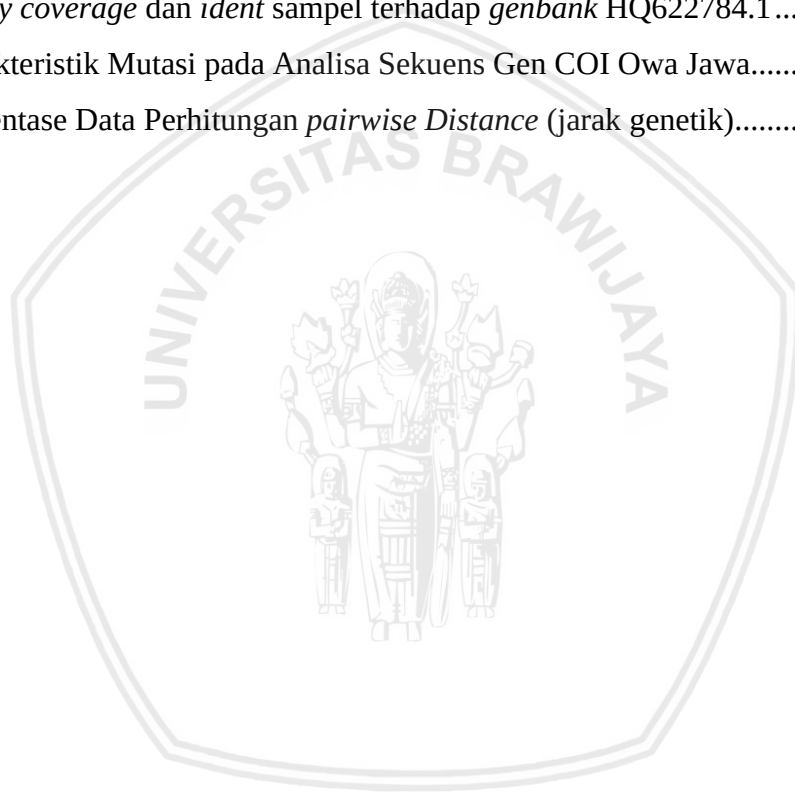
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Owa Jawa (<i>Hylobates moloch</i>)	7
2.2 DNA Mitokondria (mtDNA)	10
2.3 Gen Cytochrome C Oxidase subunit I (COI)	11
2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	12
2.4.1 Amplifikasi PCR.....	13
2.4.1.1 Denaturasi Untai Ganda DNA.....	15
2.4.1.2 Primer <i>Annealing</i>	16
2.4.1.3 DNA Polymerase <i>Extension</i>	17
2.5 Sekuensing DNA	18
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ...	21
3.1 Kerangka Konseptual.....	21

3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	24
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
4.2 Pemilihan Sampel Owa Jawa	24
4.3 Alat dan Bahan	25
4.4 Tahapan Penelitian.....	25
4.5 Rancangan Penelitian.....	26
4.6 Prosedur Kerja	27
4.6.1 Pengambilan Sampel Rambut Owa Jawa	27
4.6.2 Isolasi DNA	27
4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA	27
4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA.....	27
4.6.3.2 Uji Kualitas DNA.....	28
4.6.4 Desain Primer	30
4.6.5 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)	30
4.6.6 Uji Kualitas Produk PCR.....	30
4.6.7 Sekuensing DNA	31
4.6.8 Analisa Data.....	31
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	32
5.1 Isolasi, Amplifikasi, dan Sekuensing Gen COI	32
5.2 Analisa Sekuan Gen COI Owa Jawa	37
BAB 6 PENUTUP.....	43
6.1 Kesimpulan	43
6.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA.....	44
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Informasi individu sampel Owa Jawa	25
5.1 Konsentrasi dan Kemurnian Isolat DNA Owa Jawa (<i>Hylobates moloch</i>)	34
5.2 Urutan Oligonukleotida Primer Gen COI Owa Jawa.....	36
5.3 Program PCR untuk Amplifikasi gen COI Owa Jawa	36
5.4 <i>Query coverage</i> dan <i>ident</i> sampel terhadap <i>genbank</i> HQ622784.1	38
5.5 Karakteristik Mutasi pada Analisa Sekuens Gen COI Owa Jawa.....	38
5.6 Persentase Data Perhitungan <i>pairwise Distance</i> (jarak genetik).....	40

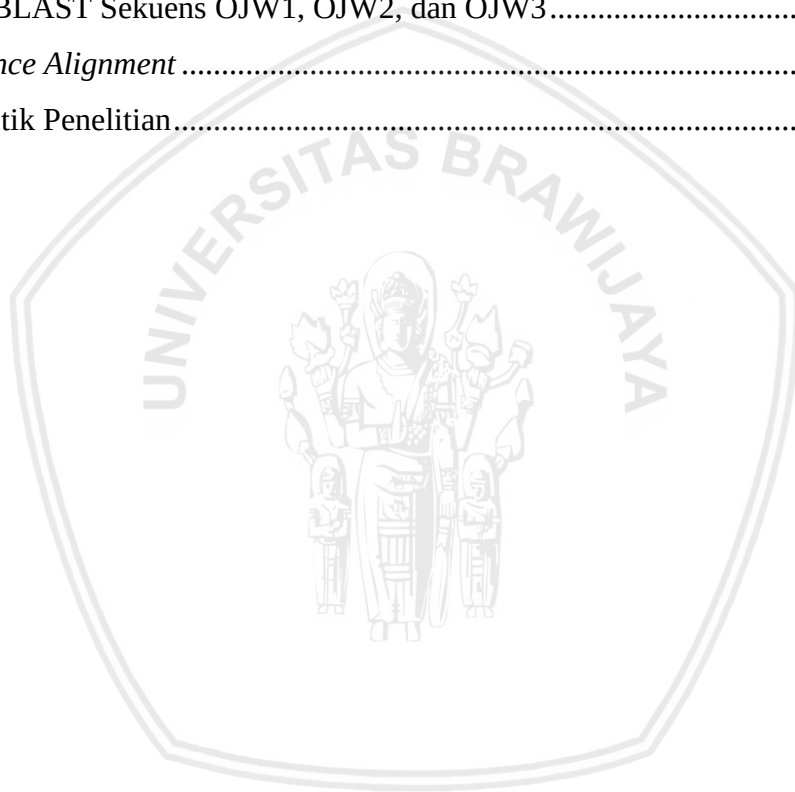


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Klasifikasi dan penyebaran genus <i>Hylobates</i>	8
2.2 Peta sebaran habitat owa Jawa	9
2.3 Pohon filogeni awal <i>Gibbon</i>	9
2.4 Pasangan owa Jawa	10
2.5 DNA Mitokondria	12
2.6 Skema satu siklus PCR	18
2.7 Skema sekuensing DNA metode Sanger	21
3.1 Bagan kerangka konseptual.....	23
4.1 Homologi sekuen gen menggunakan BioEdit® dan BLAST	30
5.1 Isolat DNA total Owa Jawa Agarose 1%.....	35
5.2 Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 2%.....	37
5.3 Pohon filogenetik owa Jawa menggunakan metode <i>Maximum Likelihood Tree</i> dengan repliasi <i>bootstrap</i> 1000×.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Tahapan Penelitian	50
2. Protokol Isolasi DNA	51
3. Desain Primer	52
4. Elektropherogram dan format FASTA hasil sekuens owa Jawa	56
5. Hasil BLAST Sekuens OJW1, OJW2, dan OJW3	57
6. <i>Sequence Alignment</i>	57
7. Laik Etik Penelitian	58



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
μL	Mikroliter
AE	<i>Eluted buffer</i>
AL	<i>Lysis buffer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	<i>Base Pair</i>
CITES	<i>Convention on International Trade in Species of Wild Fauna and Flora</i>
Cm	Sentimeter
ddH ₂ O	<i>Doubele distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Triphospat deoxynucleoside</i>
ddNTPs	<i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
EtBr	<i>Etidium bromide</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
g	Gram
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
kb	<i>Kilobase</i>
Kg	Kilogram
Mg	Magnesium
mL	Mililiter
mtDNA	<i>mintochondrial DNA</i>

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>potential of Hydrogen</i>
Pmol	<i>Picomol</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
COI	<i>Cytochrome c oxidase subunit 1</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di dunia ini terdapat 14 jenis Owa (*gibbon*) yang hanya ditemukan di Asia, dan 6 jenis di antaranya hidup di Indonesia, yaitu di Sumatera (termasuk Kepulauan Mentawai), Jawa dan Kalimantan. Owa atau *gibbon* adalah anggota suku Hylobatidae, salah satu dari 17 suku primata yang dikenal pada saat ini. Berdasarkan penelitian yang paling mutakhir mengenai populasi liar, genetika serta analisis karakteristik suara, para ahli meyakini bahwa terdapat paling tidak 30 jenis dan anak jenis yang dikelompokkan ke dalam 4 marga, yaitu *Bunopithecus*, *Hylobates*, *Nomascus* dan *Symphalangus* (Kemenhut, 2013). Owa Jawa (*Hylobates moloch*) merupakan primata endemik yang hanya ditemukan di Pulau Jawa. Sebarannya terbatas pada hutan-hutan di Jawa Barat, terutama pada daerah yang dilindungi, seperti Taman Nasional Ujung Kulon, Gunung Halimun Salak, Gunung Gede Pangrango, serta Cagar Alam Gunung Simpan dan Leuweung Sancang. Di Jawa Tengah hanya ditemukan di sekitar Gunung Slamet sampai sekitar Pegunungan Dieng (Supriatna & Wahyono 2000).

Di dalam peraturan perundangan Indonesia, owa Jawa termasuk jenis satwa yang dilindungi berdasarkan Undang-undang No.5 tentang Konservasi Sumber Daya Alam Hayati dan Ekosistemnya dan Peraturan Pemerintah No.7 Tahun 1999 tentang Pengawetan Tumbuhan dan Satwa Liar. Ancaman terbesar terhadap keberadaan owa Jawa berasal dari kerusakan habitat dan perburuan untuk dijadikan satwa peliharaan. Saat ini status konservasi owa Jawa dikategorikan sebagai satwa terancam punah (*endangered*) oleh *World Conservation Union* (IUCN, 2008). Dikatakan sebagai terancam punah karena populasinya di alam

diperkirakan kurang dari 2500 individu, kemudian dengan observasi yang berkesinambungan terjadi penurunan jumlah individu dewasa dan tidak ada subpopulasi yang terdiri lebih dari 250 individu dewasa (*IUCN Conservation Monitoring Center*). Selain itu CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna*) menyatakan bahwa owa Jawa termasuk kedalam Appendix I yang berarti segala bentuk perdagangan untuk spesies ini dilarang.

Berbagai upaya untuk menjaga keragaman genetik dari ancaman kepunahan sedang dilakukan terhadap owa Jawa untuk meningkatkan populasi baik di habitat alam (*in-situ*) maupun di lembaga konservasi (*ex-situ*). Upaya ini turut dilakukan oleh salah satu lembaga konservasi di Indonesia yaitu *Javan Primate Rehabilitation Centre* (JPRC), Jawa Barat. JPRC merupakan lembaga konservasi yang fokus terhadap rehabilitasi primata-primata yang terdapat di pulau Jawa. Setelah direhabilitasi individu-individu owa Jawa yang berada di JPRC akan dilepasliarkan (*release*) ke habitat alaminya.

Penelitian dan pemahaman lebih lanjut mengenai owa Jawa perlu dilakukan demi mendukung upaya pelestariannya. Beberapa studi telah dilaksanakan untuk memahami karakteristik owa Jawa baik dari aspek makro seperti persebaran dan tingkat populasi di alam, maupun secara biomolekuler seperti penentuan tingkat familia dilihat dari sisi genetiknya (Preuschoft, 1998). Namun, penelitian untuk owa Jawa secara biomolekuler masih sangat terbatas sehingga perlu penelitian lebih lanjut tentang kekerabatan intraspecies (pada spesies yang sama) dan interspecies (pada spesies berbeda). Penelitian kekerabatan intraspecies dan

interspesies dapat dilakukan salah satunya dengan melihat sekuen gen di dalam DNA mitokondria (mtDNA) (Densmore and White., 1991).

Analisa kekerabatan menggunakan mtDNA sangat lazim dilakukan. Hal ini dikarenakan mtDNA memiliki beberapa kelebihan dalam studi keragaman genetik yaitu terdapat dalam jumlah kopi yang tinggi sehingga mudah diisolasi untuk berbagai keperluan analisis genom, selain itu ukuran mtDNA relatif kecil sehingga dapat dipelajari secara menyeluruh sebagai satu kesatuan yang utuh (Solihin 1994), mtDNA ditransmisikan melalui garis maternal antar generasi tanpa mengalami rekombinasi, sehingga seluruh molekul dapat dianggap sebagai satu unit genetik tunggal yang memiliki banyak alel (DiMauro, 2011). Salah satu gen dari mtDNA yang dapat digunakan sebagai parameter analisa kekerabatan yaitu *Cytochrome C oxidase subunit 1* (COI). Gen COI digunakan untuk mempelajari karakteristik genetik antar spesies maupun antar individu (Hebert *et al.* 2003). Perkembangan literatur tentang barcode DNA menunjukkan bahwa sebuah fragmen pendek COI dapat digunakan sebagai penanda variasi yang secara akurat dapat mengidentifikasi berbagai macam hewan sampai tingkat spesies (Luo *et al.* 2011). Setelah mengetahui kekerabatan intraspesies pada sampel, maka perlu pula dibandingkan secara interspesies. Sekuen gen interspesies yang dipakai adalah gen COI pada owa Hoolock (*Hoolock hoolock*) dari genus *Hoolock* dan Siamang (*Symphalangus syndactylus*) dari genus *Symphalangus* yang didapat dari NCBI.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kekerabatan owa Jawa (*Hylobates moloch*) yang berada di *Javan Primate Rehabilitation Centre* (JPRC) Jawa Barat secara intraspesies dan

interspesies berdasarkan sekuen gen COI (*Cytochrome C Oxidase subunit 1*) pada DNA Mitokondria menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

Bagaimana karakteristik genetik baik berupa homologi atau variasi pada owa Jawa berdasarkan sekuen gen COI (*Cytochrome C Oxidase subunit 1*) pada DNA Mitokondria dalam kekerabatan owa Jawa (*Hylobates moloch*) yang berada di *Javan Primate Rehabilitation Centre* (JPRC) Jawa Barat secara intraspesies dan interspesies menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)?

1.3 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan berupa rambut 3 ekor owa Jawa (*Hylobates moloch*) jantan masing-masing berusia 8-10 tahun yang berada di *Javan Primate Rehabilitation Centre*, Jawa Barat.
2. Sampel DNA diisolasi dari rambut owa Jawa (*Hylobates moloch*) menggunakan *Geneaid: Genomic DNA Mini Kit (Tissue 100 Preps)*. Pengambilan sampel rambut diambil pada rambut yang berfolikel.
3. Primer gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* didesain menggunakan gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* dari owa Jawa (*Hylobates moloch*) dengan kode akses HQ622784.1 menggunakan program Primer3Plus.
4. Amplifikasi gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* pada mtDNA owa Jawa (*Hylobates moloch*) dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *forward* (OJW_F) 5'-ATG

TCG TAG CCC ACT TCC AC-3'dan primer *reverse* (OJW_R) 5'-TGT ATG CAT CGG GGT AGT CA-3'.

5. Metode PCR dilakukan menggunakan mesin *SensoQuest Thermocycler* dengan program: predenaturasi 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 54,5°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama satu menit, dan *post extension* 72°C selama 7 menit.
6. Sekuensing gen *Cytochrome C Oxidase subunit 1* dilakukan dengan metode *Sanger sequencing (dideoxy sequencing)* dengan menggunakan primer *reverse* (OJW_R) 5'-TGT ATG CAT CGG GGT AGT CA-3'.
7. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen dan kekerabatan antar owa Jawa (*Hylobates moloch*) di *Javan Primate Rehabilitation Centre* Jawa Barat, owa Hoolock (*Hoolock hoolock*) *accession number* KY250073.1 dan Siamang (*Symphalangus syndactylus*) *accession number* HQ622798.1 menggunakan program BioEdit®, *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI serta program MEGA versi 7.026.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui karakteristik genetik owa Jawa berdasarkan sekuen gen COI (*Cytochrome C Oxidase subunit 1*) pada DNA Mitokondria owa Jawa.
2. Mengetahui kekerabatan owa Jawa (*Hylobates moloch*) yang berada di *Javan Primate Rehabilitation Centre* (JPRC) Jawa Barat secara

intraspecies dan interspecies menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini dapat bermanfaat dalam membantu menyediakan informasi genetik berupa perpustakaan gen untuk kebutuhan konservasi owa Jawa (*Hylobates moloch*) di tempat pengambilan sampel yaitu *Javan Primate Rehabilitation Centre*, Jawa Barat dan sebagai ilmu pengetahuan baru untuk referensi.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Owa Jawa

Owa Jawa (*Hylobates moloch*) merupakan salah satu dari tujuh jenis owa (*gibbon*) dalam suku *Hylobatidae* yang terdapat di Indonesia dan Asia Tenggara (IUCN, 2016). Ketujuh jenis owa tersebut adalah *Hylobates agilis* (Cuvier, 1821) di Pulau Sumatera dan sebagian kecil daratan Thailand dan Malaysia (Geissmann & Nijman, 2008a), *H. albibarbis* (Lyon, 1911) di Pulau Kalimantan (Indonesia) (Nijman et al., 2008), *H. klossii* (Miller, 1903) di Kepulauan Mentawai (Whittaker & Geissmann, 2008), *H. lar* (Linnaeus, 1771) di Pulau Sumatera dan daratan Malaysia, Thailand, Lao, dan Myanmar (Brockelman & Geissmann, 2008), *H. moloch* (Audebert, 1798) di Pulau Jawa (Andayani et al., 2008), *H. muelleri* (Martin, 1841) di Pulau Kalimantan (Indonesia, Brunei, dan Malaysia) (Geissmann & Nijman, 2008b), dan *H. pileatus* (Gray, 1861) di daratan Cambodia, Lao, dan Thailand (Brockelman et al., 2008). Nijman et al. (2008) menyebutkan pula bahwa *H. albibarbis* merupakan sinonim *H. agilis ssp. albibarbis*.

Berdasarkan penelitian yang paling mutakhir mengenai populasi liar, genetis, dan analisis karakteristik suara suku *Hylobatidae*; para ahli meyakini bahwa terdapat paling tidak 30 jenis dan anak jenis yang dikelompokkan ke dalam empat marga, yaitu *Bunopithecus*, *Hylobates*, *Nomascus*, dan *Symphalangus*. Nama marga *Bunopithecus* kini telah diubah menjadi *Hoolock* (IUCN, 2016). Owa Jawa adalah anggota dari marga *Hylobates* dan nama lokal owa lainnya di Indonesia mencakup ungko (*H. agilis* dan *H. albibarbis*) di Kalimantan dan Sumatera, siamang kerdil atau bilou (*H. klossii*) di Kepulauan Mentawai, owa

tangan putih atau sarudung (*H. lar*) di Sumatera, dan kalaweit (*H. muelleri*) di Kalimantan.

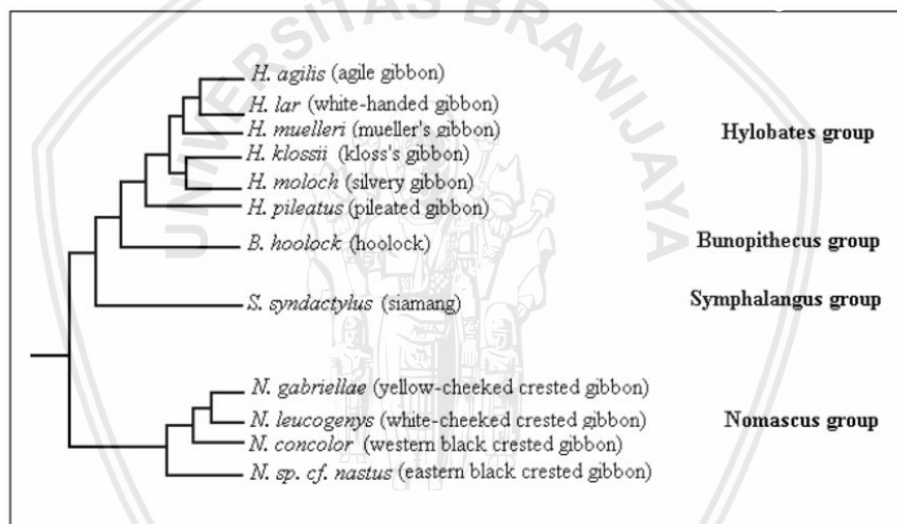
Genus	Subgenus	Species	Penyebaran
<i>Hylobates</i>	<i>Hylobates</i>	<i>Agilis</i>	Sumatera Barat, Kalimantan
		<i>Lar</i>	Malaysia, Thailand, Burma,
		<i>Moloch</i>	Semenanjung Malaysia,
		<i>Muelleri</i>	Yunan, Sumatera Barat
		<i>Pileatus</i>	Jawa Barat, Jawa Tengah
		<i>Klosii</i>	Kalimantan
		<i>Concolor</i>	Thailand, Kamboja Mentawai Vietnam, Yunan, Laos
	<i>Nomascus</i>	<i>Leucogenys</i>	Laos, Vietnam
		<i>Gabriellae</i>	Laos, Vietnam, Kamboja
	<i>Bunopithecus</i>	<i>Hoolock</i>	Assam, Bangladesh, Burma
	<i>Sympalangus</i>	<i>Syndactylus</i>	Semenanjung Malaysia, Sumatera

Gambar 2.1 Klasifikasi dan penyebaran genus *Hylobates* (Geissmann, 1995).

Owa Jawa merupakan primata endemik yang hanya ditemukan di Pulau Jawa. Sebarannya terbatas pada hutan-hutan di Jawa Barat, terutama pada daerah yang dilindungi, seperti Taman Nasional Ujung Kulon, Gunung Halimun salak, Gunung Gede Pangrango, serta Cagar Alam Gunung Simpang dan Leuweung Sancang. Di Jawa Tengah hanya ditemukan di sekitar Gunung Slamet sampai sekitar Pegunungan Dieng (Supriatna & Wahyono 2000). Satwa itu hidup secara arboreal yang melakukan sebagian besar aktivitas hariannya di lapisan kanopi atas dan jarang turun ke tanah. Pergerakan dari pohon yang satu ke pohon yang lain dilakukan dengan bergelayutan (*brachiasi*). Luas teritori owa Jawa berkisar antara 16-17 ha, dan jelajah hariannya dapat mencapai 1.500 m (Supriatna & Wahyono 2000).



Gambar 2.2 Peta sebaran habitat owa Jawa (Sumber: Nijman, 2001)



Gambar 2.3 Pohon filogeni awal dari 12 jenis *gibbon* berdasarkan kombinasi data studi vokalisasi dan molekular (Geissmann, 2002 dan Ross & Geissmann, 2001)

Tubuh owa Jawa ditutupi rambut yang berwarna abu-abu sampai keperakan, dengan rambut di sekitar wajah berwarna putih (Marshall & Sugardjito, 1986). Owa Jawa tidak memiliki ekor, dengan tangan jauh lebih panjang daripada kaki serta memiliki suara yang lantang dan khas. Suara khas owa Jawa betina yang dikeluarkan pada pagi hari (*morning call*) bisa terdengar sampai radius 1 km. Sebagaimana owa lainnya, owa Jawa hidup berpasangan dalam sistem keluarga monogami. Anggota keluarga biasanya terdiri dari sepasang individu dewasa dan

1 – 4 anak (Leighton 1986). Individu yang sudah mulai dewasa akan memisahkan diri untuk membentuk kelompok baru dengan pasangannya. Masa kehamilan owa Jawa berlangsung sekitar 7 bulan, dengan jarak kelahiran berkisar 3–4 tahun. Umumnya owa Jawa dapat hidup hingga 35 tahun (Supriatna & Wahyono 2000).



Gambar 2.4 Pasangan owa Jawa (Kemenhut, 2013).

Menurut Napier & Napier (1967) dan IUCN (2016), taksonomi owa Jawa adalah sebagai berikut :

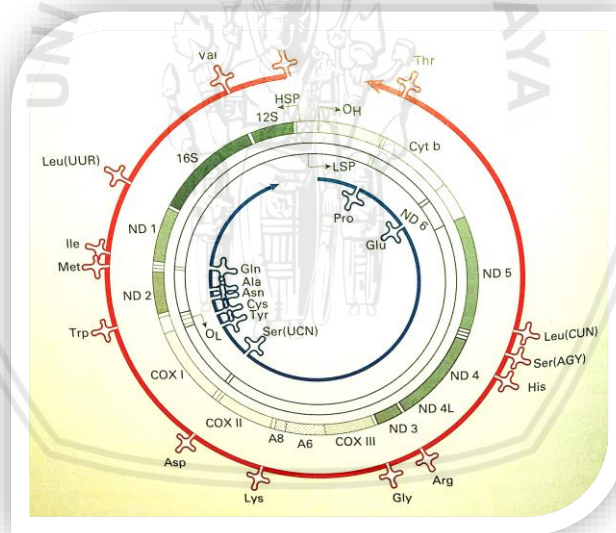
Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Ordo	: Primata
Familia	: Hylobatidae
Genus	: <i>Hylobates</i>
Species	: <i>Hylobates moloch</i> (Audebert, 1798)

2.2 DNA Mitokondria (mtDNA)

Mitokondria adalah organel yang bertanggung jawab di dalam metabolisme aerobik pada sel-sel eukariot. Mitokondria memiliki molekul DNA tersendiri dengan ukuran kecil yang susunannya berbeda dengan DNA inti. Setiap sel mengandung satu sampai ratusan mitokondria. DNA mitokondria merupakan DNA utas ganda yang berhentuk sirkuler (**Gambar 2.5**), ditransmisikan secara maternal, dan memiliki 16.569 *base pair* (bp) yang terdiri atas 37 gen yaitu gen-gen penyandi rRNA 12S dan 16S, 22 tRNA, dan 13 protein sub unit (*protein-encoding region*). Selain itu mtDNA juga memiliki urutan nukleotida non penyandi (*non-coding region*) yang disebut dengan daerah *Displacement-loop* (D-Loop). Keseluruhan DNA dan D-Loop pada mtDNA tersebar pada dua bagian yaitu *light strand* yang kaya dengan sitosin dan *heavy strand* yang kaya dengan guanin. Penamaan tersebut didasarkan pada kenyataan bahwa *heavy strand* memiliki berat molekul yang lebih besar dibandingkan dengan *light strand* (DiMauro, *et al.*, 2006). *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*). *Heavy strand* terdiri dari 12 gen penyandi protein (NADH *dehydrogenase* 1/ ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, 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 (DiMauro, *et al.*, 2006). DNA mitokondria dapat diamati pada **Gambar 2.5**.

Beberapa hal yang mendukung penggunaan mtDNA sebagai penanda dalam studi keragaman genetik dan studi biologi populasi pada hewan yaitu: (i) DNA mitokondria terdapat dalam *high copy number*. Jumlah duplikat yang tinggi ini

menjadikannya mudah diisolasi dan dipurifikasi untuk berbagai keperluan analisis genom; (ii) Ukuran DNA mitokondria relatif kecil (14-39 kb) sehingga dapat dipelajari sebagai satu kesatuan yang utuh; (iii) Bagian- bagian dari genom mitokondria berevolusi dengan kecepatan yang berbeda. Diketahui bahwa tingkat evolusi dari suatu gen atau bagian dari DNA merupakan faktor penting yang menentukan penggunaan penanda DNA dalam studi sistematika dan biogeografi. Gen-gen yang terkonservasi dengan baik dapat dijadikan sebagai dasar penelusuran kesamaan asal muasal, sedangkan gen-gen yang tak terkonservasi dengan baik yaitu gen-gen yang berevolusi dengan cepat dapat digunakan untuk perbandingan galur-galur baru (Solihin, 1994).



Gambar 2.5 Gen-Gen di DNA Mitokondria (DiMauro, *et al.*, 2006).

2.3 Gen Cytochrome C Oxidase subunit 1 (COI)

Gen penyandi dalam genom mtDNA di antaranya adalah Gen *Cytochrome C oxidase subunit I* (COI). COI telah dipilih menjadi salah satu gen yang sekuennya digunakan dalam *barcoding* (Handayani, *et al.* 2016). Gen ini mempunyai sifat-

sifat yang memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam menentukan identitas spesies pada hampir semua binatang tingkat tinggi. Gen COI memiliki banyak kelebihan untuk mempelajari karakteristik genetik karena sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuennya, serta banyak bagian yang bersifat *conserve* (lestari) sehingga dapat digunakan sebagai DNA *barcoding* pada sebagian besar spesies (Hebert *et al.* 2003). Gen COI juga dapat digunakan untuk merekonstruksi filogenetik pada cabang evolusi tingkat spesies (Palumbi 1996). Selain itu susunan asam amino dari protein yang disandi gen COI jarang mengalami substitusi sehingga gen COI bersifat stabil dan dapat digunakan sebagai penanda analisis filogeni, namun basa-basa pada triple kodonnya masih berubah dan bersifat silent yaitu perubahan basa yang tidak merubah jenis asam amino (Lynch & Jarrell 1993 dalam Herlina 2013). Selain itu gen ini memiliki kopi yang banyak sehingga mudah diamplifikasi (Zein dan Prawiradilaga, 2013). Selain kelebihan-kelebihan tersebut diatas, diketahui bahwa belum ada penelitian lebih lanjut pada gen COI owa Jawa (*Hylobates moloch*) untuk mengetahui kekerabatannya.

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam (Handoyo dan Ari, 2000). Teknik ini banyak digunakan oleh dokter dan peneliti untuk mendiagnosis penyakit, kloning, penentuan urutan gen, dan penyusunan genom. Teknik PCR merupakan proses enzimatik sederhana namun sangat baik yang memungkinkan amplifikasi fragmen DNA (gen) tertentu dari

kompleks DNA. PCR dapat dilakukan dengan menggunakan sumber DNA dari berbagai jaringan dan organisme, termasuk rambut, kulit, rambut, air liur, dan mikroba. Sedikit saja fragmen DNA telah dapat menghasilkan cukup banyak salinan yang selanjutnya dapat digunakan untuk analisa.

Komponen - komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (*Deoxynucleotide triphosphates*); buffer PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim polimerase DNA (Handoyo dan Ari, 2000).

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extension*) dan (5) pemantapan (*postextension*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo dan Ari, 2000).

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.

2.4.1 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 analisis lebih lanjut. Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel yang diwarnai dengan editium bromida dan divisualisasikan dengan sinar ultraviolet.

2.4.1.1 Denaturasi Untai Ganda DNA

Denaturasi DNA adalah proses menjadikan DNA untai tunggal dari DNA untai ganda yang dibuka. Denaturasi awal ini dilakukan sebelum enzim taq

polymerase ditambahkan. 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 (Yusuf, 2010).

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.

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* polimerase 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).

2.4.1.2 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 $Tm = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$. Suhu *annealing* biasanya 5°C di bawah Tm primer yang sebenarnya. Secara

repository.ub.ac.id

sederhana T_m dipengaruhi oleh DNA template, komponen buffer, dan konsentrasi primer (Sasmito dkk., 2014).

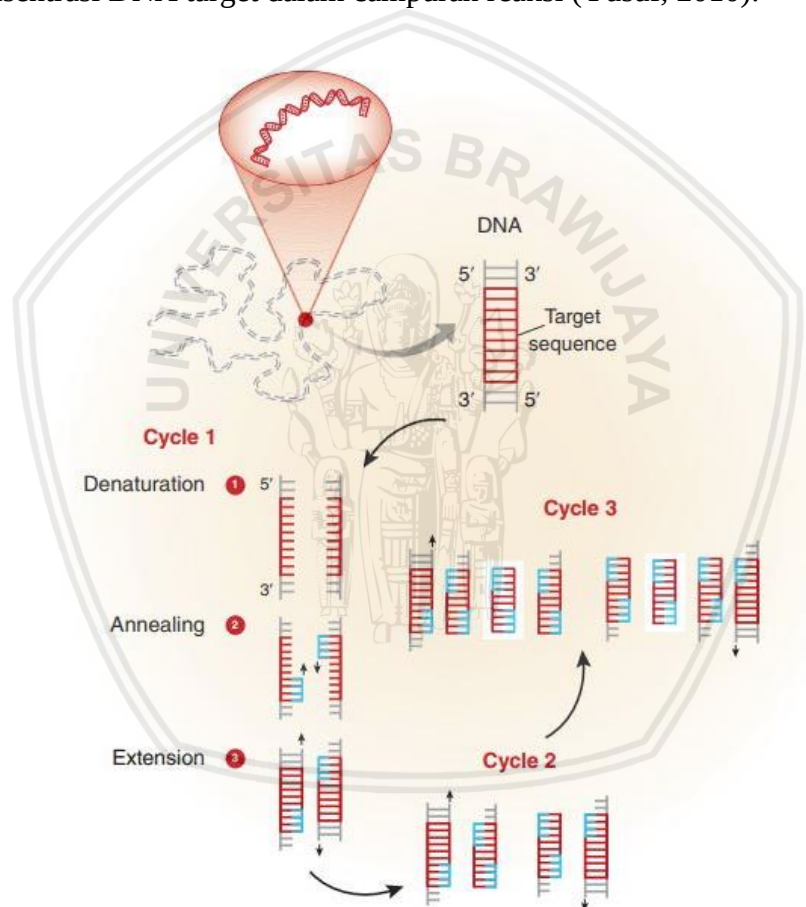
Panjang primer berkaitan dalam penentuan waktu untuk proses *annealing*. Panjang primer 18-22 basa membutuhkan waktu 30 detik, sedangkan untuk panjang primer lebih besar dari 22 basa membutuhkan waktu *annealing* 60 detik. Suhu *annealing* secara umum yang digunakan berkisar antara 37-60°C. Pemilihan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

2.4.1.3 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 kilo base (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 (Garibyan and Avashia, 2013)

2.5 Sekuensing DNA

Tujuan dilakukan sekuensing DNA adalah untuk mengetahui urutan basa nukleotida suatu fragmen DNA. DNA dapat diurutkan dengan prosedur kimia dengan menghancurkan molekul DNA yang diberi label pada sebagian

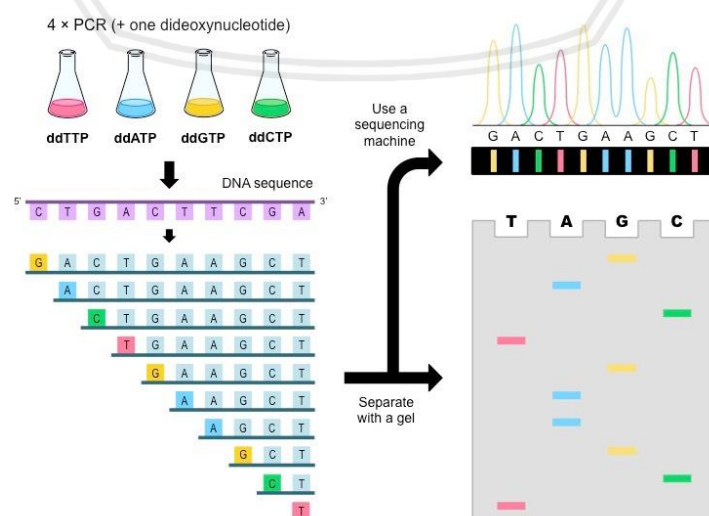
pengulangan basis. Panjang fragmen yang berlabel merupakan identifikasi dari posisi dasar tersebut. Metode ini menggambarkan reaksi yang membelah DNA secara khusus pada Guanin, Adenin, Sitosin dan Timin, dan Sitosin itu sendiri. Bila produk dari keempat reaksi ini diproses secara elektroforesis pada gel poliakrilamida untuk melihat berdasarkan ukuran, urutan DNA dapat dibaca dari pola pita radioaktif.

Metode yang umum digunakan adalah metode *Sanger sequencing (dideoxy sequencing)* (**Gambar 2.6**). Proses awal metode ini menggunakan satu primer dengan tambahan dideoxynukleotide 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 *Sanger sequencing (dideoxy sequencing)* adalah penggunaan trifosfat dideoxynucleotide (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 *fluorescent* dengan label nukleotida, dan nukleotida termodifikasi. Sampel DNA dibagi menjadi empat urutan reaksi terpisah yang mengandung keempat standar deoxynucleotides (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) dan DNA polimerase. Setiap reaksi hanya ditambahkan satu dari empat dideoxynucleotide (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 dideoxynucleotide (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-biotec.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 dianalisis, 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-biotec.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, 2003).



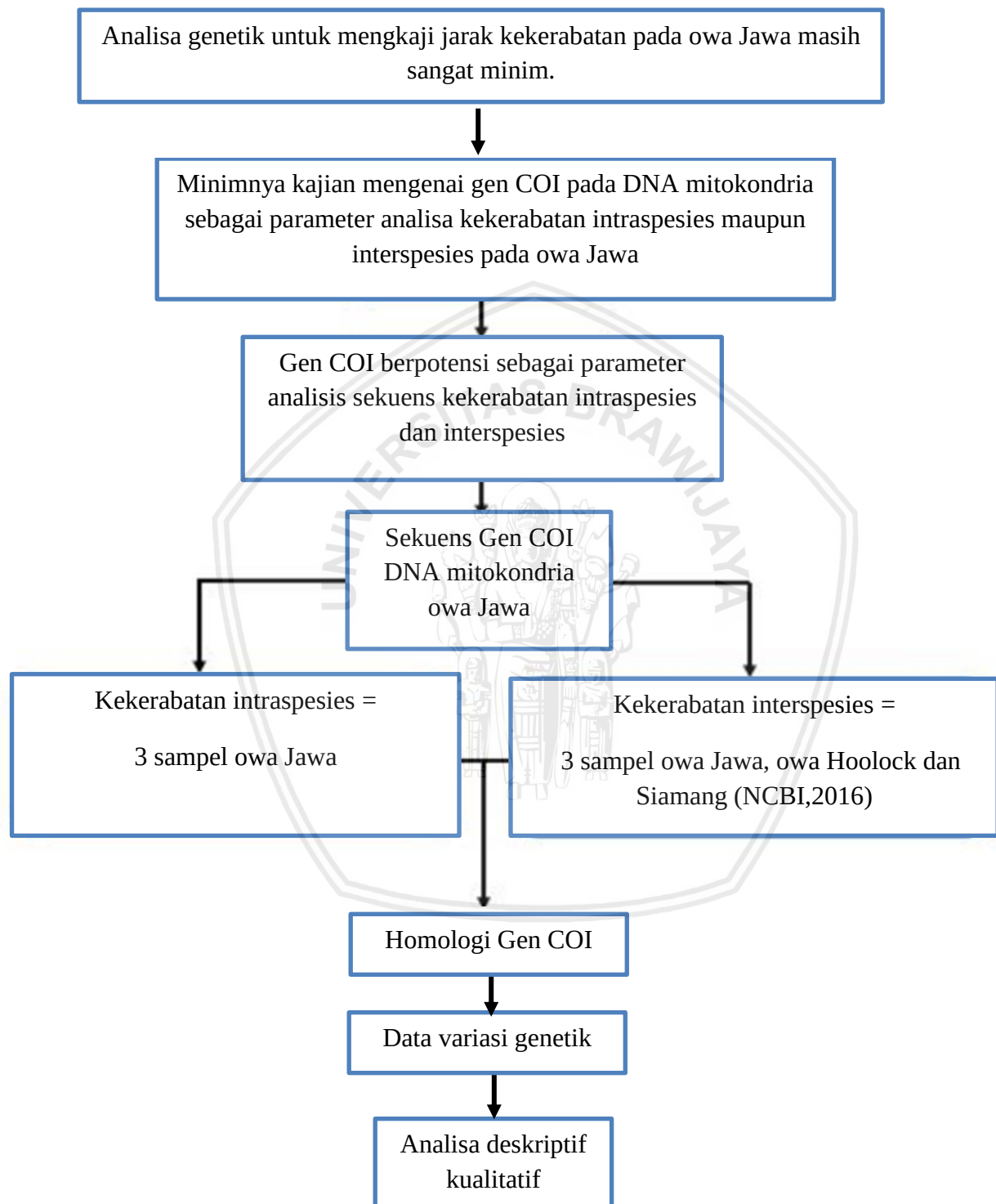
Gambar 2.7 Skema metode *Sanger sequencing* (*dideoxy sequencing*) (onlinebiologynotes.com, 2018)

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Analisa kekerabatan pada owa Jawa (*Hylobates moloch*) secara genetik merupakan kajian yang perlu ditinjau lebih lanjut mengingat masih minimnya informasi mengenai hal ini. Gen COI (*Cytochrome C Oxidase subunit 1*) pada DNA mitokondria masih belum dikaji sebagai parameter analisa kekerabatan owa Jawa baik secara intraspecies maupun interspecies. Perlu kajian kualitas pada gen COI karena memiliki potensi yang baik. Potensi itu dapat dilihat dari letaknya yang berada di DNA mitokondria, diturunkan secara maternal, secara historis memiliki sifat yang stabil, dan variabilitasnya yang rendah (1-2%). Homologi dan analisa secara kualitatif dilakukan pada sekuen gen COI yang didapatkan (menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction/PCR* dan pembacaan menggunakan metode *Sanger sequencing*) untuk melihat kemampuannya dalam mengukur jarak kekerabatan owa Jawa (*Hylobates moloch*) secara intraspecies dan interspecies.

Kekerabatan intraspecies dilihat dengan membandingkan sekuen gen COI pada 3 sampel owa Jawa yang berasal dari *Javan Primate Rehabilitation Centre*, Jawa Barat dan satu sekuen gen COI owa Jawa dari *gen bank* NCBI dengan kode akses HQ622784.1. Kekerabatan interspecies dilakukan dengan membandingkan sekuen gen COI pada 3 sampel owa Jawa, sekuen owa Jawa dari *gen bank* NCBI dengan kode akses HQ622784.1, owa Hoolock (*Hoolock hoolock*) dengan kode akses KY250073.1, dan Siamang (*Symphalangus syndactylus*) dengan kode akses HQ622798.1. Bagan kerangka konseptual dapat diamati pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah analisa sekuen gen COI (*Cytochrome C Oxidase subunit 1*) pada DNA mitokondria owa Jawa (*Hylobates moloch*) memperlihatkan variasi karakteristik genetik berupa homologi ataupun variasi yang dapat membantu analisa kekerabatan secara intraspecies dan interspecies.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa rambut owa Jawa. Pengambilan sampel rambut owa Jawa dilakukan di *Javan Primate Rehabilitation Centre*, Jawa Barat. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang untuk pemesanan primer, Laboratorium ADD (*Animal Diagnostic Disease*) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang untuk isolasi DNA dan pelaksanaan PCR, Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maliki Ibrahim Malang untuk Uji kuantitas DNA, dan Genetika Science Indonesia, Jakarta untuk melakukan sekuensing produk PCR. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2019 - Maret 2019.

4.2 Pemilihan Sampel Owa Jawa

Owa Jawa (*Hylobates moloch*) yang digunakan sebagai sampel berasal dari *Javan Primate Rehabilitation Centre*, Jawa Barat. Jumlah total owa Jawa yang terdapat di JPRC adalah 18 ekor. Pada penelitian ini digunakan sampel dengan jumlah 3 ekor owa Jawa dengan kriteria dewasa dan berjenis kelamin jantan. Identitas sampel dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Informasi Individu Sampel Owa Jawa

No	Nama	Umur (Tahun)	Jenis Kelamin	Asal	Simbol
1	Wanto	8-10	Jantan	Tasikmalaya	OJW1
2	Dwi	8-10	Jantan	Howlett, UK	OJW2
3	Candi	8-10	Jantan	Cirebon	OJW3

4.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain sarung tangan, masker, kertas label, *microsentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), *micro tube rack*, mikropipet, labu Erlenmeyer 100ml, membrane silica, *collection tube*, *white tip*, *yellow tip*, sentrifugator, incubator, mesin penangas, *vortex*, *freezer*, timbangan analitik digital, mesin PCR *thermocycler*, mesin automatic DNA *sequencer*, komputer, *Bio Step UV-Transilluminator DH-40*, *AE-Nano200 Nucleic Acid Analyzer*[®], Bio-Rad *Electrophoresis (PowerPac Basic Power Supply)*, kamera dan tisu.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu rambut 3 ekor owa Jawa (*Hylobates moloch*), *Geneaid: Genomic DNA Mini Kit (Tissue 100 Preps)*, ddH₂O, primer *forward* (OJW_F) 5'-ATG TCG TAG CCC ACT TCC AC-3' dan primer *reverse* (OJW_R) 5'-TGT ATG CAT CGG GGT AGT CA-3', PCR *mix* (Promega *GoTaq*[®] *Green Master Mix 2×*), marker DNA 100 bp dan 1 kb, DNA *loading dye*, Tris Borat EDTA (TBE 1x), *agarose* 1% dan 2 %, *loading buffer*, ethanol absolut, alkohol 70%, aluminium foil, Proteinase K, larutan buffer GT, larutan buffer W1, larutan GBT, larutan wash buffer dan larutan elusi (*AE/elution buffer*).

4.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap. Pertama, yaitu pemilihan dan pengambilan sampel yang dilakukan di *Javan Primate Rehabilitation Centre*, Jawa Barat. Didapatkan 3 sampel berupa rambut owa Jawa individu yang berbeda dengan kriteri tertentu. Sampel tersebut selanjutnya melalui tahap isolasi DNA serta dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif pada isolat yang didapat. Setelah isolat dinilai baik maka dilakukan tahap berikutnya yaitu amplifikasi gen target secara invitro

dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer yang telah didesain. Produk PCR yang didapat selanjutnya diuji secara kualitatif dan dilakukan sekuensing DNA target sehingga dapat dilakukan analisa deskriptif pada hasil sekuensing tersebut. Bagan tahapan penelitian dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian studi kasus yang dianalisa secara deskriptif kualitatif, yaitu dengan mendeskripsikan hasil analisa data. Data diperoleh dari sekuen gen COI untuk merekonstruksi pohon filogenetik dalam menentukan kekerabatan intraspecies antara sampel owa Jawa, dan interspecies antara sampel owa Jawa dengan owa Hoolock, dan Siamang. Sebanyak 3 sampel rambut yang diuji merupakan rambut dari owa Jawa (*Hylobates moloch*) yang diambil sedikitnya 10 helai dan dipotong sepanjang 0,5 – 1 cm dari pangkal rambut yang berfolikel setiap individu. Dilakukan isolasi DNA pada sampel rambut tersebut kemudian diukur konsentrasinya dan kemurniannya menggunakan nanospektrofotometer, dan ukuran fragmen DNA menggunakan elektroforesis gel *agarose* 1%. Ekstraksi pada sampel rambut menggunakan protokol phenol chloroform (Sambrook *et al.* 1989) dan dimodifikasi dengan penambahan proteinase K (PK), karena pada rambut mengandung ikatan chitin protein tinggi. DNA yang dihasilkan dilarutkan dengan TE buffer. Setelah itu, sampel DNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *forward* dan primer *reverse*. Untuk mengetahui ukuran fragmen produk PCR diukur dengan elektroforesis gel *agarose* 2%. Produk PCR kemudian disekuensing. Hasil sekuensing fragmen DNA kemudian dianalisis dengan menggunakan program BioEdit®, BLAST NCBI dan MEGA versi 7.026 serta dianalisa secara deskriptif kualitatif.

4.6 Prosedur Kerja

Prosedur kerja secara umum mengacu ke (Fatchiyah, dkk. 2008).

4.6.1 Pengambilan Sampel Rambut Owa Jawa

Pengambilan rambut pada owa Jawa dilakukan setelah prosedur *handling* dan *restrain* dilakukan. Sampel rambut diambil sedikitnya 10 helai dan dipotong sepanjang 0,5 - 1 cm dari pangkal rambut yang berfolikel dari tiap individu owa Jawa. Sampel rambut yang berhasil dikumpulkan dimasukkan kedalam kantong plastik kecil yang bisa disegel dan dimasukkan ke dalam amplop kertas, dan diberi catatan lengkap. Sampel dibawa ke laboratorium dan disimpan di *freezer*.

4.6.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dari sampel rambut owa Jawa menggunakan *Geneaid: Genomic DNA Mini Kit (Tissue 100 Preps)* mengikuti protokol isolasi DNA dari rambut (**Lampiran 2**). Terdapat 3 langkah utama dalam isolasi DNA, yaitu penghancuran sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein serta pemurnian atau permanenan DNA.

4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan mesin *AE-Nano200 Nucleic Acid Analyzer*[®]. Blanko yang digunakan adalah ddH₂O. ddH₂O 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).

Secara kuantitatif, DNA ditentukan konsentrasinya melalui spektrofotometri sinar ultra violet dengan menggunakan alat spektrofotometer (Beckman DU 650, Made in USA). DNA menyerap secara kuat sinar ultra violet pada panjang gelombang 260 nm (nano meter), sedangkan protein pada panjang gelombang 280 nm. Pada panjang gelombang 260 nm, absorbansi dengan nilai satu setara dengan 50µg/ml DNA untai ganda. Untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA, yang berkorelasi dengan kualitas DNA maka dilakukan pembagian nilai Optical Density (OD) 260 dengan OD280. Apabila nilai ratio yang diperoleh berkisar antara 1,8-2,0 maka DNA dikatakan murni (kualitas DNA baik) namun apabila nilai ratio lebih kecil dari 1,80 maka DNA tersebut terkontaminasi dengan protein.

4.6.3.2 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan gel elektroforesis *agarose* 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen COI. Uji kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan mesin Bio-Rad *Electrophoresis (PowerPac Basic Power Supply)*. Cetakan *agarose* dibersihkan dan diletakkan secara *horizontal*, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 ml dan gel *agarose* 1% (0,15 g) hingga mendidih atau *agarose* larut. Menurut Fatchiyah dkk., (2008) campuran selanjutnya ditambahkan larutan EtBr sebanyak 1µl dan didinginkan (tidak sampai memadat), kemudian disiapkan sisir dan *plate* untuk membentuk sumuran. Campuran *agarose*, 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* Bio-Rad *Electrophoresis* (*PowerPac Basic Power Supply*). 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 analisis (Fatchiyah dkk, 2008).

4.6.4 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di desain menggunakan NCBI *Genbank* : HQ622784.1. Primer *forward* dan primer *reverse* didapatkan melalui *primer3plus* dengan menggunakan data HQ622784.1 *Hylobates moloch* COI (**Lampiran 3**). Sepasang sekuens primer yang didapatkan adalah primer *forward* (OJW_F) 5'-ATG TCG TAG CCC ACT TCC AC-3' (*start*: 336; *length* : 20 bp; *Tm* : 57.1°C; *GC* : 55%) dan primer *reverse* (OJW_R) 5'-TGT ATG CAT CGG GGT AGT CA-3' (*start*: 796; *length* : 20 bp; *Tm* : 55,5°C; *GC* : 50 %) dengan target produk PCR 228 bp.

4.6.5 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sampel DNA dari owa Jawa diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (OJW_F) dan *reverse* (OJW_R). Amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1 μ L DNA, 1 μ L primer *forward* 10pmol, 1 μ L primer *reverse* 10pmol, 5 μ L PCR mix dan 2 μ L ddH₂O ke dalam mikrotube 200 μ L (PCR tube). Tahapan amplifikasi dimulai dari predenaturasi 94⁰C selama empat menit, denaturasi 94⁰C selama 30 detik, kemudian annealing pada suhu 50,3⁰C selama 30 detik. Extension pada suhu 72⁰C selama 1 menit dan post extension pada 72⁰C selama 7 menit. Proses akan berulang selama 35 siklus.

4.6.6 Uji Kualitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA yaitu untuk menghitung kemurnian produk PCR gen COI dari rambut owa Jawa. Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas isolat DNA. Sebanyak 3 μ L Produk PCR tersebut dipipet ke dalam sumur gel *agarose* 2% dengan TBE 1x pada voltase 100V, selama 30 menit. Kemudian didokumentasikan hasil elektroforesis dengan kamera digital pada UV-transiluminator.

4.6.7 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen COI dilakukan satu arah yaitu dengan menggunakan primer OJW_R 10 pmol untuk melihat sekuen gen COI sepanjang 228bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *Sanger sequencing* (*dideoxy sequencing*). Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50ng/ μ 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.

4.6.8 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini kemudian dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikan kekerabatan intraspecies antara 3 sampel owa Jawa di Javan Primate Rehabilitation Centre Jawa Barat, satu sekuen gen COI owa Jawa dari *gen bank* NCBI, owa *Hoolock* dan Siamang yang juga dari *gen bank* NCBI melalui homologi gen dengan menggunakan *software* BioEdit® dan BLAST NCBI.

Tahap analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuens DNA dengan membandingkan antara sampel OJW1, OJW2, dan OJW3 dengan database NCBI *Genebank*: HQ622784.1 (owa Jawa), KY250073.1 (owa *Hoolock*) dan HQ622798.1 (Siamang). Penyejajaran sekuens menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment*. Analisis filogeni menggunakan perangkat lunak MEGA versi 7.026 dengan metode *bootstrapped Maximum Likelihood Tree* (ML) memakai 1000 kali pengulangan. Hasil analisis program MEGA tersebut akan diperoleh matriks jarak genetik persamaan basa nukleotida.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Isolasi DNA, Amplifikasi, dan Sekuensing Gen COI Owa Jawa

Analisa gen COI (*Cytochrome C Oxidase Subunit 1*) owa Jawa (*Hylobates moloch*) pada penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu isolasi, amplifikasi dan sekuensing.

5.1.1 Isolasi DNA Owa Jawa

Isolasi DNA dari sampel owa Jawa (*Hylobates moloch*) berupa rambut dilakukan dengan menggunakan *Geneaid DNA Mini Kit* (50) sesuai dengan protokol. Isolat DNA yang dihasilkan kemudian diuji secara kuantitatif menggunakan *AE-Nano200 Nucleic Acid Analyzer*[®] (*nanophotometer*) yang hasilnya dapat dilihat pada **Tabel 5.1** Selain itu isolat DNA diuji secara kualitatif menggunakan Elektroforesis *agarose* 1% yang dapat dilihat pada **Gambar 5.1**

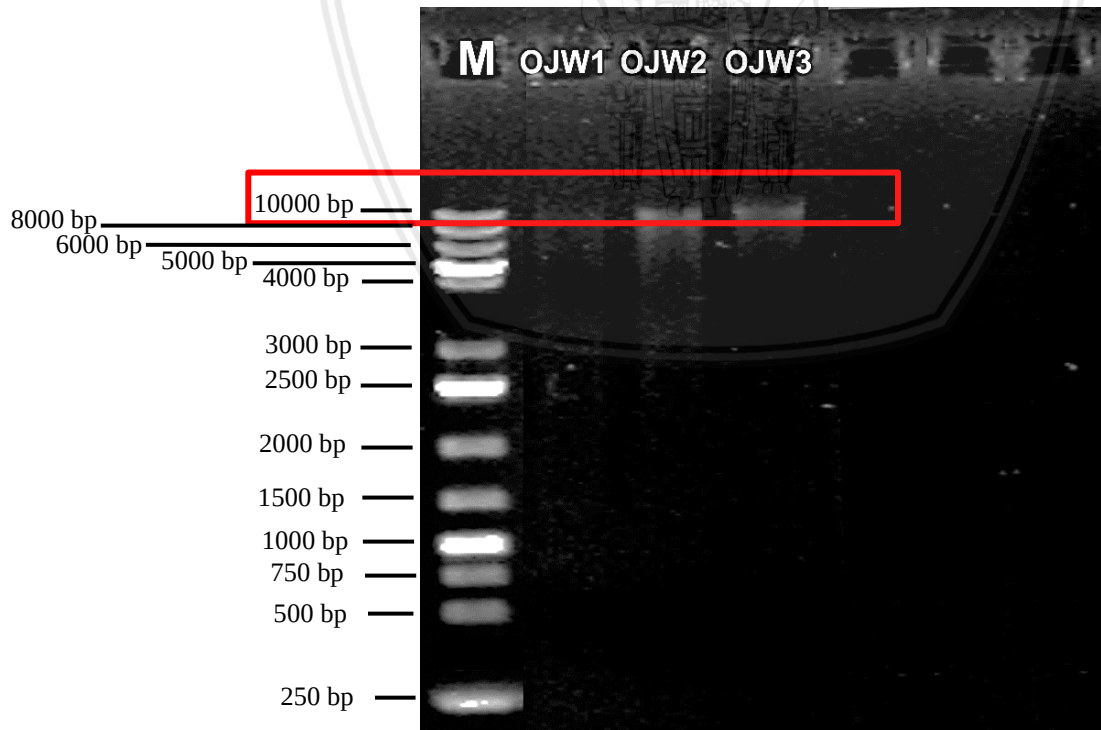
Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian Isolat DNA Owa Jawa (*Hylobates moloch*)

Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (nm) (Absorbansi 260/280)
OJW1	27,08 ng/ μ L	1,68
OJW2	25,77 ng/ μ L	1,58
OJW3	26,63 ng/ μ L	2,00

Keterangan : OJW1=Wanto, OJW2=Dwi, OJW3=Candi

Hasil isolasi DNA dikatakan baik apabila didapatkan DNA yang murni dan utuh. Kemurnian DNA diperoleh dari perbandingan absorban $A_{260/280}$. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8 – 2,0. Pengukuran konsentrasi DNA maupun penentuan kemurniannya merupakan suatu tahap yang sangat diperlukan dari serangkaian proses isolasi DNA. Konsentrasi DNA

dapat dihitung secara akurat melalui penyerapan spektrofotometrik sinar ultraviolet (Siswanto, dkk., 2016). New England Biolabs (2018) merekomendasikan bahwa konsentrasi yang digunakan pada *running* PCR adalah 1pg-10 ng/50 μ L untuk DNA target yang relatif pendek. Berdasarkan hal tersebut, isolat DNA OJW1 (27,08 ng/ μ L=13,54 ng/50 μ L), OJW2 (25,77 ng/ μ L=12,88 ng/50 μ L), dan OJW3 (26,63 ng/ μ L=13,315 ng/50 μ L) memiliki konsentrasi yang baik untuk proses PCR karena lebih dari 10 ng/50 μ L. Menurut Linacero *et al.*, (1998) dalam Tenriulo (2001), kontaminasi protein dan bahan organik lainnya ditandai dengan rendahnya nilai rasio $A_{260/280}$ (<1,8), sebaliknya kontaminasi fenol ditandai dengan tingginya nilai rasio tersebut (> 2,0). Hasil uji kuantitatif isolat DNA sampel OJW1 dan OJW2 pada tabel menunjukkan rasio absorbansi dibawah 1.8nm sehingga terindikasi adanya kontaminasi protein. Sedangkan sampel OJW3 menunjukkan rasio absorbansi DNA yang murni karena bernilai 2,0 nm.



Gambar 5.1 Isolat DNA total owa Jawa Agarose 1%

Keterangan: M= marker 1 kb, OJW1=Wanto, OJW2=Dwi, OJW3=Candi

Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA yang terang dan berada diatas marker dengan pita DNA 10.000 bp. Hal tersebut menunjukkan konsentrasi isolat yang baik serta memiliki ukuran pada kisaran 16-18 kb (DNA mitokondria) dan 20-50 kb (DNA inti) (Meganathan, *et al.*, 2011).

Pada sumur 1 (sampel OJW1) terlihat pita DNA yang terbentuk tipis dan tidak menyebar, sumur 2 (sampel OJW2) dan sumur 3 (sampel OJW3) terlihat pita DNA yang terbentuk tebal dan tidak menyebar. Tingkat ketebalan pita DNA ditentukan dari kemurnian atau proses ekstraksi yang kurang tepat pada sampel yang diamati, sehingga menyebabkan sampel tersebut tidak memiliki kualitas yang bagus (Nugroho, 2015). Ketebalan pita DNA total owa Jawa yang paling bagus terdapat pada sampel 2 dan 3.

5.1.2 Amplifikasi Gen COI Owa Jawa

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan (Rudiretna dan Darmo, 2000). Amplifikasi gen COI pada owa Jawa menggunakan primer yang didesain dari *genebank* NCBI *reference sequence* HQ622784.1 dan memiliki panjang target sekuens 228 bp (**Tabel 5.2**). Program PCR yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 5.3**.

Tabel 5.2 Urutan Oligonukleotida Primer Gen COI Owa Jawa (*Hylobates moloch*)

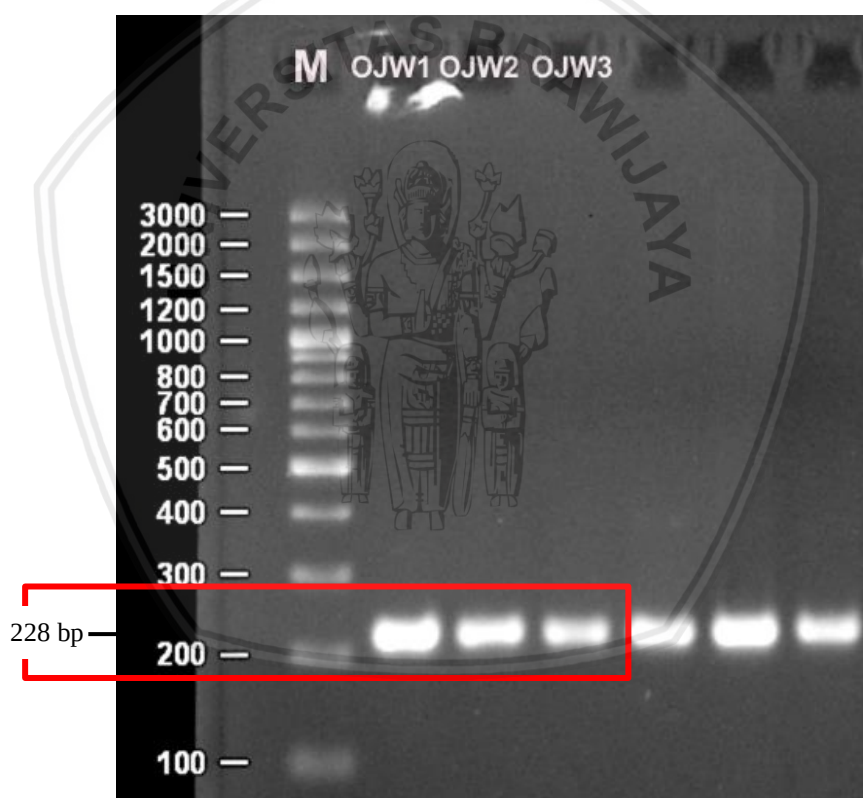
Primer	Urutan Oligo Nukleotida	Lokasi Penempelan (basa ke)
<i>Forward</i> (OJW_F)	5'-ATG TCG TAG CCC ACT TCC AC-3'	1115-1135
<i>Reverse</i> (OJW_R)	5'-TGT ATG CAT CGG GGT AGT CA-3'	1323-1343

Keterangan : Target sekuensing yaitu *reverse-forward* (1343bp-1115bp = 228 bp)

Tabel 5.3 Program PCR untuk Amplifikasi gen COI Owa Jawa (*Hylobates moloch*)

Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	3 menit	94°C
Denaturasi	30 detik	94°C
Annealing	30 detik	54,5°C
Ekstensi	1 menit	72°C
Post Ekstensi	7 menit	72°C

Proses PCR selama kurang lebih 90 menit menghasilkan produk yang selanjutnya melalui uji kualitatif elektroforesis *agarose* 2%. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.



Gambar 5.2 Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi *Agarose* 2%
Keterangan : M= marker 100 bp, OJW1=Wanto, OJW2=Dwi, OJW3=Candi.

Hasil uji kualitatif tersebut menggambarkan keberhasilan proses PCR dengan produk yang dihasilkannya yaitu sesuai dengan target *basepair*, *single band* dan tidak adanya dimer. Produk PCR OJW1, OJW2, dan OJW3 menempati sekitar 228 bp

berdasarkan marker. Hal ini menunjukkan kesesuaian produk PCR dengan target berdasarkan desain primer yaitu berukuran 228 bp dan siap untuk disekuensing.

5.1.3 Sekuensing Gen COI Owa Jawa

Semua produk PCR (OJW1, OJW2, dan OJW3) selanjutnya melalui tahap sekuensing dengan metode *Sanger sequencing (dideoxy sequencing)* menggunakan *Automatic DNA Sequencer (ABI 370A DNA sequencer)*. Pembacaan sekuens menggunakan *software BioEdit®* pada komputer sistem operasi Windows 10. Hasil sekuensing DNA berupa grafik elektroferogram dan data berupa urutan basa hasil sekuensing dalam format FASTA (**Lampiran 4**). Hasil tersebut kemudian diolah dengan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) guna mengkalkulasi similaritas sekuens dengan *database* di NCBI. Hasil BLAST kemudian menjadi patokan atas keberhasilan atau kesesuaian sekuensing (panjang sekuens yang dapat dibandingkan) (Madden, 2003). Sekuens menunjukkan kualitas baik dengan panjang basa yang dapat dibandingkan (*Query cover*) yaitu 93% (OJW1), 93% (OJW2), dan 90% (OJW3), serta memiliki presentasi identitas (*ident*) diatas 98% (**Tabel 5.4** dan **Lampiran 5**). Sesuai dengan pernyataan Wiley (2011), bahwa sekuens dengan *Query cover* dan *ident* pada kisaran 95% memiliki kualitas yang baik dan berarti nilai kemiripan yang tinggi.

Tabel 5.4 *Query coverage* dan *ident* sampel terhadap *genbank* HQ622784.1

Sampel	Panjang Basa (bp)	<i>Query coverage</i>	<i>Ident</i>
OJW1 (Wanto)	217	93%	98%
OJW2 (Dwi)	221	93%	99%
OJW3 (Candi)	219	90%	100%

5.2. Analisa Sekuen Gen COI Owa Jawa

5.2.1. Mutasi Genetik

Hasil sekuensing dari ketiga sampel owa Jawa adalah sekitar 198 bp sampai dengan 204 bp dan panjang basa sekuensing untuk analisa yaitu 163 bp setelah melalui penyejajaran. Analisa data menggunakan *software* BioEdit® (**Lampiran 6**) menunjukkan bahwa terdapat 22 situs bervariasi (mengalami substitusi basa/mutasi) untuk karakteristik genetik secara interspesies dan tidak adanya variasi berupa mutasi genetik pada karakteristik genetik intraspesies (**Tabel 5.5**).

Tabel 5.5 Karakteristik Mutasi pada Analisa Sekuens Gen COI Owa Jawa

Sampel	Jenis Mutasi	Jumlah	Total
OJW1 Wanto	Translasi	0	0
	Transversi	0	
OJW2 Dwi	Translasi	0	0
	Transversi	0	
OJW3 Candi	Translasi	0	0
	Transversi	0	
<i>Symphalangus syndactylus</i>	Translasi	10	13
	Transversi	3	
<i>Hoolock hoolock</i>	Translasi	8	9
	Transversi	1	
			22 pb

Terdapat 4 jenis mutasi pada proses duplikasi DNA, yaitu mutasi yang menyebabkan tergantinya purin (A,G) dengan purin atau pirimidin (C,T) dengan pirimidin (translasi), penggantian basa dari purin ke pirimidin atau sebaliknya (transversi), penambahan basa nukleotida (insersi), dan pengurangan basa nukleotida (delesi) (Lemey, 2009). Berdasarkan **Tabel 5.5** dapat disimpulkan bahwa terjadi substitusi basa atau mutasi yang didominasi oleh tipe Translasi. Tidak ditemukan adanya mutasi pada sampel OJW1 Wanto, OJW2 Dwi dan OJW3 Candi yang berarti ketiga sampel tersebut memiliki susunan basa yang sama dan kekerabatan yang sangat dekat. Selain itu, tipe mutasi Translasi juga mendominasi sampel pembanding yaitu *Symphalangus syndactylus* sebanyak 76% dan *Hoolock hoolock* sebanyak 88%.

Tidak terdapat tipe mutasi delesi ataupun insersi pada analisa sekuens tersebut. Hal ini sesuai dengan Habert *et al.*, (2003) bahwa gen COI memiliki kelebihan dalam analisa karakteristik genetik karena sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuen gennya serta banyak bagian yang bersifat *conserve* (lestari).

5.2.2. Gen COI dalam Analisa Kekerabatan Owa Jawa Intraspecies dan Interspecies

Analisa filogenetik berkaitan erat dengan peristiwa evolusi biologis. Evolusi adalah proses gradual suatu organisme yang memungkinkan spesies sederhana menjadi lebih kompleks. 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. Perhitungan jarak genetik menggunakan metode *Pairwise Distance* pada penelitian ini ditunjukkan pada **Tabel 5.6**. Analisis filogenetik biasanya juga direpresentasikan sebagai sistem percabangan seperti diagram pohon yang dikenal sebagai pohon filogenetik (Brinkman *and* Leipe, 2001). Pohon filogenetik dapat dibuat menggunakan *software* MEGA versi 7.026. Metode yang digunakan untuk mendesain pohon filogenetik adalah *Kimura 2-parameter* dengan repliasi *bootstrap* 1000× yang hasilnya ditunjukkan pada **Gambar 5.4**.

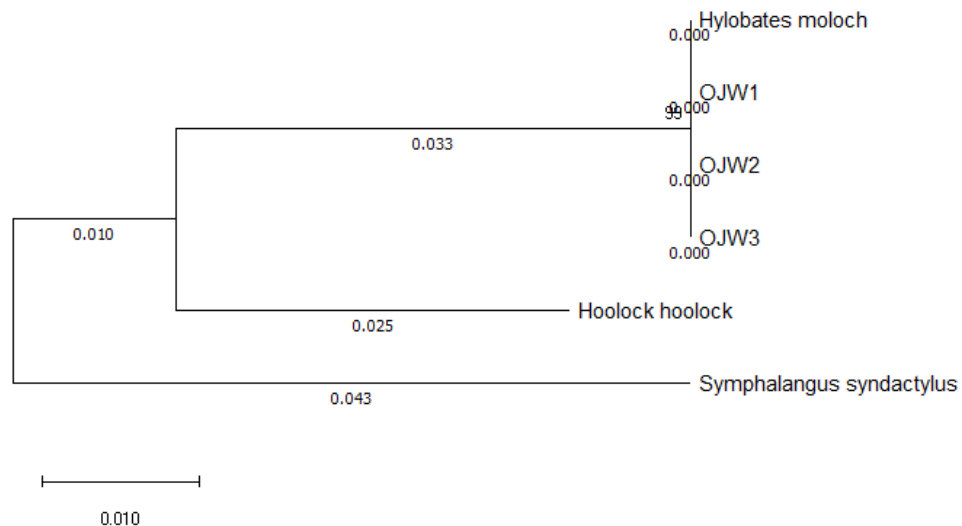
Tabel 5.6 Persentase Data Perhitungan *Pairwise Distance* (*Genetic distance*/Jarak genetik)

	1	2	3	4	5	6
1. (<i>H. moloch</i>)						
2. (OJW1 Wanto)	0.000					
3. (OJW2 Dwi)	0.000	0.000				
4. (OJW3 Candi)	0.000	0.000	0.000			
5. (<i>S. syndactylus</i>)	0.086	0.086	0.086	0.086		
6. (<i>Hoolock hoolock</i>)	0.058	0.058	0.058	0.058	0.079	

Keterangan : = Intraspecies = Interspecies

Hasil *Pairwise Distance* pada **Tabel 5.6** memperlihatkan jarak genetik secara intraspecies maupun interspecies. Semakin besar nilai jarak genetik (*p-distance*) diantara populasi atau individu maka semakin terisolasi antara satu dengan lainnya, jarak genetik menunjukkan kemungkinan adanya pengaruh isolasi geografis terhadap suatu populasi (Schmitt dan Haubrich, 2008; Laltanpuui et al., 2014). Jarak genetik yang diperlihatkan oleh sampel OJW1 Wanto, OJW2 Dwi, dan OJW3 Candi terhadap sampel referensi *H. moloch* memiliki nilai 0%. Avise (2000) dalam Habert (2003) menyebutkan bahwa jarak genetik intraspecies pada DNA mitokondria sangat jarang sekali bernilai lebih dari 2%. Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa sampel OJW1 Wanto, OJW2 Dwi, dan OJW3 Candi memiliki hubungan intraspecies terhadap sampel referensi *H. moloch* HQ622784.1. Hubungan interspecies dapat terlihat jika sampel OJW1 Wanto, OJW2 Dwi, OJW3 Candi, dan *H. moloch* HQ622784.1 dibandingkan dengan sampel referensi Siamang (*Symphalangus syndactylus*) *accession number* HQ622798.1 yang bernilai 8,6%, serta dapat pula terlihat jika dibandingkan dengan sampel referensi owa Hoolock (*Hoolock hoolock*) *accession number* KY250073.1 yaitu bernilai 5,8% sampai 7,9%.

Berdasarkan keterangan diatas jelas bahwa gen COI pada owa Jawa dapat digunakan sebagai parameter analisa kekerabatan baik intraspecies maupun interspecies. Gen COI pada hasil *Pairwise Distance* **Tabel 5.6** juga memperlihatkan bahwa owa Jawa (sampel OJW1 Wanto, OJW2 Dwi, OJW3 Candi, dan *H. moloch* HQ622784.1) lebih dekat dengan genus Hoolock (sampel referensi *Hoolock hoolock*) dengan jarak genetik 5,8%-7,9% daripada genus *Symphalangus* (sampel referensi *Symphalangus syndactylus*) dengan jarak genetik 8,6%. Jarak genetik tersebut juga digambarkan dalam pohon filogenetik pada **Gambar 5.3**.



Gambar 5.3 Pohon filogenetik owa Jawa menggunakan metode *Maximum Likelihood Tree* dengan repliasi *bootstrap* 1000×

Konstruksi pohon filogenetika adalah hal yang terpenting dan menarik dalam studi evolusi (Saitou dan Imanishi, 1989). Analisis filogenetika dari keluarga sekuen nukleotida atau asam amino adalah analisis untuk menentukan bagaimana keluarga tersebut diturunkan selama proses evolusi. Hubungan evolusi diantara sekuen digambarkan dengan menempatkan sekuen sebagai cabang luar dari sebuah pohon. Hubungan cabang pada bagian dalam pohon merefleksikan tingkat dimana sekuen yang berbeda saling berhubungan. Dua sekuen yang sangat mirip akan terletak sebagai neighboring outside dari cabang-cabang dan berhubungan dalam cabang umum (*Common branch*) (Mount, 2001).

Maximum Likelihood Tree merupakan metode yang umum digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik berbasis metode jarak (*distance method*). Kombinasi *Maximum Likelihood Tree* dengan analisis *bootstrap* dapat menjadi pilihan untuk mengevaluasi pohon filogenetik berbasis jarak. *Maximum Likelihood Tree* memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberi estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen.

Semua kemungkinan pohon yang terbentuk dipertimbangkan, sehingga metode ini cocok untuk sekuen dalam jumlah kecil. (Dharmayanti, 2011).

Efron (1979) memperkenalkan metode sampling ulang (resampling) dari data yang telah ada yang dikenal dengan analisis bootstrap untuk menguji validitas konstruksi pohon filogenetika. Analisis *bootstrap* dilakukan untuk mengetahui tingkat kepercayaan pengelompokan. Nilai *bootstrap* ditunjukkan pada angka yang terletak pada cabang-cabang pohon filogenetika. (Dharmayanti, 2011).

Pohon filogenetik pada **Gambar 5.4** menunjukkan kualitas yang baik karena memiliki nilai *bootstrap* diatas 99%. Hal ini menandakan kestabilan pohon filogeni dalam pembentukan kelompok (*clade*). Sesuai dengan Osawa *et.al.*, (2004) dalam Wirdateti (2016), bahwa nilai *bootstrap* dikatakan stabil jika nilainya berada di atas 95% dan dikatakan tidak stabil jika nilainya berada di bawah 70%.

Berdasarkan pohon filogeni tersebut diketahui bahwa ketiga sampel owa Jawa (OJW1 Wanto, OJW2 Dwi, dan OJW3 Candi) dan referensi *H. moloch* HQ622784.1 berada dalam satu *clade* (kelompok) dengan jarak genetik sama yaitu kurang dari 1%. Nilai jarak ini menunjukkan tidak adanya variasi sekuens intraspesies. Jika sampel owa Jawa (OJW1 Wanto, OJW2 Dwi, dan OJW3 Candi) dibandingkan dengan referensi *Hoolock hoolock* maka masih dapat dikatakan *ingroup* (grup yang sama) karena memiliki *common ancestor* (nenek moyang yang sama) dan memiliki jarak genetik 0,058. Tampak pula kedudukan *sistergroup* (dua *clade* yang memiliki *common ancestor* yang sama) jika sampel owa Jawa dan sampel referensi *H. moloch* HQ622784.1 dibandingkan dengan sampel referensi *Symphalangus syndactylus* dengan jarak genetik 0,86. Pohon filogeni ini sesuai dengan **Tabel 5.6** yang juga menunjukkan bahwa owa Jawa (sampel OJW1 Wanto, OJW2 Dwi, OJW3 Candi, dan *H. moloch* HQ622784.1) cenderung lebih dekat dengan owa *Hoolock* (sampel

Hoolock hoolock) dari genus *Hoolock* dan memiliki jarak genetik yang lebih jauh dengan Siamang (sampel referensi *Symphalangus syndactylus*) dari genus *Symphalangus*. Hal ini sesuai dengan *Geissmann* (2006a) yang menyatakan bahwa owa Jawa jika dilihat secara molekuler lebih dekat dengan genus *Hoolock* daripada genus *Symphalangus*.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Karakteristik genetik owa Jawa (*Hylobates moloch*) yang berada di *Javan Primate Rehabilitation Center* (JPRC) Jawa Barat berhasil dideskripsikan berdasarkan sekuen Gen COI (*Cytochrome C Oxidase subunit 1*) pada DNA Mitokondria owa Jawa dengan kode akses (HQ622784.1). Karakteristik berupa variasi dapat dilihat dengan adanya mutasi berupa translasi dan transversi.
2. Berdasarkan jarak genetik dan pohon filogeni, jika dilihat secara molekuler kekerabatan intraspecies antara sampel OJW1 Wanto, OJW2 Dwi, OJW3 Candi, dan *H. moloch* HQ622784.1 berkerabat sangat dekat dan merupakan spesies yang sama. Kekerabatan interspecies jika dilihat secara molekuler owa Jawa (sampel OJW1 Wanto, OJW2 Dwi, OJW3 Candi, dan *H. moloch* HQ622784.1) lebih dekat dengan genus *Hoolock* (sampel referensi *Hoolock hoolock* KY250073.1) dengan jarak genetik 5,8%-7,9% daripada genus *Sympalangus* (sampel referensi *Sympalangus syndactylus* HQ622798.1) dengan jarak genetik 8,6%.

6.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai gen COI pada owa Jawa (*Hylobates moloch*) mengenai standar keragaman genetik (*genetic diversity*) maupun jarak genetik (*genetic distance*) mengingat masih minimnya informasi mengenai hal tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Andayani, N., W. Brockelman, T. Geissmann, V. Nijman & J. Supriatna. 2008. *Hylobates moloch*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T10550A3199941. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T10550A3199941.en>. Downloaded on 9 January 2019.
- Brockelman, W. & T. Geissmann. 2008. *Hylobates lar*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T10548A3199623. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T10548A3199623.en>. Downloaded on 9 January 2019.
- Densmore, Llewellyn III and P. Scott White. 1991. *The systematics and Evolution of the Crocodilia as Suggested by Restriction Endonuclease Analysis of Mitochondrial and Nuclear Ribosomal DNA*. Copeia. Pp. 602-615.
- Dharmayanti, N. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. WARTAZOA 21 (1): 1-10.
- DiMauro, Salvatore., Michio Hirano., Eric A Scon. 2006. *Mitochondrial medicine*. Informa Healthcare, an imprint of Informa UK.
- Efron, B. 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. Ann. Statist. 7(1): 1 – 26.
- Fatchiyah. 2008. Buku Praktis: *Mengenai Polymerase Chain Reaction Dasar Teknik Amplifikasi DNA & Aplikasinya*. UB. Malang
- Garibyan, Lilit., dan Nadhi Avashia. 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 133.
- Geissmann T. 2006a. Gibbons Systematics and Species Identification. Gibbon Research Lab. <http://www.warhai.org/projects/grpspecies.htm> [14 Maret 2019].
- Geissmann, T. & V. Nijman. 2008a. *Hylobates agilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T10543A3198943. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T10543A3198943.en>. Downloaded on 5 January 2019.
- Geissmann, T., M.E. Grindley, Ngwe L., Saw S.A., Thet N.A., Saw B.H., & F. Momberg. 2013. *The Conservation Status of Hoolock Gibbons in Myanmar*. Gibbon Conservation Alliance, Zurich, Switzerland.

- Habert, Paul D. N., Sujeevan Ratnasingham., and Jeremy R. de Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. The Royal Society. Vol. 270.
- Hamdi, Dinul. 2018. *Analisa Kekerabatan Buaya Senyulong (Tomistoma schlegelii) Berdasarkan Gen COI Dengan Menggunakan Metode Polymerase Chain Reaction*. UB. Malang.
- Handayani. 2008. *Analisis DNA Mitokondria Badak Sumatera Dalam Konservasi Genetik* [Skripsi]. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Handoyo, D dan Ari Rudiretna. 2000. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Unitas. Vol.9, No 1.
- Hebert, PDN., S. Ratnasingham & JR. de Waard. 2003. *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species*, Proceedings of the Royal Society B. 270(1): S96–S99.
- Herlina. 2013. *Karakteristik gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) pada kerang bulu (Anadara antiquilata Linn.) asal Perairan Panimbangan dan Bojonegara, Provinsi Banten (Skripsi)*. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. IPB.
- Lemey, Phillipe., Marco Salemi., and Anne-Mieke Vandemme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press., United Kingdom.
- Marshall, J. & J. Sugardjito. 1986. *Gibbon Systematics*. In: Swindler, D.A. & J. Erwin (eds.). *Comparative Primate Biology*. Vol. 1: Systematics, Evolution, Anatomy, Alan R. Liss, New York. pp.137–185.
- Nijman V. 2001. *Forest and Primates: Conservation and Ecology Of The Endemic Primates Of Java and Borneo*. Kalimantan, Tropenbos, Series 5.
- Obenrader, Sarah. 2003. *The Sanger Method*. Davidson College. North Carolina.
- IUCN. 2016. *Hylobates moloch*.. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Kementrian Kehutanan. 2013. *Strategi dan Rencana Aksi Konservasi Owa Jawa (Hylobates moloch) 2013-2022*. Jakarta.
- Leighton, D. 1987. *Gibbons: Territoyiality and monogamy*. Primate Societies. Chicago: University of Chicago Press.
- Luo et al. 2011. *Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals*. BMC Genomics 12: 84-96.

- Madden, Tom. 2003. *The BLAST Sequence Analysis Tool : The NCBI handbook*. The National Laboratory Medicine. USA.
- Meganathan, P.R., Bhawana Dubey., Mark A. Batzer., David A. Ray., Ikramul Haque. 2011. Complete Mitochondrial Genome Sequence of Three *Crocodylus* species and Their Comparison within the Order Crocodylia. *Gene*. 478:35-43.
- Mount, D.W. 2001. Phylogenetic prediction. In: Bioinformatic, Sequence and Genome Analysis. Cold Spring Harbor laboratory. New York Press pp. 237 – 280.
- Nanodrop Technologies, Inc. 2007. *260/280 and 260/230 Ratios Nanodrop ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. Wilmington (US): Nanodrop Technologies, Inc
- Napier, R.M. & P.H. Napier. 1967. *A Hand Book of Living Primates*. Academic Press, London.
- New England Biolabs. 2018. *PCR Troubleshooting Guide*. [https://www .neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide](https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide). [14 Maret 2019]
- Nijman, V. 2001. Effect of Behavioural Change due to Habitat Disturbance on Density Estimation in Rain Forest Vertebrate, as Illustrated by Gibbons (Hylobatidae). Pp 217-225 in Hillegers P. J. M. & de long H. H (eds) *The Balance Between Biodiversity Conservation and Sustainable use of Tropical Rain Forest*. Tropenbos, Wageningen. Netherland
- Madden, Tom. 2003. *The BLAST Sequence Analysis Tool : The NCBI handbook*. The National Laboratory Medicine. USA.
- Nijman, V. 2004. *Conservation of the Javan Gibbon Hylobates moloch: Population Estimates, Local Extinctions, and Conservation Priorities*. The Raffles Bulletin of Zoology, 52(1): 271-280
- Nugroho, Fitra Arya. 2015. Identifikasi Pola Haplotipe DNA Mitokondria Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) Segara Anakan Kabupaten Cilacap Jawa Tengah Menggunakan Enzim Retriksi HindIII. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Palumbi, SR. 1996. *Nucleic acids II: the polymerase chain reaction*. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) *Molecular systematics*. Sinauer, Sunderland, MA, p 205–248 Q

- Preuschoft H. 1998. *Grzimek's Encyclopedia Mammals Vol.2* New York: Mc. Graw-Hill.
- Rudiretna, Ari dan Darmo Handoyo. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). Universitas Surabaya.
- Saitou, N. and T. Imanishi. 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum-Parsimony, MaximumLikelihood, Minimum Evolution and Neighbor-joining Methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* 6(5): 514-525.
- Sasmito, Dinda Eling K., Rahadian Kurniawan dan Izzati Muhimmah. 2014. Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA : Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)* V 2014.
- Schmitt. T. dan K. Haubrich. 2008. The Genetic Structure of the Mountain Forest Butterfly *Erebia euryale* Unravels the Late Pleistocene and Postglacial History of The Mountain Coniferous Forest Biome in Europe. *Molecular ecology* 17(9): 2194-2207 (doi: 10.1111/j.1365-294x.2007.03687.x)
- Siswanto, Jo Edy., Tiara Berlian., Evira Putricahya., Lidya V. Panggalo., dan Luluk Yuniani. 2016. Isolasi DNA pada Sampel Darah Tepi dan Swab *Buccal* Pada Bayi Penderita ROP: Perbandingan Hasil Uji Konsentrasi dan Indeks Kemurnian. *Sari Pediatri*. 18 :4.
- Solihin, Dedy Duryadi. 1994. *Peran DNA Mitokondria (mtDNA) Dalam Studi Keragaman Genetik dan Biologi Populasi Pada Hewan*. Institut Pertanian Bogor.
- Sulistyaningsih, E. 2007. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi*. *J. Biomedis*, Vol 1.
- Supriatna, J. & E.H. Wahyono. 2000. *Panduan Lapangan Primata Indonesia*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta. Halaman 254–260.
- Tenriulo, A., E. Suryati., A. Parenrengi., Rosmiat. 2001. Ekstraksi DNA Rumput Laut *Kappahycus alvarezii* dengan Metode Fenol Kloroform. Makassar : Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Vol. 2 No.2 ISSN 1211-2132.
- 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. Lieberman. 2011. *Phylogenetics: Theory and Practise of Pylogenetic Systematics: Second Edition*. Wiley-Blackwell., USA.

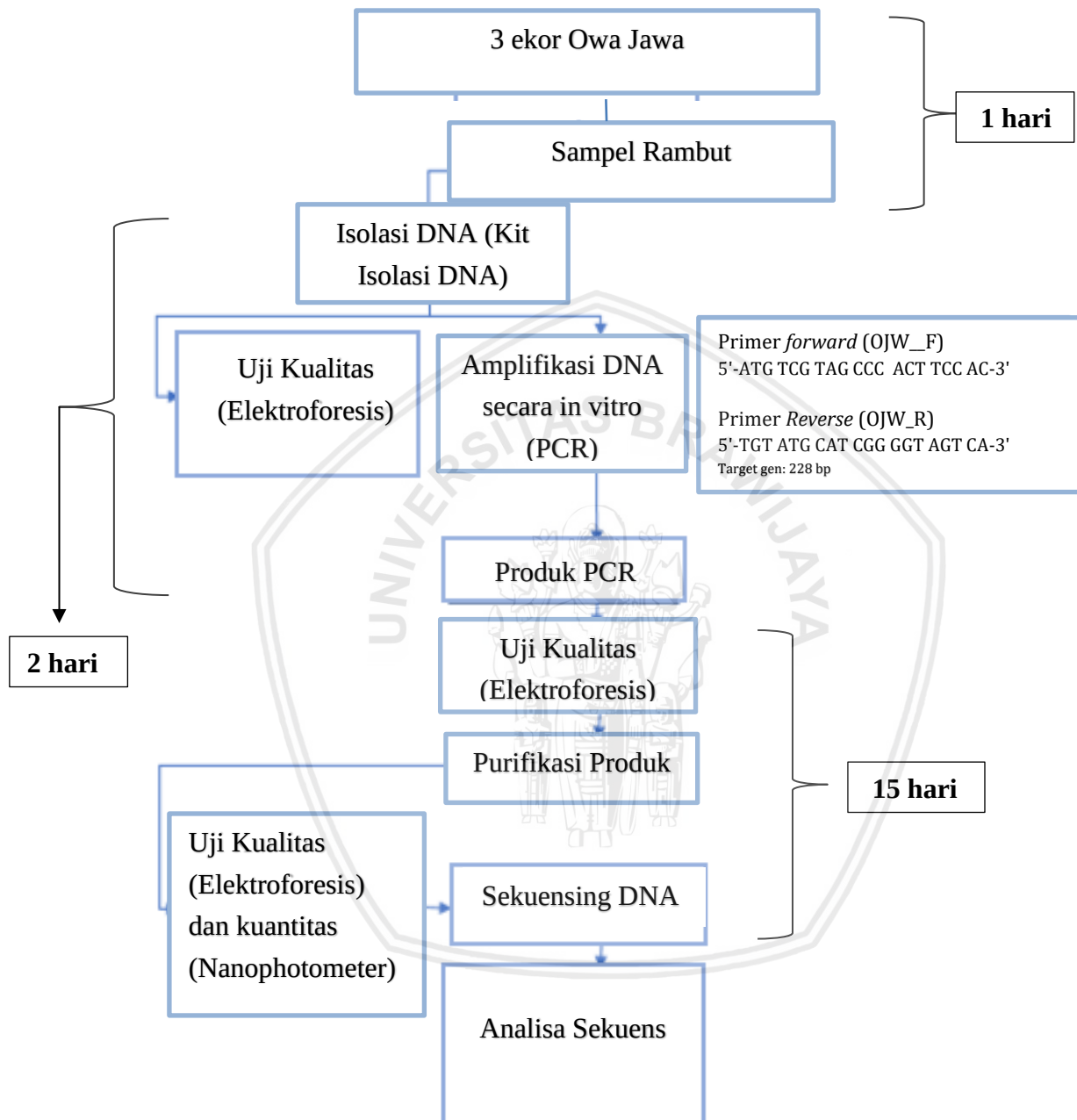
- Wirdateti., Eka indriana., dan Handayani. 2016. Analisis Sekuen DNA Mitokondria Cytochrome Oxidase I (COI) mtDNA Pada Kukang Indonesia (*Nycticebus spp*) sebagai Penanda Guna Pengembangan Identifikasi Spesies. *Jurnal Biologi Indonesia*. 12 (1) : 119-128.
- Yusuf, Zuhriana. 2010. Polymerase Chain Reaction. *Saintek Vol 5 No.6*. Gorontalo. Universitas Negeri Gorontalo.
- Zein, M. Syamsul Arifin, dan Dewi Malia Prawiradilaga. 2013. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Kencana Prenamedia Group., Jakarta. 15-16.



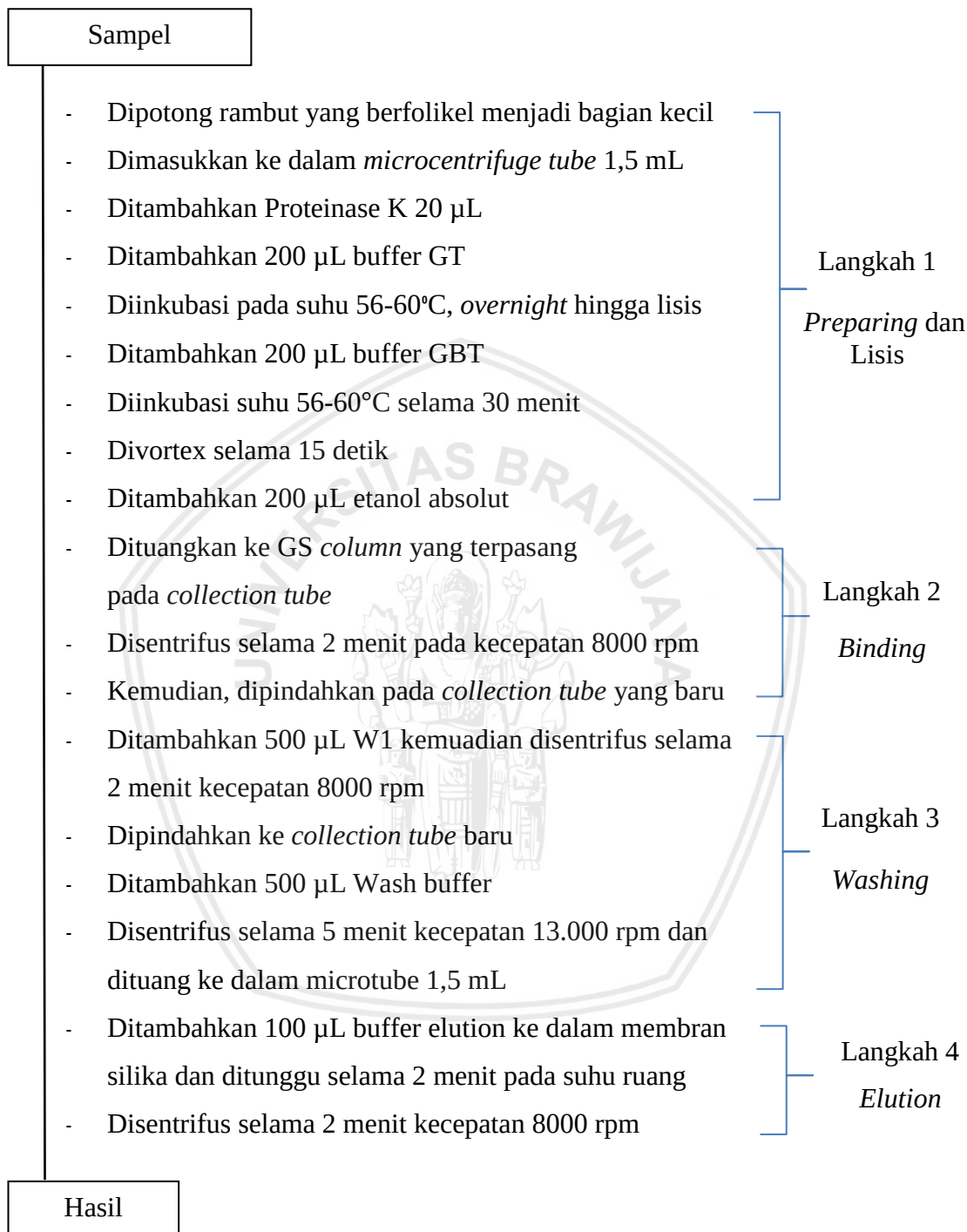


LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan Penelitian

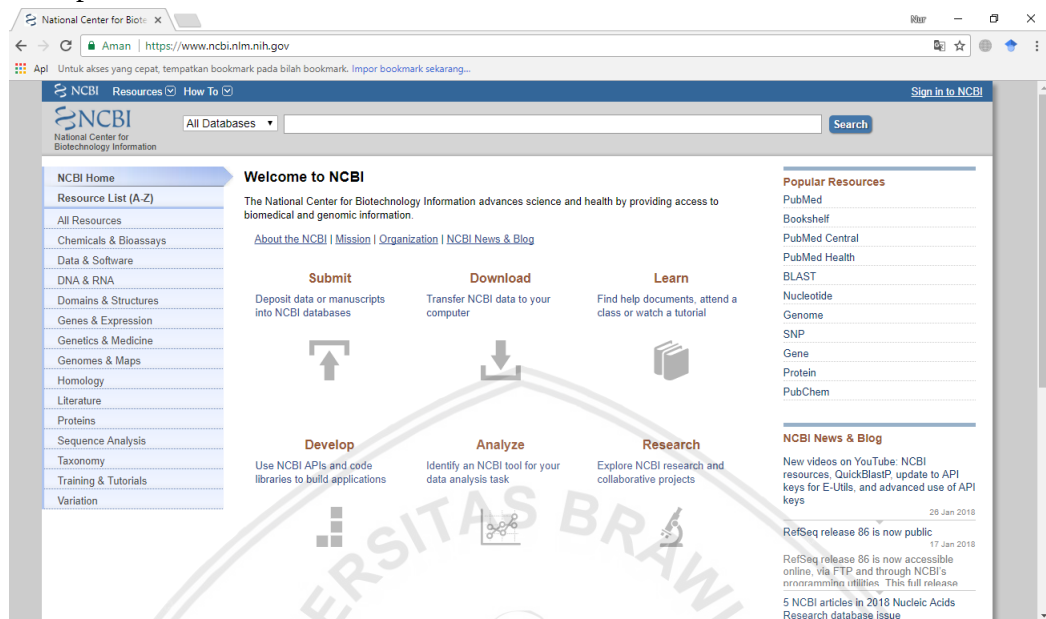


Lampiran 2. Protokol Isolasi DNA dengan Geneaid Kit

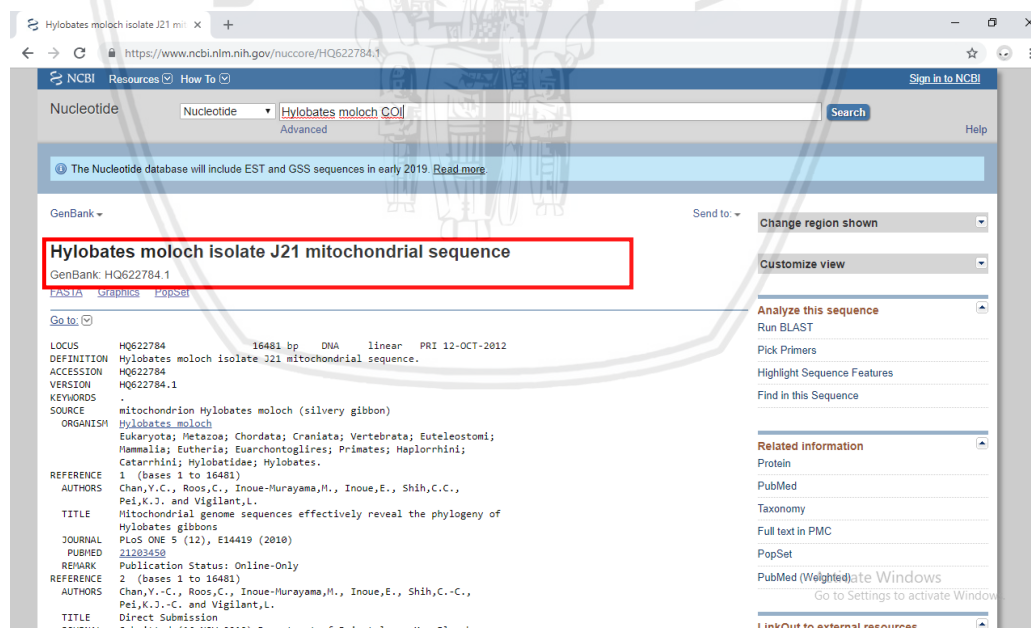


Lampiran 3. Desain Primer

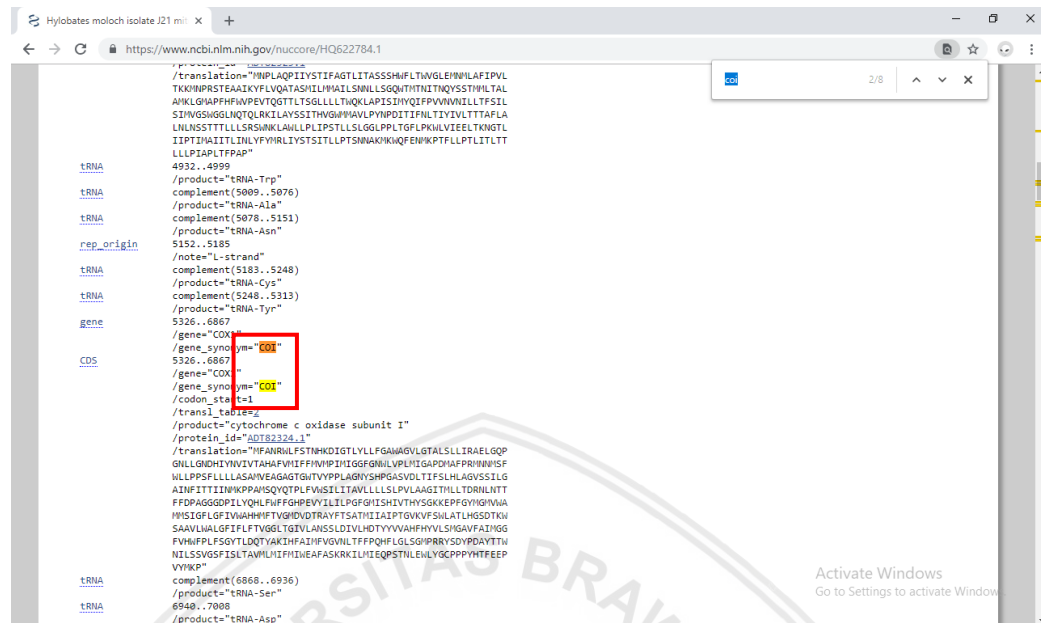
- a. Dibuka Halaman NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sehingga muncul tampilan seperti berikut :



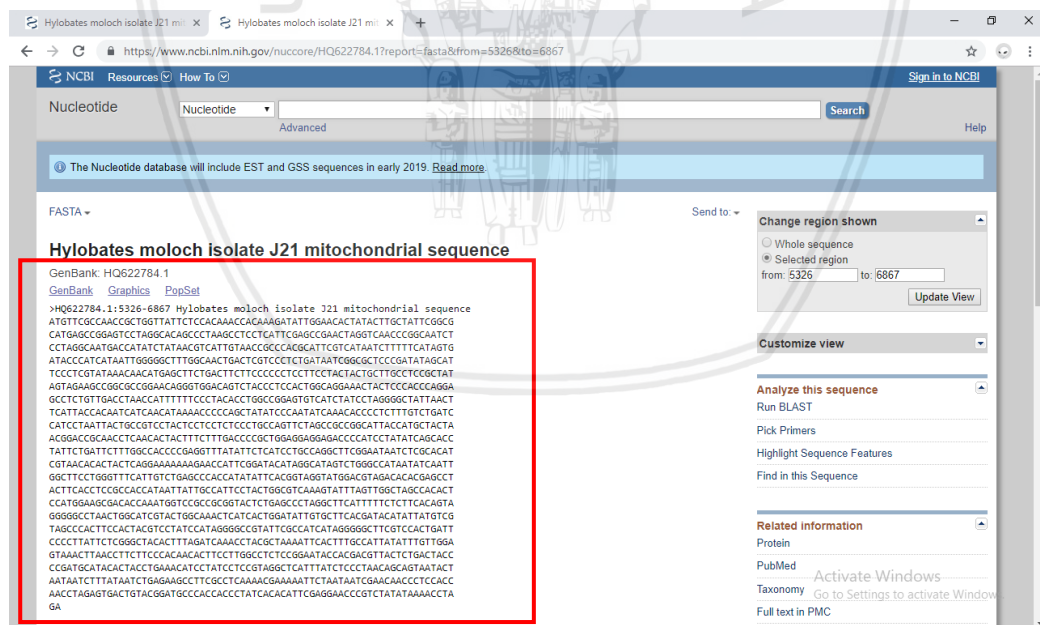
- b. Dipilih 'Nucleotide' kemudian diisi kata kunci pada pencarian (*Hylobates moloch COI*). Klik search hingga muncul tampilan sebagai berikut



c. Lakukan pencarian (ctrl+F) “COI”



d. Klik kanan link COI yang tersedia lalu pilih “open link in new tab” lalu klik FASTA, maka urutan basa gen COI dapat di copy



e. Dibuka website Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager Help
About Source Code

Task: Detection Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified. Pick Primers Reset Form

Main General Settings Advanced Settings Internal Oligo Penalty Weights Sequence Quality

Sequence Id:

Paste source sequence below Or upload sequence file: Tidak ada file yang dipilih

Mark selected region: Clear

Excluded Regions: < >

Targets: []

Included Region: { }

☒ Pick left primer or use left primer below. ☐ Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below. ☒ Pick right primer or use right primer below (5'→3' on opposite strand).

- f. Sekuens DNA dari Fasta NCBI yang telah *copy* selanjutnya dipaste di lokasi *paste souce sequence below* seperti tampilan berikut dan diklik ikon *Pick Primer*. Sebelum langkah diatas, tersedia pula kolom *General setting* untuk mengatur pencarian primer berdasarkan panjang primer, Tm, %GC, dan lain sebagainya sesuai kebutuhan.

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager Help
About Source Code

Task: Detection Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified. Pick Primers Reset Form

Main General Settings Advanced Settings Internal Oligo Penalty Weights Sequence Quality

Sequence Id:

Paste source sequence below Or upload sequence file: Tidak ada file yang dipilih

Mark selected region: Clear

Excluded Regions: < >

Targets: []

Included Region: { }

☒ Pick left primer or use left primer below. ☐ Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below. ☒ Pick right primer or use right primer below (5'→3' on opposite strand).

g. Klik pick primer lalu muncul sebagai berikut

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#) [Help](#)
[About](#) [Source Code](#)

< Back

Pair 1:

☒ Left Primer 1:

Sequence:

Start: 1115 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 55.0 % ANY: 3.0 SELF: 2.0

☒ Right Primer 1:

Sequence:

Start: 1342 Length: 20 bp Tm: 59.9 °C GC: 50.0 % ANY: 6.0 SELF: 1.0

Product Size: 228 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 2.0

[Send to Primer3Manager](#) [Reset Form](#)

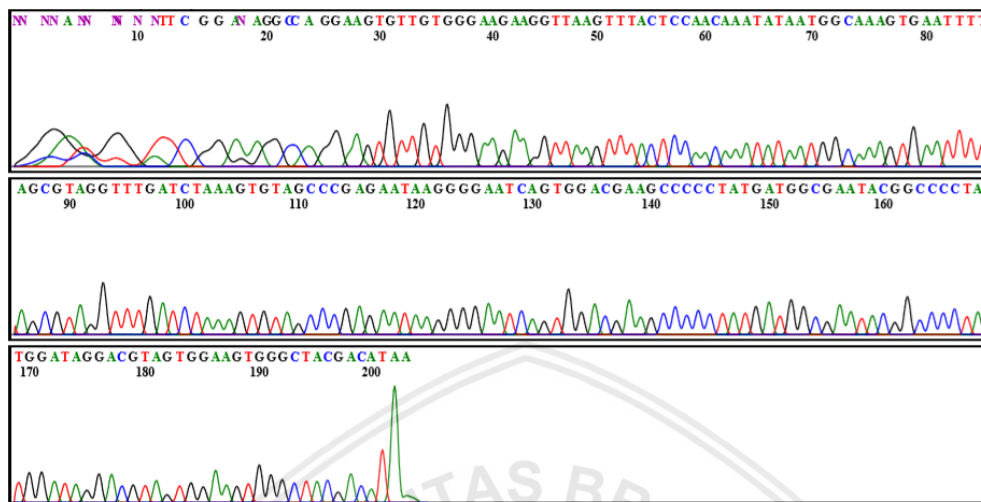
1	ATGTTGCGCA	ACCGCTGGTT	ATTCTCCACA	AACCAACAAG	ATATTGGAAC
51	ACTATACTTG	CTATTGCGCG	CATGAGCCGG	AGTCCTAGGC	ACAGCCCTAA
101	GCTCTCTCAT	TGAGGCGGAA	CTAGGTCAAC	CGGGCAATCT	CCTAGGCAAT
151	GACCATATCT	ATAACCTCAT	TGTAACCGCC	CACGCAITCG	TCAATATCTT
201	TTTCATAGTG	ATACCCATCA	TAATTGGGGG	CTTTGGCAAC	TGACTCGTCC
251	CTCTGATAAT	CGGCGCTCCC	GATATAGCAT	TCCCTCGTAT	AACCAACATG
301	AGCTTCTGAC	TTCTTCCCCC	CTCCTTCCTA	CTACTGCTTG	CCTCCGCTAT
351	AGTAGAAGCC	GGGCGCGGAA	CAGGGTGGAC	AGTCTACCCCT	CCACTGGCAG
401	GAACTACTCT	CCACCCAGGA	GCTCTGTTG	ACCTAACCAT	TTTTTCCCTA
451	CACCTGGCCG	GAGTGTCTAT	TATCCTAGGG	GCTATTAACT	TCATTACCAC
501	ATTCATCAAC	ATAAAACCCC	CAGGTATATC	CCATATCAAA	ACACCCCTCT
551	TTGTCTGATC	CATCCTAATT	ACGCGCGTCC	TACTCTCTCT	CTCCCTGCCA
601	GTTCTAGCCG	CCGGCATTAC	CATGCTACTA	ACGGACCCGCA	ACCTCAACAC
651	TACTTTCTTT	GACCCGCTG	GAGGAGGAGA	CCCCATCCTA	TATCAGCACG
701	TATTCTGATT	CTTTGGCCAC	CCGAGGTTT	ATATTTCAT	CCTGCCAGGC

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

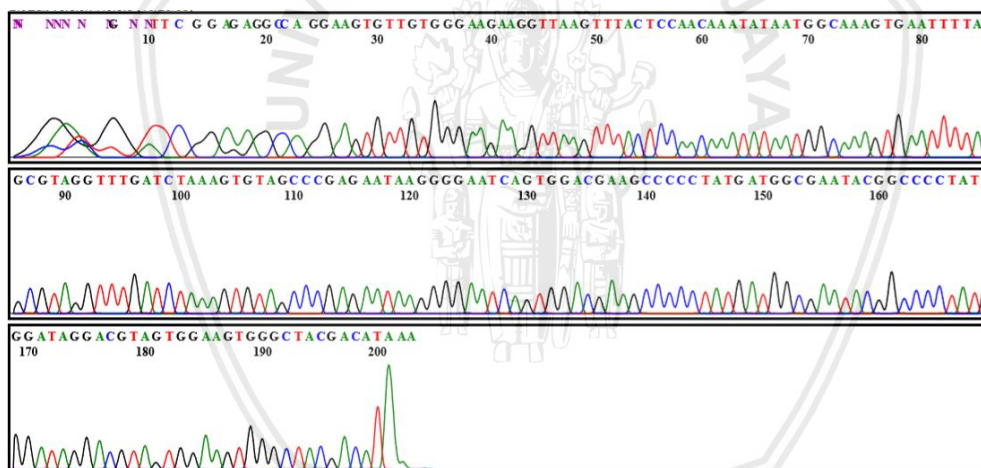
Desain primer dilakukan sendiri hingga ditemukan primer *forward* dan *reverse*.

Lampiran 4. Grafik Elektrogram Sekuen Sampel owa Jawa

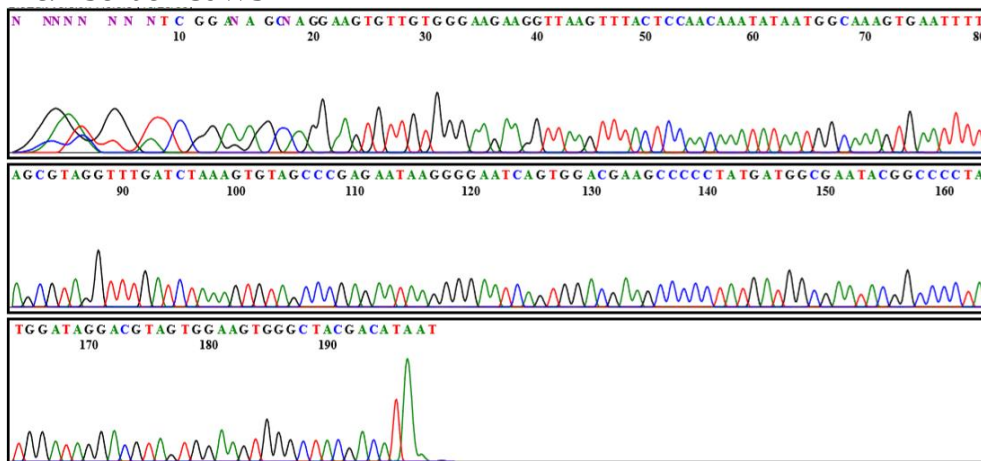
a. Sekuen OJW1



b. Sekuen OJW2



c. Sekuen OJW3



Lampiran 5. Hasil BLAST Sekuens OJW1, OJW2, dan OJW3

a. BLAST OJW1

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
Hylobates moloch isolate J21 mitochondrial sequence	342	342	93%	2e-90	98.95%	HQ622784.1	
Hylobates moloch isolate J13 mitochondrial sequence	342	342	93%	2e-90	98.95%	HQ622783.1	
Hylobates moloch isolate J12 mitochondrial sequence	342	342	93%	2e-90	98.95%	HQ622782.1	

b. BLAST OJW2

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
Hylobates moloch isolate J21 mitochondrial sequence	346	346	93%	2e-91	99.48%	HQ622784.1	
Hylobates moloch isolate J13 mitochondrial sequence	346	346	93%	2e-91	99.48%	HQ622783.1	
Hylobates moloch isolate J12 mitochondrial sequence	346	346	93%	2e-91	99.48%	HQ622782.1	
Hylobates agilis isolate P02 mitochondrial sequence	329	329	93%	2e-86	97.91%	HQ622762.1	

c. BLAST OJW3

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
Hylobates moloch isolate J21 mitochondrial sequence	335	335	90%	4e-88	100.00%	HQ622784.1	
Hylobates moloch isolate J13 mitochondrial sequence	335	335	90%	4e-88	100.00%	HQ622783.1	
Hylobates moloch isolate J12 mitochondrial sequence	335	335	90%	4e-88	100.00%	HQ622782.1	
Hylobates agilis isolate P02 mitochondrial sequence	318	318	90%	4e-83	98.34%	HQ622762.1	

Lampiran 6. Sequence Alignment

Hylobates moloch	TATGTCGTAGCCCACTTCCACTACGTCCTATCCATAGGGGCCGTATTCGCCATCATAGGGGGCTT
OJW1	
OJW2	
OJW3	
Hoolock hoolock	T.....T.....A.....T.....
Symphalangus syndactylus	T.....A.....T.....A.....

Hylobates moloch	TCGTCCACTGATTCCCTTATTCCTCGGGCTACACTTTAGATCAAACCTACGCTAAATTCACCTTGCCATT
OJW1	
OJW2	
OJW3	
Hoolock hoolock	C.....G.....CC.....A.....G.....
Symphalangus syndactylus	C.....C.....T.....C.....C.....

Hylobates moloch	TATATTGTTGGAGTAACTTAACCTTCT
OJW1	
OJW2	
OJW3	
Hoolock hoolock	A.....T.....
Symphalangus syndactylus	A.....

Lampiran 7. Laik Etik Penelitian



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 1082-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : KARAKTERISTIK GEN CYTOCHROME C OXIDASE
SUBUNIT I UNTUK ANALISA KEKERABATAN OWA
JAWA (*Hylabates moloch*) DENGAN MENGGUNAKAN
METODE PCR

PENELITI : ANNUR RISKY AULIA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 17 Februari 2019

Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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