

**ANALISA KEKERABATAN ANTAR KASUARI
GELAMBIR GANDA (*Casuarius casuarius*) TERHADAP
KASUARI Kerdil (*Casuarius bennetti*) DIECO
GREEN PARK BERDASARKAN SEKUEN GEN
CYT-B DENGAN METODE *POLYMERASE
CHAIN REACTION***

SKRIPSI

Oleh:

SALSABILA WIDDHIE APRITAHANI

155130107111043



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

**ANALISA KEKERABATAN ANTAR KASUARI
GELAMBIR GANDA (*Casuarius casuarius*) TERHADAP
KASUARI KERDIL (*Casuarius bennetti*) DI ECO
GREEN PARK BERDASARKAN SEKUEN GEN
CYT-B DENGAN METODE *POLYMERASE
CHAIN REACTION***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

SALSABILA WIDDHIE APRITAHANI

155130107111043



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

2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ANALISA KEKERABATAN ANTAR KASUARI GELAMBIR GANDA
(*Casuarius casuarius*) TERHADAP KASUARI Kerdil (*Casuarius
bennetti*) DIECO GREENPARK BERDASARKAN SEKUEN GEN
CYT-B DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION***

Oleh:

SALSABILA WIDDHIE A.

155130107111043

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 25 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 198105042005011001

drh. Yudit Oktanella. M.Si
NIP. 2014058810222001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 196312161988031002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Salsabila Widdhie A.
NIM : 155130107111043
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul:

**Analisa Kekerbatan Antar Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius Casuarius*)
Terhadap Kasuari Kerdil (*Casuarius Bennetti*) Di Eco Green Park Berdasarkan
Sekuen Gen *Cyt-B* Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction***

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari proposal 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 proposal 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, 6 Agustus 2019
Yang menyatakan,

**(Salsabila Widdhie A.)
NIM. 155130107111043**

**Analisa Kekerbatan Antar Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius Casuarius*)
Terhadap Kasuari Kerdil (*Casuarius Bennetti*) Di Eco Green Park
Berdasarkan Sekuen Gen *Cyt-B* Dengan Metode
*Polymerase Chain Reaction***

ABSTRAK

Kasuari Gelambir Ganda adalah salah satu satwa endemik Indonesia yang berada di Papua. Kasuari Gelambir Ganda memiliki status *vulnerable*, sehingga diperlukanlah tindakan breeding dan menjaga kemurnian genetik. Penelitian tentang keragaman genetik dilakukan dengan menggunakan *marker* dari DNA mitokondria (mtDNA). Gen *cytochrome b* baik digunakan untuk determinasi kekerabatan filogenetik pada spesies dikarenakan dari variabilitas sekuennya dan sekuennya terjaga dengan baik dimasing-masing spesies. Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui tingkat kekerabatan antar individu Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius casuarius*) dan dibandingkan dengan Kasuari Kerdil (*Casuarius bennetti*) dari data NCBI menggunakan sekuen gen *cytochrome b*. DNA didapatkan dari empat sampel bulu Kasuari Gelambir Ganda, 2 Kasuari jantan dan 2 Kasuari betina yang berasal dari Eco Green Park, Batu. Sampel bulu diisolasi menggunakan *QIAgen[®] DNA Mini Kit*. Primer yang digunakan dalam metode PCR adalah primer *forward* (CYTB_F) 5'-GCTGACACCTCACTAGCCTT-3' dan primer *reverse* (CYTB_R) 5'-CGTGTGAGTGTTGGGTTGTC -3'. Hasil sekuensing dianalisa menggunakan program *Bioedit* dan NCBI BLAST dengan *accession number* NC_002778.2 untuk Kasuari gelambir ganda dan U76051.1 untuk Kasuari kerdil. Hasil penelitian jarak genetik antara NC_002778.2 dengan keempat sampel dan antar individu sampel kasuari gelambir ganda berada pada rentang 0,003-0,038. Kesimpulan penelitian ini, jarak genetik intraspecies keempat Kasuari gelambir ganda di Eco Green Park Batu berada dibawah 2%. Berdasarkan jarak genetik interspecies dan posisi pohon filogenetik, Kasuari gelambir ganda Eco Green Park berbeda kekerabatan dengan Kasuari kerdil.

Kata kunci : Kasuari Gelambir Ganda, mtDNA, cyt-b, PCR

repository.ub.ac.id

Genetic Relationship Between Southern Casswoary (*Casuarius casuarius*) with Dwarf Cassowary (*Casuarius bennetti*) on Eco Green Park Based on CYT-B Gen Sequence With Polymerase Chain Reaction

ABSTRACT

Southern Cassowary is one of Indonesia's endemic animals in Papua. Southern Cassowary has a vulnerable status, so breeding and genetic purity are needed. Research on genetic diversity is carried out using markers from mitochondrial DNA (mtDNA). The *cytochrome b* gene is well used for the determination of phylogenetic relationships in species because of the variability of its sequences and its sequences are well preserved in each species. The purpose of this study was to determine the level of kinship between individuals of Southern Cassowary (*Casuarius casuarius*) and compared to dwarf Cassowary (*Casuarius bennetti*) from NCBI data using sequences of the *cytochrome b*. DNA was obtained from four samples of Southern Cassowary hair, 2 male Cassowaries and 2 female Cassowaries originating from Eco Green Park, Batu. Fur samples were isolated using *QIAgen*® DNA Mini Kit. The primers used in the PCR method are forward primer (CYTB_F) 5' - GCTGACACCTCACTAGCCTT-3' and reverse primer (CYTB_R) 5' - CGTGTGAGTGTTGGGTTGTC -3'. Sequencing results were analyzed using the Bioedit program and NCBI BLAST with accession number NC_002778.2 for Southern Cassowary and U76051.1 for dwarf cassowaries. The results of the genetic distance study between NC_002778.2 with the four samples and between individuals with Southern Cassowary samples were in the range 0.003-0.038. Conclusion of this study, the genetic distance of the fourth intraspecies of Southern Cassowary in the Eco Green Park Batu is below 2%. Based on interspecies genetic distance and phylogenetic tree position, Eco Green Park Southern cassowary is different from relation with dwarf cassowary.

Keywords: Southern Cassowary, mtDNA, cyt-b, PCR

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas perkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Analisa Kekerabatan Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius Casuarius*) Dengan Kasuari Kerdil (*Casuarius Bennetti*) Di Eco Green Park Berdasarkan Sekuen Gen *Cyt-B* Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.**

Atas terselesainya skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Edwin widodo, S.Si., M.Sc.,Ph.D dan drh. Yudit Oktanella. M.Si 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. Tiara Widyaputri, M.Si sebagai dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran selama pelaksanaan ujian skripsi.
3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Drh. Nani Yuliati sebagai dokter hewan Eco Green Park atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada penulis.
5. Drh. Aulia Firmawati sebagai dosen Pembina akademik atas bimbingannya selama berada di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

6. Keluarga penulis, Ayah Edy, Ibu Widya, serta adik kandung Muhammad Widdhie, atas segala pengorbanan, doa, materi, dan kasih sayang yang tak terhingga kepada penulis.
7. Keluarga besar Utomo yang telah memberikan dukungan selama ini.
8. Sahabat tersayang yang selalu memberikan semangat dan doa Annissa, Latifa, Rara, Adi, dan Sofines
9. Teman sejawat yaitu Mentari Putri Nastiti, Yuliasuti Khairunisa, Amelia Diyan Safitri, Anastasha Reza, dan Hana Mitsuki Putri yang telah memberi masukan, motivasi, dan semangat selama proses penulisan skripsi kepada penulis, kakak tingkat Seruni Ummi Aziizalita, Rifqi Rahman, Dinul Hamdi, Andi Citra yang telah membimbing dan memberi motivasi serta anggota kelas Decode 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.

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kasuari Gelambir Ganda (<i>Casuaris casuaris</i>)	6
2.2 Kasuari Kerdil (<i>Casuaris bennetti</i>)	8
2.3 DNA Mitokondria (mtDNA)	9
2.4 Gen <i>Cytochrome b</i>	11
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i>	14
2.6 Sekuensing DNA	15
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA	18
3.1 Kerangka Konseptual	18
3.2 Hipotesa Penelitian	21
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	22
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	22
4.2 Pemilihan Sampel Kasuari Gelambir Ganda	22

4.3	Alat dan Bahan	23
4.4	Tahapan Penelitian.....	23
4.5	Rancangan Penelitian.....	25
4.6	Prosedur Kerja	25
4.6.1	Pengambilan Sampel Bulu Kasuari Gelambir Ganda.....	25
4.6.2	Isolasi DNA	26
4.6.3	Uji Kuantitas dan Kualitas.....	26
4.6.3.1	Uji Kuantitas DNA	26
4.6.3.2	Uji Kualitas DNA	26
4.6.4	Desain Primer	27
4.6.5	Proses PCR	29
4.6.6	Uji Kualitas Produk PCR.....	29
4.6.7	Sekuensing DNA	30
4.6.8	Analisa Data	30
BAB 5.	HASIL DAN PEMBAHASAN	32
5.1	Isolasi DNA Kasuari Gelambir Ganda	32
5.2	Amplifikasi Gen <i>Cyt-b</i> dengan Metode PCR	34
5.3	Sekuensing Gen <i>Cyt-b</i>	37
5.4	Hasil Penyejajaran Sekuen DNA Gen <i>Cyt-b</i>	41
5.5	Hubungan Kekerabatan Kasuari Gelambir Ganda Berdasarkan Pohon Filogenetik.....	43
BAB 6.	PENUTUP.....	48
6.1	Kesimpulan	48
6.2	Saran	48
	DAFTAR PUSTAKA	49
	LAMPIRAN.....	52

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Informasi Individu Sampel Kasuari Gelambir Ganda.....	22
5.1 Kemurnian DNA Kasuari Gelambir Ganda	32
5.2 <i>Query Coverage</i> dan <i>Identity</i> Sampel terhadap <i>Genebank</i> Kasuari Gelambir Ganda	37
5.3 Karakteristik Mutasi Analisa Sekuen Gen <i>Cyt-b</i> Kasuari Gelambir Ganda dan Kasuari Kerdil.....	42
5.4 Presentasi Data <i>Pairwise Distance</i>	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Burung Kasuari Gelambir Ganda.....	7
2.2 Burung Kasuari Kerdil	9
2.3 DNA mitokondria	11
2.4 Letak gen <i>Cyt-b</i> dalam DNA mitokondria.....	12
2.5 Perbedaan basa nukleotida Kasuari.....	12
2.6 Letak Gen <i>Cytochrome b</i>	14
2.7 Skema sekuensing DNA Metode Sanger	17
3.1 Bagan Kerangka Konseptual.....	20
4.1 Kerangka Operasional.....	24
4.2 Perbedaan <i>Cytochrome b</i> Kasuari Gelambir Ganda dan Kasuari Kerdil	28
4.3 Letak target gen yang digunakan pada Kasuari Gelambir Ganda.....	29
5.1 Hasil elektroforesis isolasi DNA total agarose 1%	34
5.2 <i>Origin</i> Oligo Nukleotida Gen <i>Cyt-b</i>	35
5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR Agarosa 1,7%	36
5.4 Hasil BLAST Gen <i>Cyt-b</i> GGWB1 terhadap <i>Genebank</i>	39
5.5 Hasil BLAST Gen <i>Cyt-b</i> GGWB2 terhadap <i>Genebank</i>	39
5.6 Hasil BLAST Gen <i>Cyt-b</i> GGWB3 terhadap <i>Genebank</i>	40
5.7 Hasil BLAST Gen <i>Cyt-b</i> GGWB4 terhadap <i>Genebank</i>	40
5.8 Penyejajaran Sekuen Sampel	41
5.9 Pohon Filogenik	44

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
µl	Mikroiter
ATP	<i>Adenosine Tri Phosphat</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	<i>Base pair</i>
Cm	Centimeter
Cyt-b	<i>Cytochrome b</i>
ddH ₂ O	<i>Doubele distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Triphospat deoxynucleoside</i>
ddNTPs	<i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic</i>
EtBr	<i>Etidium bromide</i>
g	Gram
GGWB	<i>Gelambir Ganda Walkng Bird</i>
HCl	<i>Hydrochloric acid</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
KCl	Kalium klorida
Kg	Kilogram
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnesium Klorida
mL	Mililiter
mM	Milomolar
mtDNA	DNA Mitokondria
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potensial of Hydrogen
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Burung Kasuari merupakan satwa endemik yang memiliki wilayah persebaran hampir merata di seluruh wilayah di Papua. Terdapat beberapa macam Burung Kasuari yaitu Kasuari Gelambir Ganda atau Southern Cassowary, Kasuari Gelambir Tunggal atau Northern Cassowary, dan Kasuari Kerdil atau Dwarf Cassowary. Menurut daftar merah *Internasional Union for Conservation Nature (IUCN)*, status konservasi burung jenis ini masuk ke dalam *vulnerable* (rentan). Berdasarkan Peraturan Pemerintah (PP) Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 1999 Burung Kasuari termasuk salah satu burung yang dilindungi oleh Negara (Rahawarin dkk, 2014).

Konservasi mempunyai arti pelestarian yaitu melestarikan atau mengawetkan daya dukung, mutu, fungsi, dan kemampuan lingkungan secara seimbang. Konservasi merupakan salah satu upaya untuk mempertahankan kelestarian satwa, tanpa adanya konservasi akan menyebabkan rusaknya habitat alami satwa. Konservasi terbagi menjadi dua yaitu konservasi eksitu dan insitu. Menurut Maghfiroh (2011), konservasi eksitu adalah upaya konservasi yang dilakukan dengan menjaga dan mengembangbiakkan jenis tumbuhan dan satwa di luar habitat alaminya dengan cara pengumpulan jenis, pemeliharaan dan budidaya (penangkaran), sedangkan konservasi insitu adalah upaya konservasi sumber daya genetik dalam populasi alami tumbuhan atau satwa. Konservasi eksitu dapat mencakup kegiatan *breeding* dan

penelitian seperti pengumpulan data gen yang digunakan dalam membantu menjaga keberadaan suatu spesies hewan.

Perkembangan ilmu berpengaruh pada pendekatan filogenetik, sehingga kekerabatan antar organisme yang awalnya hanya berdasarkan data morfologi, anatomi, fisiologi dan paleontologi tetapi sekarang berkembang teknik molekuler dalam rekonstruksi filogenetik. Hal ini juga untuk menjembatani adanya organisme kompleks yang sulit dibedakan hanya dengan data morfologi. Data molekuler tersebut seperti peta *restriksi*, *hibridisasi* DNA, sekuen protein dan sekuen DNA. Kasuari Gelambir Ganda dengan Kasuari Kerdil memiliki penampakan tubuh yang sama dan hanya dibedakan dari ukuran tubuh dan gelambir, bahkan pada saat anakan dan remaja burung tersebut secara morfologi terlihat sama sehingga diperlukan analisa secara gentika untuk memastikan apakah spesies tersebut memiliki kekerabatan yang sangat dekat atau tidak. Analisa kekerabatan juga dapat digunakan untuk menentukan tempat *release* hewan tersebut karena adanya perbedaan habitat (Suparman, 2012).

Analisa kekerabatan dapat diketahui dengan cara melakukan analisa berdasarkan sekuen DNA mitokondria. DNA mitokondria merupakan molekul DNA rangkap yang berbentuk sirkuler dan memiliki laju mutasi yang tinggi, diturunkan hanya oleh induk betina atau ibu ke anak dan tidak mengalami rekombinasi. MtDNA telah banyak digunakan dalam enanda molekul studi genetika populasi, penelusuran kekerabatan, dan pelacakan beberapa penyakit (Wandia, 2001). Gen MtDNA yang biasanya digunakan salah satunya yaitu gen *cytochrome b*, gen ini merupakan salah

satu gen penyandi protein di dalam genom mitokondria yang banyak digunakan untuk meneliti hubungan spesies dari genus atau family yang sama (Widayanti dkk, 2004).

Eco Green Park merupakan lembaga eksitu yang ada di Jawa Timur. Eco Green Park memiliki beberapa jenis Kasuari salah satunya yaitu Kasuari Gelambir Ganda atau Kasuari Gelambir Ganda. Analisa kekerabatan Kasuari Gelambir Ganda pada Eco Green Park akan membantu untuk melihat kekerabatan pada Kasuari Gelambir Ganda yang dijadikan sampel, dan diharapkan kedepannya bisa dilakukan untuk program *breeding*.

Tindakan konservasi salah satunya adalah memiliki data gen dan melakukan analisa secara genetik dapat dilakukan pada Kasuari Gelambir Ganda. Gen *Cytochrome b* yang merupakan gen DNA mitokondria yang diturunkan oleh induk sehingga tidak terganggu oleh heterozigositas dapat digunakan untuk analisa kekerabatan. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kekerabatan Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius casuarius*) yang berada di Eco Green Park di Kota Batu Jawa Timur secara intraspecies dan interspecies berdasarkan sekuen gen *Cytochrome b* pada DNA Mitokondria menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kekerabatan individual (intraspecies) berdasarkan sekuen gen *Cytochrome b* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Kasuari Gelambir Ganda di Eco Green Park?

2. Bagaimana jarak genetik antar spesies (interspecies) antara Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius casuarius*) dengan Kasuari Kerdil (*Casuarius bennetti*) ?

1.3 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah bulu 4 ekor Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius casuarius*) dewasa (usia 7 tahun), 2 ekor berjenis kelamin jantan dan 2 ekor berjenis kelamin betina yang berada di Eco Green Park Kota Batu, Jawa Timur
2. Gen *Cytochrome b* diisolasi dari bulu Kasuari Gelambir Ganda menggunakan *QIAamp[®] DNA Mini Kit* (50).
3. Primer gen *Cytochrome b* didesain menggunakan gen *Cytochrome b* dari Kasuari Gelambir Ganda menggunakan program *Primer 3 plus*.
4. Amplifikasi DNA gen *Cytochrome b* Kasuari Gelambir Ganda dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *forward* (CYTB_F) 5'-GCTGACACCTCACTAGCCTT-3' dan primer *reverse* (CYTB_R) 5'-AGGTGAATGAGGGTGATGCC-3'.
5. Metode PCR dilakukan dengan mesin *Biorad* dengan program: predenaturasi 94°C selama empat menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 51,8°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama satu menit, dan *post extension* 72°C selama tujuh menit.
6. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode *Sanger* (*dye terminator labelling*) dengan menggunakan sepasang primer *forward* (CYTB_F) 5'-

GCTGACACCTCACTAGCCTT -3' dan primer *reverse* (CYTB_R) 5'-AGGTGAATGAGGGTGATGCC -3'.

7. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen DNA dan tingkat kekerabatan antar Kasuari Gelambir Ganda di Eco Green Park dan jarak genetik Kasuari Gelambir Ganda dengan Kasuari Kerdil menggunakan program *Bioedit* dan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI serta program MEGA.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui kekerabatan individual (intraspesies) berdasarkan sekuen gen *Cytochrome b* dan jarak genetik pada Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius casuarius*) di Eco Green Park, Batu.
2. Untuk mengetahui jarak genetik antar spesies (interspesies) antara Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius casuarius*) dengan Kasuari Kerdil (*Casuarius bennetti*).

1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi genetik berupa perpustakaan gen dan juga hasil analisa kekerabatan untuk keperluan konservasi genetik Kasuari Gelambir Ganda di Eco Green Park, Batu. serta dengan mengetahui tingkat kemurnian suatu spesies maka galur murni akan tetap terjaga sehingga dapat membantu meningkatkan populasi.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius casuarius*)

Kasuari Gelambir Ganda (*casuarius casuarius*) merupakan salah satu satwa endemik khas Papua dan dapat ditemukan di Kabupaten Merauke. Persebaran Kasuari tidak hanya di Papua melainkan terdapat di Benua Australia dan daerah Pulau Seram di Kepulauan Maluku. Kasuari termasuk jenis unggas yang tidak dapat terbang dan mengendalikan kedua kakinya yang besar untuk berjalan dan pertahanan diri. Kasuari memiliki ukuran tubuh yang cukup besar untuk jenis unggas. Tubuh Kasuari diselimuti oleh bulu berwarna hitam sedangkan warna pada kepala serta leher yaitu biru (**Gambar 2.1**) (Khalishah, 2016).

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Aves
Ordo	: Struthioniformes
Famili	: Casuariidae
Genus	: Casuarius
Spesies	: <i>Casuarius casuarius</i>



Gambar 2.1 Burung Kasuari Gelambir Ganda (Khalishah, 2016)

Burung Kasuari Gelambir Ganda dewasa dapat tumbuh hingga mencapai 170 cm. Burung Kasuari mempunyai kaki yang besar dan kuat dengan tiga buah jari pada masing-masing kakinya. Jari-jari kaki burung ini sangat berbahaya karena diperlengkapi dengan cakar yang sangat tajam. Seperti umumnya spesies burung yang berukuran besar, burung Kasuari Gelambir Ganda tidak dapat terbang.

Pertumbuhan kasuari di alam liar mengalami banyak penurunan sejak tahun 1988 hingga sekarang berkisar sekitar 6000 -13.000 dan termasuk dalam kategori *vulnerable* pada IUCN. Penurunan populasi diakibatkan oleh rusaknya habitat hutan dan juga perburuan liar, hasil dari perburuan digunakan untuk berbagai macam diantaranya bulu digunakan untuk aksesoris dan daging yang di konsumsi oleh penduduk sekitar. Upaya konservasi untuk burung ini sudah dilaksanakan di Taman Nasional Wasur dan Cagar Alam Bupul, perkembangan yang baik dapat terlihat dari

ditemukannya beberapa sarang telur Kasuari yang menandakan habitat masih 80% cocok untuk berkembangbiak, hasil akurasi ini didukung oleh adanya beberapa data sekunder dari WWF Indonesia (Khalishah, 2016).

2.2 Kasuari Kerdil (*Casuarius bennetti*)

Burung Kasuari kerdil merupakan spesies burung kasuari yang paling kecil dan banyak ditemukan di daerah Papua. Burung ini memiliki tinggi mencapai 1 meter dengan berat badan sekitar 25 kg, hanya memiliki sedikit selisih tinggi dengan Kasuari lainnya (**Gambar 2.2**). Habitat kasuari kerdil berada di hutan hujan area Papua, Pulau Seram dan Yapen. Makanan utama dari Kasuari Kerdil yaitu buah – buahan, serangga serta beberapa vertebrata kecil seperti kadal (Bruce *et al.*, 2016).

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Aves
Ordo	: Struthioniformes
Famili	: Casuariidae
Genus	: Casuarius
Spesies	: <i>Casuarius bennetti</i>





Gambar 2.2 Burung Kasuari Kerdil (Bruce *et al.*, 2016).

Perbedaan secara morfologi jantan dan betina tidak terlalu tampak hanya pada betina warna bulu lebih cerah. Masa breeding Kasuari Kerdil pada bulan Juni hingga Oktober. Periode inkubasi pada saat telur telah keluar selama 47-54 hari. Anak Burung Kasuari akan memiliki corak strip pada bulu yang berwarna coklat dan akan mulai menghilang pada umur 3 bulan dan pada saat berumur 6 bulan bulu akan mulai tampak lebih coklat tua (Bruce *et al.*, 2016).

2.3 DNA Mitokondria (mtDNA)

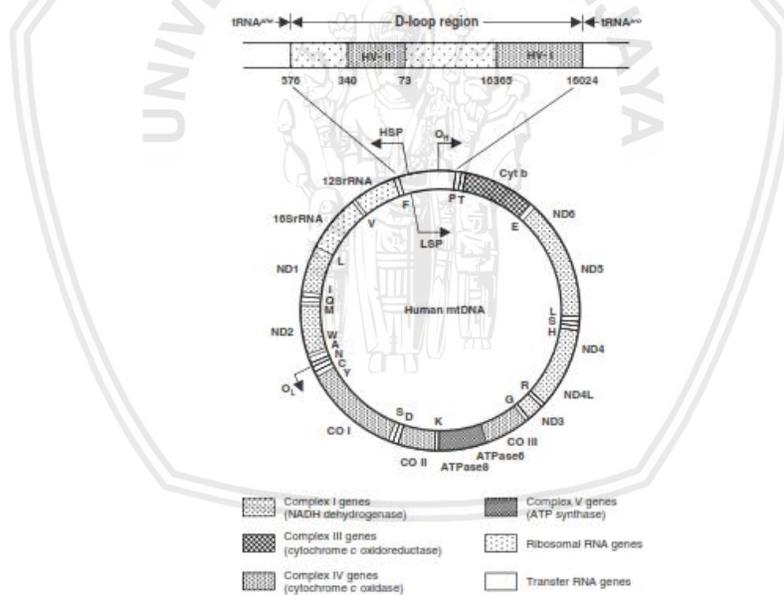
Mitokondria merupakan organel sel dari eukariota (jamur, tumbuhan dan hewan) yang mempunyai fungsi utama untuk memproduksi ATP melalui proses fosforilasi oksidatif. Sebagian besar sel mamalia mengandung ratusan mitokondria. Setiap unit mitokondria berisi sedikit ataupun banyak kopi genom mtDNA. Satu sel somatik mengandung ratusan atau ribuan kopi genom mtDNA identik yang sebagian besar ditemukan pada jaringan yang membutuhkan banyak oksigen, seperti otak dan otot skeletal. Pola pewarisan mtDNA hanyalah dari pihak ibu. Mekanisme pewarisan

mtDNA terjadi karena reduksi mtDNA paternal (dari sperma) selama proses spermatogenesis. Pada saat fertilisasi mtDNA sperma mengalami dilusi sederhana dan proteolisis yang dimediasi *ubiquitin* serta digesti aktif mtDNA sperma didalam ovum yang dibuahi. Berbagai macam perlindungan sel telur, mtDNA paternal yang memasuki oosit menjadi hilang setelah ovum yang dibuahi mengalami pembelahan mitosis pertama (Hidayat, 2017).

Molekul mtDNA adalah molekul polimer rantai ganda, yaitu rantai *heavy* (H) *strand* dan rantai *light* (L) *strand*. H-*strand* memiliki banyak purin (adenin dan guanin), kemudian L-*strand* memiliki pirimidin (timin dan sitosin). Secara fungsional mtDNA mamalia dan manusia dibagi menjadi *coding* dan *control region*. Daerah *codingregion* berisi 37 gen tanpa intron yang mengkode 2 ribosomal RNA (12S dan 16SrRNA), 22 transfer RNA (tRNA) dan 13 protein enzim. Daerah *control region*, yang bertanggungjawab terhadap D-*loop*, diikat oleh gen untuk tRNA^{phe} dan tRNA^{pro} (Hidayat, 2017).

Beberapa penelitian terkait mtDNA dapat dilihat pada penelitian kekerabatan antara dua jenis Burung Kakak Tua (*Cacatua alba*) dan (*C. moluccensis*) menggunakan *Cytochrome b* metode PCR untuk kepentingan konservasi sebagai penuntun dalam mengevaluasi efek genetik dari perubahan populasi pada masa mendatang dan dapat dijadikan sebagai petunjuk dalam pengelolaan konservasi yang bertujuan untuk menjaga tingkat diversitas saat sekarang. Kekerabatan filogenetik dari Elang Laut Perut putih menggunakan *Cytochrome b* metode PCR digunakan untuk menggambarkan secara rinci mengenai keanekaragaman genetik spesies ini dan

hubungan kekerabatannya dengan spesies *Haliaeetus* yang lain sebagai salah satu upaya konservasi yang bertujuan untuk melestarikan keanekaragaman genetik dari suatu unit taksonomi. Penentuan karakteristik juga dapat menggunakan *Cytochrome b* metode PCR digunakan untuk menentukan kekerabatan, pola manajemen budidaya, serta sumber daya genetik mempunyai peran penting dalam pembentukan galur unggul, sementara keragaman genetik dapat diketahui melalui karakterisasi dan evaluasi yang lebih baik. Penggunaan *Cytochrome C Oxidase Sub-unit 1 (COI)* metode PCR dalam kegiatan konservasi juga dapat dilakukan seperti *barcoding* Rangkok Badak dan Elang Jawa untuk Konservasi genetika.

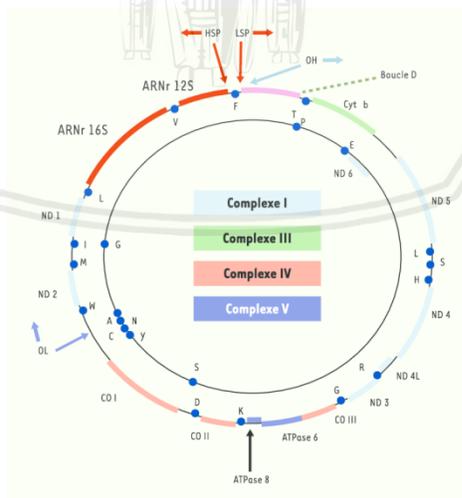


Gambar 2.3 DNA mitokondria (Hidayat, 2017).

2.4 Gen *Cytochrome b*

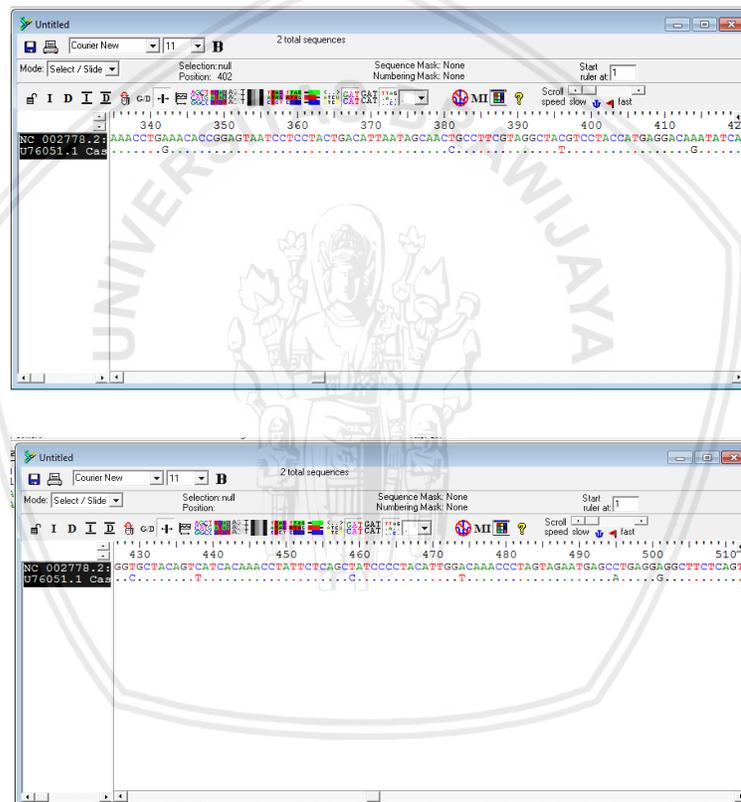
Gen *Cytochrome b* merupakan salah satu gen mitokondrial yang dikode oleh DNA mitokondria dan biasanya digunakan untuk menyelesaikan berbagai perbedaan

taksonomi. Gen tersebut berperan dalam reaksi transportasi elektron dalam proses respirasi aerobik seluler pada sel eukariotik dan aerobik prokariotik, protein ini termasuk ke dalam rantai respirasi yang kemudian akan diteruskan ke *Cytochrome c*. Gen *Cytochrome b* memiliki beberapa variasi sehingga gen tersebut banyak digunakan untuk pembandingan spesies dalam satu genus atau spesies yang sama. Seperti pada gen lain dalam mtDNA, gen *Cytochrome b* memiliki urutan yang spesifik dan memiliki keunggulan dalam hal jumlah yang mencapai 1000 kopi lokus, sehingga dapat digunakan untuk amplifikasi DNA target. Sekuen gen *Cytochrome b* memiliki keunikan yaitu bersifat kekal pada tingkatan spesies dan dapat digunakan untuk pengelompokan penentuan hubungan kekerabatan antar spesies. *Cytochrome b* memiliki delapan transmembran heliks dihubungkan oleh intramembran atau domain ekstrasembran. Sekuen gen *cyt b* yang berasal dari *Sus scrofa* dengan ukuran dari base pair gen *Cytochrome b* sekitar 1140 bp (Farias *et al.*, 2001).

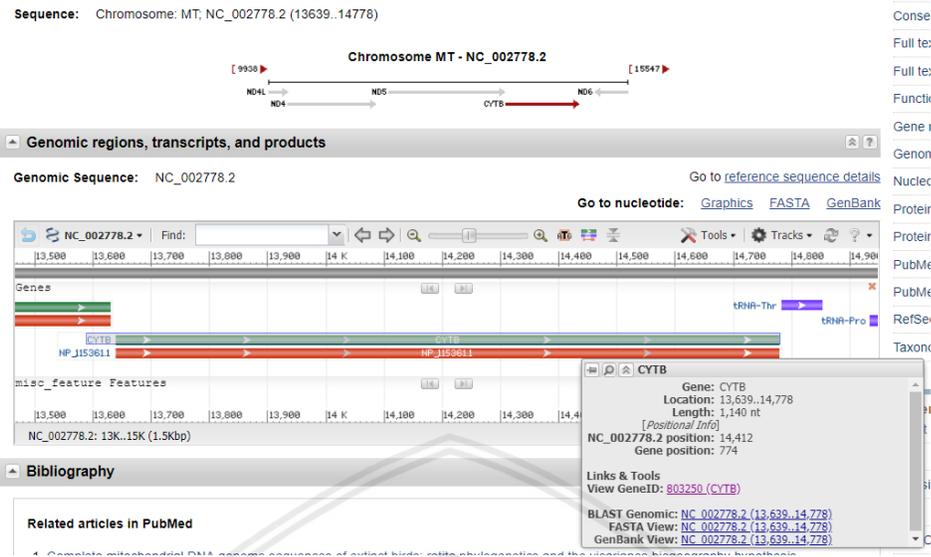


Gambar 2.4 Letak gen *Cytochrome b* dalam DNA mitokondria (May-Panloup *et al.*, 2004).

Sampel bulu Burung Kasuari Gelambir Ganda yang akan dibandingkan dengan Kasuari Kerdil menggunakan *gene bank* NCBI yaitu NC_002778.2 untuk Kasuari Gelambir Ganda dan U76051.1 untuk Kasuari Kerdil. Perbedaan basa nukleotida dari keduanya dapat dilihat pada **gambar 2.5**. Lokasi gen *Cytochrome b* pada mitokondria berada pada region kromosom MT diantara nomer 13.639 – 14.778 dapat dilihat pada **gambar 2.6**.



Gambar 2.5 Perbedaan basa nukleotida Kasuari Gelambir Ganda (atas) Kasuari Kerdil (bawah)



Gambar 2.6 Letak Gen *Cytochrome b* pada Kasuari Gelambir Ganda

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode biomolekuler yang berfungsi untuk memperbanyak segmen DNA spesifik secara invitro menggunakan enzim DNA polimerase dan primer nukleotida yang nantinya akan berhibridisasi dengan DNA dari arah yang berlawanan. Pembuatan cetakan sebelum menggunakan PCR sangat diperlukan agar kedua serat hasil penyalinan dapat saling komplementer. Amplifikasi DNA dapat terjadi bila urutan nukleotida pada kedua ujung diketahui. Komponen yang perlu disiapkan dalam proses PCR adalah templat DNA, dNTPs, enzim polimerase DNA, *buffer* PCR, sepasang primer (*forward* dan *reverse*), dan magnesium klorida (Elza *et al.*, 1998).

Proses pembuatan cetakan DNA pertama yaitu dengan melisiskan sampel atau isolasi DNA. Isolasi DNA menggunakan bulu dapat menggunakan 500 ml *lysis buffer* terdiri dari 50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 2% SDS dan proteinase K dengan

total konsistensi 175 mg/ml. Kelebihan dari isolasi DNA adalah mendapatkan kualitas DNA yang lebih baik dan murni (Elza *et al.*, 1998).

Secara umum, proses PCR dibagi menjadi 3 tahap yaitu denaturasi, *annealing*, dan *extension*. Pertama tahap *annealing* DNA yang telah dicetak akan di denaturasi menggunakan pemanasan 94°C dalam waktu kurang lebih 60 detik menggunakan campuran primer oligonukleotida, enzim DNA polimerase dan empat macam dNTP. Campuran tersebut didinginkan hingga temperatur 37°-56° yang akan menyebabkan primer *annealing* dengan sekuen target, kemudian bila temperature dinaikan lagi suhu 72°-76° C maka proses *annealing* terhenti dan memasuki tahap *extension*. Primer yang telah berhibridasi akan diperpanjang menggunakan DNA polymerase. Proses tersebut diulang hingga mendapatkan jumlah DNA yang diinginkan. Satu segmen DNA secara eksponensial suatu segmen DNA akan diampifikasi sebanyak 30 kali replikasi dan akan menghasilkan 2 kali fragmen turunannya, sehingga dalam beberapa jam jumlah DNA dalam nanogram dapat diperbanyak jutaan kali (Elza *et al.*, 1998).

2.6 Sekuensing DNA

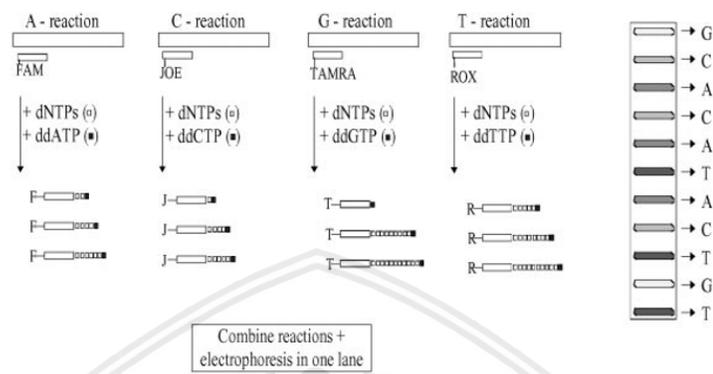
Sekuensing DNA merupakan proses penentuan urutan basa nukleotida pada molekul DNA. DNA molekul dihancurkan menggunakan prosedur kimia dan akan didapatkan hasil urutannya kemudian diberikan label, panjang fragmen yang diberi label merupakan identifikasi dari posisi dasar tersebut. Metode ini menggambarkan reaksi pembelahan DNA pada Guanin, Adenin, Sitosin dan Timin (**Gambar 2.5**). Metode yang sering dilakukan dalam sekuensing adalah menggunakan menggunakan

metode sanger. Metode sanger merupakan metode sekuensing DNA yang menggabungkan rantai-terminating dideoksi oleh *polymerase* DNA selama melakukan *in vitro* replikasi DNA. Proses awal reaksi PCR menggunakan satu primer atau dua primer dan ditambahkan dideoxynucleotida yang dilabel *fluorescent* (Widowati, 2013).

Ekstensi rantai DNA Metode Sanger dimulai pada DNA cetakan menggunakan oligonukleotida pendek yang disebut *primer*. *Primer* dapat diperpanjang menggunakan DNA polimerase yaitu enzim yang dapat melakukan replikasi DNA. Penggunaan jenis basa deoksinukleotida (dNTP) dan nukleotida pemutus atau dalam konsentrasi rendah (ddNTP) ditambahkan bersamaan dengan *primer* dan DNA polimerase. Penempelan ddNTP pada cetakan akan mengakibatkan terhentinya sintesis utas dengan DNA cetakan oleh dNTP. Reaksi ini menghasilkan beberapa fragmen yang berbeda panjangnya dengan label radioaktif. Fragmen DNA tersebut kemudian dipisahkan melalui gel elektroforesis poliakrilamida (Jannah, 2014).

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. Panjang sekuen yang dihasilkan berkisar antara 1.000–1.200 pasang basa (bp) dan tidak mampumencapai lebih dari 2.000 bp (Jannah, 2014).



Gambar 2.7 Skema sekuensing DNA Metode Sanger (Franca *et al.*, 2002)



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

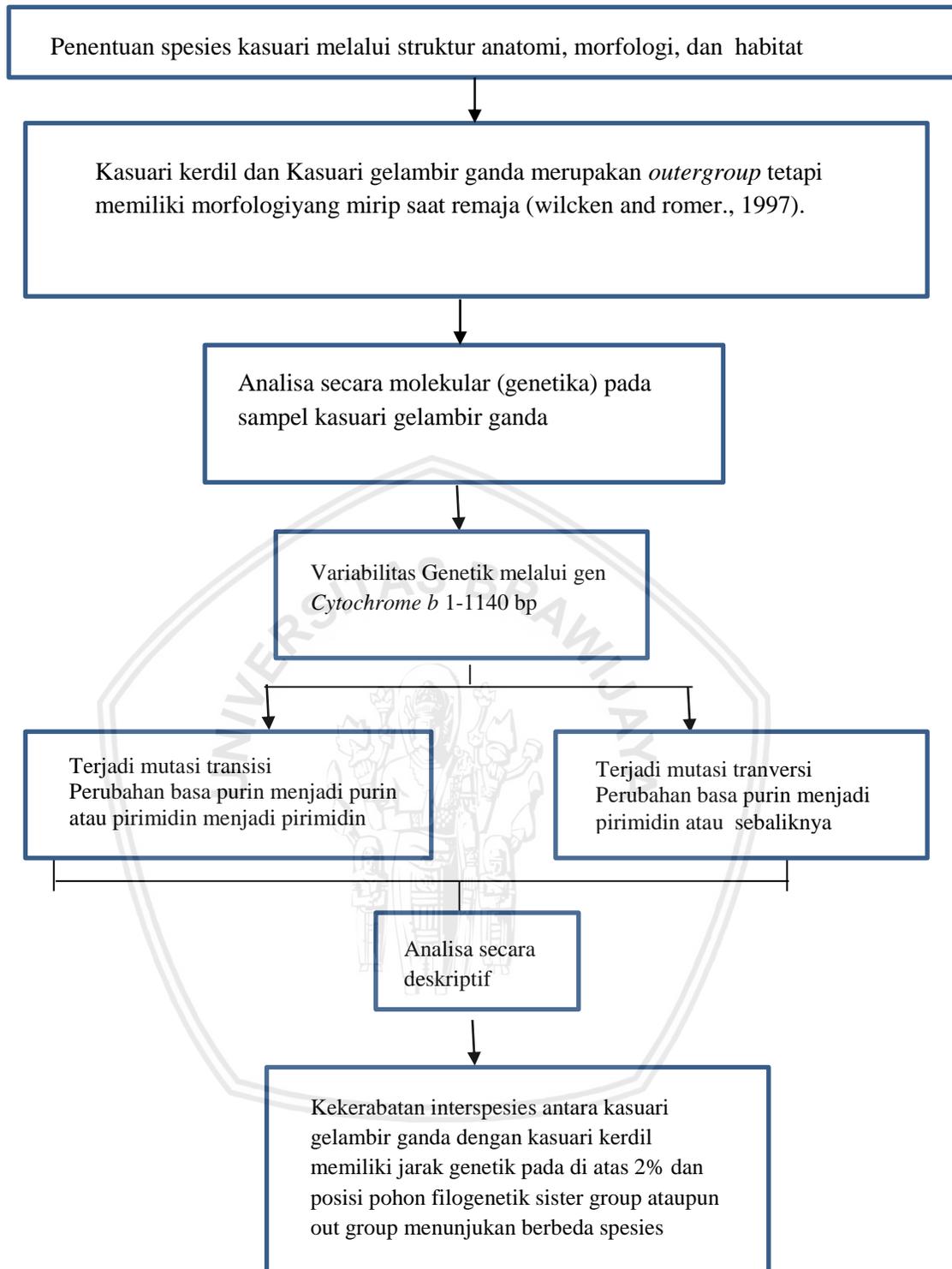
3.1 Kerangka Konseptual

Burung Kasuari merupakan hewan yang dilindungi oleh Negara berdasarkan Peraturan Pemerintah (PP) Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 1999. Status IUCN *vulnerable* (rentan). Tindakan konservasi harus dilakukan untuk tetap dapat melestarikan populasi dari burung tersebut. Analisa kekerabatan dapat dilakukan untuk melihat kekerabatan dari suatu individu spesies dan membandingkan dengan spesies lainnya. Perbandingan interspesies dari Kasuari Gelambir Ganda dan Kasuari Kerdil dilakukan karena adanya kesamaan dari anakan dan pada saat remaja. Perbandingan ini dapat dilakukan dengan mengambil sampel bulu Burung Kasuari Gelambir Ganda dan gen Kasuari Kerdil dari NCBI. Sampel bulu diambil dari masing masing individu Kasuari Gelambir Ganda yang akan diisolasi untuk mendapatkan DNA. Gen yang digunakan adalah gen *Cytochrome b* NC_002778.2 untuk Kasuari Gelambir Ganda dan U76051.1 untuk Kasuari Kerdil, karena gen tersebut dapat membantu menentukan kekerabatan dari individu dalam suatu populasi.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik PCR adalah teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* yang membutuhkan sepasang primer *forward* dan primer *reverse* dengan target gen 421 bp dari total 1140 bp. Teknik selanjutnya adalah melakukan sekuensing untuk mendapatkan urutan basa nukleotida dengan memisahkan masing-masing basa nukleotida. Hasil sekuen DNA dilakukan penyejajaran menggunakan algoritma

ClustalW multiple alignment, selanjutnya dilakukan analisa kekerabatan antar Kasuari gelambir ganda secara deskriptif dari hasil pengolahan perangkat lunak MEGA versi X. Hasil sekuen yang didapatkan selanjutnya akan dibandingkan dengan gen spesies terdekat yaitu kasuari kerdil dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* (NJ) (Fautley, 2013).

Hasil yang diharapkan pada penelitian ini adalah kekerabatan secara intraspecies antar individu sampel kasuari gelambir ganda memiliki *identity* sekuen gen *Cyt-b* yang tinggi jika dibandingkan dengan data gene bank NCBI kasuari kerdil (U76051.1) dan jarak genetik antar individu kasuari gelambir ganda berada dibawah 2%. Kekerabatan secara interspecies antara kasuari gelambir ganda dengan kasuari kerdil adalah melihat dari jarak genetik lebih dari 2% dan posisi dari pohon filogenetik yaitu dalam posisi *sister spesies* ataupun *out group* sehingga terlihat bahwa kedua kasuari tersebut berbeda spesies. Bagan kerangka konseptual dapat diamati pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Kasuari gelambir ganda yang dijadikan sampel pada Eco Green Park memiliki kekerabatan yang sesuai dengan kekerabatan pada tingkat intraspecies (dilihat dari pohon filogenetik dan juga perhitungan *pairwise distance* yang meliputi *genetic distance* dan *sequence diversity*).

Melihat jarak genetik pada tingkat interspecies antara Kasuari gelambi ganda (*Casuarius casuarius*) dengan Kasuari kerdil (*Casuarius bennetti*) (dilihat dari pohon filogenetik dan juga perhitungan *pairwise distance* yang meliputi *genetic distance* dan *sequence diversity*).



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium ADD (*Animal diagnostic disease*) FKH UB untuk pelaksanaan PCR dan Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maliki Ibrahim Malang untuk Uji kuantitas DNA dengan sampel yang diperoleh dari Eco Green Park, Batu Jawa Timur pada bulan Februari 2019 - April 2019.

4.2 Pemilihan Sampel Kasuari Gelambir Ganda

Pengambilan sampel bulu Kasuari Gelambir Ganda yang digunakan berasal dari Eco Green Park, Batu Jawa Timur. Pemilihan sampel bulu Kasuari Gelambir Ganda dilakukan berdasarkan jenis kelamin dan usia. **Tabel 4.1** menunjukkan informasi singkat masing – masing individu Kasuari Gelambir Ganda.

Tabel 4.1 Data Informasi Individu Sampel Kasuari Gelambir Ganda

No.	Nama	Umur (Tahun)	Jenis Kelamin	Kode Sampel
1	GGWB1	>7	Jantan	G1
2	GGWB2	>7	Betina	G2
3	GGWB3	>7	Jantan	G3
4	GGWB4	>7	Betina	G4

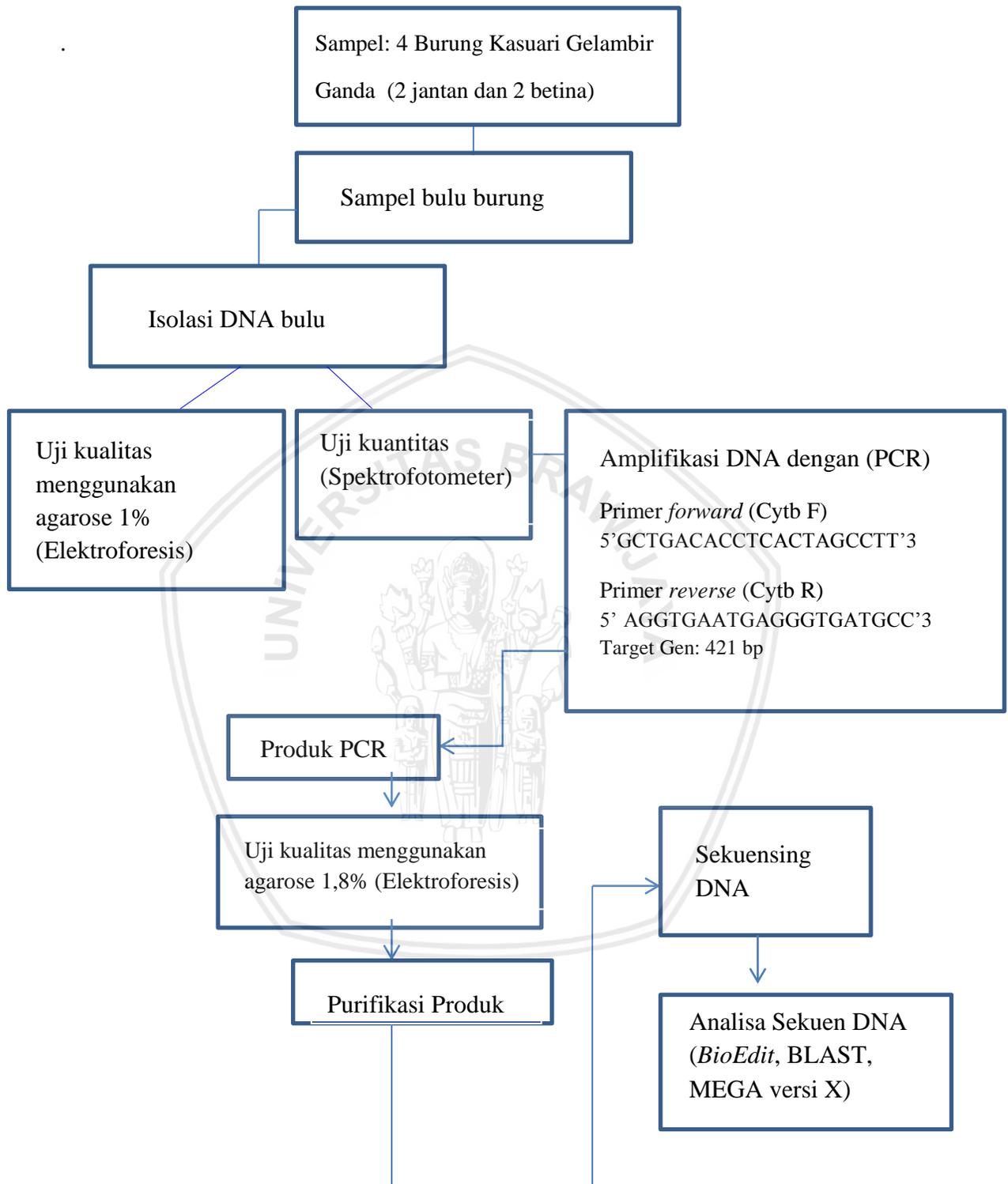
4.3 Alat dan Bahan

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sarung tangan, masker, pinset, gunting, kamera, tisu, ice box, kertas label, *microcentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, mikropipet, mesin *vortex*, mesin penangas, sentrifugator, inkubator, timbangan analitik digital, *freezer*, mesin PCR (*SensoQuest Thermocycler*), komputer, ND-1000 *Spectrophotometer*, *UV-Transilluminator*, dan *Mupid-ExuElectrophoresis*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bulu pada bagian punggung, primer *forward* (CYTB_F) 5'- GCTGACACCTCACTAGCCTT -3' dan primer *reverse* (CYTB_R) 5'- AGGTGAATGAGGGTGATGCC -3', *lysis buffer* (50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 2% SDS, *proteinase K*, *buffer* elektroforesis, PCR *mix* (Promega *GoTaq*[®] *Green Master Mix 2*^x), *loading dye*, *agarose gel* 1% dan 1,8%, *DNA ladder double destilate H2O (ddH2O)*, dan larutan TBE 1x.

4.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian pertama yakni koleksi sampel berupa bulu Burung Kasuari Gelambir Ganda. Kedua melakukan isolasi DNA dari sampel bulu yang didapat. Ketiga melakukan uji kuantitas dan kualitas isolasi DNA yang digunakan. Kempat melakukan desain primer yang meliputi primer *forward* dan *reverse*. Kelima melakukan kegiatan PCR, hasil dari PCR selanjutnya diuji kualitas dan kuantitasnya. Produk PCR di sekuensing, dan tahap terakhir menganalisa data kerangka operasional dapat dilihat pada **Gambar 4.1**



Gambar 4.1 Kerangka Operasional

4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian studi kasus yang dianalisa secara deskriptif, yaitu dengan mendeskripsikan hasil analisa data masing – masing sampel. Data diperoleh dari sekuen DNA *Cytochrome b* untuk merekonstruksi pohon filogenetik dalam menentukan kekerabatan individual antara Kasuari Gelambir Ganda dan Kasuari Kerdil. Jumlah sampel yang akan diujikan berjumlah 4 sampel bulu dari Kasuari Gelambir Ganda, yang selanjutnya akan dilakukan isolasi DNA melalui sampel bulu tersebut. Hasil dari isolasi DNA akan diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometri dan gel agarose 1% untuk ukurannya. Sampel DNA diamplifikasi menggunakan PCR dengan sepasang primer *forward* (CYTB_F) 5'-GCTGACACCTCACTAGCCTT -3' dan primer *reverse* (CYTB_R) 5'-AGGTGAATGAGGGTGATGCC -3'. Ukuran fragmen dari produk PCR dapat diukur menggunakan elektroforesis gel agarose 1,8%, kemudian produk disekuensing. Hasil dari sekuensing fragmen DNA kemudian dilakukan analisis menggunakan program *BioEdit*, BLAST NCBI, aplikasi MEGA versi X, kemudian dianalisa secara deskriptif.

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1. Pengambilan Sampel Bulu Kasuari Gelambir Ganda

Penelitian ini menggunakan bulu Burung Kasuari Gelambir Ganda bagian punggung dicabut menggunakan pinset. Tiap bulu dimasukkan ke dalam amplop yang diberi label berbeda. Sampel bulu yang diambil kemudian dipotong kecil – kecil dan disimpan pada tabung 50 ml dan diletakkan di *freezer* (Wirastika, 2013)

4.6.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dari bulu Kasuari Gelambir ganda dilakukan menggunakan *QIAamp® DNA Mini Kit*. Prosedur dilakukan sesuai dengan protocol kit yang memiliki 3 prinsip utama yakni melakukan perusakan pada dinding eritrosit atau leukosit, melakukan pemisahan DNA dari bahan padat seperti protein, dan melakukan pemurnian DNA. Protokol isolasi DNA menggunakan *QIAamp® DNA Mini Kit* dapat dilihat di **Lampiran 1**.

4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan menggunakan mesin ND-1000 *Spectrophotometer*. Blanko yang digunakan cairan *buffer*, pelarut, ataupun cairan pembawa yang digunakan pada sampel. Cairan yang digunakan adalah ddH₂O sebanyak 1 µL. Cairan ddH₂O ditetaskan langsung pada *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1µL. Absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutup. Rata-rata panjang gelombang yang digunakan adalah 260 nm dan 280 nm. Sampel diambil sebanyak 1 µL, kemudian ditetaskan diatas pedestal *submicroliter cell* yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup diatas sampel yang telah ditetaskan. Tekan tombol *sample* kemudian ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor.

4.6.3.2 Uji Kualitas DNA

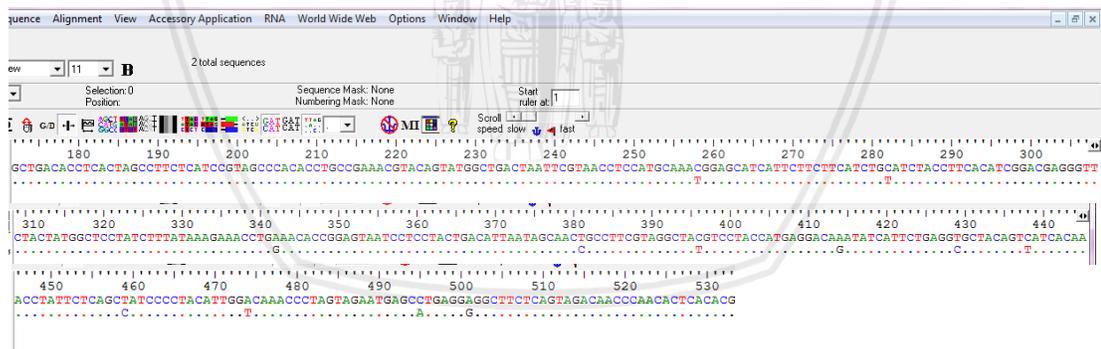
Uji kualitas DNA dari Bulu Burung Kasuari Gelambir Ganda dapat dilakukan menggunakan elektroforesis agarose 1% dan menggunakan mesin Mupid-

ExuElectrophoresis (Novitasari dkk., 2014).. Protokol uji kualitas DNA dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

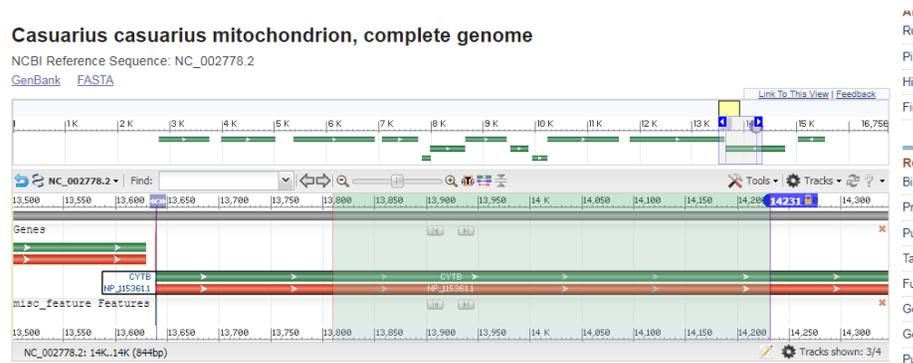
4.6.4 Desain Primer

Desain primer merupakan komponen PCR yang digunakan sebagai template dan menentukan akurasi sekuen DNA yang akan diamplifikasi. Desain primer memiliki sepasang primer yaitu *forward* dan *reverse*. Primer yang didapatkan merupakan rangkaian basa nukleotida yang memiliki beberapa syarat yaitu pertama panjang basa berkisar 18 – 30 terdiri dari A, G, C, dan T. Kedua *Primer Melting Temperature* (T_m) atau suhu leleh merupakan suhu yang dibutuhkan oleh primer untuk mengalami disosiasi atau lepas ikatan. Suhu leleh yang baik berkisar 52 -58°C. Ketiga adalah jumlah C-G adalah 40-60% dari total primer. Keempat selisih *Primer Melting Temperature*, pasangan primer sebaiknya tidak memiliki selisih suhu leleh yang terlalu tinggi. Pasangan primer yang memiliki suhu leleh lebih dari 5°C menyebabkan penurunan proses amplifikasi atau bahkan tidak akan terjadi. Kelima adalah pengulangan atau *repeat and runs*, pengulangan dengan basa yang sama atau lebih dari tiga basa berurutan, contoh AGCGGGGGATG memiliki 5 basa berurutan G harus dihindari karena dapat menyebabkan terjadinya breathing pada primer dan mispriming, sehingga proses penempelan dari primer menjadi sulit. Pengulangan 2 basa yang sama juga tidak dianjurkan, contoh ATATATAT karena akan menimbulkan adanya hairpin. Hairpin merupakan struktur yang terbentuk oleh basis pasangan asam oynucleic antara urutan komplementer untai tunggal baik DNA maupun RNA (Sasmito dkk., 2014). Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA

dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) didesain menggunakan NCBI *Genebank* : NC_002778.2 421 bp *circular* antara 172 - 533 DNA *Casuarium casuarium cytochrome b gene*, mitochondrion, complete genome. Primer *forward* yang didapatkan adalah (CYTB_F) 5'- GCTGACACCTCACTAGCCTT - 3' (*length* : 20 bp; Tm : 56,8°C; GC : 55%) dan primer *reverse* (CYTB_R) 5'- AGGTGAATGAGGGTGATGCC -3' (*length* : 20 bp; Tm : 57,3°C; GC : 55 %) dengan target produk PCR 421 bp . Pembuatan primer dilakukan secara manual menggunakan aplikasi primer3plus di www.bioinformatics.nl dengan mencocokkan setiap kemungkinan primer yang dapat digunakan dengan mengukur ketepatan *Primer Melting Temperature* dan komposisi GC menggunakan aplikasi bernama *Olygo Analyzer*. Desain primer yang telah jadi akan dipesan melalui perusahaan bernama Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) yang berasal dari Singapore.



Gambar 4.2 Perbedaan *Cytochrome b* Kasuari Gelambir Ganda dan Kasuari Kerdil



Gambar 4.3 Letak target gen yang digunakan pada Kasuari Gelambir Ganda

4.6.5 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hasil sampel isolasi DNA Burung Kasuari Gelambir Ganda kemudian diamplifikasi menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (CYTB_F) dan *reverse* (CYTB_R). Campurkan larutan yang akan dilakukan amplifikasi dimulai dengan 1 μ L DNA, 1 μ L primer *forward* 10 pmol, 1 μ L primer *reverse* 10 pmol, 5 μ L PCR *mix* dan 2 μ L ddH₂O ke dalam *microtube* 200 μ L. Bahan yang telah dicampurkan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Mesin PCR melakukan amplifikasi dengan beberapa tahap yaitu yang pertama adalah predenaturasi, predenaturasi dilakukan dengan suhu 94°C selama empat menit dan diikuti dengan denaturasi suhu 94°C selama 30 detik. Kedua adalah tahap *annealing*, suhu *annealing* mengikuti suhu dari T_m primer 50,9°C selama 30 detik, tahap ketiga *extension* suhu 72°C selama 7 menit (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

4.6.6 Uji Kualitas Produk PCR

Pengujian kualitas produk PCR digunakan untuk memvisualisasikan produk PCR gen *Cytochrome b* dari bulu Kasuari Gelambir Ganda dan dilanjutkan menggunakan gel agarose yang dilakukan *running* elektroforesis. Sebanyak 3 μ L

Produk PCR tersebut dipipet ke dalam sumur gel *agarose* 1% dengan TBE 1x pada voltase 100V, selama 30 menit. Kemudian didokumentasikan hasil elektroforesis dengan kamera digital pada UV-transiluminator (**Lampiran 2**).

4.6.7 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen *Cytochrome b* dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer BEL_F dan BEL_R 10pmol untuk melihat sekuen gen *Cytochrome b* sepanjang 421 bp 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 telah diperoleh dari hasil penelitian akan dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikannya. Keekerabatan empat sampel Kasuari Gelambir Ganda di Eco Gren Park kota Batu Jawa Timur, melalui homologi gen *Cytochrome b* dengan software *Bioedit* dan BLAST NCBI. Tahap analisis dimulai dengan menyejajaran sekuen kasuari gelambir ganda GGWB1, GGWB2, GGWB3, GGWB4 dengan database Kasuari Gelambir Ganda NCBI *Genebank* : NC_002778.2. menggunakan program *Bioedit*. Analisis filogeni menggunakan perangkat lunak MEGA versi X dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining (NJ)* memakai 1000 kali pengulangan. Hasil analisis program MEGA versi X tersebut akan diperoleh

matriks jarak genetik persamaan basa nukleotida untuk menentukan pohon filogenetik seberapa dekat jarak antara kasuari gelambir ganda dengan kasuari kerdil.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi DNA Kasuari Gelambir Ganda

Isolasi DNA dilakukan menggunakan sampel bulu yang diekstrak menggunakan protokol *QIAamp® DNA Mini Kit*. Hasil isolasi memiliki tujuan untuk mendapatkan hasil isolasi DNA total yang setelahnya dilakukan uji kuantitas menggunakan *Implen NanoDrop® Spectrophotometer ND-100* dengan panjang gelombang A_{260} dan A_{280} nm. Hasil konsentrasi dan kemurnian dari bulu Kasuari gelambir ganda dapat dilihat pada **tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Kemurnian DNA Kasuari Gelambir Ganda

Sampel	Kemurnian (Absorbansi 260/280 nm)
GGWB1	1,10
GGWB2	1,92
GGWB3	0.80
GGWB4	0,86

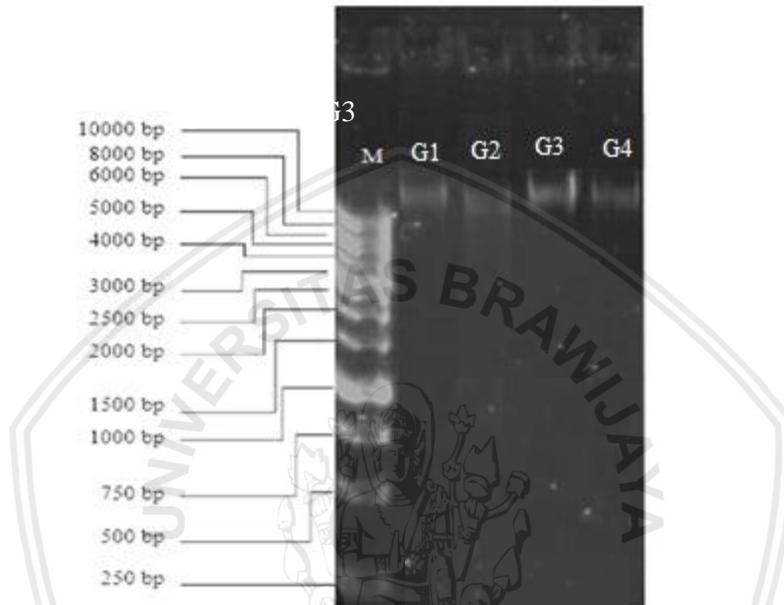
Menurut Ayu, dkk (2011) DNA dinyatakan murni apabila memiliki perbandingan A_{260} dan A_{280} yaitu 1,8 – 2,0. Kurangnya nilai absorbansi dari 1,8 dapat disebabkan adanya kontaminasi yang ditimbulkan oleh protein, sedangkan untuk nilai absorbansi di atas 2,0 disebabkan adanya kontaminasi dari RNA. Hasil kemurnian pada keempat sampel yang telah diuji, terdapat dua sampel GGWB1 dan GGWB3 yang menunjukkan hasil di bawah 1,8 yang menyatakan adanya kontaminasi dari

protein, sedangkan untuk sampel GGWB4 didapatkan nilai absorbansi di atas 2 menunjukkan adanya kontaminasi dari RNA. Kontaminasi protein mempunyai arti bahwa terdapat kontaminasi dari protein yang tidak terpurifikasi sempurna. Konsentrasi dan kemurnian hasil dari isolasi DNA dipengaruhi oleh kecepatan isolasi dan komposisi penambahan lisis buffer (Sholihah, 2014). Hasil dari isolasi yang dilakukan tetap diuji secara kualitatif untuk melihat hasil isolasi yang terkontaminasi protein atau RNA dapat digunakan untuk kemudian dilanjutkan sekuensing.

Tingkat kemurnian ditentukan dalam rasio antara A_{260} nm dan A_{280} nm pada sampel DNA. Nilai A_{260} menunjukkan nilai maksimal DNA yang dapat menyerap sinar UV, sedangkan A_{280} adalah nilai maksimal residu protein atau phenol dapat menyerap cahaya. Teknik PCR dapat digunakan untuk amplifikasi region genome DNA yang tidak diketahui dan DNA yang memiliki konsentrasi rendah dapat dilanjutkan untuk diamplifikasi tetapi memiliki resiko penempelan primer dapat tidak sesuai target. (holihah, 2014).

Uji kualitatif dilakukan dengan metode elektroforesis agarose 1%. Hasil dari isolasi DNA agarose 1% dapat dilihat pada **Gambar 5.1**. Elektroforesis adalah suatu metode peisahan yang memanfaatkan medan listrik yang dihasilkan oleh elektroda yang dapat memisahkan senyawa yang memiliki muatan berupa kation maupun anion. Elektroforesis membutuhkan media untuk pemisah seperti gel agarosa. Gel agarosa merupakan polisakarida yang diekstrak dari rumput laut. Agarosa sendiri bersifat non toksik sehingga tidak membahayakan pada saat digunakan (Langga dkk, 2012). Pembacaan menggunakan gel agarosa untuk DNA memerlukan DNA marker

ladder, digunakan DNA marker 1 kb karena dapat membantu menandai DNA lebih spesifik dari 250 bp hingga 10.000 bp (Saniy, 2014). Alat dari elektroforesis akan memberikan hasil berupa pita-pita pemisah senyawa, untuk kecepatan gerak molekul tergantung dari kekentalan medium serta pada bentuk molekulnya (Harahap. 2018).



Gambar 5.1 Hasil elektroforesis isolasi DNA total agarose 1%

Hasil uji kualitatif isolat DNA menggunakan mesin elektroforesis menunjukkan bahwa hasil keempat sampel di atas 10.000 bp, menunjukkan kualitas dari isolasi baik. Hasil isolasi DNA menunjukkan DNA dapat diisolasi dengan baik yang ditunjukkan dengan munculnya pita yang jelas dan terang dan berada di atas marker pada semua sumuran (Hidayati dkk., 2016). Hasil isolat DNA yang didapat selanjutnya digunakan untuk amplifikasi DNA dengan teknik PCR.

5.2 Hasil Amplifikasi Gen *Cyt-b* dengan Metode PCR

Amplifikasi gen *Cytochrome b* dilakukan bertujuan untuk mendapatkan fragmen gen *Cytochrome b* yang akan dianalisa untuk melihat persamaan antara

sekuen DNA Kasuari gelambir ganda di Eco Green Park. Desain primer berasal dari NCBI *Genebank* : NC_002778.2 421 bp *circular* antara 172 - 533 DNA *Casuarius casuarius cytochrome b gene*, mitochondrion, *complete genome*.

1	ATGGCCCCAA	ACATTGGGAA	ATCCCACCCT	CTACTCAAAA	TCATCAACAG
51	CTCCCTAATT	GATCTCCCTT	CCCCCTCGAA	CATCTCAGCC	TGATGAAACT
101	TCGGATCCCT	TCTAGGGATT	TGCCTAARTTA	CCCAAATCCT	CACAGGACTA
151	CTACTAGCTA	TGCACTACAC	AGCTGACACC	TCACTAGCCT	TCTCATCCGT
201	AGCCACACCC	TGCCGAAACG	TACAGTATGG	CTGACTAATT	CGTAACCTCC
251	ATGCCAACCG	AGCATCATTC	TTCTTCATCT	GCATCTACCT	TCACATCGGA
301	CGAGGGTTCT	ACTATGGCTC	CTATCTTTAT	AAAGAAACCT	GAAACACCGG
351	AGTAATCCTC	CTACTGACAT	TAATAGCAAC	TGCCTTCGTA	GGCTACGTCC
401	TACCATGAGG	ACAAATATCA	TTCTGAGGTG	CTACAGTCAT	CACAAACCTA
451	TTCTCAGGTA	TCCCCTACAT	TGGACAAACC	CTAGTAGAAT	GAGCCTGAGG
501	AGGTTTCTCA	GTAGACAACC	CAACACTCAC	ACGATTCTTT	GGCCTACATT
551	TCOTGCTCCC	ATTCCTAATC	GOTGGCATCA	CCCTCATTCA	CCTAACCTTC
601	CTTCACGAAT	COGGTCCAA	TAACCCCTTA	GGAATCGTCT	CCCCTGTGA
651	CAAAATCCCA	TTCCACCCAT	ACTTCTCCCT	AAAAGACATC	CTAGGGTTCA

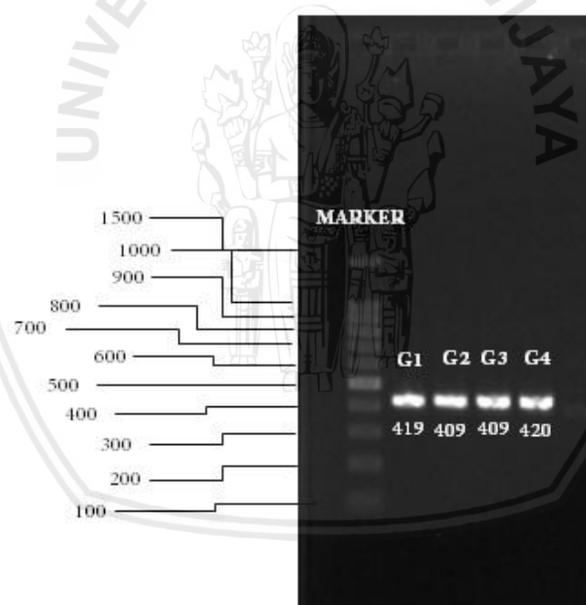
Gambar 5.2 *Origin* Oligo Nukleotida Gen Cyt-b
Keterangan : Biru: Primer *forward* Cyt-b kuning: Primer *reverse* Cyt-b
(Primer3plus, 2019).

Berdasarkan **Gambar 5.2** diketahui bahwa primer *forward* memiliki urutan basa nitrogen (CYTB_F) 5'- GCTGACACCTCACTAGCCTT - 3' (*length* : 20 bp; Tm : 56,8°C; GC : 55%) dan primer *reverse* (CYTB_R) 5'- AGGTGAATGAGGGTGATGCC -3' (*length* : 20 bp; Tm : 57,3°C; GC : 55 %) dengan target produk PCR 421 bp.

Program PCR yang digunakan meliputi denaturasi, *annealing*, dan ekstensi. Tahap pertama yaitu menggunakan mesin PCR Biorad predenaturasi dengan suhu 94°C selama 4 menit untuk menstabilkan suhu yang dilanjutkan denaturasi selama 30 detik suhu 94°C untuk memecah DNA *double helix* menjadi *single helix*, dilanjutkan *annealing* dengan suhu yang sudah ditentukan dan yang paling cocok dengan primer

yaitu 56°C dan ekstensi berlangsung sebanyak 35 siklus dengan suhu 72°C selama 7 menit untuk memperpanjang untai DNA.

Hasil PCR diuji secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa konsentrasi 1,8% . Penggunaan gel agarosa memiliki beberapa tingkatan konsentrasi, rentan yang biasa digunakan yaitu pada konsentrasi 0,2% hingga 3%, semakin rendah tingkat konsentrasi gel agarosa semakin cepat DNA fragmen melewatinya tetapi spesifikasi molekul yang melewati rendah, sehingga untuk mengetahui spesifikasi molekul yang melewatinya konsentrasi yang dibutuhkan semakin tinggi (Barril and Nates, 2012).



Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR pada Agarosa 1.7%

Keterangan: M: Marker 100bp, G1: GGWB1, G2: GGWB2, G3: GGWB3, G4: GGWB4

Hasil uji kualitas produk PCR masing – masing individu menunjukkan panjang *base pair* yaitu G1 (GGWB1) 419 bp, G2 (GGWB2) 409 bp, G3 (GGWB3) 409 bp,

G4 (GGWB4) 420 bp. Target *base pair* yang diinginkan adalah 421 bp. Hasil dari keempat sampel PCR mendekati dari target sehingga dapat digunakan untuk sekuensing.

5.3 Hasil Sekuensing Gen *Cyt-b*

Sekuensing DNA memiliki tujuan yaitu menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) pada suatu sampel DNA (Tasma, 2015). Keempat sampel yaitu GGWB1, GGWB2, GGWB3, dan GGWB4 dilakukan sekuensing. Metode yang digunakan yaitu metode sanger. Hasil sekuensing selanjutnya akan dibaca menggunakan program *Bioedit*. Hasil sekuen berupa grafik elektroferogram dan data berupa urutan basa hasil sekuensing dalam format FASTA. Urutan basa dapat dibaca melalui program BLAST untuk mengetahui kualitas hasil sekuensing, hasil yang didapat berupa presentasi dari *query coverage* dan *identity*.

Query coverage merupakan presentasi panjang sekuen sampel yang disejajarkan dengan panjang sekuen yang terdapat pada *genebank*. *Identity* merupakan persamaan hasil basa nukleotida sekuensing yang didapat dengan sekuen referensi (Newell *et al.*, 2013). Hasil *query coverage* dan *identity* dapat dilihat pada

Tabel 5.2

Tabel 5.2 *Query Coverage* dan *Identity* Sampel terhadap *Genebank* Kasuari Gelambir Ganda (NC_002778.2)

Sampel	Panjang Basa (bp)	<i>Query coverage</i>	<i>Identity</i>
GGWB1	397	95%	99%
GGWB2	395	95%	99%
GGWB3	394	95%	99%
GGWB4	401	95%	99%

Sampel GGWB1, GGWB2, GGWB3, GGWB4 memiliki *query coverage* sama yaitu 95% dengan *identity* mencapai 99%. Hasil sekuensing GGWB1 setelah dilakukan BLAST diketahui memiliki *query coverage* 95% di mana dari 397 total basa nukleotida, terdapat 395 segmen basa nukleotida yang sejajar dengan referensi pada titik 18-395 terhadap titik referensi 13.856-14.233 dengan *identity* 99% di mana dari 378 basa nukleotida terdapat 370 basa nukleotida yang sama (**Tabel 5.2 dan Gambar 5.4**)

Hasil sekuensing GGWB2 setelah dilakukan BLAST diketahui memiliki *query coverage* 95% di mana dari 395 total basa nukleotida, terdapat 394 segmen basa nukleotida yang sejajar pada titik 19-394 terhadap titik referensi 13.858-14.233 dengan *identity* 99% di mana dari 376 basa nukleotida terdapat 375 basa nukleotida yang sama (**Tabel 5.2 dan Gambar 5.5**).

Sampel GGWB3 memiliki hasil *query coverage* 95% dengan total basa nukleotida 394 terdapat 393 segmen basa nukleotida yang sejajar pada titik 18-393 terhadap titik referensi 13.858-14.233 dengan *identity* 99% di mana dari 376 basa nukleotida terdapat 375 basa nukleotida yang sama (**Tabel 5.2 dan Gambar 5.6**).

Sampel GGWB4 setelah dilakukan BLAST memiliki hasil *query coverage* 95% dengan total basa nukleotida 401 terdapat 395 segmen basa nukleotida yang sejajar pada titik 14-395 terhadap titik referensi 13.851-14.233 dengan *identity* 99% di mana dari 383 basa nukleotida terdapat 381 basa nukleotida yang sama (**Tabel 5.2 dan Gambar 5.7**).

Range 1: 13856 to 14233 GenBank Graphics ▼ Most Match ▲ Overview

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
693 bits(375)	0.0	377/378(99%)	0/378(0%)	Plus/Plus
Query 18	ACGTACAGTATGGCTGACTAATTCGTAACCTCCATGCAAAACGGAGCATCATTCTTCTTCA			77
Sbjct 13856	ACGTACAGTATGGCTGACTAATTCGTAACCTCCATGCAAAACGGAGCATCATTCTTCTTCA			13915
Query 78	TCTGCATCTACCTTCACATTGGACGAGGGTTCTACTATGGCTCCTATCTTTATAAAGAAA			137
Sbjct 13916	TCTGCATCTACCTTCACATCGGACGAGGGTTCTACTATGGCTCCTATCTTTATAAAGAAA			13975
Query 138	CCTGAAACACCGGAGTAATCCTCCTACTGACATTAATAGCAACTGCCTTCGTAGGCTACG			197
Sbjct 13976	CCTGAAACACCGGAGTAATCCTCCTACTGACATTAATAGCAACTGCCTTCGTAGGCTACG			14035
Query 198	TCCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCTACAGTCATCACAAACCTATTCTCAG			257
Sbjct 14036	TCCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCTACAGTCATCACAAACCTATTCTCAG			14095
Query 258	CTATCCCCACATTGGACAAACCTAGTAGAATGAGCCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACA			317
Sbjct 14096	CTATCCCCACATTGGACAAACCTAGTAGAATGAGCCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACA			14155
Query 318	ACCCAACACTCACACGATTTCTTTGCCCTACATTTCTGCTCCCATTCTAATCGCTGGCA			377
Sbjct 14156	ACCCAACACTCACACGATTTCTTTGCCCTACATTTCTGCTCCCATTCTAATCGCTGGCA			14215
Query 378	TCACCCTCATTACCTAA 395			
Sbjct 14216	TCACCCTCATTACCTAA 14233			

Gambar 5.4 Hasil BLAST gen Cyt-b sampel GGWB1 terhadap urutan nukleotida *genebank* NCBI: NC_002778.2
 Keterangan: *Query coverage* 95% dan *identity* 99%

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
689 bits(373)	0.0	375/376(99%)	0/376(0%)	Plus/Plus
Query 19	GTACAGTATGGCTGACTAATTCGTAACCTCCATGCAAAACGGAGCATCATTCTTCTTCATC			78
Sbjct 13858	GTACAGTATGGCTGACTAATTCGTAACCTCCATGCAAAACGGAGCATCATTCTTCTTCATC			13917
Query 79	TGCATCTACCTTCACATTGGACGAGGGTTCTACTATGGCTCCTATCTTTATAAAGAAACC			138
Sbjct 13918	TGCATCTACCTTCACATCGGACGAGGGTTCTACTATGGCTCCTATCTTTATAAAGAAACC			13977
Query 139	TGAAACACCGGAGTAATCCTCCTACTGACATTAATAGCAACTGCCTTCGTAGGCTACGTC			198
Sbjct 13978	TGAAACACCGGAGTAATCCTCCTACTGACATTAATAGCAACTGCCTTCGTAGGCTACGTC			14037
Query 199	CTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCTACAGTCATCACAAACCTATTCTCAGCT			258
Sbjct 14038	CTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCTACAGTCATCACAAACCTATTCTCAGCT			14097
Query 259	ATCCCCACATTGGACAAACCTAGTAGAATGAGCCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAC			318
Sbjct 14098	ATCCCCACATTGGACAAACCTAGTAGAATGAGCCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAC			14157
Query 319	CCAACACTCACACGATTTCTTTGCCCTACATTTCTGCTCCCATTCTAATCGCTGGCATC			378
Sbjct 14158	CCAACACTCACACGATTTCTTTGCCCTACATTTCTGCTCCCATTCTAATCGCTGGCATC			14217
Query 379	ACCCTCATTACCTAA 394			
Sbjct 14218	ACCCTCATTACCTAA 14233			

Gambar 5.5 Hasil BLAST gen Cyt-b sampel GGWB2 terhadap urutan nukleotida *genebank* NCBI: NC_002778.2
 Keterangan: *Query coverage* 95% dan *identity* 99%

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
689 bits(373)	0.0	375/376(99%)	0/376(0%)	Plus/Plus
Query 18	GTACAGTATGGCTGACTAATT	CGTAACCTCCATGCAAACGGAGCATCATTCTTCTTCATC	77	
Sbjct 13858	GTACAGTATGGCTGACTAATT	CGTAACCTCCATGCAAACGGAGCATCATTCTTCTTCATC	13917	
Query 78	TGCATCTACCTTCACATTGGACGAGGGTTCTACTATGGCTCCTATCTTTATAAAGAAACC	137		
Sbjct 13918	TGCATCTACCTTCACATCGGACGAGGGTTCTACTATGGCTCCTATCTTTATAAAGAAACC	13977		
Query 138	TGAAACACCGGAGTAATCCTCCTACTGACATTAATAGCAACTGCCTTCGTAGGCTACGTC	197		
Sbjct 13978	TGAAACACCGGAGTAATCCTCCTACTGACATTAATAGCAACTGCCTTCGTAGGCTACGTC	14037		
Query 198	CTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCTACAGTCATCACAACCTATTCTCAGCT	257		
Sbjct 14038	CTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCTACAGTCATCACAACCTATTCTCAGCT	14097		
Query 258	ATCCCCACATTGGACAAACCTAGTAGAATGAGCCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAC	317		
Sbjct 14098	ATCCCCACATTGGACAAACCTAGTAGAATGAGCCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAC	14157		
Query 318	CCAACACTCACACGATTCTTTGCCCTACATTTCTGCTCCCATTCCTAATCGCTGGCATC	377		
Sbjct 14158	CCAACACTCACACGATTCTTTGCCCTACATTTCTGCTCCCATTCCTAATCGCTGGCATC	14217		
Query 378	ACCTTCATTACCTAA	393		
Sbjct 14218	ACCTTCATTACCTAA	14233		

Gambar 5.6 Hasil BLAST gen Cyt-b sampel GGWB3 terhadap urutan nukleotida *genebank* NCBI: NC_002778.2

Keterangan: *Query coverage* 95% dan *identity* 99%

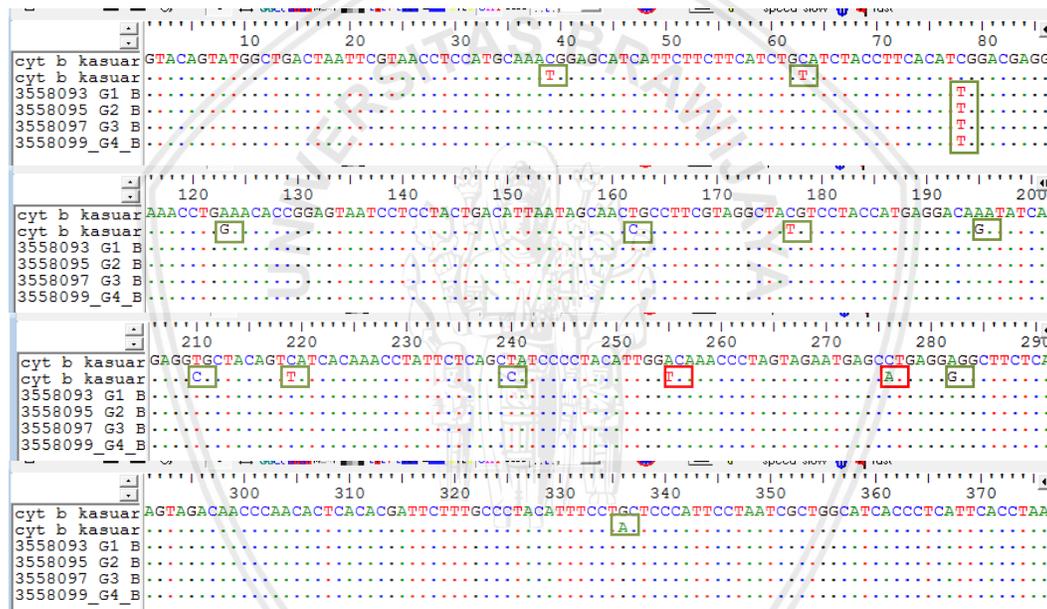
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
695 bits(376)	0.0	381/383(99%)	1/383(0%)	Plus/Plus
Query 14	CCG-AACGTACAGTATGGCTGACTAATT	CGTAACCTCCATGCAAACGGAGCATCATTCTT	72	
Sbjct 13851	CCGAAACGTACAGTATGGCTGACTAATT	CGTAACCTCCATGCAAACGGAGCATCATTCTT	13910	
Query 73	CTTCATCTGCATCTACCTTCACATTGGACGAGGGTTCTACTATGGCTCCTATCTTTATAA	132		
Sbjct 13911	CTTCATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGAGGGTTCTACTATGGCTCCTATCTTTATAA	13970		
Query 133	AGAAACCTGAAACACCGGAGTAATCCTCCTACTGACATTAATAGCAACTGCCTTCGTAGG	192		
Sbjct 13971	AGAAACCTGAAACACCGGAGTAATCCTCCTACTGACATTAATAGCAACTGCCTTCGTAGG	14030		
Query 193	CTACGTCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCTACAGTCATCACAACCTATT	252		
Sbjct 14031	CTACGTCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCTACAGTCATCACAACCTATT	14090		
Query 253	CTCAGCTATCCCCACATTGGACAAACCTAGTAGAATGAGCCTGAGGAGGCTTCTCAGT	312		
Sbjct 14091	CTCAGCTATCCCCACATTGGACAAACCTAGTAGAATGAGCCTGAGGAGGCTTCTCAGT	14150		
Query 313	AGACAACCCAACACTCACACGATTCTTTGCCCTACATTTCTGCTCCCATTCCTAATCGC	372		
Sbjct 14151	AGACAACCCAACACTCACACGATTCTTTGCCCTACATTTCTGCTCCCATTCCTAATCGC	14210		
Query 373	TGGCATCACCTCATTACCTAA	395		
Sbjct 14211	TGGCATCACCTCATTACCTAA	14233		

Gambar 5.7 Hasil BLAST gen Cyt-b sampel GGWB4 terhadap urutan nukleotida *genebank* NCBI: NC_002778.2

Keterangan: *Query coverage* 95% dan *identity* 99%

5.4 Hasil Penyejajaran Sekuen DNA Gen Cyt-b

Sekuen gen *Cyt-b* masing-masing sampel individu kasuari gelambir ganda GGWB1, GGWB2, GGWB3, dan GGWB4 disejajarkan menggunakan referensi dari database kasuari gelambir ganda NCBI *Genebank* : NC_002778.2. Perbandingan menggunakan 376 bp, dari *basepair* ke 226 sampai 601. Sekuen sampel kasuari gelambir ganda akan disejajarkan dengan gen *Cyt-b* kasuari kerdil NCBI *Genebank* : U76051.1.



Gambar 5.8 Penyejajaran sekuen sampel GGWB1, GGWB2, GGWB3, GGWB4 terhadap referensi kasuari gelambir ganda *genebank* dan kasuari kerdil *genebank*
 Keterangan: kotak hijau transisi dan kotak merah tranversi

Hasil sekuen sampel GGWB1, GGWB2, GGWB3 dan GGWB4 disejajarkan dengan sekuen referensi *genebank* kasuari gelambir ganda dan kasuari kerdil menggunakan algoritma *ClustalW Multiple Alignment* pada *software Bioedit* (**Gambar 5.8 dan Tabel 5.3**)

Mutasi dapat terjadi pada saat proses amplifikasi DNA, terdapat empat jenis mutasi yaitu transisi di mana bergantinya purin (A, G) menjadi purin (A, G) atau pirimidin (C, T) menjadi pirimidin (C, T), kemudian transversi yaitu purin (A, G) menjadi pirimidin (C, T) atau sebaliknya pirimidin (C, T) menjadi purin (A, G), selanjutnya delesi yaitu kurangnya basa nukleotida, terakhir inversi yaitu penambahan basa nukleotida (Warmadewi, 2017).

Tabel 5.3 Karakteristik Gen *Cyt-b* terhadap referensi Gen *Cyt-b* Kasuari Gelambir Ganda dan Kasuari Kerdil

Sampel	Jenis Mutasi	Jumlah	Total
Gen Referensi Kasuari Kerdil	Tranversi	2	13
	Transisi	11	
GGWB1	Tranversi	0	1
	Transisi	1	
GGWB2	Tranversi	0	1
	Transisi	1	
GGWB3	Tranversi	0	1
	Transisi	1	
GGWB4	Tranversi	0	1
	Transisi	1	
Total			17

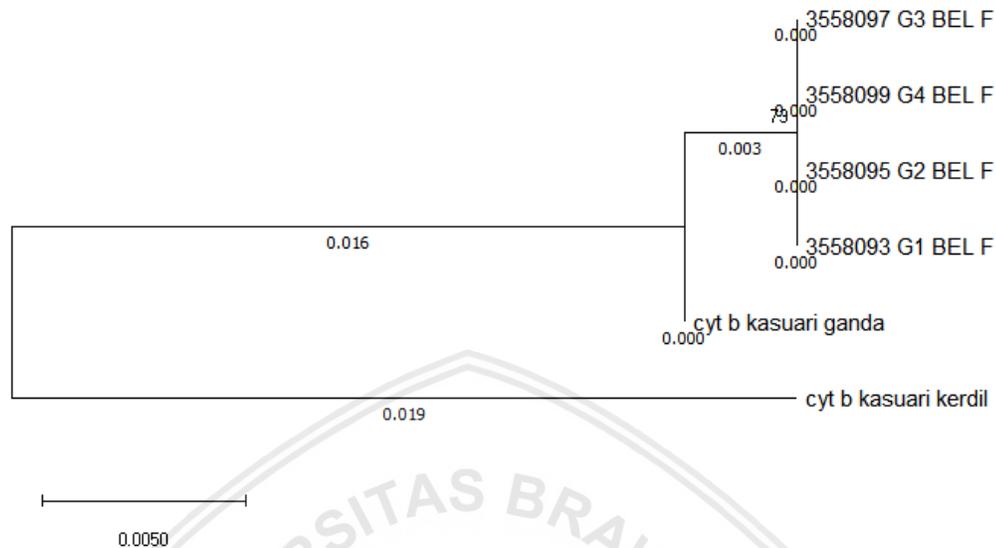
Empat sampel kasuari gelambir ganda dan data kasuari kerdil yang telah dibandingkan dengan data *genbank* kasuari gelambir ganda menunjukkan terdapat 17 basa nukleotida yang bermutasi, di mana 2 basa mengalami mutasi tranversi dan 15 basa mengalami mutasi transisi. Sampel GGWB1, GGWB2, GGWB3, dan GGWB4 semua mengalami hanya satu mutasi transisi, selanjutnya hubungan kekerabatan antar

kasuari gelambir ganda terhadap kasuari kerdil dapat dianalisa melalui pembuatan pohon filogenik.

5.5 Hubungan Kekerabatan Kasuari Gelambir Ganda Berdasarkan Pohon Filogenetik

Analisa filogenik spesies hewan dapat dilakukan dengan cara melihat morfologi dan gen – gen yang berada di sekuen DNA mitokondria. Filogenik penting untuk menjawab pertanyaan biologis seperti hubungan antar spesies atau gen dan penggunaan sekuen DNA mitokondria dapat memperjelas hubungan spesies secara evolusi yang kabur akibat variasi dari morfologi. Penyebutan dari pohon filogenetik berasal dari diagram yang dihasilkan seperti bercabang-cabang berbentuk pohon (Yang and Rannala, 2012).

Pembuatan pohon filogenetik dilakukan menggunakan *software* MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi X yaitu menggunakan *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1000x pengulangan. Dalam beberapa penelitian tentang aves untuk pembuatan pohon filogenik biasa menggunakan *neighbor joining* dan *minimum evolution* karena didasarkan pada jarak genetik. Perhitungan jarak genetik dan *sequence diversity* dilakukan dengan menggunakan perhitungan *pairwise distance* pada *software* MEGA X. *Pairwise distance* merupakan perhitungan statistik untuk menentukan jarak genetik. Pohon filogenetik pada sekuen gen *Cyt-b* seluruh sampel akan dijelaskan pada **Gambar 5.9**.



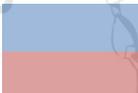
Gambar 5.9 Pohon filogenik kasuari gelambir ganda terhadap kasuari kerdil menggunakan metode *neighbor-joining* dengan replikasi *bootstrap* 1000x

Hasil dari pohon filogenik di atas adalah sampel G1 (GGWB1), G2 (GGWB2), G3 (GGWB3), dan G4 (GGWB4) merupakan *clade sister group* dengan jarak genetik sangat dekat hingga tidak terdapat jarak yaitu 0,000. *Clade* yang diisi oleh *Cyt-b* kasuari gelambir ganda merupakan referensi data *genebank* kasuari gelambir ganda NC_002778.2 bila dibandingkan dengan sampel memiliki jarak 0,003. *Clade* yang diisi oleh *Cyt-b* kasuari kerdil merupakan referensi data *genebank* kasuari kerdil U76051.1 termasuk *clade out group*, bila dibandingkan dengan sampel maka jarak genetiknya 0,038. Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan analisa pada sekuen yang digunakan dan menghitung dari mutasi yang ada yang selanjutnya akan dibentuk menjadi pohon filogenetik (Yang dan Rannala, 2012). Jarak genetik

dapat dilihat lebih lanjut menggunakan perhitungan *pairwise distance* yang akan dijelaskan pada **Tabel 5.4**.

Tabel 5.4 Presentasi Data *Pairwise Distance*

	1	2	3	4	5	6
1. Kasuari ganda						
2. kasuari kerdil	0.036					
3. GGWB1	0.003	0.038				
4. GGWB2	0.003	0.038	0.000			
5. GGWB3	0.003	0.038	0.000	0.000		
6. GGWB4	0.003	0.038	0.000	0.000	0.000	0,000

Keterangan :  = Intraspecies
= Interspecies

Jarak genetik antara referensi data *genebank* kasuari gelambir ganda (NC_002778.2) terhadap sampel GGWB1, GGWB2, GGWB3, dan GGWB4 adalah 0,003 (0,3%). Jarak genetik antara referensi data *genebank* kasuari gelambir ganda (NC_002778.2) dengan referensi data *genebank* kasuari kerdil (U76051.1) adalah 0,038 (3,8%). Jarak genetik antara GGWB1, GGWB2, GGWB3, dan GGWB4 yaitu 0,000 (0%) di mana tidak ada jarak genetik diantara mereka bila dilihat dari gen *Cyt-b* dan kemungkinan besar berasal dari indukan yang sama atau tetua yang sama, dilihat dari *clade* yang sejajar menandakan benar satu spesies dan dengan jarak 0% dari setiap individu.

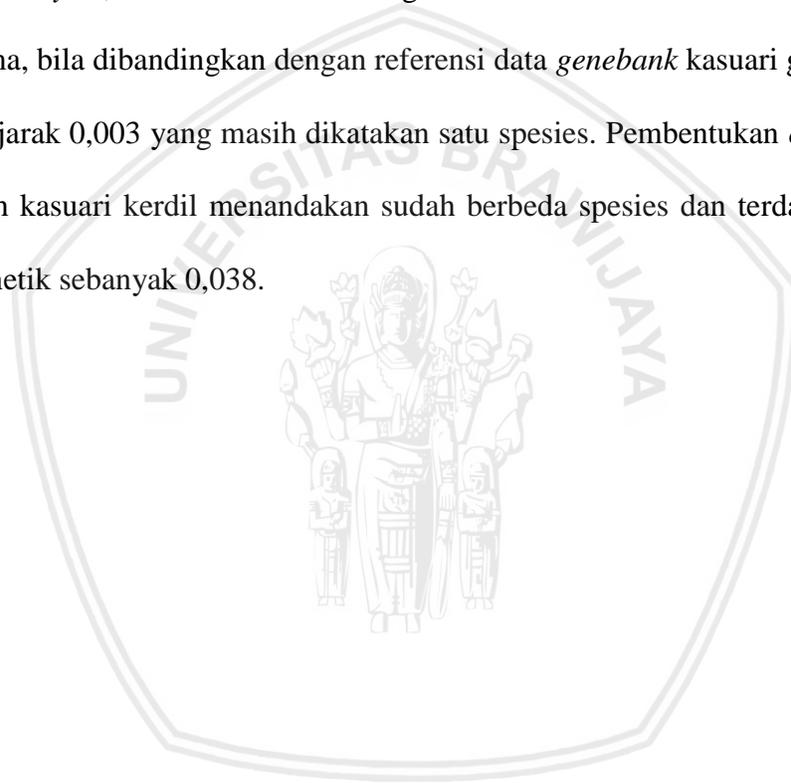
Menurut Bradley dan Baker (2001), jarak genetik $< 2\%$ menandakan adanya variasi intraspesies dan menurut Kartavtsev (2013), jarak genetik antara individu dalam spesies yang sama dan dalam populasi yang sama adalah 0,3-1,38%. Hasil jarak genetik pada pohon filogenetik dengan perhitungan *pairwise distance* adalah sama, sehingga data jarak genetik dapat dikatakan valid. Jarak genetik referensi data *genebank* kasuari gelambir ganda (NC_002778.2) yang merupakan referensi dari gen *Cyt-b* kasuari gelambir ganda jika dibandingkan dengan keempat sampel individu kasuari gelambir ganda di Eco Green Park memiliki angka di bawah 2%.

Menurut Kartavtsev (2013), jarak genetik interspesies yang masih berada pada satu genus adalah 0,93-10,31%, untuk jarak famili adalah 1,36-17,86%, serta ordo 3,88 hingga 26,36. Jarak antara referensi data *genebank* Kasuari kerdil (U76051.1) dibandingkan dengan keempat sampel kasuari gelambir ganda yaitu 0.038. Menurut hasil jarak genetik antara kasuari gelambir ganda pada sampel Eco Green Park dengan kasuari kerdil merupakan beda spesies yang masih berada pada satu genus.

Sequence diversity adalah nilai variasi sekuen per 100 basa nukleotida. Variasi sekuen dapat berupa *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) dan juga mutasi insersi dan delesi. Analisa secara Interspesies menggunakan *sequence diversity* dilakukan dengan membandingkan antara referensi data *genebank* kasuari kerdil (U76051.1) dengan data *genebank* kasuari gelambir ganda (NC_002778.2) dan masing-masing individu kasuari gelambir ganda. Perbandingan data *genebank* kasuari kerdil (U76051.1) dengan data *genebank* kasuari gelambir ganda (NC_002778.2) dan masing-masing individu kasuari gelambir ganda mendapatkan hasil yang sama yaitu

3,8 %. Berdasarkan hasil tersebut kasuari gelambir ganda (perwakilan data *genebank* dan sampel pada Eco Green Park) dengan kasuari kerdil tidak terlihat perbedaan yang signifikan berdasarkan dari *sequence diversity*.

Berdasarkan data pohon filogenik dan *pairwise distance* yang dibuat keempat sampel kasuari gelambir ganda tersebut tidak memiliki jarak genetik antar kasuari untuk gen *Cyt-b*, dan memiliki kemungkinan berasal dari indukan atau keturunan yang sama, bila dibandingkan dengan referensi data *genebank* kasuari gelambir ganda terdapat jarak 0,003 yang masih dikatakan satu spesies. Pembentukan *clade outgroup* baru oleh kasuari kerdil menandakan sudah berbeda spesies dan terdapat perbedaan jarak genetik sebanyak 0,038.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan sekuen gen *Cyt-b* jarak genetik keempat sampel memiliki jarak 2%, hal ini menunjukkan bahwa keempat sampel dekat dengan data *genebank* kasuari gelambir ganda (NC_002778.2). Semua sampel memiliki jarak genetik 0% atau bisa dikatakan tidak memiliki jarak genetik, sehingga keempat sampel ini berkerabat dekat atau berasal dari tetua yang sama.
2. Berdasarkan jarak genetik, kasuari gelambir ganda di Eco Green Park dan kasuari kerdil memiliki jarak 3,8% dan membuktikan berbeda spesies namun masih berada dalam 1 genus. Berdasarkan posisi dari pohon filogenetik didapatkan kasuari gelambir ganda di Eco Green Park dan kasuari kerdil berada pada posisi *out group*.

6.2 Saran

Upaya konservasi memerlukan penelitian kekerabatan lebih lanjut untuk kasuari gelambir ganda yang berada di lembaga konservasi eksitu maupun insitu dan untuk menghasilkan sebuah individu yang lebih baik maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap gen lainnya sehingga memberikan informasi genetik dan silsilah keturunan yang jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayu, B. P., S. R. Purbowatiningrum., N. L. Agustina., dan Aminin. 2011. Purifikasi DNA Kromosom *Geobacillus* sp. dYTae-14 Menggunakan Kolom Silika dengan Denaturasi Urea. *Jurnal Sains dan Matematika*, 19(4): 2
- Bradley R. D. and R. J. Baker. A Test Of The Genetic Species Concept: Cytochrome-B Sequences And Mammals. *Journal of Mammalogy*, 82(4): 960–973
- Bruce, M., Beehler. And T. K. Pratt. 2016. Birds of New Guinea: Description, Taxonomy, and Systematics. Princeton University Press, Princeton. 41.
- Elza, I. A., J. Scholahuddin, dan I. Arief. 1998. PCR (Polymerase Chain Reaction): Teknik dan Aplikasinya di Bidang Kedokteran Gigi. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*, 5(1): 44-45: 103
- Farias, I. P., G. Orti, I. Sampaio, H. Schneider, and A. Meyer. 2001. The *Cytochrome b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Jurnal Molecular Evolution*, 53(1): 89.
- Franca, L.T.C., E. Carrilho, and T.B.L. Kist. 2002. A Review of DNA Sequencing Techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics* 35: 169
- Handoyo, D. dan A. Rudiretna. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1): 23-24.
- Harahap, M. R. 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1): 22.
- Hidayat, Taufik. 2017. DNA Mitokondria (mtDNA) Sebagai Salah Satu Pemeriksaan Alternatif untuk Identifikasi pada Kasus Infantisida. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6(1): 215-216.
- Hidayati., E. Saleh., A. Tahrir. 2016. Identifikasi Keragaman Gen *Bmpr-1b* (*Bone Morphogenetic Protein Receptor Ib*) Pada Ayam Arab, Ayam Kampung Dan Ayam Ras Petelur Menggunakan Pcr-Rflp. *Jurnal Peternakan*, 13(1): 8
- Jannah, S. N. 2014. Analisis Sekuen Gen Sitokrom Oksidase I DNA Mitokondria Lalat Buah *Bacetrocera sp* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang.
- Kartavtsev Yuri. 2013. Sequence Diversity at Cyt-b and Co-1 mtDNA Genes in Animal Taxa Proved Neo-Darwinism. *J Phylogen Evolution Biol*, 1(1): 4.
- Khalishah, Rana. 2016. Analisis Kualitas Habitat Kasuari Gelambir Ganda (*Casuarius Casuarius*) dengan Menggunakan Software Invest Studi Kasus di Daerah Penghubung Taman Nasional Wasur dan Cagar Alam Bupul Kabupaten Merauke [Skripsi]. Program Studi Penginderaan Jauh Dan Sistem Informasi Geografi. Sekolah Vokasi. Universitas Gadjah Mada.

- Langga, I. M., M, Restu., T, Kuswinanti. 2012. Optimalisasi Suhu Dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi Dna Tanaman Bitti (*Vitex Cofassus Reinw*)Serta Analisis Keragaman Genetik Dengan Teknik Rapd-Pcr. *J. Sains & Teknologi*, 12(3): 272.
- Maghfiroh, A. 2011. Pengaruh Konservasi Sumber Daya Alam Terhadap Akhlak Siswa Kepada Lingkungan Hidup di Opa Plasma SMAN 1 Wonoayu Sidoarjo [Skripsi]. Fakultas Tarbiyah. Institue Agama Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya.
- May-Panloup, P., M. F. Chretien, Y. Malthiery, and P. Reyner, 2004. Mithochondries et Reproduction. *Medicine/Science*, 20(1): 780.
- Newell, P. D., A. D. Fricker., C. A. Roco., P. Chandransu., and S. M. Merkel. 2013. A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST. *Journal Of Microbiology & Biology Education*, 14(2): 240.
- Novitasari, D. A., R. Elyyra, dan D. I. Roslim. 2014. Teknik Isolasi dan Elektroforesis Dna Total pada Kryptopterus Apogon (Bleeker 1851) dari Sungai Kampar Kiri dan Tapung Hilir Kabupaten Kampar Provinsi Riau. *Jom FMIPA*, 1(2): 259-260.
- Rahawarin, Y. Y., E. Kilmaskossu, Y. Kerepea, W. Y. Mofu, dan R. Angrianto. 2014. Perburuan Kasuari (*Casuarius spp.*) Secara Tradisional oleh Masyarakat Suku Nduga di Distrik Sawaerma Kabupaten Asmat. *Jurnal Manusia dan Lingkungan*, 21(1): 99.
- Saniy, F. A. 2014. Keragaman dan Kekerabatan Genetik Ikan Mas (Strain Majalaya, Rajadanu, Subang), Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*), dan Giant Barb (*Catlocarpio siamensis*) Berbasis RAPD-PCR [Thesis]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Program Studi Perikanan. Universitas Padjajaran. Jatinangor.
- Sasmito, D. E. K., R. Kurniawan, dan I. Muhimmah. 2014. Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V. Yogyakarta. 94-98.
- Sholihah, S. M. 2014. Hubungan Kekerabatan Beberapa Kultivar Pisang (*Musa Sp.*) Untuk Sifat Ketahanan Terhadap Penyakit Berdasarkan *Resistance Gene Analog (Rga)*. Jurusan Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Suparman. 2012. Markah Molekuler dalam Identifikasi dan Analisis Kekerabatan Tumbuhan serta Implikasinya bagi Mata Kuliah Genetika. *Jurnal Bioedukasi*, 1(1): 60.
- Tasma, I. M. 2015. Pemanfaatan Teknologi Sekuensing Genom Untuk Mempercepat Program Pemuliaan Tanaman. *Jurnal Litbang*, 34(4): 160.

- Wandia, I. N. 2001. Genom Mitokondria. *Jurnal Veterinary*, 2(4): 132.
- Warmadewi, D. A. 2017. Mutasi Genetik. Fakultas Peternakan Universitas Udayana, Denpasar. 20.
- Widayanti, R., D. D. Soliha, D. Sajuthi, dan R. R. D. Perwitasari. 2004. Kajian Penanda Genetik Gen Cytochrome B pada *Tarsius* sp. *Jurnal Sain Vet*, 24(1): 3.
- Widowati, E. W. 2013. Desain Primer Sitokrom B (*cyt b*) Sebagai Salah Satu Komponen PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk Deteksi DNA Babi. Lembaga Penelitian Universitas Negeri Sunan Kalijaga, Yogyakarta.
- Wilcken, J. and L. Romer. 1997. Cassowary Husbandry Manual. Currumbin Sanctuary Conservation Unit., Australia. 31.
- Yang, Z. and B. Rannala. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews / Genetics*, 13(1): 303.





LAMPIRAN

Lampiran 1. Isolasi DNA

1. Sampel bulu kasuari yang telah dipotong kecil-kecil kurang lebih 0,5 cm dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml
2. Tambahkan (Proteinase K) sebanyak 20 μ L
3. Masukkan PBS sebanyak 300 μ L
4. Selanjutnya buffer AL dimasukkan sebanyak 200 μ L, kemudian divortex selama 15 detik dan diinkubasi selama 1 hari pada suhu 56°C
5. Etanol (96-100%) ditambahkan sebanyak 200 μ L, kemudian divortex selama 15 detik
6. Sentrifus selama 1 jam dengan kecepatan 8000 rpm, kemudian pindahkan ke *collection tube* baru dengan suhu 20°C
7. Buffer AW1 ditambahkan sebanyak 500 μ L, kemudian disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm dan dipindahkan ke *collection tube* baru
8. Tambahkan buffer AW2 sebanyak 500 μ L, kemudian disentrifus kembali selama 6 menit kecepatan 13.500 rpm dan dituangkan ke dalam *collection tube* baru
9. Tambahkan buffer AE sebanyak 100 μ L dan ditunggu selama 1 menit pada suhu ruang
10. Terakhir sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm

Lampiran 2. Uji Kualitas DNA

1. Bersihkan cetakan agarose dan diletakkan secara horizontal
2. Panaskan TBE sebanyak 35 ml di oven selama 30 detik bersama serbuk agarose 1% atau 0,35 gram hingga agarose larut
3. Kemudian tambahkan larutan EtBr pada larutan agarose sebanyak 1 μ l dan didinginkan
4. Siapkan sisir dan plate untuk membentuk sumuran
5. Selanjutnya larutan agarose dimasukkan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak terdapat gelembung udara
6. Gel didiamkan selama 10-20 menit pada suhu ruang hingga memadat dan diambil secara perlahan untuk diletakkan dalam *chamber* Bio-Rad
7. Masukkan sampel yang telah dibuat koktail ke dalam sumuran sebanyak 4 μ l
8. Kemudian larutan buffer elektroforesis (*running* TBE) dituangkan kedalam *chamber* hingga menutupi seluruh bagian gel
9. Marker DNA ladder dimasukkan ke dalam sumuran paling ujung kiri
10. kemudian *chamber* dihubungkan dengan power supply dan dinyalakan dengan tegangan 100 volt, arus listrik 400 mA selama 30 menit
11. Lakukan *running* dan setelah *running* gel elektroforesis selesai arus listrik diputuskan dan gel diangkat dari *chamber*. Pola pita dapat dilihat di bawah UV-Transilluminator
12. Terakhir hasil pada Bio-Rad Gel doc ez imager dibaca

Lampiran 3. NCBI Accession Number

GenBank - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U76051.1>

Casuarium bennetti cytochrome b gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds

GenBank: U76051.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: [🔍](#)

LOCUS CBU76051 1143 bp DNA linear VRT 24-JUL-2016
 DEFINITION Casuarium bennetti cytochrome b gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds.
 ACCESSION U76051
 VERSION U76051.1
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Casuarium bennetti
 ORGANISM *Casuarium bennetti*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Archelosauria; Archosauria; Dinosauria; Saurischia; Theropoda; Coelurosauria; Aves; Palaeognathae; Casuariiformes; Casuariidae; Casuarium.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1143)
 AUTHORS Lee, K., Feinstein, J. and Cracraft, J.
 TITLE Phylogenetic relationships of the ratite birds: resolving conflicts between molecular and morphological data sets
 JOURNAL (in) Mindell, D.P. (Ed.); AVIAN MOLECULAR EVOLUTION AND SYSTEMATICS: Academic Press; New York (1997) In press
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1143)
 AUTHORS Lee, K., Feinstein, J. and Cracraft, J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-OCT-1996) Department of Ornithology, American Museum of Natural History, Central Park West at 79th Street, New York, NY 10024, USA
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1143
 /organism="Casuarium bennetti"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:30463"

Change region shown
 Customize view
 Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence
 Related information
 Protein
 Taxonomy
 Recent activity
 Turn Off Clear
 Casuarium bennetti cytochrome b gene, mitochondrial gene encoding mitochond Nucleotide
 Casuarium bennetti CYTB (2) Nucleotide
 Casuarium casuarium mitochondrion, complete genome Nucleotide
 CYTB [Casuarium casuarium] Gene
 Casuarium casuarium CYTB (2) Nucleotide
 See more...

NCBI Reference Sequence: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_002778.2

Casuarium casuarium mitochondrion, complete genome

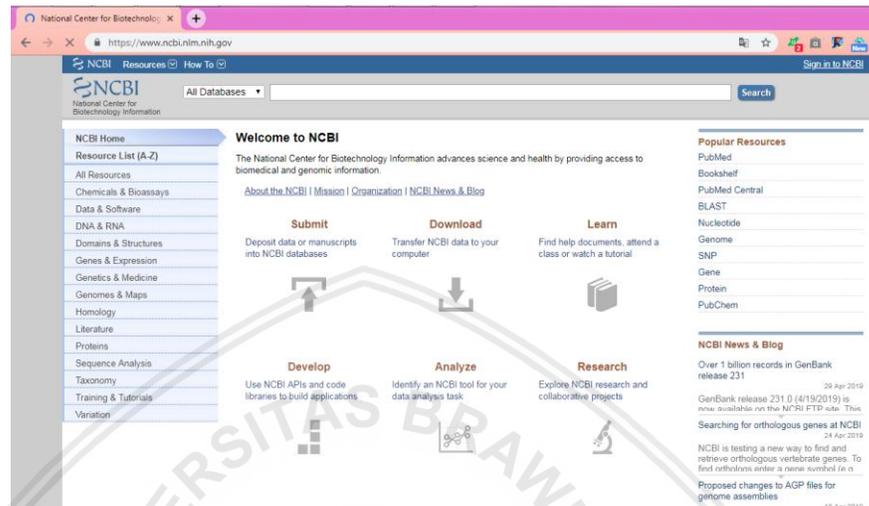
FASTA [Graphics](#)

Go to: [🔍](#)

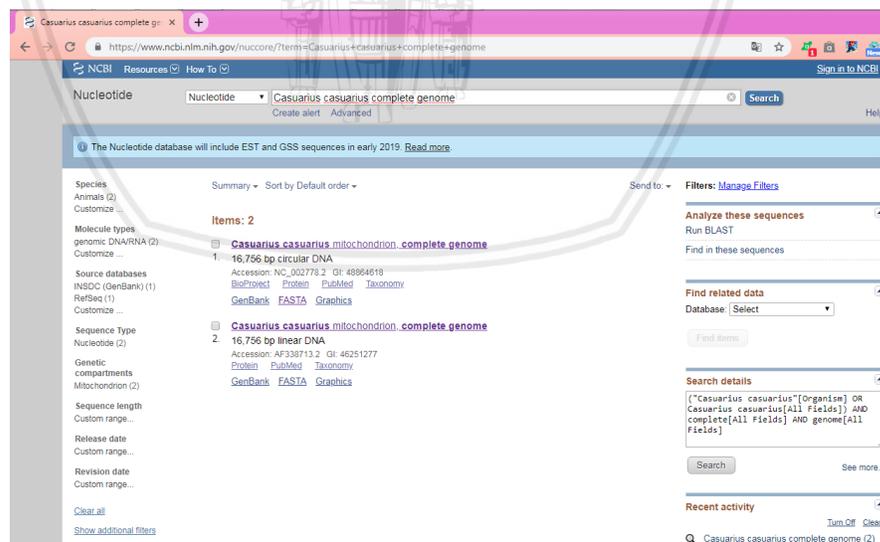
LOCUS NC_002778 16756 bp DNA circular VRT 01-FEB-2010
 DEFINITION Casuarium casuarium mitochondrion, complete genome.
 ACCESSION NC_002778
 VERSION NC_002778.2
 DBLINK Project: [10858](#)
 BioProject: [PRJNA10858](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE mitochondrion Casuarium casuarium (southern cassowary)
 ORGANISM *Casuarium casuarium*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Archelosauria; Archosauria; Dinosauria; Saurischia; Theropoda; Coelurosauria; Aves; Palaeognathae; Casuariiformes; Casuariidae; Casuarium.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 16756)
 AUTHORS Haddrath, O. and Baker, A.J.
 TITLE Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis
 JOURNAL Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 268 (1470), 939-945 (2001) [11270967](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 16756)
 CONSRTM NCBI Genome Project
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-JUN-2004) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA
 REFERENCE 3 (bases 1 to 16756)
 AUTHORS Haddrath, O. and Baker, A.J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (21-JAN-2001) Centre for Biodiversity and Conservation Biology, Royal Ontario Museum, 100 Queen's Park Crescent, Toronto, Ontario M5S 2C6, Canada
 COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AF338713](#).
 On Jun 17, 2004 this sequence version replaced [NC_002778.1](#).
 Genome sequence lacks part of non-coding region.
 COMPLETENESS: full length.
 FEATURES
 Location/Qualifiers

Customize view
 Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence
 Related information
 BioProject
 Protein
 PubMed
 Taxonomy
 Full text in PMC
 Gene
 Genome
 PubMed (Weighted)
 LinkOut to external resources
 BOLD Link [GBIR0241-06] [Barcodes of Life]
 Order ND5 cDNA clone/Protein/Antibody/IRNAi [OnGene]
 Order ND6 cDNA clone/Protein/Antibody/IRNAi [OnGene]

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



- b. *All Database* diganti dengan pilihan *Nucleotide* kemudian diisikan kata kunci pada pencarian yaitu *Casuarus casuarus complete genome*. Klik *search* hingga muncul tampilan berikut :



Casuarium casuarium mitochondrii

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_002778.2

Nucleotide

Advanced

The Nucleotide database will include EST and GSS sequences in early 2019. [Read more](#)

GenBank

Send to

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

BioProject

Protein

PubMed

Taxonomy

Full text in PMC

Gene

Genome

PubMed (Weighted)

Casuarium casuarium mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_002778.2

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to](#)

LOCUS NC_002778 16756 bp DNA circular VRT 01-FEB-2018

DEFINITION Casuarium casuarium mitochondrion, complete genome.

ACCESSION NC_002778

VERSION NC_002778.2

DBLINK Project: [10858](#)

BioProject: [PRJNA10858](#)

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE mitochondrion Casuarium casuarium (southern cassowary)

ORGANISM [Casuarium casuarium](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Archelosauria; Archosauria; Dinosauria; Saurischia; Theropoda; Coelurosauria; Aves; Palaeognathae; Casuariiformes; Casuariidae; Casuarium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 16756)

AUTHORS Haddad, O. and Baker, A. J.

TITLE Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis

JOURNAL Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 268 (1478), 939-945 (2001)

PUBMED 11379087

REFERENCE 2 (bases 1 to 16756)

CONSTRN NCBI Genome Project

DIRECT Direct Submission

COMMENT

c. Lakukan pencarian (ctrl+F) “CYTOCHROME B”.

Casuarium casuarium mitochondrii

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_002778.2

cytochrome b 1/2

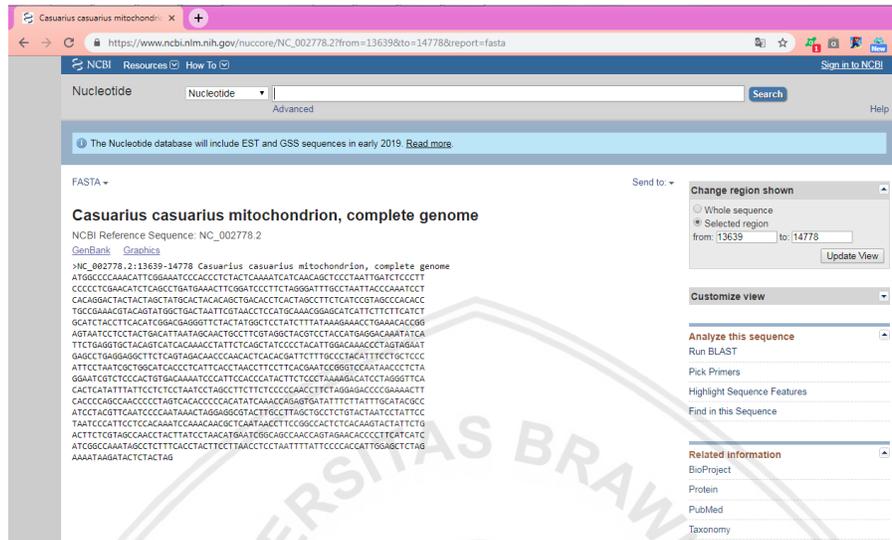
```

/product="NADH dehydrogenase subunit 5"
/protein_id="NP_115361.1"
/db_xref="GeneID:893250"
/translation="MGTLLNLSLTLTLIIPILLLSPKQNTPLSITSTVKT
AFTSLIHSIFZYSGTETIVSQVMFTPHFKIPLSKIQDQYSLFFPIALFVUSI
LQFATVIASEPHIKTFYLLFLIAHLTLIIMHFILFIGNEVGTISFLIGIM
HNRHMRITLQIVNIRISGVGLISQHLASTNTEIQDQSYETQPHLPLGLE
LAATGKSGQGLPHLPAHEGPTVSAALHNSHVVAGIFLLIRTPLLINQATLT
TCLLGLSTLFAATCALQNDIKKIIAFSTSSQLGVMVITGLNLPQLAFHISHTA
FKAVLPLCSGSIHSLGEGEIQKPSGLQLPITTTACLTIGSLAUNSTPLAGPYS
KOLIEELMNSVYLNTHALLLATSFTATYSENLTIVGKGFREPIIPIHEHQA
VPIPIRLALGSIAGLLTNSVLPKTPPHITPIVTKMAAIZVTELGHLALELNL
TNHLTPSKQNTYNSFSITLGYVNPLLHRLPPIHLLNSQKIASHLIDLSMKYKIPPEG
LADLQHGASTSTPLHTGLIXTVLGSFALSLILLSTQ"
13639..14778
/gene="CYTB"
/db_xref="GeneID:893250"
13639..14778
/gene="CYTB"
/codon_start=1
/transl_table=2
/product="Cytochrome b"
/protein_id="NP_115361.1"
/db_xref="GeneID:893250"
/translation="MSPRIKSHPLKIKINSLSLDLPSPSHSAHNFGLGCLIT
QILTGLLARRHTADSLAFSVAHTCRVQVGLIRNLHANGASFFICVLIHGGRG
FYGSVLYKETMIVGILLLHATAFVGVVLPQVQISFAGATVITNLFSAIPYIGQT
LVHAWGFSVDNPTLFRFALHFLPFLIAGITLIMLFLHESGSSNPLGVSHCDK
IPIVYVSLIIGLFTLIPLLIPLLAFFSPILLGDEHFTAWLVIPNIGISVFL
FAVALRISPKLGGVLAASVLLFLIPFLHKSQRSHITRPLSQVFLMLVANLL
ILTVISQVPEHPIIIIGQASFTYFLNLLLPFTIGALENNIL"
14783..14852
/product="tRNA-Pro"
14935..14996
/product="tRNA-Thr"
complement(15026..15547)
/gene="ND5"
/db_xref="GeneID:893248"
complement(15026..15547)
/gene="ND5"
/codon_start=1
/transl_table=2
ubunit 6"

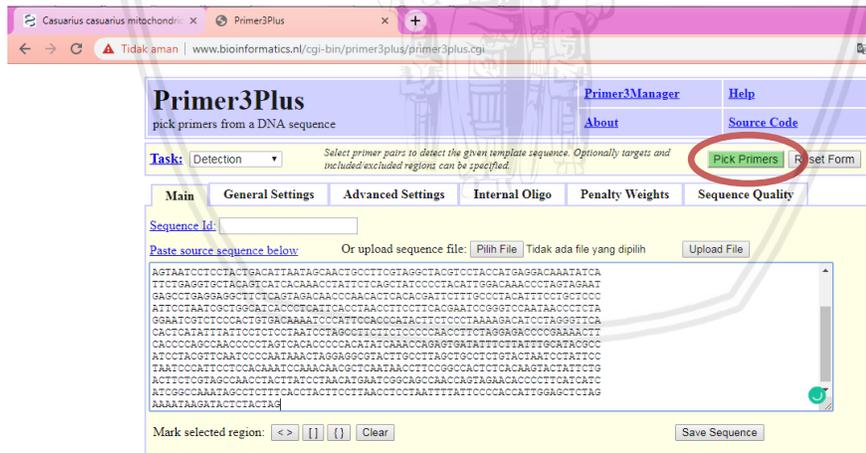
```

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_002778.2?from=13639&to=14778

Kemudian klik “CDS” untuk melihat letak FASTA dan klik “FASTA” untuk menyalin urutan basa.

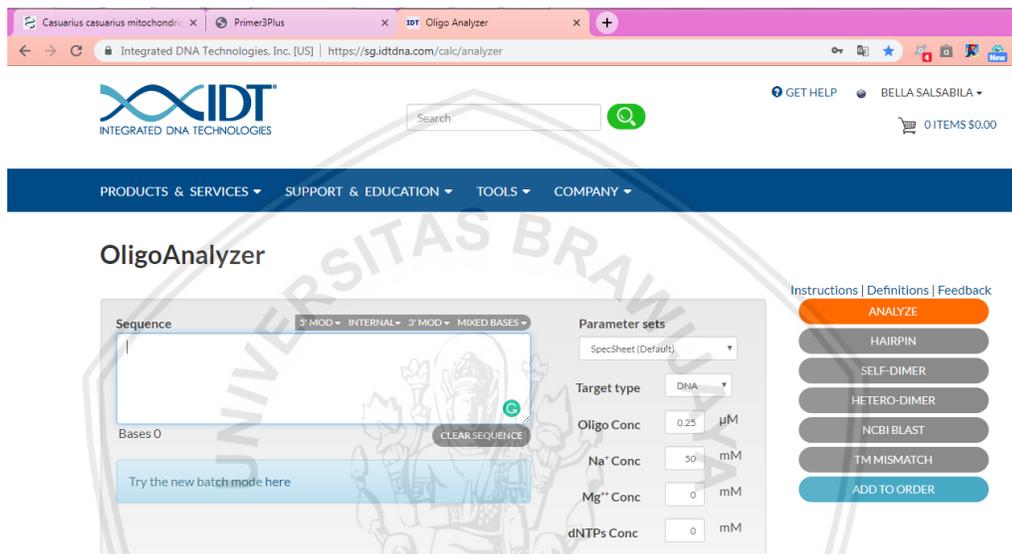


d. Dibuka website primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).



Sekuen dari FASTA NCBI disalin di *paste source sequence below* seperti gambar di atas dan diklik “Pick Primer”.

- e. Desain primer dilakukan sendiri hingga ditemukannya primer forward dan reverse yang sesuai dibantu menggunakan program *OligoAnalyzer Tool* yang berada pada website (<https://sg.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) untuk menentukan TM dan GC konten yang sesuai.



- f. Dimasukan pilihan primer *forward* atau *reverse* yang dipilih dan dilihat GC konten dan TM yang sesuai. Klik “Analyze” dan akan muncul tampilan berikut :

Results	
SEQUENCE	5'-GCT GAC ACC TCA CTA GCC TT-3'
COMPLEMENT	5'-AAG GCT AGT GAG GTG TCA GC-3'
LENGTH	20
GC CONTENT	55%
MELT TEMP	56.8 °C

Lampiran 5. Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 1059-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 : ANALISA KEKERABATAN ANTAR KASUARI
GELAMBIR **GANDA** (*Casuarus casuarius*) TERHADAP
KASUARI KERDIL (*Casuarus bennetti*) DI ECO GREEN
PARK BERDASARKAN SEKUEN GEN *cyt-B* DENGAN
METODE POLYMERASE CHAIN REACTION

PENELITI : SALSABILA WIDDHIE

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Maiang, 8 Januari 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

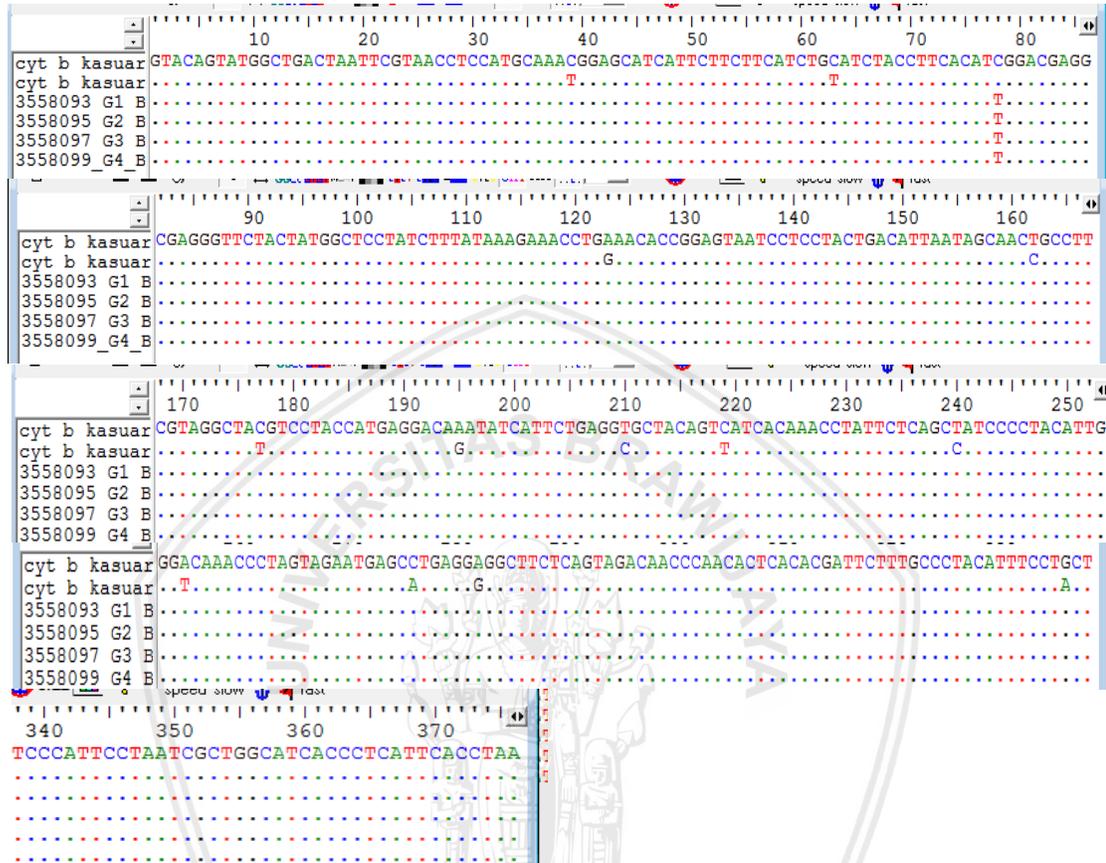


Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 6. Hasil Uji Kuantitas

		KEMENTERIAN AGAMA UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI LABORATORIUM JURUSAN BIOLOGI Jl. Gajayana 50 Malang						
HASIL ANLISA LABORATORIUM								
No Analisa : GA0404/01			Terima dari : Mentari			: FKH/Universitas Brawijaya (UB)		
Sampel : DNA			Instansi Asal : FKH/Universitas Brawijaya (UB)					
Janis Analisa: Spektrofotometer NANO Drop								
NO. 260/230	Type	Abs230	Abs260	Abs280	260/280	Con(ng/ul)	Time	
15	2.18 Dsdna	5.47	11.93	6.19	1.93	596.65	2019- 4- 4//16:13:45	
16	2.14 Dsdna	5.23	11.21	5.67	1.98	560.34	2019- 4- 4//16:14:26	
17	2.05 Dsdna	4.64	9.49	4.91	1.93	474.63	2019- 4- 4//16:15:19	
18	1.20 Dsdna	0.17	0.20	0.16	1.28	9.98	2019- 4- 4//16:16: 8	
19	2.06 Dsdna	28.81	59.48	53.58	1.11	2974.2	2019- 4- 4//16:16:47	
20	0.36 Dsdna	3.36	1.21	0.79	1.54	60.43	2019- 4- 4//16:17:23	
21	3.25 Dsdna	-0.22	-0.71	-0.65	1.10	-35.54	2019- 4- 4//16:18:33	
22	10.83 Dsdna	-0.06	-0.64	-0.33	1.92	-31.82	2019- 4- 4//16:19:16	
23	1.45 Dsdna	-0.05	-0.08	-0.10	0.80	-3.87	2019- 4- 4//16:19:51	
24	1.61 Dsdna	0.25	0.40	0.47	0.86	20.13	2019- 4- 4//16:20:260	

Lampiran 7. Penyejajaran Produk PCR Kasuari Gelambir Ganda dengan Data *Genebank* Kasuari kerdil



Lampiran 8. Grafik Elektroforegram Sampel Kasuari Gelambir Ganda

1. Sampel GGWB1



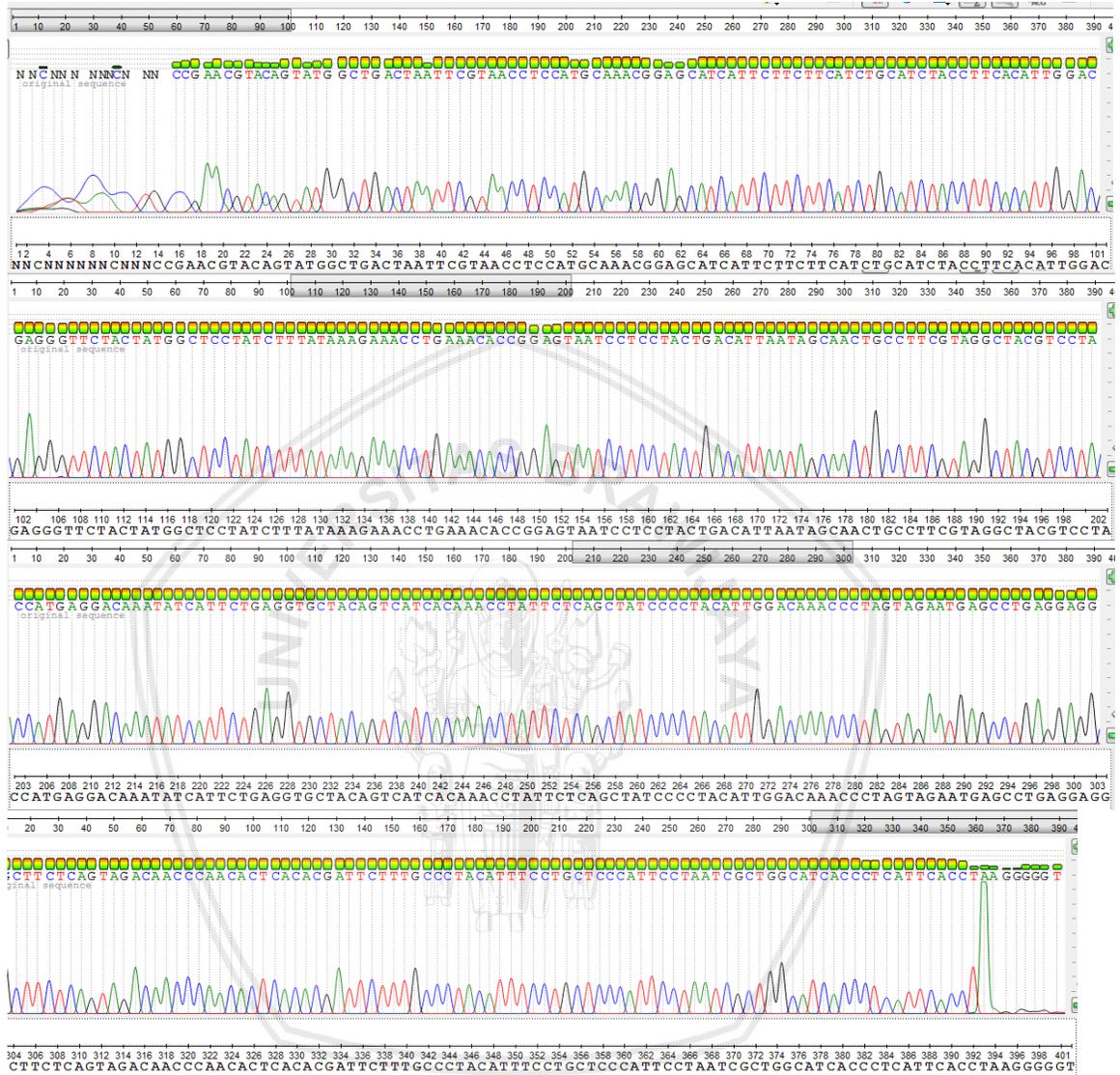
2. Sampel GGWB2



3. Sampel GGWB3



4. Sampel GGWB4



Lampiran 9. BLAST Sekuen DNA Sampel

a. *Paste* sekuen DNA yang akan di BLAST atau dengan memilih file sekuen dengan format *.txt* atau *fasta*. Lalu klik “BLAST”

The screenshot shows the NCBI Nucleotide BLAST search page. The 'Or, upload file' section is highlighted with a red box, showing a file selection button labeled 'Pilih File' and a file name '1st_BASE_35..._1_BEL_F.seq'. The 'BLAST' button at the bottom is also highlighted with a red box. The 'Program Selection' section shows 'Highly similar sequences (megablast)' selected.

b. Selanjutnya pilih daftar yang diinginkan untuk disejajarkan dengan sampel. Daftar tersebut diurutkan berdasarkan *max score*, *total score*, *query coverage*, *e-value*, dan *ident*.

Sequences producing significant alignments:

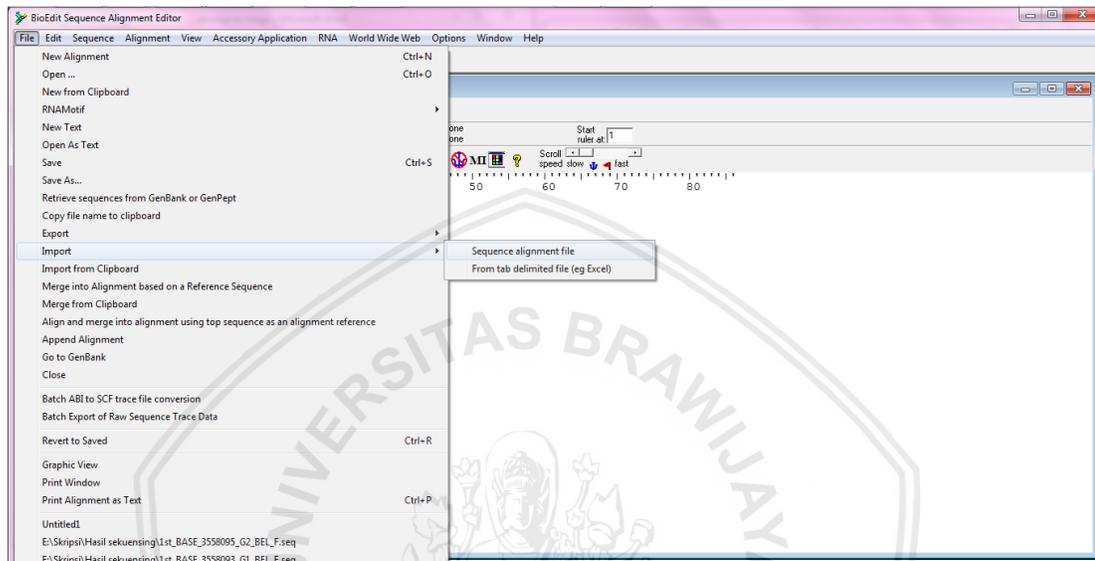
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

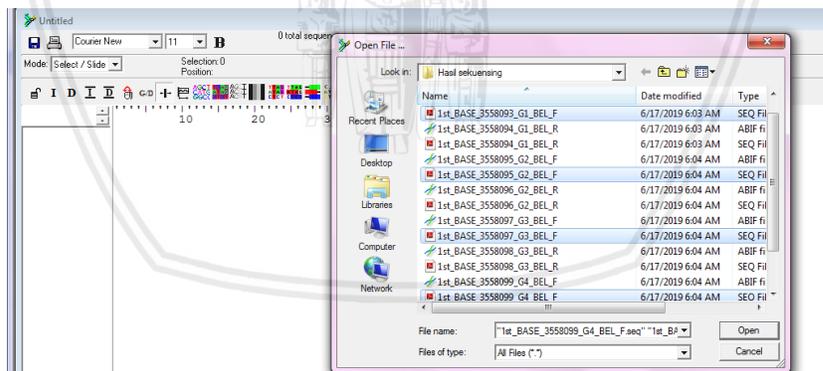
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Casuarinus casuarinus mitochondrion, complete genome	693	693	95%	0.0	99.74%	AF338713.2
<input type="checkbox"/> Casuarinus bennetti mitochondrion, partial genome	621	621	95%	6e-174	96.30%	U78051.1
<input type="checkbox"/> Casuarinus bennetti cytochrome b, gene, mitochondrial, gene encoding mitochondrial protein, complete cds	621	621	95%	6e-174	96.30%	U78051.1
<input type="checkbox"/> Asterix rowi voucher AV16697 cytochrome b, gene, partial cds, mitochondrial	484	484	94%	8e-133	89.89%	AY713359.1
<input type="checkbox"/> Asterix rowi voucher THN collection cytochrome b, gene, partial cds, mitochondrial	484	484	94%	8e-133	89.89%	AY713365.1
<input type="checkbox"/> Asterix rowi voucher S.24355.1 cytochrome b, gene, partial cds, mitochondrial	484	484	94%	8e-133	89.89%	AY713348.1

Lampiran 10. Pembacaan Hasil Sekuensing Menggunakan Bioedit

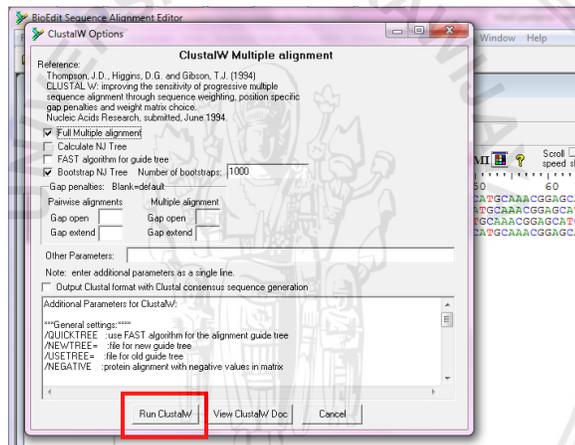
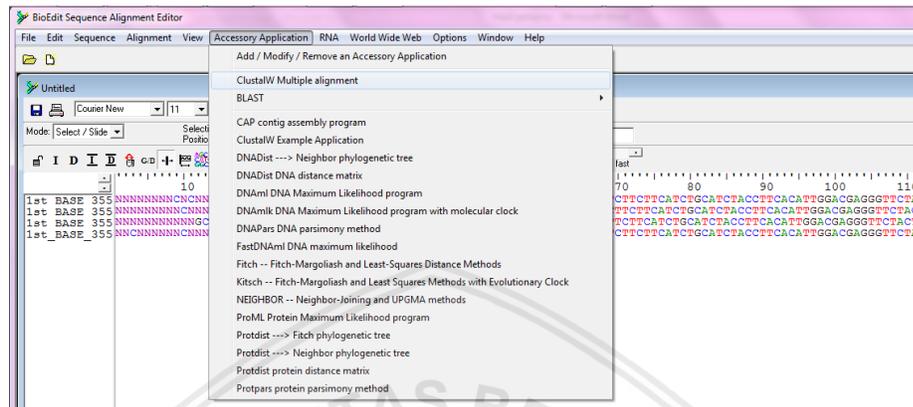
- a. Dibuka aplikasi BioEdit *Tools*, kemudian klik “File > New Alingment” setelah itu klik Tab File lagi > *Import*



- b. Pilih semua sekuens yang akan disejajarkan



- c. Kemudian untuk mensejajarkan sekuen, klik *Accessory Application* > *ClustalW*
Multiple Alignment > *Run ClustalW*



Lampiran 10. Persamaan Kasuari Gelambir Ganda dan Kasuari Kerdil

KASUARI KERDIL

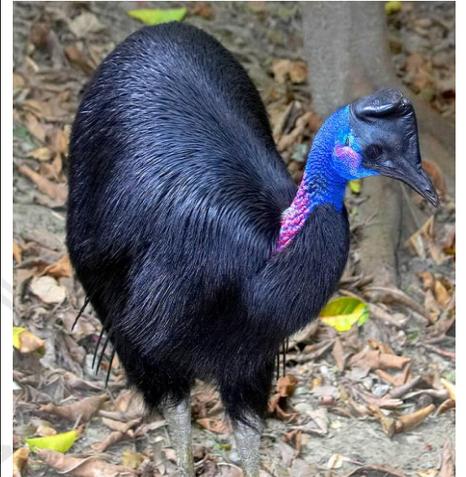
ANAKAN



REMAJA



DEWASA



KASUARI GELAMBIR GANDA

ANAKAN



REMAJA



DEWASA



Lampiran 11. Anatomi Osteo Kasuari

