

repository.ub.ac.id

**ANALISA VARIASI GENETIK INDIVIDUAL PADA MERAK  
JAWA (*Pavo muticus*) BERDASARKAN GEN *CYTOCHROME B*  
(CYT B) DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN  
REACTION* (PCR) DI ECO GREEN PARK**

**SKRIPSI**

Oleh:

**AMELIA DIYAN SAFITRI**

**155130101111056**



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



repository.ub.ac.id

**ANALISA VARIASI GENETIK INDIVIDUAL PADA MERAK  
JAWA (*Pavo muticus*) BERDASARKAN GEN *CYTOCHROME B*  
(CYT B) DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN  
REACTION* (PCR) DI ECO GREEN PARK**

**SKRIPSI**

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

**Oleh:**

**AMELIA DIYAN SAFITRI**

**155130101111056**



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

**2019**

**LEMBAR PENGESAHAN****Analisa Variasi Genetik Individual Pada Merak  
Jawa (*Pavo muticus*) Berdasarkan Gen *Cytochrome B*  
(*cyt b*) Dengan Metode *Polymerase Chain*  
*Reaction* (PCR) Di Eco Green Park****Oleh:****AMELIA DIYAN SAFITRI****155130101111056**

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

Pembimbing I

Pembimbing II

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

**drh. Yudit Oktanella, M.Si**  
NIP. 2014058810222001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

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

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Amelia Diyan Safitri  
NIM : 155130101111056  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul :

**Analisa Variasi Genetik Individual Pada Merak Jawa (*Pavo muticus*) Berdasarkan Gen *Cytochrome B* (Cyt B) Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Di Eco Green Park**

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 25 Juli 2019  
Yang menyatakan,

**(Amelia Diyan Safitri)**  
**NIM. 155130101111056**

**Analisa Variasi Genetik Individual Pada Merak  
Jawa (*Pavo muticus*) Berdasarkan Gen *Cytochrome B*  
(*cyt b*) Dengan Metode *Polymerase Chain*  
*Reaction* (PCR) Di Eco Green Park**

**ABSTRAK**

Merak Jawa (*Pavo muticus*) merupakan salah satu satwa endemik Indonesia yang berada di Pulau Jawa. Status konservasi Merak Jawa tergolong *Endangered* dan status perdagangannya adalah Apendiks II. Sehingga diperlukan tindakan *breeding* dan menjaga kemurnian genetik. Penelitian tentang keragaman genetik dilakukan dengan menggunakan DNA mitokondria (mtDNA). MtDNA hanya diturunkan oleh induk sehingga dapat digunakan untuk penentuan hubungan kekerabatan antar individu. Salah satu mtDNA yang digunakan untuk analisa kekerabatan adalah gen *cytochrome b* (*cyt b*). *Cyt b* digunakan untuk determinasi kekerabatan filogenetik pada spesies dikarenakan terdapat kodon yang bervariasi antar individunya. Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui variasi genetik molekuler antar individu Merak Jawa yang kemudian dibandingkan dengan Merak India (*Pavo cristatus*) dari data NCBI menggunakan sekuen gen *cyt b*. DNA didapatkan dari enam sampel bulu Merak Jawa, tiga jantan dan tiga betina yang berasal dari *Eco Green Park*, Batu. Sampel bulu diisolasi menggunakan *QIAGEN<sup>®</sup> DNA Mini Kit*. Primer yang digunakan dalam metode PCR adalah primer *Forward* (*Cyt b*) 5' TACTACTACACCGCAGACACA 3' dan *Reverse* (*Cyt b*) 5' GTTGGGAGTGGGCTAAGAAG 3'. Hasil PCR dilakukan sekuensing dengan metode *Sanger*. Analisa sekuen gen dilakukan menggunakan program *Bioedit* dan NCBI BLAST dengan *accession number* AF013763.1 untuk Merak Jawa (*Pavo muticus*) dan NC\_009260.1 untuk Merak India (*Pavo cristatus*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa antara sampel B2, J1, dan J2 tidak memiliki perbedaan basa nukleotida terhadap Merak Jawa referensi NCBI yaitu sebesar 0%. Sampel B2, J1, dan J2 memiliki perbedaan basa nukleotida terhadap Merak India referensi NCBI sebanyak 4,5%. Ketiga sampel merupakan kerabat dekat dalam satu spesies yang sama. Kesimpulan dari penelitian ini adalah Merak Jawa (*Pavo muticus*) di Eco Green Park berkerabat dekat dalam satu spesies yang sama dan memiliki karakter sekuen DNA yang berbeda dengan Merak India (*Pavo cristatus*).

**Kata kunci:** Merak Jawa, mtDNA, *cyt b*, PCR

**Analisa Variasi Genetik Individual Pada Merak  
Jawa (*Pavo muticus*) Berdasarkan Gen *Cytochrome B*  
(*cyt b*) Dengan Metode *Polymerase Chain*  
*Reaction* (PCR) Di Eco Green Park**

**ABSTRACT**

Javanese Peacock (*Pavo muticus*) is one of Indonesia's endemic animals in Java. The conservation status of the Java Peacock is classified as Endangered and its trading status is Appendix II. So that breeding and genetic purity are needed. Research on genetic diversity is carried out using mitochondrial DNA (mtDNA). MtDNA is only passed down by the parent so that it can be used to determine kinship relationships between individuals. One of the mtDNA used for kinship analysis is the cytochrome b (*cyt b*) gene. *Cyt b* is used for the determination of phylogenetic kinship in species because there are codons that vary between individuals. This study aims to determine the molecular genetic variation between Javanese Peacock individuals which is then compared with Indian Peacock (*Pavo cristatus*) from NCBI data using the *cyt b* gene sequence. DNA was obtained from six samples of Javanese Peacock feathers, three males and three females from Eco Green Park, Batu. Feather samples were isolated using QIAgen® DNA Mini Kit. The primers used in the PCR method are Forward (*Cyt b*) 5' primers 'TACACTACACCGCAGACACA 3' and Reverse (*Cyt b*) 5' 'GTTGGGAGTGGGCTAAGAAG 3'. The PCR results were sequenced using the Sanger method. Gene sequence analysis was performed using the Bioedit and NCBI BLAST programs with accession number AF013763.1 for Java Peacock (*Pavo muticus*) and NC\_009260.1 for Indian Peacock (*Pavo cristatus*). The results showed that between B2, J1 and J2 samples did not have nucleotide base differences to the NCBI reference Peacock Java, which was 0%. Samples B2, J1, and J2 have nucleotide bases differences to Indian Peacock referencing NCBI as much as 4,5%. The three samples are close relatives in the same species. The conclusion of this study is that Javanese Peacock (*Pavo muticus*) in Eco Green Park is closely related in the same species and has a different DNA sequence character with Indian Peacock (*Pavo cristatus*).

**Keywords :** *Javan Peafowl, mtDNA, cyt b, PCR*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena atas perkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Analisa Variasi Genetik Berdasarkan Gen *Cytochrome-B* (Cyt-B) pada Merak Jawa (*Pavo muticus*) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Eco Green Park**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc, sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS, IPU dan drh. Yudit Oktanella, M.Si sebagai dosen pembimbing atas bimbingan, nasihat, saran dan segala perhatian yang telah diberikan selama penyusunan skripsi ini.
3. Drh. Dodik Prasetyo, M.Vet., dan drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si., sebagai dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran selama pelaksanaan ujian skripsi.
4. Drh. Ahmad Fauzi, M.Sc selaku dosen pembimbing akademik atas bimbingannya dalam mengambil keputusan akademik.
5. Drh. Yuli sebagai dokter hewan Eco Green Park atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada penulis.

6. Keluarga penulis, Bapak Didik Sukarno, Ibu Agustina Tri Wiyanthi, kakak Taufan Adriansyah dan adik Bayu Adrianto atas segala pengorbanan, doa, materi, dan kasih sayang yang tak terhingga kepada penulis.
7. Teman seperjuangan penelitian “Payung Bakso” Anatasha Reza, Mentari, Hana Mitsuki, Yuliasuti Khairunisa, Salsabila Widdhie yang telah memberikan motivasi, masukan dan semangat selama proses penulisan skripsi kepada penulis. Sahabat seperjuangan “Pengabdi Mamang Apip” Afna Hanunnida, Nur Fitria Ramadhani, Devina Andini Ghassana dan Farazia Suryati Nazzilla, Angelia Primajayanti, Innas Ismi yang telah memberikan semangat serta motivasi kepada penulis untuk cepat lulus, M. Abdillah, Nur Jauharah Fitriani, Dinul Hamdi dan Ristanti Putri Utami yang telah memberikan waktu dan arahan kepada penulis serta anggota kelas *Classy Class* yang telah menemani proses belajar selama 4 tahun masa pendidikan dokter hewan.

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

Malang, 25 Juli 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Merak Jawa dan Merak India .....	7
2.2 DNA Mitokondria (mtDNA) .....	9
2.3 <i>Cytochrome B</i> (cyt b).....	12
2.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	13
2.4.1 Denaturasi Untai Ganda DNA .....	15
2.4.2 Annealing (Penempelan Primer).....	16
2.4.3 Extention (Pemanjangan Primer).....	16
2.5 Sekuensing DNA .....	17
2.6 Variasi Genetik .....	18
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ...</b>	<b>20</b>
3.1 Kerangka Konseptual.....	20
3.2 Bagan Kerangka Konseptual .....	23
3.3 Hipotesis Penelitian .....	24
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>26</b>



4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	26
4.2 Pemilihan Sampel Merak Jawa.....	26
4.3 Alat dan Bahan .....	27
4.4 Tahapan Penelitian.....	27
4.5 Rancangan Penelitian.....	28
4.6 Prosedur Kerja .....	29
4.6.1 Pengambilan Sampel Merak Jawa .....	29
4.6.2 Isolasi DNA .....	29
4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA .....	31
4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA.....	31
4.6.3.2 Uji Kualitas DNA.....	31
4.6.4 Desain Primer .....	33
4.6.5 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	33
4.6.6 Uji Kualitas Produk PCR.....	34
4.6.7 Sekuensing DNA .....	34
4.6.8 Analisa Data.....	35
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>36</b>
5.1 Hasil Isolasi DNA Merak Jawa.....	36
5.2 Amplifikasi Gen Cyt b dengan Metode PCR.....	39
5.3 Sekuensing Gen Cyt b.....	41
5.4 Analisa Sekuen DNA Gen Cyt b.....	43
5.5 Hubungan Kekerbatan Merak Jawa Berdasarkan Filogenik.....	44
<b>BAB 6 PENUTUP.....</b>	<b>48</b>
6.1 Kesimpulan.....	48
6.2 Saran.....	48
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>49</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>53</b>

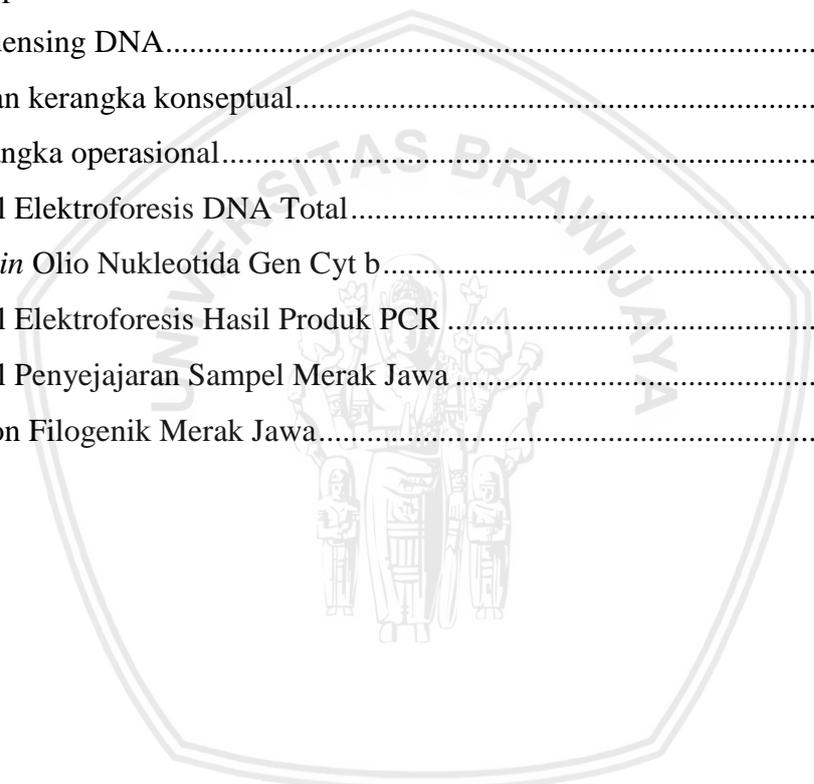
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Perbandingan klasifikasi Merak Jawa dan Merak India .....	7
4.1 Pemilihan sampel Merak Jawa.....	24
5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Merak Jawa.....	36
5.2 <i>Query Coverage</i> dan <i>Ident</i> Sampel .....	42
5.3 Jenis Mutasi pada Sampel .....	43
5.4 Persentase Data Perhitungan <i>Pairwise Distance</i> .....	45



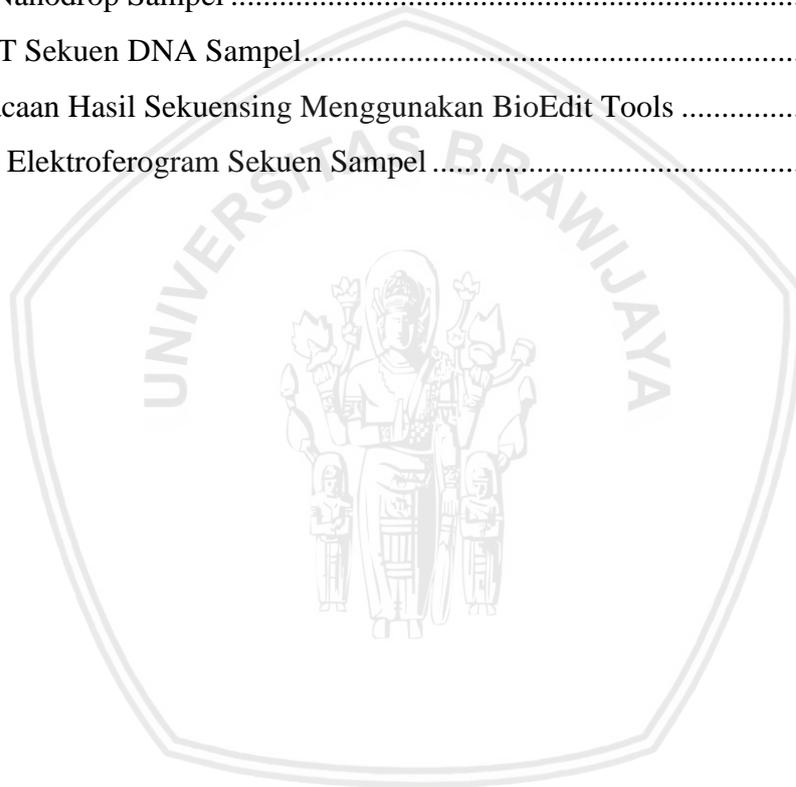
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 A. Merak Jawa betina; B. Merak Jawa jantan; C. Merak India betina; D. Merak India jantan .....	10
2.2 Struktur mitokondria .....	11
2.3 Tahapan PCR .....	16
2.4 Sekuensing DNA.....	17
3.1 Bagan kerangka konseptual.....	22
4.1 Kerangka operasional.....	27
5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total.....	38
5.2 <i>Origin</i> Olio Nukleotida Gen Cyt b.....	39
5.3 Hasil Elektroforesis Hasil Produk PCR .....	40
5.4 Hasil Penyejajaran Sampel Merak Jawa .....	43
5.5 Pohon Filogenik Merak Jawa.....	46



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Isolasi DNA.....	53
2. Uji kualitas DNA .....	54
3. Desain primer .....	55
4. Hasil Nanodrop Sampel .....	59
5. BLAST Sekuen DNA Sampel.....	60
6. Pembacaan Hasil Sekuensing Menggunakan BioEdit Tools .....	63
7. Grafik Elektroferogram Sekuen Sampel .....	65



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
°C	Derajat Celcius
µL	Mikroliter
AE	<i>Eluted buffer</i>
AL	<i>Lysis buffer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	<i>Base Pair</i>
CITES	<i>Convention on International Trade in Species of Wild Fauna and Flora</i>
Cm	Sentimeter
ddH <sub>2</sub> O	<i>Doubele distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Triphospat deoxynucleoside</i>
ddNTPs	<i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
g	Gram
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
kb	<i>Kilobase</i>
Kg	Kilogram
Mg	Magnesium
mL	Mililiter
mtDNA	<i>mintochondrial DNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>potential of Hydrogen</i>
Pmol	<i>Picomol</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan flora dan faunanya. Salah satu fauna endemik Indonesia adalah burung merak atau *peacock* yang masuk ke dalam genus *Pavo*. Genus *pavo* memiliki 2 spesies di antaranya ialah *Pavo muticus* (Merak Jawa), dan *Pavo cristatus* (Merak India). Kedua burung tersebut memiliki morfologi yang hampir sama, hanya saja terdapat perbedaan warna di mana Merak Jawa (*Pavo muticus*) dominan berwarna hijau sedangkan Merak India (*Pavo cristatus*) dominan berwarna biru.

Merak Jawa (*Pavo muticus*) adalah satwa endemik di Pulau Jawa yang saat ini statusnya dilindungi oleh undang-undang berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian No. 66/KPTS/Um/2/1973; Keputusan Menteri Kehutanan No. 301/Kpts-II/1991 dan PP No. 7 tahun 1999 (Takandjandji dan Sawitri, 2010). Status burung Merak Jawa menurut IUCN (2018), *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* adalah *Endangered* atau terancam punah.

Merak Jawa memiliki panjang tubuh 180-250 cm untuk jantan dan 100-110 cm untuk betina. Merak Jawa berukuran besar, memiliki leher yang panjang, ekor panjang, warna bulu yang dominan hijau dan berwarna biru pada mahkotanya. Perbedaannya dengan Merak Jawa betina adalah ukuran tubuh yang lebih kecil, bulu yang agak kusam dan tidak mempunyai ekor panjang seperti jantan (Winnasis., dkk, 2011).

Menurunnya populasi Merak Jawa disebabkan oleh rusaknya habitat dan perburuan liar. Jumlah populasi Merak Jawa sekitar 10.000-19.000 individu menurut IUCN (2018). Perburuan liar pada Merak Jawa dipicu oleh potensi yang dimiliki satwa tersebut, seperti keindahan bulu, suara yang merdu, keunikan bentuk dan tingkah laku. Oleh karena itu burung ini tergolong langka dan bernilai ekonomis tinggi. Populasi Merak Jawa semakin menurun dengan semakin banyaknya kawasan hutan yang dijadikan sebagai lahan pertanian, perladangan, dan pemukiman penduduk (Takandjandji dan Sawitri, 2010). Untuk mengatasi penurunan populasi burung Merak Jawa (*Pavo muticus*) secara drastis, perlu dilakukan pembinaan habitat dan peningkatan terhadap pengawasan. Pengawasan yang dapat dilakukan adalah mengetahui kekerabatan antar spesies untuk mengetahui adanya *inbreeding* (perkawinan sedarah) yang memungkinkan adanya penurunan kemampuan dalam reproduksi, kondisi fisik dan penampilan yang buruk (Thohari, 1987).

*Inbreeding* merupakan perkawinan antara individu yang berkerabat lebih dekat dari kekerabatan rata-rata dalam populasi. Individu berkerabat adalah yang mempunyai tetua bersama atau moyang bersama beberapa generasi sebelumnya. Keuntungan dari *inbreeding* adalah peningkatan persentase pasangan gen homozigot dan turunya jumlah pasangan gen heterozigot. Sedangkan kerugian dari *inbreeding* adalah memburuknya kemampuan reproduksi dan produksi dari hewan tersebut (Warmadewi., dkk, 2015).

Selain pengawasan pada perkembangbiakannya, populasi Merak Jawa juga ditinjau dari kemurnian spesiesnya. Spesies Merak India (*Pavo cristatus*) yang

berasal dari genus yang sama dengan Merak Jawa (*Pavo cristatus*) memiliki persebaran yang kemungkinan saling tumpang tindih karena persebaran Merak Jawa yang luas (Kushwaha and Kumar, 2016). Maka dari itu untuk menghindari adanya persilangan antara Merak Jawa (*Pavo muticus*) dan Merak India (*Pavo cristatus*) dilakukan upaya penelitian tingkat molekuler untuk menentukan kemurnian dari Merak Jawa (*Pavo muticus*).

Kesamaan genetik antar spesies dalam satu genus atau famili dapat ditentukan dengan menganalisis mtDNA (DNA Mitokondria). MtDNA merupakan struktur terbesar dalam sitoplasma sel. Jumlah mitokondria dalam satu sel bervariasi dari ratusan sampai ribuan tergantung kebutuhan sel terhadap energi (Wandia, 2001). Salah satu gen yang berada di dalam mtDNA adalah *Cytochrome B* (cyt b).

Gen *Cytochrome B* (cyt b) merupakan transmembran protein yang penting dalam rantai respirasi seluler organisme yang dikodekan oleh mitokondria. Adanya variasi urutan pada cyt b menyebabkan gen ini banyak digunakan untuk membandingkan spesies dalam genus atau famili yang sama. Keunikan sekuen gen cyt b yaitu terdapat bagian yang bersifat kekal di dalam tingkat spesies sehingga dapat digunakan untuk mengelompokkan berdasarkan jenis hewan atau untuk penentuan hubungan kekerabatan antar jenis hewan (Widayanti, 2006).

Berdasarkan pertimbangan di atas, penelitian ini dilakukan untuk melakukan analisa variasi genetic individual pada Merak Jawa (*Pavo muticus*) dan dibandingkan dengan Merak India (*Pavo cristatus*) berdasarkan gen *Cytochrome b* (cyt b) dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu, sebagai berikut:

- 1) Bagaimana variasi genetik individual berdasarkan sekuen gen *Cytochrome B* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Merak Jawa (*Pavo muticus*) di Eco Green Park?
- 2) Bagaimana tingkat kekerabatan individual Merak Jawa (*Pavo muticus*) dan antar spesies dengan Merak India (*Pavo cristatus*) berdasarkan sekuen gen *Cytochrome B* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Eco Green Park?

## 1.3 Batasan Masalah

- 1) Sampel bulu yang digunakan yaitu bulu Merak Jawa (*Pavo muticus*) sejumlah enam sampel yang diperoleh dan disetujui oleh Eco Green Park Batu.
- 2) DNA diisolasi dari bulu Merak Jawa (*Pavo muticus*) menggunakan metode dari *Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit*.
- 3) Amplifikasi DNA gen *Cytochrome B* Merak Jawa (*Pavo muticus*) dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* menggunakan sepasang primer Cyt B dari database NCBI Genebank: *Forward* (Cyt b) 5' TACTACTACACCGCAGACACA 3' dan *Reverse* (Cyt b) 5' GAAGAATCGGGTGAGGGTTG 3'.

- 4) Metode PCR dilakukan melalui tahapan berikut: predenaturasi 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) 52,8°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 1 menit, dan *post extension* 72°C selama 7 menit.
- 5) Sekuensing DNA dilakukan dengan metode dideoksi sanger berdasarkan *dye terminator labelling* menggunakan sepasang primer *Forward* (AMG\_F) 5' TACTACTACACCGCAGACACA 3' dan *Reverse* (AMG\_R) 5' GAAGAATCGGGTGAGGGTTG 3'.
- 6) Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen DNA dan tingkat kekerabatan dan variasi genetik antar individu Merak Jawa (*Pavo muticus*) di Eco Green Park Batu dan dibandingkan dengan Merak India (*Pavo cristatus*) menggunakan program Bioedit dan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI serta program MEGA.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

- 1) Mengetahui variasi genetik individual berdasarkan sekuen gen *Cytochrome B* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Merak Jawa (*Pavo muticus*) di Eco Green Park.
- 2) Mengetahui tingkat kekerabatan individual Merak Jawa (*Pavo muticus*) dan antar spesies dengan Merak India (*Pavo cristatus*) berdasarkan sekuen gen

*Cytochrome B* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di eco Green Park.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi genetik berupa perpustakaan gen untuk keperluan pengembangan konservasi berupa pengaturan *breeding* untuk menambah populasi satwa dengan menjaga kemurnian genetik Merak Jawa (*Pavo muticus*) di Eco Green Park.





## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Merak Jawa dan Merak India

Burung merak di dunia diketahui terdapat 3 jenis yang berbeda. Dua diantaranya berada di Asia dan satu di Afrika. Burung merak yang paling populer dan didistribusikan secara luas adalah burung Merak Jawa (*Pavo muticus*) dan Merak India (*Pavo cristatus*). Perbandingan klasifikasi dari burung Merak Jawa dan Merak India dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

**Tabel 2.1** Perbandingan Klasifikasi Merak Jawa dan Merak India (Lukanov, 2011).

	<b>Merak Jawa (<i>Pavo muticus</i>)</b>	<b>Merak India (<i>Pavo cristatus</i>)</b>
<b>Kingdom</b>	Animalia	Animalia
<b>Filum</b>	Chordata	Chordata
<b>Kelas</b>	Aves	Aves
<b>Ordo</b>	Galliformes	Galliformes
<b>Famili</b>	Phasianidae	Phasianidae
<b>Subfamili</b>	Phasianinae	Phasianinae
<b>Genus</b>	Pavo	Pavo
<b>Spesies</b>	<i>Pavo muticus</i>	<i>Pavo cristatus</i>

Merak Jawa (*Pavo muticus*) dikenalkan pertama kali di Eropa oleh Aldrovandi pada awal abad XVII sebagai *Pavo laponensis*. Pada awal abad XIX dijelaskan bahwa ada dua subspecies dari Merak Jawa oleh Francois Levaillant dan George Shaw. Sedangkan pada tahun 1949 Jean Theodore Delacour menyatakan bahwa terdapat tiga subspecies dari Merak Jawa. Merak Jawa dinyatakan sebagai spesies terancam punah dalam daftar IUCN *red list* (Lukanov, 2011).

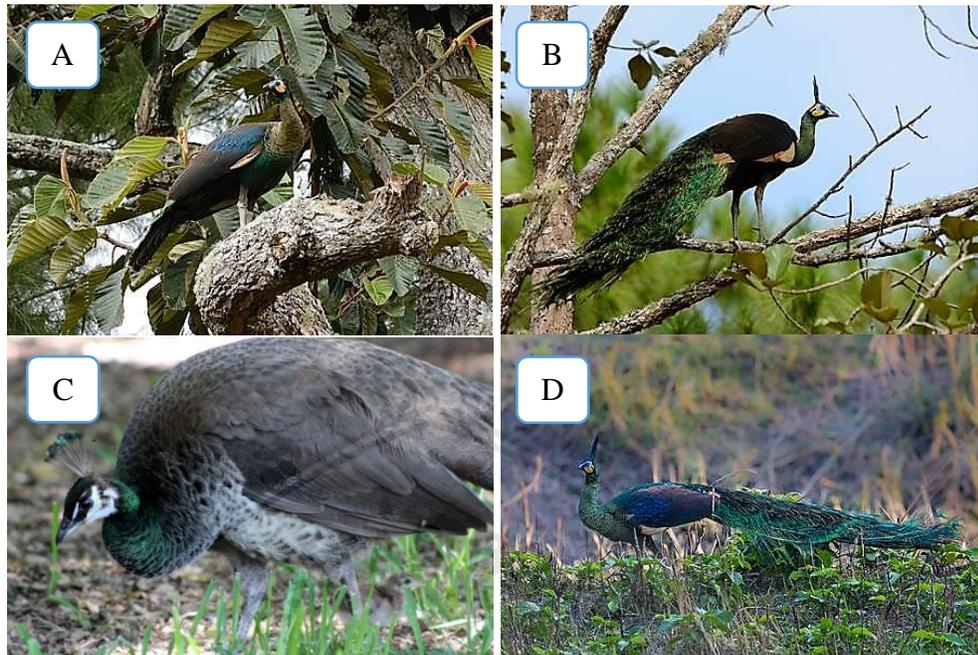
Merak India (*Pavo cristatus*) adalah burung nasional India dan dihormati oleh masyarakat Yunani kuno. Merak India pertama kali dijelaskan dan diklasifikasikan oleh Linnaeus dalam "*Systema Naturae*" pada tahun 1758. Selama dua abad terakhir, dalam suatu percobaan telah menciptakan banyak mutasi warna pada Merak India. Asosiasi Peafowl Serikat (UPA) di Amerika Utara dijelaskan bahwa kemungkinan variasi warna dan mutasi sebagian besar dari Merak India (Lukanov, 2011).

Merak Jawa (*Pavo muticus*) didistribusikan di Assam Selatan, Burma, Thailand, Indo-China, Malaya dan Jawa. Merak Jawa mempunyai tiga subspecies, yakni *Pavo muticus imperator*, *Pavo muticus spicifer* dan *Pavo muticus muticus*. *Pavo muticus spicifer* didistribusikan di India Barat Laut yang diperkirakan sudah punah. *Pavo muticus imperator* tersebar di Burma Selatan, Thailand, China Selatan, Vietnam dan Laos. *Pavo muticus muticus* tersebar di Pulau Jawa dan sudah dinyatakan punah di Malaya (Hernowo, 1999). Sedangkan Merak India tersebar di seluruh Negara India. Rentang geografis Merak Jawa dan Merak India umumnya tidak tumpang tindih. Namun rentang distribusi Merak Jawa meluas 1500-1800 m sedangkan Merak India

terbatas pada dataran rendah dan seringkali kurang dari 600 m (Kushwaha and Kumar, 2016).

Habitat dari Merak Jawa adalah hutan terbuka, hutan sekunder, hutan sungai dan tepi hutan. Merak Jawa di Taman Nasional Ujung Kulon lebih memilih hutan terbuka dengan semak-semak dan area terbuka sebagai tempat merumput untuk makan (Hernowo, 1999). Sedangkan habitat dari Merak India adalah hutan terrestrial dan seringkali ditemukan berkembangbiak dengan baik di daerah hutan atau di perkotaan (Kushwaha and Kumar, 2016).

Merak Jawa mempunyai bulu yang berwarna hijau keemasan. Burung jantan dewasa berukuran sangat besar dengan penutup ekor yang sangat panjang. Di atas kepalanya terdapat jambul tegak. Burung betina berukuran lebih kecil dari burung jantan. Bulu-bulunya kurang mengkilap, berwarna hijau keabuan dan tanpa dihiasi bulu penutup ekor. Memiliki aksen warna hitam di sekitar mata dan warna kuning cerah di sekitar telinga (Pravitasari, 2018). Sedangkan Merak India mempunyai warna dominan biru. Kepala, dada dan leher berwarna biru dan bulu-bulu di sisi kepala dan leher bagian atas berwarna hijau kebiruan. Warna bulu Merak India betina tidak lebih mencolok dari jantan. Bagian leher, punggung dan mantel sakrum berwarna coklat-keabuan dan leher bagian atas memiliki warna hijau kebiruan (Lukanov, 2011). Perbedaan morfologi antara Merak Jawa dan Merak India terdapat pada **Gambar 2.1**

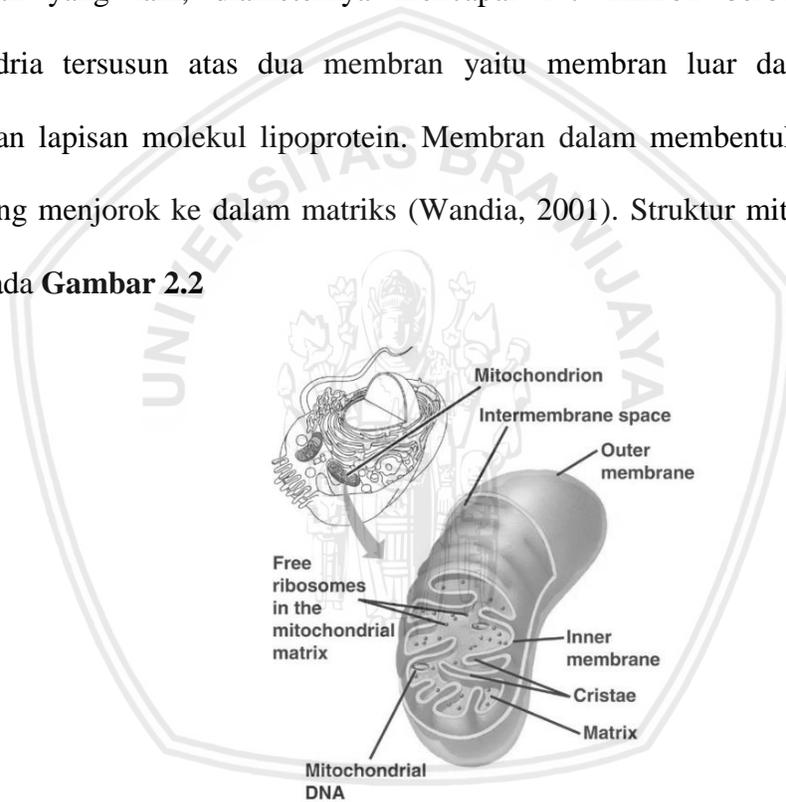


**Gambar 2.1** Berbagai jenis merak dengan jenis kelamin berbeda A. Merak Jawa betina; B. Merak Jawa jantan (Tonusin, 2016); C. Merak India betina; D. Merak India jantan (Saetia, 2016).

Masalah utama tingkat populasi Merak Jawa adalah banyaknya manusia yang mengkonsumsi telur dan daging mereka dan degradasi habitat yang menyebabkan penurunan populasi. Sementara itu tempat pelestarian Merak Jawa juga dirasa kurang memenuhi kebutuhan Merak Jawa itu sendiri seperti tempat bersarang, area bertengger, tempat makan dan minum, dan pemahaman tentang pola perilaku Merak Jawa (Hernowo, 1999). Sedangkan Merak India dilaporkan mengalami perburuan liar untuk diambil bulu dan dagingnya yang kemudian digunakan untuk membuat kerajinan tangan atau dijadikan obat-obatan. Selain itu kerusakan habitat juga menyebabkan menurunnya populasi Merak India (Kushwaha and Kumar, 2016).

## 2.2 DNA Mitokondria (mtDNA)

Mitokondria merupakan struktur terbesar dalam sitoplasma sel. Jumlah mitokondria dalam satu sel bervariasi dari ratusan sampai ribuan tergantung kebutuhan sel terhadap energi. Ukuran dan bentuk mitokondria berbeda-beda, beberapa di antaranya hanya berdiameter beberapa ratus milimikron dengan bentuk globular. Sedangkan yang lain, diameternya mencapai 1-7 mikron berbentuk filamen. Mitokondria tersusun atas dua membran yaitu membran luar dan dalam yang merupakan lapisan molekul lipoprotein. Membran dalam membentuk lekukan atau krista yang menjorok ke dalam matriks (Wandia, 2001). Struktur mitokondria dapat dilihat pada **Gambar 2.2**



**Gambar 2.2** Struktur mitokondria (Susmiarsih, 2010)

mtDNA mempunyai 2 untai yaitu untai Heavy (H) yang kaya dengan guanine dan untai Light (L) yang kaya dengan sitosin. mtDNA merupakan DNA yang padat gen dan hampir tidak mempunyai intron, berukuran sebesar 16569 pasang basa (pb) yang membentuk 37 gen. untai H menyandi 13 polipeptida untuk protein kompleks

rantai respirasi, 22 tRNA dan 2 rRNA (12S dan 16S) yang berfungsi dalam proses sintesis protein mitokondria. Ketiga belas polipeptida meliputi 7 sub unit (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 dan 6) dari kompleks I rantai respirasi, satu sub unit (apositokrom b) dari kompleks III, tiga sub unit (CO I, II, III) dari kompleks IV dan dua sub unit (ATP ase 6 dan ATP ase 8) dari kompleks V (Susmiarsih, 2010).

Secara umum, mtDNA terdiri atas daerah pengkode dan non pengkode. Daerah non pengkode ini memiliki variasi tinggi pada tiap individu yang disebut *Displacement loop* (D-loop) sehingga seringkali digunakan untuk keperluan filogenetik. Berbeda halnya dengan DNA inti, DNA mitokondria diwariskan melalui garis keturunan induk. Hal ini terjadi karena hampir tidak adanya rekombinasi DNA mitokondria dari pejantan dan DNA mitokondria dari induk saat pembuahan sel telur oleh sperma. Saat terjadi pembuahan, bagian ekor sperma dilepaskan sehingga hampir tidak ada DNA mitokondria dari pejantan yang masuk ke dalam sel telur. Oleh karena itu, mtDNA bersifat haploid karena diturunkan dari induk ke seluruh keturunannya (Satiyarti., dkk, 2017).

### **2.3 Cytochrome B (Cyt b)**

Gen *cytochrome B* (cyt b) merupakan transmembrane protein yang penting dalam rantai respirasi seluler organisme. Gen cyt b mtDNA dapat digunakan sebagai parameter klasifikasi pada berbagai tingkatan taksa, karena nilai mutasi pada gen ini berbeda berdasarkan posisi kodonnya. Kodon pertama dan kedua pada cyt b mtDNA memiliki nilai gamma yang rendah. Hal ini berarti bahwa kodon pertama dan kedua pada gen cyt b memiliki nilai substitusi yang rendah atau tidak bervariasi antar

individu. Sebaliknya, kodon ketiga memiliki nilai gamma yang tinggi. Hal ini berarti bahwa kodon ketiga memiliki nilai substitusi yang tinggi, yang berarti memiliki variasi antar individunya. Sebagian besar substitusi pada kodon ketiga bersifat *saturation effect*. *Saturation effect* adalah perubahan basa nukleotida yang tidak diikuti dengan perubahan asam amino yang ditranslasikan (Rahman, 2010).

Gen *cyt b* dikodekan oleh mitokondria. Adanya variasi urutan pada *cyt b* menyebabkan gen ini banyak digunakan untuk membandingkan spesies dalam genus atau family yang sama. Keunikan sekuen gen *cyt b* yaitu terdapat bagian yang bersifat kekal di dalam tingkat spesies, sehingga dapat digunakan untuk pengelompokan berdasarkan jenis hewan atau untuk penentuan hubungan kekerabatan antar jenis hewan (Widayanti, 2006).

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

*Polymerase chain reaction* (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah template DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA template; dNTPS (*Deoxynucleotide triphosphates*); buffer PCR; magnesium klorida ( $MgCl_2$ ) dan enzim polymerase DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu pra-denaturasi DNA template, denaturasi DNA template, penempelan primer pada template (*annealing*),

pemanjangan primer (*extension*) dan pemantapan (*post extension*). Tahap denaturasi template DNA sampai pemanjangan orimer (*extension*) merupakan tahapan berulang, di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Siklus PCR dapat dilihat pada **Gambar 2.3**.

#### **2.4.1 Denaturasi Untai Ganda DNA**

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polymerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi untai tunggal. Proses ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat dan mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktivitas enzim Taq polymerase. Aktivitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5; 95 dan 97,5°C (Yusuf, 2010).

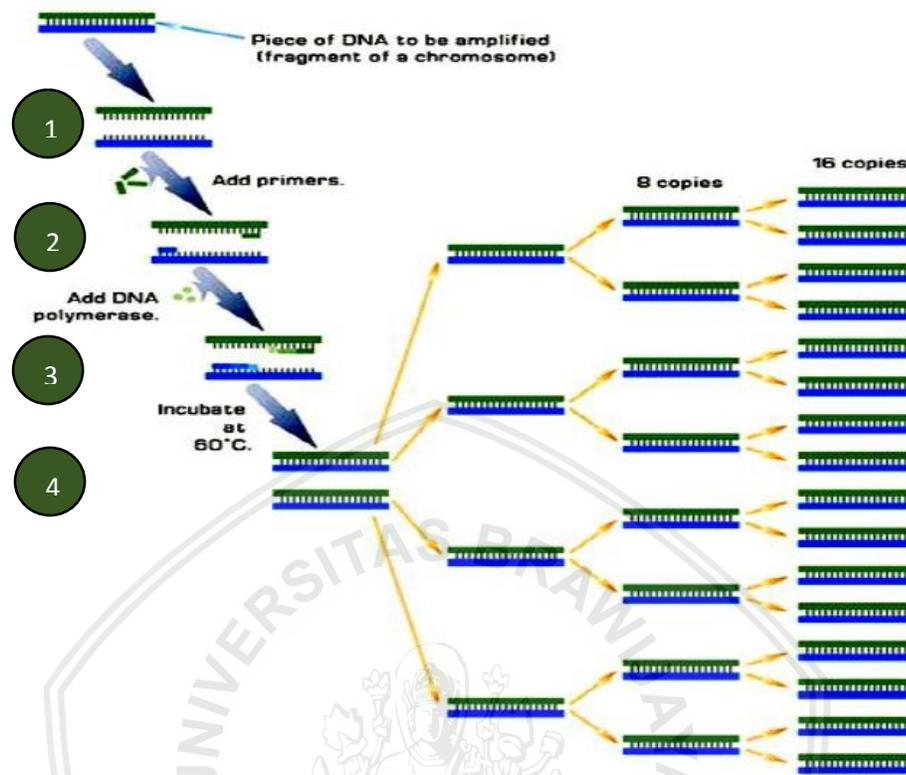
#### **2.4.2 Annealing (penempelan primer)**

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18-25 basa, mengandung 50-60% G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu annealing pada umumnya dalam PCR adalah 30-45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi

temperaturnya. Kisaran temperature penempelan yang digunakan adalah 36-72°C, namun suhu yang biasa digunakan adalah 50-60 °C (Yusuf, 2010).

#### **2.4.3 Extention (Pemanjangan primer)**

Pada tahap ini, taq polymerase memulai aktivitasnya yaitu memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukelotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35-100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR di waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda (Yusuf, 2010).



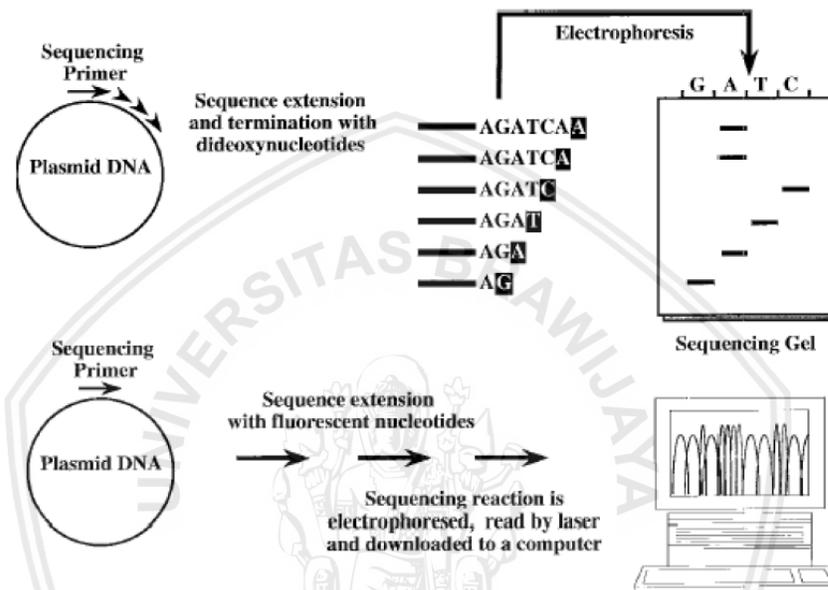
**Gambar 2.3** Tahapan PCR: (1) denaturasi pada suhu 90-95°C, (2) annealing pada suhu 37-65°C, (3) elongasi pada suhu 72°C, (4) siklus pertama selesai (Yusuf, 2010).

## 2.5 Sekuensing DNA

Sekuensing merupakan proses penentuan urutan nukleotida dari suatu fragmen DNA tertentu. Metode sekuensing yang telah dikembangkan terdiri atas tiga metode, yaitu metode Maxam-Gilbert, metode Sanger dan *automated DNA sequencing* (Savira, 2012). Metode yang umum dilakukan saat ini adalah metode Sanger.

Metode Sanger merupakan metode sekuensing yang ditemukan oleh Frederick Sanger pada tahun 1977. DNA mula-mula harus didenaturasi dan dipisahkan menjadi untai tunggal dengan pemanasan. Satu primer oligonukleotida yang dilabel radioaktif kemudian ditambahkan ke dalam reaksi dan akan menempel pada sekuens

pasangannya pada DNA target. DNA polymerase digunakan untuk menyalin DNA untai tunggal. Penambahan sedikit ddNTP ke dalam campuran dNTP akan memberikan informasi urutan basa DNA. Dideoksinukleotida akan terinkorporasi pada ujung 3' untai DNA yang baru disintesis (Lyrawati, 2004).



Gambar 2.4 Sekuensing DNA (Grompe, et al., 1998).

## 2.6 Variasi Genetik

Variasi genetik adalah gen yang dihasilkan oleh individu-individu dalam suatu populasi di mana setiap individu memiliki variasi dalam alel untuk sifat-sifat tertentu. Seringkali, sifat-sifat genetik ini berpindah dari satu generasi ke generasi berikutnya (Krieger, 2010). Variasi genetik sangat penting bagi lingkup individu maupun populasi. Data genetik dapat diterapkan pada banyak bidang penelitian di antaranya untuk mengkarakterisasi dasar molekuler variasi dalam sistem genetika tertentu atau dalam

aplikasi data genetik untuk pengetahuan evolusi atau sejarah alam. Variasi genetik merupakan indikasi seberapa baik organisme atau spesies tertentu akan mampu beradaptasi dengan perubahan di lingkungan (Holdich, 2011).

Variasi pada sifat bawaan dalam suatu kelompok timbul karena adanya faktor keturunan dan faktor lingkungan. Variasi genetic tersebut dapat dimungkinkan akibat adanya individu-individu yang memiliki kombinasi gen (*genotype*) yang berbeda. *Genotype* tidak dapat diamati secara langsung, oleh karenanya perlu menggunakan sifat-sifat luar yang bisa diamati disebut fenotipe (Thohari, 1987).

Penggunaan lain dari data variasi genetik adalah untuk mengetahui efek dari perkawinan pada suatu populasi yang mengalami penurunan tingkat produksi. Tingkat perkawinan sedarah (*inbreeding*) yang tinggi dapat menyebabkan peningkatan mortalitas, perkembangan abnormal atau karakteristik yang tidak diinginkan lainnya seperti resistensi terhadap penyakit. Data genetik dapat digunakan untuk memilih individu yang berpotensi atau yang memiliki sifat yang kompatibel dengan situasi lingkungannya (Holdich, 2011).

Analisis sekuen merupakan suatu teknik yang dianggap paling baik untuk melihat keragaman hayati suatu kelompok organisme. Pada prinsipnya polimorfisme dilihat dari urutan atau sekuen DNA dari fragmen tertentu dari suatu genom organisme. Untuk melihat keanekaragaman jenis dapat dilakukan melalui analisis sekuen gen 18S-rRNA atau DNA mitokondria (Suryanto, 2003).

## BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep

Merak Jawa (*Pavo muticus*) merupakan satwa endemik di Pulau Jawa yang saat ini status konservasinya adalah *Endangered* menurut IUCN (2018) dengan status perdagangannya Appendix II menurut CITES (2017). Berkurangnya populasi dari Merak Jawa disebabkan karena maraknya terjadi perburuan liar dan terjadinya eksploitasi kawasan hutan habitat dari Merak Jawa (Takandjanji dan Sawitri, 2010).

Tindakan konservasi yang dilakukan untuk mempertahankan eksistensi Merak Jawa ialah dengan konservasi *in-situ* dan *ex-situ*. Kualitas bibit dan variasi genetik merupakan faktor utama keberhasilan upaya penangkaran. Sehingga makin tinggi variasi genetik dari bibit yang digunakan maka makin tinggi kualitasnya sebagai induk, demikian pula kualitas yang diharapkan pada keturunannya. Penangkaran satwa liar yang menggunakan bibit dalam jumlah sedikit, maka akan meningkat kemungkinan terjadinya *inbreeding* (Thohari, 1987). *Inbreeding* adalah perkawinan sedarah antara individu yang berkerabat lebih dekat dari kekerabatan rata-rata dalam populasi. Kerugian dari *inbreeding* adalah memburuknya kemampuan reproduksi dan produksi dari hewan tersebut (Warmadewi., dkk, 2015). Oleh karena itu identifikasi molekuler diperlukan untuk menghindari hal tersebut.

Identifikasi molekuler melalui mtDNA seringkali digunakan untuk keperluan filogenetik karena hanya diwariskan melalui garis keturunan induk. Hal ini terjadi karena hampir tidak adanya rekombinasi mtDNA dari pejantan dan dari induk pada saat pembuahan sel telur oleh sperma. Saat terjadi pembuahan, bagian ekor sperma dilepaskan sehingga hampir tidak ada mtDNA dari pejantan yang masuk ke dalam sel telur. Oleh karena itu mtDNA bersifat haploid karena diturunkan dari induk ke seluruh keturunannya (Satiyarti., dkk, 2017). MtDNA menyandi 13 polipeptida untuk protein kompleks rantai respirasi, 22 tRNA dan 2rRNA (12S dan 16S). Ketiga belas polipeptida meliputi 7 sub unit dari kompleks I yaitu ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 dan 6. Satu sub unit dari kompleks III yaitu *cytochrome b*. Tiga sub unit dari kompleks IV yaitu CO I, II, III dan dua sub unit dari kompleks V yaitu ATPase 6 dan ATPase 8 (Sumiarsih, 2010).

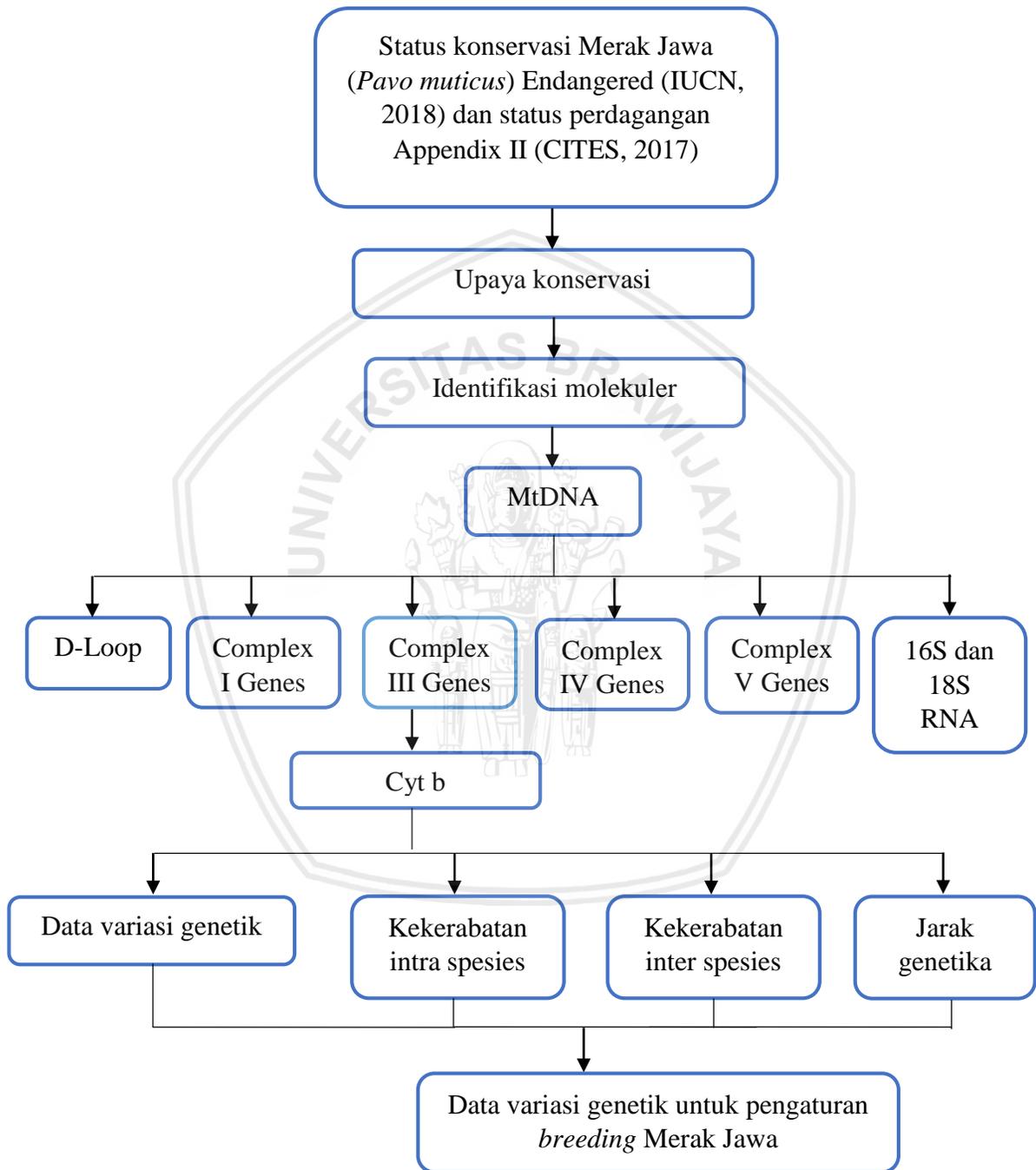
Salah satu gen dalam mtDNA yang digunakan untuk membandingkan spesies dalam genus atau famili yang sama adalah gen *cytochrome b* (*cyt b*). *Cyt b* merupakan transmembran protein yang penting dalam rantai respirasi seluler organisme. Gen *cyt b* dapat digunakan sebagai parameter klasifikasi pada berbagai tingkatan taksa karena nilai mutasi pada gen ini berbeda berdasarkan posisi kodonnya. Kodon pertama dan kedua pada gen *cyt b* memiliki nilai gamma yang rendah. Hal ini berarti kodon pertama dan kedua memiliki nilai substitusi yang rendah atau tidak bervariasi antar individu. Sebaliknya, kodon ketiga memiliki nilai gamma yang tinggi. Hal ini berarti kodon ketiga memiliki nilai substitusi yang tinggi, yang berarti memiliki variasi antar individunya (Rahman, 2010).

Sekuens dari cyt b dapat memperlihatkan adanya variasi genetik dan jarak genetik menurut Bradley dan Barker (2001). Variasi genetik adalah gen yang dihasilkan oleh individu-individu dalam suatu populasi di mana setiap individu memiliki variasi dalam alel untuk sifat-sifat tertentu. Penggunaan dari data variasi genetik adalah untuk mengetahui efek dari perkawinan pada suatu populasi yang mengalami penurunan tingkat produksi. Data genetik digunakan untuk memilih individu yang berpotensi atau yang memiliki sifat yang kompatibel dengan situasi lingkungannya (Holdich, 2011).

Setelah didapat data variasi genetik individu pada Merak Jawa maka dapat ditentukan kekerabatan antar individu Merak Jawa tersebut untuk pengaturan *breeding*. Setelah itu dilakukan juga perbandingan antara individu Merak Jawa dengan Merak India dari data NCBI.

### 3.2 Bagan Kerangka Konseptual

Kerangka konsep penelitian disajikan pada **Gambar 3.1**



**Gambar 3.1** Kerangka Konseptual

### 3.3 Hipotesis Penelitian

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

1. Tidak terdapat variasi genetik individual pada Merak Jawa (*Pavo muticus*) berdasarkan sekuen gen *cyt b*.
2. Terdapat variasi genetik antara individu Merak Jawa (*Pavo muticus*) dengan Merak India (*Pavo cristatus*) berdasarkan sekuen gen *cyt b*.



## BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan sampel bulu Merak Jawa didapatkan dari Eco Green Park. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) untuk persiapan bahan, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang untuk pemesanan primer, 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. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2019 - April 2019.

### 4.2 Pemilihan Sampel Merak Jawa

Merak Jawa yang digunakan berada di Eco Green Park, Batu. Tidak diketahui asal dari Merak Jawa tersebut. Identitas sampel dapat dilihat pada **Tabel 4.1**

**Tabel 4.1** Informasi Individu Sampel Merak Jawa

No	Nama	Umur (Tahun)	Jenis Kelamin	Simbol
1	WBMHJ1	4-5	Jantan	J1
2	WBMHJ2	4-5	Jantan	J2
3	WBMHJ3	4-5	Jantan	J3
4	WBMHB1	4-5	Betina	B1
5	WBMHB2	4-5	Betina	B2
6	WBMHB3	4-5	Betina	B3

### 4.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain *disposable syringe*, sarung tangan, masker, kertas label, plastic klip, *microcentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), mikropipet, *white tip*, *yellow tip*, mesin vortex, sentrifugator, mesin penangas, inkubator, *freezer*, timbangan analitik digital, *thermocycler*, mesin sekuensing, komputer, *Bio Step UV-Transilluminator* DH-40, AE-Nano200 *Nucleic Acid Analyzer*®, *Mupid-Exu Electrophoresis*, kamera dan tisu.

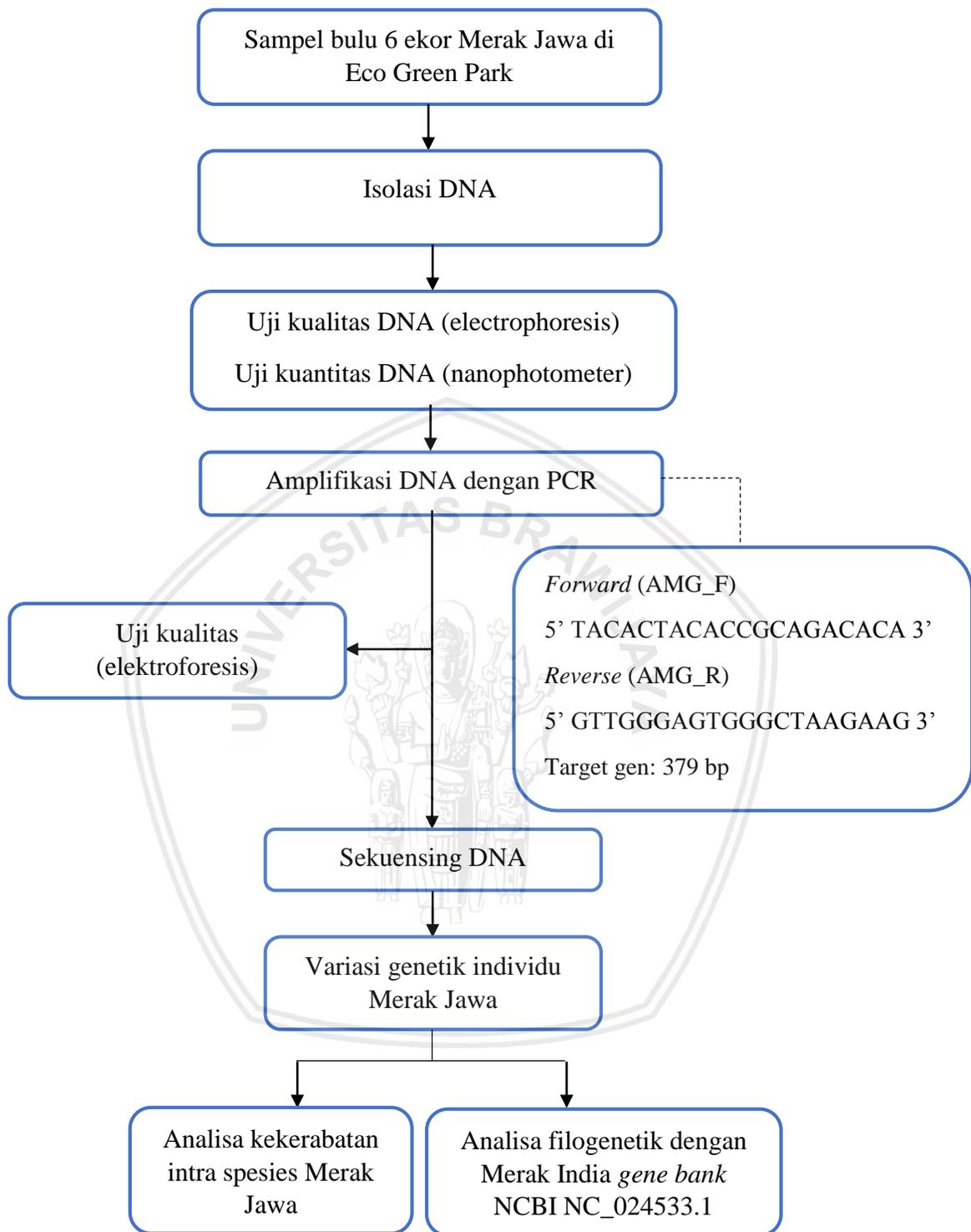
Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu sampel bulu 6 ekor Merak Jawa yaitu 3 betina dan 3 jantan, *QIAamp*® *DNA Mini Kit* (50), ddH<sub>2</sub>O, primer *forward* (AMG\_F) 5' TACTACTACACCGCAGACACA 3' dan *Reverse* (AMG\_R) 5' GTTGGGAGTGGGCTAAGAAG 3', PCR mix (*Promega GoTaq*® *Green Master Mix* 2×), marker DNA 100 bp dan 1 kb, agarose 1% dan 2 %, *loading buffer*, etanol absolut, alkohol 70%, dan aluminium foil.

### 4.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap. Pertama kali yaitu pemilihan dan pengambilan sampel yang dilakukan di Eco Green Park. Didapatkan 6 ekor sampel bulu Merak Jawa (3 jantan dan 3 betina) yang diambil dari bagian dada. Sampel bulu tersebut selanjutnya melalui tahap isolasi DNA serta dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif pada isolat yang didapat. Setelah isolat dinilai baik maka dilakukan tahap berikutnya yaitu amplifikasi gen target secara invitro dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer yang telah didesain. Produk PCR yang

didapat selanjutnya diuji secara kualitatif dan dilakukan sekuensing DNA target sehingga dapat dilakukan analisa deskriptif pada hasil sekuensing tersebut. Bagan tahapan penelitian dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.





**Gambar 4.1** Kerangka operasional

#### 4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian studi kasus data kualitatif yang dianalisa secara deskriptif, yaitu dengan mendeskripsikan hasil analisa data. Data diperoleh dari sekuen gen *cyt b* untuk merekonstruksi pohon filogenetik dalam menentukan kekerabatan intraspecies antara sampel Merak Jawa, dan interspecies antara sampel Merak Jawa dengan Merak India yang didapat dari NCBI. Jumlah sampel yang diuji ada 6 yang merupakan sampel bulu dari Merak Jawa. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA melalui sampel bulu tersebut dengan menggunakan *QIAamp® DNA Mini Kit* (50). Hasil isolasi DNA total akan diuji secara kuantitatif dengan menggunakan nanospektrofotometri dan secara kualitatif dengan melakukan elektroforesis dengan menggunakan agarosa gel konsentrasi 1%. Selanjutnya, sampel DNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *Forward* (AMG\_F) 5' TACTACTACACCGCAGACACA 3' dan *Reverse* (AMG\_R) 5' GAAGAATCGGGTGAGGGTTG 3'. Untuk kualitatif dilakukan dengan menggunakan elektroforesis dengan agarosa gel konsentrasi 2%. Hal ini dilakukan untuk mengetahui ukuran fragmen produk PCR apakah sesuai dengan yang dituju atau tidak. Hasil produk PCR selanjutnya dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing fragmen DNA kemudian dianalisis dengan menggunakan program BioEdit, BLAST NCBI dan MEGA versi 7.0 serta dianalisa secara deskriptif atau kualitatif.

## 4.6 Prosedur Kerja

### 4.6.1 Pengambilan Sampel Bulu Merak Jawa

Pengambilan bulu pada Merak Jawa dilakukan setelah prosedur *handling* dan *restrain* dilakukan. Lokasi pengambilan sampel bulu dilakukan pada bagian dada Merak Jawa masing-masing individu sebanyak 3-5 helai bulu yang dicabut langsung dari bagian dada Merak Jawa. Sampel bulu dimasukkan ke dalam plastik klip bersih dan di label sesuai nama individu. Sampel yang telah berada pada amplop kemudian disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Hogon., *et al*, 2007).

### 4.6.2 Isolasi DNA

Sampel bulu Merak Jawa kemudian dilakukan isolasi DNA menggunakan *QIAamp® DNA Mini Kit*. Prosedur isolasi dilakukan sesuai dengan protokol isolasi DNA dari bulu. Prinsip dasar isolasi DNA total dari jaringan adalah dengan memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut hingga terbentuk ekstrak sel yang terdiri atas sel-sel jaringan, DNA, dan RNA (Faatih, 2009)

Protokol dari *QIAamp® DNA Mini Kit* pertama adalah mengambil  $20\mu\text{L}$  proteinase K dan dimasukkan kedalam *microcentrifuge tube* berukuran  $1.5\text{ mL}$ . Kedua, masukkan sampel bulu yang telah dipotong  $0,5\text{-}1\text{ cm}$  kedalam *microcentrifuge tube*, dan tambahkan PBS  $200\ \mu\text{L}$ . Ketiga adalah masukkan  $200\ \mu\text{L}$  buffer AL, dan dilakukan vortex selama 15 detik. Keempat adalah melakukan inkubasi dengan suhu  $56^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Kelima, melakukan

sentrifugasi pada *microcentrifuge tube*. Keenam adalah menambahkan 200  $\mu$ L etanol dengan konsentrasi etanol 96-100%, selanjutnya di vortex 15 detik dan kembali di sentrifugasi. Ketujuh, memindahkan campuran cairan dari *microcentrifuge tube* ke *QIAamp Mini spin column* yang dimasukkan ke 2 mL *collection tube*, tutup ujung *spin column* dan lakukan sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya pindahkan *spin column* ke *collection tube* yang baru. Kedelapan, masukkan 500  $\mu$ L buffer AW1 ke *spin column*, tutup bagian ujung *spin column*, kemudian dilakukan sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya pindahkan *spin column* ke *collection tube* yang baru. Kesembilan, masukkan 500  $\mu$ L buffer AW2 ke *spin column*, tutup ujung *spin column* dan lakukan sentrifugasi 14.000 rpm selama 3 menit. Selanjutnya pindahkan *spin column* ke *collection tube* baru dan lakukan sentrifugasi dengan kecepatan penuh selama 1 menit. Kesepuluh, adalah pindahkan cairan dari *spin column* ke dalam *microcentrifuge tube* baru dan diberi label identitas sampel. Terakhir adalah menambahkan buffer AE 200  $\mu$ L, dan dinikubasi pada suhu ruang selama 1 menit, dan selanjutnya di sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Protokol tersebut dilakukan mendapatkan purifikasi total meliputi genomic, mitokondria, dan viral) pada sampel bulu (Qiagen, 2016).

#### **4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA**

##### **4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA**

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

adalah ddH<sub>2</sub>O. ddH<sub>2</sub>O diteteskan langsung diatas pedestal submicroliter cell sebanyak 1 µL, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol blank setelah lid (penutup) ditutupkan. Panjang gelombang yang digunakan adalah 260 nm dan 280 nm. Sebanyak 1 µL sampel diteteskan diatas pedestal submicroliter cell yang telah dibersihkan. Lid ditutup diatas sampel yang telah diteteskan dan ditekan tombol sample kemudian ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor (Nanodrop Technologies, 2007).

#### 4.6.3.2 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan gel elektroforesis agarose 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen *cyt b*. Uji kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan mesin *Mupid-Exu Electrophoresis*. Cetakan agarose dibersihkan dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 mL dan gel agarose 1% (0,15 g) hingga mendidih atau agarose larut. Menurut Fatchiyah dkk. (2008), campuran selanjutnya ditambahkan larutan EtBr sebanyak 1 µl dan didinginkan (tidak sampai memadat), kemudian disiapkan sisir dan plate untuk membentuk sumuran. Campuran agarose, TBE 1x dan EtBr kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel didiamkan selama 20-30 menit pada suhu kamar hingga memadat baru kemudian

diambil sisir secara perlahan. Gel dengan sumuran yang telah terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam *chamber Mupid-Exu Electrophoresis*. Kemudian larutan buffer elektroforesis (running TBE 1x) dituangkan kedalam chamber hingga menutupi seluruh bagian gel. Marker (DNA ladder) dan loading dye (1:1) dimasukkan ke dalam salah satu sumuran. Campuran larutan loading dye dan DNA (1:1) kemudian dimasukkan kedalam sumur selanjutnya. *Chamber* dihubungkan kemdengan *power supply* dan dinyalakan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah *running* gel elektroforesis selesai arus listrik diputuskan dan gel diangkat dari *chamber*. Gel selanjutnya dipindahkan ke UV-transilluminator *gel doc* dan diamati hasilnya. Hasil didokumentasikan dan diekspos dengan *gel doc* imaging sehingga memudahkan analisis (Fatchiyah dkk, 2008).

#### 4.6.4 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik PCR di desain menggunakan NCBI Genebank : AF013763.1 Primer forward dan primer *reverse* didapatkan melalui primer3plus dengan menggunakan data AF013763.1 : 14222-15365 *Pavo muticus*, complete genome (**Lampiran 4**). Sepasang sekuens primer yang didapatkan adalah primer *Forward* (AMG\_F) 5' TACTACTACACCGCAGACACA 3' dan *Reverse* (AMG\_R) 5' GAAGAATCGGGTGAGGGTTG 3' (start: 625; qlength : 20 bp; Tm : 55,7°C; GC : 50,0 %) dengan target produk PCR 379 bp.

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

Hasil sampel isolasi DNA Merak Jawa selanjutnya diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer forward (AMG\_F) dan reverse (AMG\_R). Campuran larutan yang akan dilakukan amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1 $\mu$ L DNA, 1 $\mu$ L primer *forward* 10pmol, 1 $\mu$ L primer *reverse* 10pmol, 5 $\mu$ L PCR mix dan 2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O ke dalam microtube 200 $\mu$ L. Larutan yang sudah dibuat tadi, dimasukkan kedalam mesin PCR. Pada mesin PCR terjadilah amplifikasi dengan tahapan pertama adalah predenaturasi 94°C selama empat menit, tahap kedua adalah denaturasi 94°C selama 30 detik, tahap ketiga adalah *annealing* pada suhu 50,9°C selama 30 detik, tahap keempat adalah *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit dan terakhir *post extension* pada 72°C selama 7 menit. Proses akan berulang selama 35 siklus.

#### 4.6.6 Uji Kualitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA. Pengujian kualitas produk PCR gen *cyt b* adalah dengan menggunakan elektroforesis agarosa gel. Konsentrasi agarosa gel yang digunakan adalah 2%. Konsentrasi agarosa gel yang semakin tinggi, maka akan mengurutkan base pair DNA yang semakin pendek. Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas isolat DNA. Produk PCR diambil 2 $\mu$ L menggunakan mikropipet dan dimasukkan dalam sumur gel agarosa 2% dengan TBE 1x pada voltase 100V, selama 30 menit. Hasil agarosa gel yang sudah di

running dipindahkan ke UV-transiluminator *gel doc* dan diamati hasilnya. Hasilnya didokumentasikan dengan kamera digital.

#### 4.6.7 Sekuensing DNA

Sekuensing adalah teknik yang dilakukan untuk menentukan susunan nukleotida yaitu dari adenin, guanin, sitosin, dan timin suatu molekul DNA. Sekuensing produk PCR dari gen *cyt b* dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer AMG\_F 10pmol dan AMG\_R 10pmol untuk melihat sekuen gen *cyt b* sebesar 379 bp. Sekuen DNA yang diinginkan akan di amplifikasi menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR yang diperlukan untuk dilakukan sekuensing adalah minimal 50ng/ $\mu$ L. Hasil sekuensing berupa grafik akan menyatakan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang berada pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs.

#### 4.6.8 Analisa Data

Data hasil yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikan kekerabatan antara 6 individu Merak Jawa dengan database NCBI Genebank Merak Jawa dengan *accession number* AF013763.1 melalui homologi gen *cyt b* dan membandingkan dengan Merak India dengan database NCBI Genebank *accession number* NC\_009260.1 menggunakan software BioEdit dan BLAST NCBI. Tahap analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuen DNA sampel Merak Jawa yang dibandingkan antara sampel B1, B2, B3, J1, J2, dan

J3 dengan database Merak Jawa yaitu NCBI Genebank : AF013763.1  
Penyejajaran menggunakan algoritma ClustalW multiple allignment. Analisis filogeni dapat menggunakan perangkat lunak MEGA versi 7.0 dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* (NJ) memakai 1000 kali pengulangan. Hasil analisis dari program MEGA tersebut akan didapatkan matriks jarak genetik persamaan dari basa nukleotida.



## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Hasil Isolasi DNA Merak Jawa

Gen *cyt b* yang berasal dari mtDNA telah terbukti sebagai identifikasi dan karakterisasi spesies dalam taksonomi dan ilmu forensik dan juga digunakan dalam studi evolusi molekuler. Gen *cyt b* memiliki panjang 1140 bp dan memiliki beberapa sekuens stabil yang digunakan untuk membuat primer yang akan digunakan untuk penelitian berbasis PCR (Awad., *et al*, 2014). Isolasi DNA dilakukan menggunakan sampel bulu dengan menggunakan *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* sesuai protokol (**Lampiran 1**). Hasil yang diperoleh merupakan DNA total. Isolat DNA digunakan sebagai DNA template untuk proses amplifikasi gen *cyt b* pada genom mitokondria dari Merak Jawa menggunakan metode PCR untuk mengetahui variasi genetik individual pada Merak Jawa di Eco Green Park.

**Tabel 5.1** Konsentrasi dan Kemurnian DNA Merak Jawa

Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (absorbansi 260/280)
B1	0,61	19,77
B2	3,91	0,79
B3	29,25	1,13
J1	25,39	1,83
J2	2,34	0,79
J3	0,68	0,73

Hasil isolasi bertujuan untuk mendapatkan isolasi DNA total yang kemudian dilakukan uji kuantitas menggunakan Spektrofotometer NANO Drop. Konsentrasi dan kemurnian DNA total dari bulu Merak Jawa ditunjukkan pada **Tabel 5.1 (Lampiran**

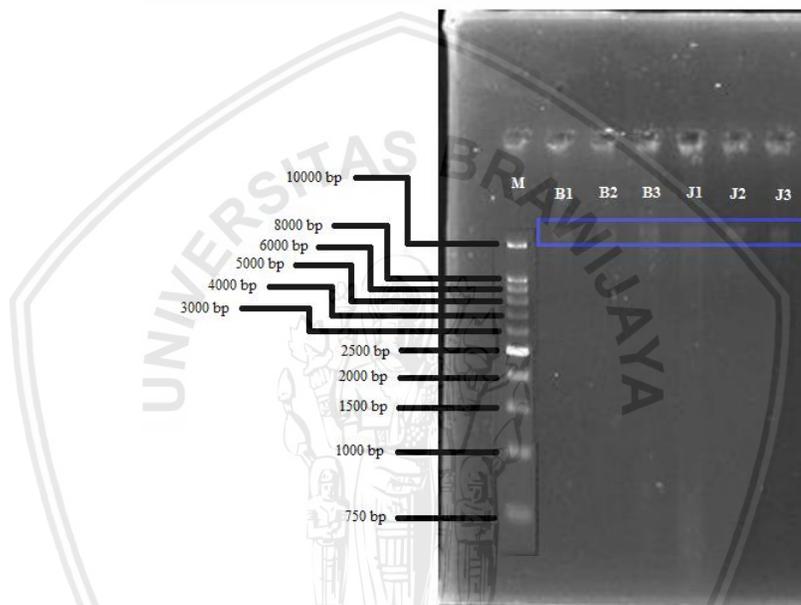
4). Hasil konsentrasi dan kemurnian DNA berdasarkan uji kuantitas tersebut dapat digunakan untuk menguji gen *cyt b* dengan metode PCR.

Isolasi DNA yang baik didukung oleh hasil kuantitas DNA yang diperoleh. Semakin banyak jumlah sel sumber DNA dan semakin baik kualitas sel tersebut dalam arti tidak terkontaminasi dengan sel dari organisme lain atau bahan-bahan pengganggu lainnya, maka semakin banyak jumlah dan bagus kualitas DNA yang didapatkan (Ahda., dkk, 2012). Pengukuran kuantitas DNA dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Kemurnian DNA ditentukan dengan menghitung rasio absorbansi pada  $A_{260}$  dengan  $A_{280}$ . Molekul DNA dikatakan murni jika rasio absorbansinya berkisar antara 1,8-2,0 (Mustafa., dkk, 2016).

DNA yang mengandung basa-basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm (Fatchiyah., *et al*, 2011). Menurut Muhammad, S.A., Praseno (1991) rasio yang kurang dari 1,8 menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA telah terkontaminasi oleh fenol atau protein. Sedangkan rasio yang lebih dari 2 berarti hasil isolasi DNA telah terkontaminasi oleh RNA. Menurut Pharmawati (2009) pada konsentrasi DNA rendah (10 ng sampai 25 ng), PCR menghasilkan pola yang konstan, tetapi bila konsentrasi DNA naik hingga 45 ng, terdapat band DNA yang tidak teramplifikasi.

Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik

isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul. Pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang dikandung oleh makromolekul tersebut. Bila arus listrik dialirkan pada suatu medium penyangga yang telah berisi protein plasma maka komponen-komponen protein tersebut akan mulai bermigrasi (Pratiwi, 2001).



**Gambar 5.1** Hasil Elektroforesis DNA total. Keterangan: M: Marker 1 kb, B1, B2, B3, J1, J2, J3 : sampel Merak Jawa. Keenam sampel hasil isolasi menggunakan kit Qiagen menunjukkan pita lebih dari 10.000 bp.

Hasil gel elektroforesis (**Gambar 5.1**) menunjukkan fragmen DNA memiliki kualitas yang baik. Hal ini ditandai dengan pita yang tebal dan utuh. Hasil pita yang tebal menunjukkan hasil yang baik (Hikmatyar., dkk, 2015). Hasil menunjukkan band DNA di atas 10.000 bp sehingga DNA yang terisolasi melebihi 10.000 bp dari total gen

mitokondria keseluruhan *Pavo muticus* genebank NCBI berjumlah 16.698 bp. Oleh karena itu, isolasi DNA yang didapat layak digunakan untuk proses PCR.

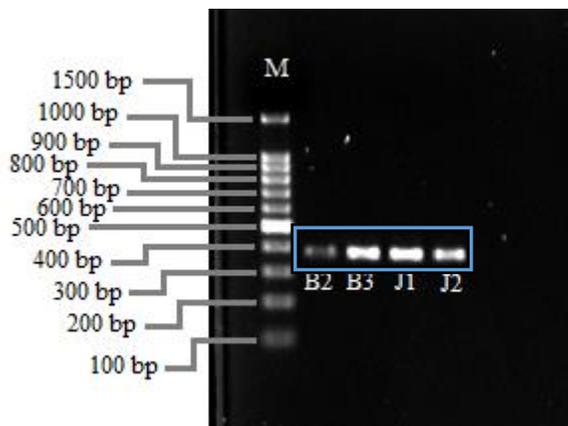
## 5.2 Amplifikasi Gen Cyt b dengan Metode PCR

Amplifikasi gen cyt b dilakukan untuk mendapatkan fragmen gen cyt b yang banyak sehingga dapat digunakan untuk melihat variasi genetik antara sekuen individu Merak Jawa di Eco Green Park dan dibandingkan dengan Merak India.

1	ATGGCACCCA	ACATCCGAAA	ATCCCACCCC	CTACTAAAAA	TAATCAACAA
51	CTCCCTAATC	GACCTCCCCG	CTCCATCTAA	CATCTCCGCT	TGATGAAACT
101	TCGGCTCCCT	GCTAGCAGTA	TGCCTTGCCA	CTCAAATCAT	CACTGGCCTA
151	CTACTAGCAA	TACACTACAC	CGCAGACACA	TCCCTAGCCT	TCTCCTCAGT
201	AGCCACACAA	TGTCGAAACG	TACAATACGG	CTGACTCATC	CGGAATCTTC
251	ATGCAAATGG	AGCTTCATTC	TTCTTCATCT	GCATCTTCCT	CCACATCGGA
301	CGCGGCCTAT	ACTACGGCTC	CTACTTATAC	AAAGAAACCT	GAAACACAGG
351	AGTAGTTCTC	CTCCTCACAC	TCATAGCAAC	CGCCTTCGTA	GGCTATGTAC

**Gambar 5.2** Origin Olio Nukeleotida Gen cyt b, keterangan: Kuning: Primer *forward*, Hijau: Primer *reverse*, Abu-abu: Region of interest (*National Center for Biotechnology Information*, 2018).

Primer yang digunakan dalam program PCR didesain dari genebank NCBI dengan referensi sekuen: AF013763.1 menggunakan *Primer3plus*, sehingga didapatkan sepasang primer *forward* dan *reverse*. Susunan basa nitrogen dari gen cyt b dengan primer yang telah didesain ditunjukkan pada **Gambar 5.2**. Primer *forward* (AMG\_F) 5' TACACTACACCGCAGACACA 3' dan *reverse* (AMG\_R) 5' GAAGAATCGGGTGAGGGTTG 3' (*start*: 140; *length* : 20 bp; *Tm* : 55,7°C; *GC* : 50,0%) dan primer *reverse* (AMG\_R) 5'GGCTGGTGTAAGTTGTCTG (*start*: 540; *length* : 20 bp; *Tm* : 55,7°C; *GC* : 50 %) dengan target produk PCR sebesar selisih dari kedua primer yaitu 379 bp.



**Gambar 5.3** Hasil Elektroforesis Hasil Produk PCR. Keterangan: M: Marker, B2, B3, J1, J2: sampel Merak Jawa. Empat sampel produk PCR menunjukkan adanya pita marker 379 bp.

Produk PCR diuji secara kualitatif dan didapatkan adanya pita DNA dengan ukuran 379 bp sesuai dengan target amplifikasi menggunakan primer forward dan reverse yang telah didesain. Hasil elektroforesis produk PCR konsentrasi agarose 1,7% dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.

Hasil uji kualitas tersebut menggambarkan keberhasilan proses PCR dengan produk yang dihasilkannya. Produk PCR B2 menempati 383,1 bp, B3= 377,6 bp, J1= 366,9 bp, dan J2= 366,9 bp berdasarkan marker. Hal ini menunjukkan kesesuaian produk PCR dengan target berdasarkan desain primer yaitu berukuran 379 bp dan siap untuk disekuensing. Target *base pair* yang diinginkan adalah 379 bp, tetapi setelah dilakukan PCR, *base pair* bisa berkurang dikarenakan primer yang digunakan tidak dilakukan analisis sehingga hanya tersisa kopian DNA nya saja tanpa primer. Base pair berkurang sekitar 20 bp (Feuillie, 2014). Pengamatan secara langsung juga dilakukan di mana keempat sampel berada pada marker  $\pm 400$  bp, sehingga sudah dapat dipastikan bahwa target yang diinginkan tercapai. Hasil dari uji kualitatif terlihat keempat sampel

mendekati target DNA yang diinginkan sehingga diharapkan sampel PCR dapat digunakan untuk tahap sekuensing. Namun sampel yang dilanjutkan ke tahap sekuensing hanya 4 sampel yaitu sampel B2, B3, J1 dan J2 dikarenakan nilai kemurnian yang mendekati standar yaitu antara 1,8 dan 2,0 (Mustafa., dkk, 2016).

### 5.3 Sekuensing Gen Cyt b

Hasil sekuensing DNA berupa grafik elektroferogram (grafik yang menunjukkan basa-basa hasil sekuensing) dan data berupa *fasta* (urutan basa-basa hasil sekuensing) (**Lampiran 7**). Hasil tersebut menunjukkan adanya fragmen basa nukleotida yang memiliki kesamaan basa nukleotida terhadap database NCBI (daerah *conserved*). Daerah *conserved* merupakan daerah yang mengalami sedikit perubahan atau sedikit mutasi pada basa nukleotida nya (Pangastuti, 2006).

Hasil sekuensing dari masing-masing sampel (B2, J1, J2) dimasukkan ke program BLAST NCBI untuk mengetahui kesejajaran basa nitrogen hasil sekuensing dengan database NCBI (**Lampiran 5**). Sampel B3 tidak dapat dibaca oleh program BLAST NCBI dikarenakan hasil sekuen yang buruk sehingga tidak adanya kesamaan basa nukleotida sekuen B3 dengan database NCBI. Hasil sekuen yang buruk ditandai dengan adanya puncak elektroferogram yang tidak teratur, munculnya residu “N” yang didistribusikan melalui urutan file.txt. Penyebab dari buruknya hasil sekuen antara lain adalah konsentrasi sampel DNA yang terlalu rendah atau terlalu tinggi, konsentrasi primer yang terlalu tinggi atau terlalu rendah, dan tidak adanya ikatan atau terjadinya mutasi antara sampel DNA dengan primer (Genewiz, 2016).

**Tabel 5.2** *Query coverage* dan *ident* sampel terhadap Genebank Merak Jawa AF013763.1

<b>Sampel</b>	<b><i>Query coverage</i></b>	<b><i>Ident</i></b>
B2	94%	99,4%
J1	94%	99,7%
J2	94%	96,5%

Pada **Tabel 5.2** sampel Merak Jawa B1 memiliki *query coverage* 94% dan *ident* 99,4% terhadap NCBI Genebank: AF013763.1 *Pavo muticus cytochrome b gene*, sampel Merak Jawa J1 memiliki *query coverage* 94% dan *ident* 99,7% , dan sampel Merak Jawa J2 memiliki *query coverage* 94% dan *ident* 96,5%.

Persentase *query coverage* adalah persen dari panjang segmen DNA yang sejajar, sedangkan *ident* adalah persentase identitas satu segmen DNA yang disejajarkan dengan urutan subjek yang sama (Newell., *et al*, 2013). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sekuen DNA sampel B2, J1 dan J2 memiliki kemiripan yang sangat dengan dengan sekuen DNA yang diinginkan yaitu spesies *Pavo muticus* (Merak Jawa).

Urutan hasil sekuen pada sampel Merak Jawa B2 menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 205 sampai 540 dari database NCBI, sampel Merak Jawa J1 menunjukkan adanya kesejajaran dari basa ke 204 sampai 540 dari database NCBI, dan sampel Merak Jawa J2 menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 191 sampai 342 dari database NCBI (**Lampiran 5**).

#### 5.4 Analisa Sekuen DNA Gen Cyt b

Sekuen gen dari ketiga sampel Merak Jawa disejajarkan dengan referensi gen *cyt b* intraspecies yaitu Merak Jawa referensi NCBI ID: AF013763.1 dan gen *cyt b* interspecies dengan Merak India referensi ID: NC\_024533.1.



**Gambar 5.4** Hasil penyejajaran sampel Merak Jawa B2, J1, dan J2 terhadap referensi gen *cyt b* *Pavo muticus* dan *Pavo cristatus*.

Keterangan: kotak merah: basa yang mengalami mutasi

Hasil sekuen amplifikasi sampel B2, J1, dan J2 disejajarkan dengan sekuen referensi gen *cyt b* *Pavo muticus* database ID: AF013763.1 dan gen *cyt b* *Pavo cristatus* database ID: NC\_024533.1 menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada software *BioEdit* (Lampiran 6). Ketiga sampel Merak Jawa setelah disejajarkan menghasilkan *basepair* sebanyak 330 bp.

**Tabel 5.3** Jenis Mutasi pada Sampel

Sampel	Jenis mutasi	Jumlah	Total
B2	Transisi	0	0
	Transversi	0	
J1	Transisi	0	0
	Transversi	0	

J2	Transisi	1	1
	Transversi	0	
<i>Pavo muticus</i>	Transisi	0	0
	Transversi	0	
<b>Total</b>			1

Berdasarkan perubahan kode genetik, terdapat dua jenis mutasi yang menyebabkan asam amino yang terkait pada rantai polipeptida berubah, yaitu mutasi transisi dan mutasi transversi (Warmadewi, 2017). Mutasi transisi adalah ketika basa pirimidin berubah ke pirimidin yang lainnya atau basa purin berubah ke basa purin lainnya. Sedangkan mutasi transversi adalah perubahan basa dari purin ke pirimidin dan sebaliknya (Aisah., dkk, 2015). Sampel B2 dan J1 yang dibandingkan dengan Merak Jawa referensi NCBI ID: AF013763.1 menunjukkan tidak adanya mutasi yang terjadi, sampel J2 terhadap Merak Jawa referensi NCBI ID: AF013763.1 menunjukkan adanya 1 mutasi (**Tabel 5.3**) Namun hal ini tidak berpengaruh pada asam amino yang dihasilkan karena perubahan berupa transisi. Hubungan kekerabatan antara ketiga sampel dengan intraspecies Merak Jawa dan dengan pembanding interspecies Merak India dapat diketahui melalui pohon filogenetik.

### 5.5 Hubungan Kekerabatan Merak Jawa Berdasarkan Filogenik

Analisa filogenetika tidak terlepas dari evolusi biologis. Evolusi adalah proses gradual, suatu organisme yang memungkinkan spesies sederhana menjadi lebih kompleks melalui akumulasi perubahan dari beberapa generasi. Keturunan akan mempunyai beberapa perbedaan dari nenek moyangnya sebab sedang berubah dalam

sebuah evolusi. Dalam mempelajari variasi dan diferensiasi genetik antar populasi, jarak genetik dapat dihitung dari jumlah perbedaan basa polimorfik suatu lokus gen masing-masing populasi berdasarkan urutan DNA (Dharmayanti, 2011).

Dilakukan perhitungan jarak genetik menggunakan *pairwise distance* untuk menunjukkan jarak genetik secara intraspecies maupun interspecies. Jarak genetik intraspecies yang diperlihatkan sampel B2, J1, dan J2 terhadap Merak Jawa referensi NCBI ID: AF013763.1 bernilai 0% atau  $\leq 2\%$ . Menurut Jurulis., dkk (2019) jarak genetik intraspecies bernilai 0% atau  $\leq 2\%$  Sedangkan untuk jarak interspecies untuk jenis hewan mamalia bernilai 2% atau  $\leq 11\%$  (Bradley and Baker, 2001). Jarak genetik interspecies ketiga sampel dan Merak Jawa terhadap Merak India referensi NCBI ID: NC\_0245533.1 bernilai 4,5% (**Tabel 5.4**).

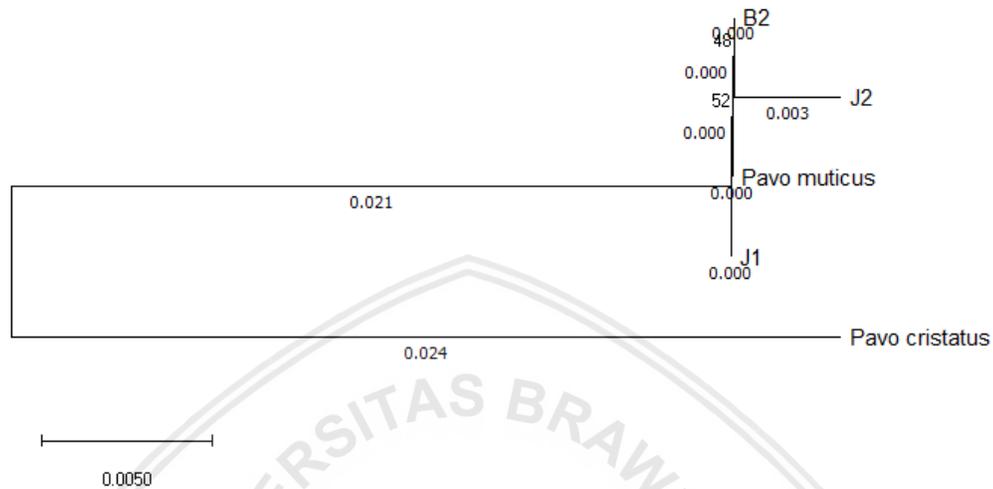
**Tabel 5.4** Persentase Data Perhitungan *Pairwise Distance*

	1	2	3	4	5
<b>1. <i>Pavo muticus</i></b>					
<b>2. B2</b>	0.000				
<b>3. J1</b>	0.000	0.000			
<b>4. J2</b>	0.003	0.003	0.003		
<b>5. <i>Pavo cristatus</i></b>	0,045	0,045	0,045	0,049	

Keterangan:  = Intraspecies  
 = Interspecies

Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan bahwa sampel B2, J1, dan J2 memiliki hubungan intraspecies terhadap Merak Jawa referensi NCBI ID: AF013763.1. hubungan interspecies dapat terlihat jika sampel B2, J1, dan J2 dan referensi Merak

Jawa dibandingkan dengan Merak India referensi NCBI ID: NC\_0245533.1. Jarak genetik tersebut juga dapat digambarkan dalam pohon filogenik (**Gambar 5.5**).



**Gambar 5.5** Pohon Filogenik Merak Jawa menggunakan Metode *Neighbor-Joining* dengan Replikasi *Bootstrap* 1000x.

Pohon filogenik yang dihasilkan menunjukkan nilai *bootstrap* sampel terhadap Merak Jawa referensi NCBI ID: AF013763.1 adalah 50. Nilai *bootstrap* yang melebihi angka 95 dikatakan signifikan, sedangkan nilai di bawah 70 dikatakan tidak stabil (Tamura., *et al*, 2011). Pohon terdiri dari cabang-cabang luar (*outer branches*) yang merepresentasikan sekuen. Sedangkan titik-titik (*nodes*) dan cabang merepresentasikan hubungan di antara sekuen (Dharmayanti, 2011). Menurut Hsieh., *et al* (2001) cabang terdekat pada pohon filogenik untuk hewan secara urut adalah hewan yang satu spesies, satu genus, satu famili dan yang terjauh adalah satu ordo yang sama. Berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada pohon filogenik tersebut, dikatakan bahwa sampel Merak Jawa

B2, J1, dan J2 dan Merak Jawa referensi NCBI ID: AF013763.1 berada dalam satu cabang yang sama dengan jarak cabang 0,00. Hal ini menunjukkan bahwa keempat sekuen berkerabat dekat karena memiliki nenek moyang yang sama. Jika melihat jarak genetik keempat sekuen terhadap Merak India referensi NCBI ID: NC\_0245533.1 yaitu 0,045 karena masih dalam satu genus yang sama (**Gambar 5.5**).

Berdasarkan hasil mutasi yang dilihat dari ketiga Merak Jawa B2 dan J1 yang dibandingkan dengan intraspecies Merak Jawa referensi NCBI ID: AF013763.1 menunjukkan tidak adanya perbedaan basa nukleotida, serta sampel J2 memiliki satu basa nukleotida yang mengalami mutasi. Hal ini bisa disimpulkan bahwa tidak adanya variasi basa nukleotida pada ketiga sampel dengan Merak Jawa referensi NCBI ID: AF013763.1. Hasil dari pembacaan mutasi juga berhubungan dengan hasil dari persentase dan perhitungan *pairwise distance* dan juga pohon filogenik di mana jarak genetik antara ketiga sampel dengan Merak Jawa referensi NCBI sebesar 0,0-0,3. Sedangkan jarak ketiga sampel dengan Merak India referensi NCBI sebanyak 4,5. Maka ketiga sampel dinyatakan masih memiliki satu *common ancestor* yang sama dengan Merak Jawa.

## BAB VI PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

1. Terdapat variasi basa nukleotida pada sampel Merak Jawa J2 terhadap Merak Jawa referensi NCBI ID: AF0137.1 yaitu terdapat satu mutasi transisi. Sampel Merak Jawa B2 dan J1 jika dibandingkan dengan Merak Jawa referensi NCBI ID: AF0137.1 tidak terdapat variasi pada basa nukleotidanya yang menunjukkan bahwa ketiga individu berkerabat dekat dan memiliki nenek moyang (*common ancestor*) yang sama yaitu Merak Jawa (*Pavo muticus*).
2. Terdapat jarak genetik antara sampel B2, J1, J2 jika dibandingkan dengan sekuen Merak India referensi NCBI ID: NC\_024533.1 sebesar 4,5% yang menunjukkan bahwa ketiga individu berada pada tingkat kekerabatan yang berbeda dengan Merak India (*Pavo cristatus*)

### 6.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai DNA mitokondria pada spesies Merak Jawa yaitu gen D-loop dan COI, serta jarak genetik antara kedua spesies yaitu Merak Jawa dan Merak India dikarenakan belum adanya data genetik yang dapat menjadi acuan pembeda spesies tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahda, Y., Muharni, I. R., dan Putri., D. H. 2012. Kualitas DNA Hasil Isolasi Dari Beberapa Bagian Batang Rambut Untuk Bahan Analisis DNA Forensik. *Eksakta*. 1(13): 87-93.
- Aisah, I., Kurniadi, E., Carnia, E., dan Ula, N. 2015. Representasi Mutasi Kode Genetik Standar Berdasarkan Basa Nukleotida. *Jurnal Matematika Integratif*. 11(1): 25-34.
- Awad, A., Khalil, S. R., and Elhakim, A. 2014. Molecular Phylogeny of Some Avian Species Using *Cytochrome B* Gene Sequence Analysis. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 16(2): 218-222.
- Bennett, S. 2010. *Pavo Cristatus Castellar Zoo*. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pavo\\_cristatus\\_-Castellar\\_Zoo,\\_Castellar\\_de\\_la\\_Frontera,\\_Spain-8a.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pavo_cristatus_-Castellar_Zoo,_Castellar_de_la_Frontera,_Spain-8a.png) [12 desember 2018].
- Bradley, R. D. and R. J. Baker. 2001. A Test Of The Genetic Species Concept: Cytochrome-B Sequences And Mammals. *Journal of Mammalogy*, 82(4): 960-973.
- Dharmayanti, N. L. P. I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *WARTAZOA*. 21(1): 1-10.
- Faatih, M. 2009. Isolasi Dan Digesti DNA Kromosom. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*. 10(1): 61-67.
- Fatchiyah. 2008. Buku Praktis: Mengenal Polymerase Chain Reaction Dasar Teknik Amplifikasi DNA & Aplikasinya. Malang: Universitas Brawijaya.
- Feuillie C., and Maxime M. M. 2014. Detection of DNA Sequences Refractory to PCR Amplification Using a Biophysical SERRS Assay (Surface Enhanced Resonant Raman Spectroscopy). *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0114148.
- GENEWIZ. 2016. *Diagnosis Sanger: Interpreting and Troubleshooting Chromatograms*. GENEWIZ Technical Support.

- Handoyo, D. dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [Generale Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. *Unitas*. 9(1): 17-29.
- Hernowo, J. B. 1999. Kajian Terhadap Habitat dan Penyebaran Lokal Merak Hijau (*Pavo muticus*) di Taman Nasional Baluran, Jawa Timur. *Media Konservasi*. 1(1):15-22.
- Hikmatyar, M. F., Royani, J. I., dan Dasumiati. 2015. Isolasi dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) Untuk Identifikasi Keragaman Genetik. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 2(2): 42-48.
- Hogon, F. E., Cooke, R., Burnidge, C. P., and Norman, J. A. 2007. Optimizing The Use Of Sheed Feathers For Gentle Analysis. *Molecular Ecology Notes*.
- Holdich, D. M. 2011. Biology of Freshwater Crayfish. School of Life and Environmental Sciences University of Nottingham.
- Hsieh, H., Chiang, Hsiao-Ling., Tsai, Li-Chin., Shu-Ya Lai., Nu-En Huang, Linacre, A., and Chun-I Lee, J. 2001. *Cytochrome b* gene for species identification of the conservation animals. *Forensic science international*. 122 (7-18).
- Jurulis, Solihin, D. D., Mardiasuti, A., dan Prasetyo, L. B. 2019. Variasi Interspesifik Julang Indonesia Berdasarkan Gen *Cytochrome B* DNA Mitokondria. *Berita Biologi*. 18(1): 1-123.
- Krieger, U., Lippman, Z., and Zamir, D. 2010. The Flowering Gene Single Flower Truss Drives Heterosis For Yield in Tomato. Nature Publishing Group. 42: 459-463.
- Kushwaha, S. and Kumar, A. 2016. A Review On Indian Peafowl (*Pavo cristatus*). *Journal of Wildlife Research*. 4(4): 42-59.
- Lukanov, H. 2011. Peafowl Species and Their Mutations. [https://www.researchgate.net/profile/Hristo\\_Lukanov/publication/274070223\\_PEAFOWLS\\_SPECIES\\_AND\\_THEIR\\_MUTATIONS/links/551405e20cf23203199cd338/PEAFOWLS-SPECIES-AND-THEIR-MUTATIONS.pdf?origin=publication\\_detail](https://www.researchgate.net/profile/Hristo_Lukanov/publication/274070223_PEAFOWLS_SPECIES_AND_THEIR_MUTATIONS/links/551405e20cf23203199cd338/PEAFOWLS-SPECIES-AND-THEIR-MUTATIONS.pdf?origin=publication_detail) [12 Desember 2018].
- Lyrawati, D. 2004. Teknik Rekombinan DNA dan Genetik. *Instrumentasi Biomedik Universitas Brawijaya*.

- Muhammad, S. A., dan Praseno. 1991. Pengantar Kloning Gena. Yayasan Essentia Medica, Yogyakarta. Hal 31-33.
- Mustafa, H., Rachmawati, I., dan Udin, Y. 2016. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk. *Jurnal Vektor Penyakit*. 10(1): 7-10.
- Nanodrop Technologies, Inc. 2007. 260/280 and 260/230 Ratios Nanodrop ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers. Wilmington (US): Nanodrop Technologies, Inc.
- Newell P. D., and Ashwana D. F. 2013. A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST. *Journal of Microbiology & Biology Education*. 14(1): 170-186.
- Pangastuti, A. 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*. 7(3): 292-296.
- Pratiwi, R. 2001. Mengenal Metode Elektroforesis. *Oseana*. 25(1): 25-31.
- Pravitasari, V. 2018. *Estimasi Populasi dan Karakteristik Habitat Merak Hijau (Pavo muticus) di Resort Rowobendo Taman Nasional Alas Purwo* [Tesis]. Fakultas Peternakan dan Agrikultural Universitas Muhammadiyah Malang.
- Qiagen. 2016. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. <http://www.qiagen.com> [20 Februari 2018].
- Rahman, A. 2010. *Keragaman Struktur Morfologis Dari Gen Cytochrome B DNA Mitokondria Kryptopterus spp. Dan Ompak spp. (Siluridae) Di Das Batang Hari Jambi* [Tesis]. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Rudloff, K. 2002. *Java Green Peafowl*. <https://www.biolib.cz/en/image/id193121/> [12 Desember 2018].
- Saetia, W. 2016. *Peacock*. [https://www.123rf.com/photo\\_69463668\\_peacock.html?fromid=V1R6Tm1jMHdjeHM3Y25jQWVmcDBwUT09](https://www.123rf.com/photo_69463668_peacock.html?fromid=V1R6Tm1jMHdjeHM3Y25jQWVmcDBwUT09) [15 Februari 2019]
- Satiyarti, R. B., Nurmilah, dan Rosahdi, T. D. 2017. Identifikasi Fragmen DNA Mitokondria Pada Satu Garis Keturunan Ibu Dari Sel Epitel Rongga Mulut

Dan Sel Folikel Akar Rambut. *Biosfer Jurnal Tadris Pendidikan Biologi*. 8(1): 13-27.

- Savira, M. 2012. *Analisis Variasi D-Loop DNA Mitokondria Pada Populasi Gajah Sumatera (Elephas maximus sumatranus) di Taman Nasional Way Kambas* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Suryanto, D. 2005. Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- Susmiarsih, T. 2010. Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa. *Majalah Kesehatan PharmaMedika*. 6(2): 178-184.
- Takandjandji, M. dan Sawitri, R. 2011. Populasi Burung Merak Hijau (*Pavo muticus*) di Ekosistem Savana, Taman Nasional Baluran, Jawa Timur. *Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*. 8(1):13-24.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Likelihood, Distance, and Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Thohari, M. 1987. Gejala Inbreeding Dalam Penangkaran Satwa Liar. *Media Konservasi*. 1(4):1-10.
- Tonusin, K. 2016. *Beautiful Male Green Peafowl (Pavo muticus) in Thai Forest*. [https://www.123rf.com/photo\\_50914787\\_beautiful-male-green-peafowl-pavo-muticus-in-thai-forest.html?fromid=aXU2ZlIwYjhzeW4vdG5rU0E1em1ydz09](https://www.123rf.com/photo_50914787_beautiful-male-green-peafowl-pavo-muticus-in-thai-forest.html?fromid=aXU2ZlIwYjhzeW4vdG5rU0E1em1ydz09) [15 Februari 2019]
- Wandia, I. N. 2001. Genom Mitokondria. *J Vet*. 2(4):131-137.
- Warmadewi, D. A. 2017. *Buku Ajar Mutasi Genetik*. Denpasar: Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Warmadewi, D. A., Oka, I. G. L., Sarini, N. P., Ardika, I. N., dan Dewantari, M. 2015. *Bahan Ajar Ilmu Pemuliaan Ternak*. Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Widayanti, R., Pakpahan, S., Artama, W. T., dan Suparta, I. 2016. Genetic Characteristics and Relationship in Different Goat Populations of

Indonesia Based on Cytochrome B Gene Sequences. *Asian Journal of Animal Sciences*. 10(1): 29-58.

Yusuf, Z. K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Saintek*. 5(6): 1-6.





### Lampiran 1. Isolasi DNA

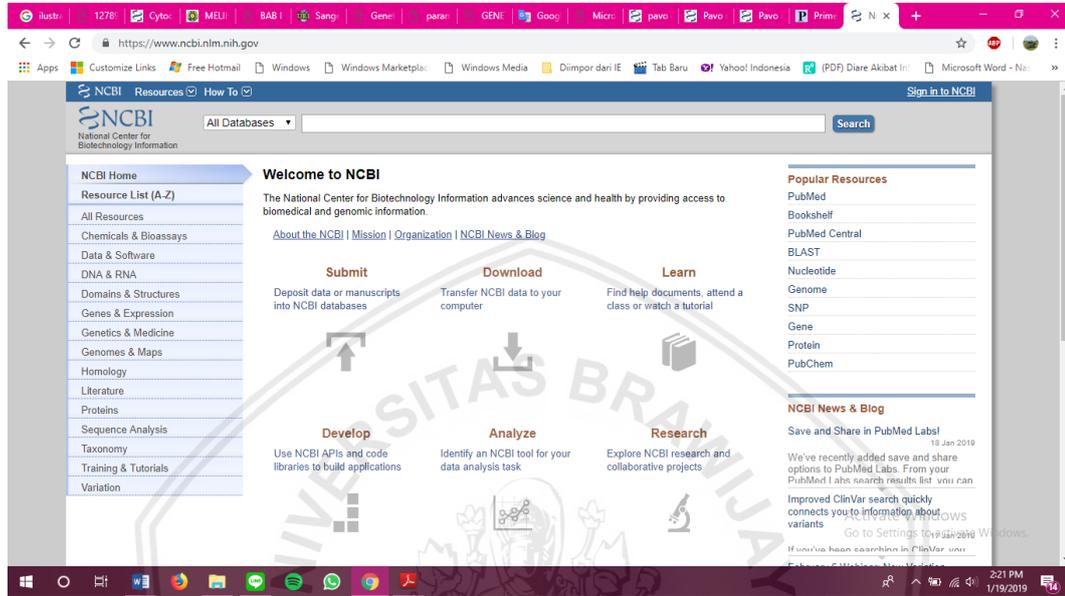
1. Masukkan sampel bulu Merak Jawa yang telah dipotong kecil-kecil kurang lebih 0,5 cm ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL.
2. Tambahkan (Proteinase K) sebanyak 20  $\mu\text{L}$ .
3. Masukkan PBS sebanyak 300  $\mu\text{L}$ .
4. Selanjutnya buffer AL dimasukkan sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , kemudian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

## Lampiran 2. Uji Kualitas DNA

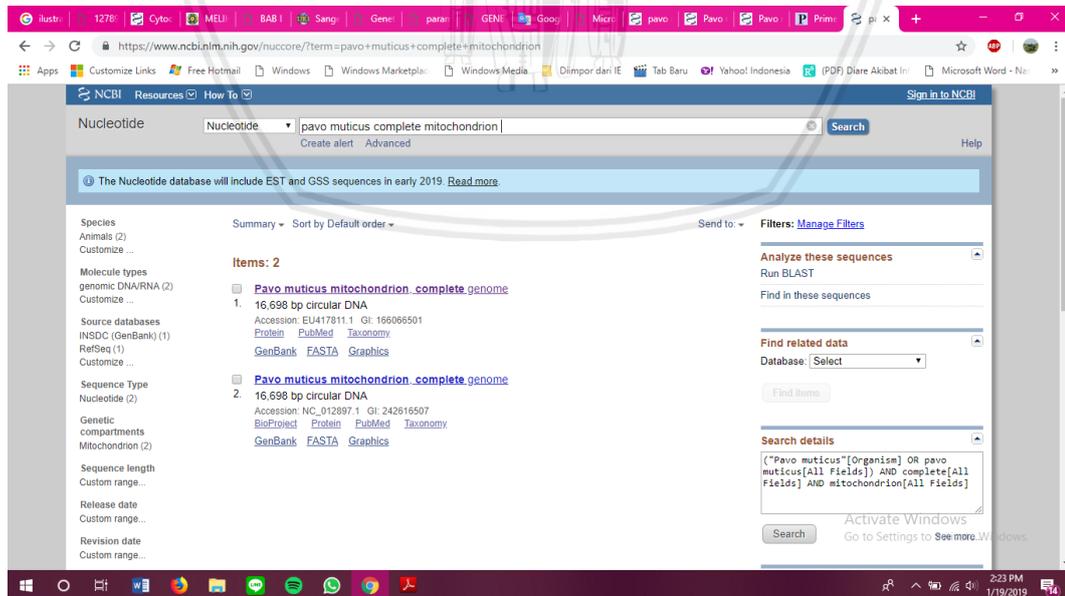
1. Bersihkan cetakan agarose dan diletakkan secara horizontal.
2. Panaskan TBE sebanyak 35 mL di oven sekama 30 detik bersama serbuk agarose 1% atau 0,35 gram hingga agarose larut.
3. Kemudian tambahkan pewarna EtBr pada larutan agarose sebanyak 1  $\mu$ L dan didinginkan.
4. Siapkan sisir dan *plate* 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 *cocktail* ke dalam sumuran sebanyak 4  $\mu$ L.
8. Kemudian larutan buffer elektroforesis (*running* TBE) dituangkan de dalam *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-Transiluminator.

### Lampiran 3: Desain Primer

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



- b. Dipilih 'Nucleotide' kemudian diisikan kata kunci pada pencarian (*Pavo muticus complete mitochondrion*). Klik search hingga muncul tampilan sebagai berikut:



NCBI Nucleotide

Search

Advanced

Help

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

Articles about the CYTB gene

Relaxation of selective constraints on an avian mitochondrial DNA following [Genome Res. 2009]

See all...

Activate Windows

More about the gene CYTB

CYTB gene

GenBank: AF013763.1

FASTA [Graphics](#)

Go to:

LOCUS AF013763 1143 bp DNA linear VRT 24-JUL-2016

DEFINITION Pavo muticus cytochrome b (cytb) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds.

ACCESSION AF013763

VERSION AF013763.1

KEYWORDS -

SOURCE mitochondrion Pavo muticus (green peafowl)

ORGANISM Pavo muticus

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Cranialia; Vertebrata; Euteleostomi; Archelosauria; Archosauria; Dinosauria; Saurischia; Theropoda; Coelurosauria; Aves; Neognathae; Gallonserae; Galliformes; Phasianidae; Phasianinae; Pavo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1143)

AUTHORS Kimball, R.T., Braun, E.L. and Ligon, J.D.

TITLE Resolution of the phylogenetic position of the Congo peafowl, Afropavo congensis: a biogeographic and evolutionary enigma

JOURNAL Proc R Soc Lond B Biol Sci 264 (1997) 1517-1523 (1997)

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

cytochrome b

3/5

Search

PubMed (Weighted)

Recent activity

Turn Off Clear

Pavo muticus **cytochrome b** (cytb) gene, mitochondrial gene encoding mitochond Nucleotide

Pavo muticus **cytochrome b** (cytb) gene, partial cds, mitochondrial Nucleotide

pavo muticus (59) Nucleotide

pavo muticus cyt b (0) Nucleotide

cyt b pavo muticus (0) Nucleotide

See more...

Activate Windows

Go to Settings to activate Windows.

PUBMED 18082609

REFERENCE 3 (bases 1 to 1143)

AUTHORS Kimball, R.T., Braun, E.L. and Ligon, J.D.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-JUL-1997) Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NH 87131, USA

FEATURES

source 1..1143

Location/Qualifiers

/organism="Pavo muticus"

/organelle="mitochondrion"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:9833"

/issue\_type="blood"

1..1143

/gene="cytb"

1..1143

/gene="cytb"

/codon\_start=1

/transl\_table=2

/product="cytochrome b"

/protein\_id="aa09335.1"

/translation="MHPNIRKSHPLKIMINSLIDLPAPSISAWNFGSLAVCLATQITGLLAPHYTADTSLAFSSVAHCTCNVQGHILIRNLHANGASFFFCIFLHTRGRG LYYGSLYKETHNIGVLLLLMATAFVGVYLPWQQSFWGATVITNLFSAIPIYIGQT LVEWAGQFSDVNPITLRFALHPLPPIVAGITIIHLTFHESGSNPLGISNSDK IPFHPYSLKDIQLGLTLPFIFLFLAIFSNLLGDPENFTFAIVLTPPNKIDPVEL FAYAILNSIPMKLGGVLAASVLLILLIPFLHKSQRTHFRPLSQILFNLVANLL ILTVIGSQVHPFIIIGQMASFSVFSILLIFPAIGTLENKLNH"

ORIGIN

1 atggcaccga acatcggaaa atcccacccc ctactaanaa taatacaaaa cctcccaatc

61 gacctccccc ctccatctaa catctccgct tgatgaact tcggctccct gctagcagta

121 ttccttgcca ctcaaatcat cactggccta ctactagcaa tacatacaac ccgagacaca

181 tccctagcct tctcctcagt agcccacaca tgtgaaacg tacaatcagg ctgactcctc

241 cggaaatctc atgcaaatgg agcttcactc tctctcatct gcatctcctt cccacatcga

301 cggagcctat actaggcttc ctactctaa aagaaacctt gaacacagg agtagcttc

361 ctctcaccac tcatagcaac cgctctgata gctatgtac tccctatagg tcaaatgtca

421 tctcaggggg caactgttat cacaaactca tctcagcaa tccctatagg tggacaaccc

481 ctgtagaact gacctcagg gggattctca gtcagcaacc caectctcac cggattcttc

541 gcctcactct tctcctccc ctgtgtaact cgggaatta caattatcca cctcactc

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

The screenshot shows the NCBI Nucleotide database search results for the Pavo muticus cytochrome b (cytb) gene. The search results display the FASTA sequence and various analysis options such as Run BLAST, Pick Primers, and Highlight Sequence Features. The sequence is highlighted in blue.

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

The screenshot shows the Primer3Plus website interface. The page displays the 'Pick Primers' button and the 'Paste template sequence below' field, which is highlighted in yellow. The interface includes various settings and options for primer selection.

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

News: Try out our new tool: [Wiley-DNA-Editor](#) - A DNA/Plasmid editor running in your browser!

## Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

Load server settings: **Default**  Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Task: **generic**

Main | General Settings | **Advanced Settings** | Internal Oligo | Penalty Weights | Advanced Sequence

Sequence Id:

Paste template sequence below Or upload sequence file:  No file chosen

```
AGTAGTTCTCTCTCCACACTCATAGCAACCCGCTTCGTAGGCTATGFACTCCATAGGTCGAARTGTCA
TTCTGAGGGGACGCTATCCAAATCTATTCTGAGCACTCCCTATATGAGCAACCCCTATAGAT
GAGCCTGAGGGGATTCCTAGTGCACACCCACCCCTCACCCTGCTTCGCGCTACACTTCTCTCTCC
CTTTGTAAATGCGAGGAAATACAAATTCACCTCCACCTCCATGATCAAGCTCAAAATATCCACTA
GGCATCTCACCAGCTCAGACAAATTCGGTCCACCCACTACTCCCTCAAGATATCCATAGGCTTAA
CTCTTAAATTTAGCTCTTCTAGCTAGGCTTTCTCCCGATGCTCTGTTGCGGCAAGATTT
TAOCCGCAAAACCCCTAGTAACCCCGGACATTAACCCGAAATGACTTCTTATTGCTAGGCC
ATCTTGTCTCAATCCCAACAACTAGSAGSCTACTAGCCCTAGCAGCTCAGTACTCATCTCTTT
TAATCCCTTCTCCCAAAATCAGAGAAAGSAGCTATAGCTCCACTCTCCAAATCTCTTTT
ACTCTAGTACTAGCTACTCTCTAATGATGSSGATGACAGTAGAACCCCTATCTGTATC
ATGGGTGAGATAGCTCTCTCTCTATTGAGCATCTCTAATCTCTCTCCGTCATGSSAGCCTTAG
AAAAAATAATCTAAGCCACTA
```

Mark selected region:

Excluded Regions:

Targets:

Included Region:

g. Klik pick primer lalu muncul sebagai berikut

News: Try out our new tool: [Wiley-DNA-Editor](#) - A DNA/Plasmid editor running in your browser!

## Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

< Back

Pair 1: Primer

Left Primer 1:

Start: 11 Length: 20 bp Tm: 60.0 C GC: 55.0% Any: 0.0 End: 0.0 TR: 8.0 HP: 0.0 Stab: 5.0 Penalty: 0.034

Right Primer 1:

Start: 517 Length: 20 bp Tm: 60.0 C GC: 55.0% Any: 17.9 End: 0.0 TR: 7.0 HP: 0.0 Stab: 4.8 Penalty: 0.041

Pair: Product Size: 507 bp Any: 0.0 End: 0.0 TR: 15.0 Penalty: 0.075

Send to Primer3Manager |

1	ATGGCACCCA	ACATCCGAAA	ATCCACCCC	CTACTAAAAA	TAATCAACAA
51	CTCCCTAATC	GACCTCCCGG	CTCCATCTAA	CATCTCCGCT	TGATGAACT
101	TGGGTCGCT	GOTAGCAGTA	TGCGTTGCCA	CTCAAAATCAT	CACTGGCCTA
151	CTACTAGCAA	TACTACTAC	CGCAGACACA	TCCCTAGCCT	TCTCCTCAGT
201	AGCCACACA	TGTGAAACG	TACAATACGG	CTGACTGATC	CGGAATCTTC
251	ATGCAAAATG	AGCTTCATTC	TTCTTCTCT	GATCTTCTCT	CCACATCGGA
301	CGCGGCTAT	ACTACGGCTC	CTACTTATAC	AAAGAACTCT	GAACACAGG
351	AGTAGTCTC	CTCTCCAC	CTATAGCAC	CGCCTCTGTA	GGCTATGTAC
401	TCCCATGAG	TCAAATGCA	TTCTGAGGG	CACTCTTAT	CACAAATCTA
451	TTCTCAGCAA	TCCCTTATAT	TGGACAACC	CTAGTAGAAT	GAGCCTGAGG
501	GGGATTCTCA	GTCGACACCC	CAAGCCTCAC	CCGATCTCTC	GGCCTACACT
551	TTCTCTCTCC	CTTTGTAATC	GGAGGAATTA	CAATTATCCA	CCTCACATTC

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

#### Lampiran 4. Hasil Nanodrop Sampel

No. 200/250	Type	Abs250	Abs260	Abs280	200/280	Conc(ng/ul)	Time
1	Dsdna	-0.02	0.01	-0.00	-19.77	0.61	2019- 4- 4//16: 4: 8
2	Dsdna	-0.10	-0.08	-0.10	0.79	-3.91	2019- 4- 4//16: 4:58
3	Dsdna	0.34	0.58	0.52	1.13	29.25	2019- 4- 4//16: 5:36
5	Dsdna	-0.15	-0.06	-0.07	0.75	-2.76	2019- 4- 4//16: 6:41
7	Dsdna	0.25	0.51	0.28	1.83	25.39	2019- 4- 4//16: 8: 3
8	Dsdna	0.04	0.04	0.06	0.79	2.24	2019- 4- 4//16: 8:37
9	Dsdna	-0.03	0.01	0.02	0.73	0.68	2019- 4- 4//16: 9:11
11	Dsdna	-0.08	0.07	-0.02	-3.71	3.31	2019- 4- 4//16:10:40

Hasil uji kuantitas sampel B1, B2, B3, J1, J2, J3 dengan spektrofotometer NANO Drop.

Keterangan: 1: sampel B1, 2: sampel B2, 3: sampel B3, 7: sampel J1, 8: sampel J2, 9: sampel J3.



## Lampiran 5. BLAST Sekuen DNA Sampel

### Hasil BLAST

1. Pilih file sekuen dengan format *.txt* atau *fasta*. Lalu klik “BLAST”

The screenshot displays the NCBI BLAST web interface. At the top, there are logos for NIH and NCBI, and a 'Sign in to NCBI' link. The main heading is 'BLAST >> blastn suite'. Below this, there are navigation links: 'Home', 'Recent Results', 'Saved Strategies', and 'Help'. The main content area is titled 'Standard Nucleotide BLAST'. It features a 'blastn' tab and a 'BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...' link. The 'Enter Query Sequence' section has a text input field for 'Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)', a 'Clear' button, and a 'Query subrange' section with 'From' and 'To' fields. Below this is an 'Or, upload file' section with a 'Choose File' button (highlighted with a red box) and a file name '1st\_BASE\_3...AMG\_F.seq'. There is also a 'Job Title' field and an 'Align two or more sequences' checkbox. The 'Choose Search Set' section includes a 'Database' dropdown set to 'Nucleotide collection (nr/nt)', an 'Organism' field, and several checkboxes for 'Exclude' and 'Limit to' options. The 'Program Selection' section has radio buttons for 'Optimize for' options: 'Highly similar sequences (megablast)', 'More dissimilar sequences (discontiguous megablast)', and 'Somewhat similar sequences (blastn)'. At the bottom, a 'BLAST' button (highlighted with a red box) is next to the text 'Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)'. There is also a checkbox for 'Show results in a new window' and a link for '+ Algorithm parameters'.

2. 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"/> <a href="#">Pavo muticus mitochondrion, complete genome</a>	608	608	94%	4e-170	99.40%	<a href="#">EU417811.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pavo muticus imperator cytochrome b (cytb) gene, complete cds: mitochondrial</a>	608	608	94%	4e-170	99.40%	<a href="#">DQ010650.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pavo muticus cytochrome b (cytb) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds</a>	608	608	94%	4e-170	99.40%	<a href="#">AF013763.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pavo muticus isolate V20 cytochrome b (cytb) gene, partial cds: mitochondrial</a>	547	547	94%	9e-152	96.13%	<a href="#">AY870282.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pavo cristatus mitochondrion, complete genome</a>	531	531	94%	9e-147	95.24%	<a href="#">KF444060.1</a>

## Hasil BLAST

Pavo muticus cytochrome b (cytb) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds

Sequence ID: [AF013763.1](#) Length: 1143 Number of Matches: 1

Range 1: 205 to 540 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
608 bits(329)	4e-170	334/336(99%)	2/336(0%)	Plus/Plus

```

Query 18  CACACATGTCG--ACGTACAATACGGCTGACTCATCCGGAATCTTCATGCAATGGAGCT 75
Sbjct 205  CACACATGTCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCCGGAATCTTCATGCAATGGAGCT 264

Query 76  TCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCTCCACATCGGACGGGCTATACTACGGCTCTAC 135
Sbjct 265  TCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCTCCACATCGGACGGGCTATACTACGGCTCTAC 324

Query 136  TTATACAAGAAACCTGAAACACAGGAGTAGTTCTCCTCCTCACACTCATAGCAACCGCC 195
Sbjct 325  TTATACAAGAAACCTGAAACACAGGAGTAGTTCTCCTCCTCACACTCATAGCAACCGCC 384

Query 196  TTCGTAGGCATGTACTCCCATGAGGTCAAATGTCATTCTGAGGGGCAACTGTTATCAC 255
Sbjct 385  TTCGTAGGCATGTACTCCCATGAGGTCAAATGTCATTCTGAGGGGCAACTGTTATCAC 444

Query 256  AAATCTATTCTCAGCAATCCCTTATATTGGACAAACCCCTAGTAGAATGAGCCTGAGGGGG 315
Sbjct 445  AAATCTATTCTCAGCAATCCCTTATATTGGACAAACCCCTAGTAGAATGAGCCTGAGGGGG 504

Query 316  TTCTCAGTCGACAAACCCCAACCTCACCCGATTCTTC 351
Sbjct 505  TTCTCAGTCGACAAACCCCAACCTCACCCGATTCTTC 540

```

Gambar hasil BLAST gen cyt b mukleotida sampel B2 terhadap urutan nukleotida dari Database NCBI dengan *sequence* ID: AF013763.1 Pavo muticus.

Keterangan: 94% *Query coverage*, 99,4% *Ident*

Pavo muticus cytochrome b (cytb) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds

Sequence ID: [AF013763.1](#) Length: 1143 Number of Matches: 1

Range 1: 204 to 540 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
616 bits(333)	2e-172	336/337(99%)	1/337(0%)	Plus/Plus

```

Query 17  CCACACATGTCG-AACGTACAATACGGCTGACTCATCCGGAATCTTCATGCAATGGAGC 75
Sbjct 204  CCACACATGTCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCCGGAATCTTCATGCAATGGAGC 263

Query 76  TTCAATCTTCTTCATCTGCATCTTCTCCACATCGGACGGGCTATACTACGGCTCTTA 135
Sbjct 264  TTCAATCTTCTTCATCTGCATCTTCTCCACATCGGACGGGCTATACTACGGCTCTTA 323

Query 136  CTTATACAAGAAACCTGAAACACAGGAGTAGTTCTCCTCCTCACACTCATAGCAACCGCC 195
Sbjct 324  CTTATACAAGAAACCTGAAACACAGGAGTAGTTCTCCTCCTCACACTCATAGCAACCGCC 383

Query 196  CTTCTGAGGCATGTACTCCCATGAGGTCAAATGTCATTCTGAGGGGCAACTGTTATCAC 255
Sbjct 384  CTTCTGAGGCATGTACTCCCATGAGGTCAAATGTCATTCTGAGGGGCAACTGTTATCAC 443

Query 256  AAATCTATTCTCAGCAATCCCTTATATTGGACAAACCCCTAGTAGAATGAGCCTGAGGGGG 315
Sbjct 444  AAATCTATTCTCAGCAATCCCTTATATTGGACAAACCCCTAGTAGAATGAGCCTGAGGGGG 503

Query 316  ATTCTCAGTCGACAAACCCCAACCTCACCCGATTCTTC 352
Sbjct 504  ATTCTCAGTCGACAAACCCCAACCTCACCCGATTCTTC 540

```

Gambar hasil BLAST gen cyt b mukleotida sampel J1 terhadap urutan nukleotida dari Database NCBI dengan *sequence* ID: AF013763.1 Pavo muticus.

Keterangan: 94% Query coverage, 99,7% Ident

Pavo muticus cytochrome b (cytb) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds  
Sequence ID: [AF013763.1](#) Length: 1143 Number of Matches: 1

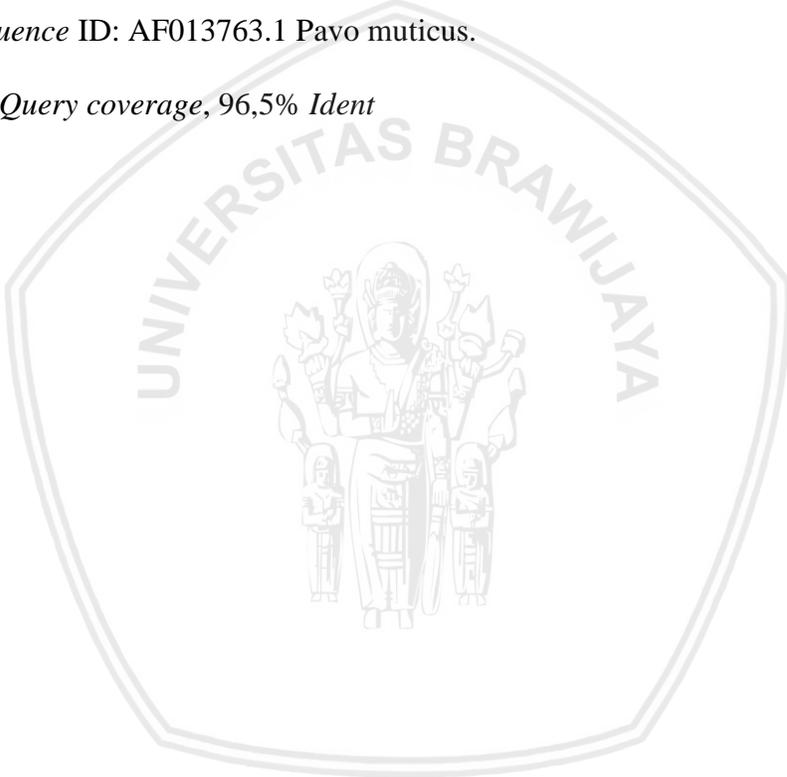
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
244 bits(132)	5e-61	146/152(96%)	3/152(1%)	Plus/Plus

Query	7	TCT-CTTAGTAG-TCACACATGTCG-AACGTACAATACGGCTGACTCATCCGGAATCTTC	63
Sbjct	191	TCTCCTCAGTAGCCACACATGTCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCCGGAATCTTC	250
Query	64	ATGCAAATGGAGCTTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTCCACATCGGACGCGGCCTAT	123
Sbjct	251	ATGCAAATGGAGCTTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTCCACATCGGACGCGGCCTAT	310
Query	124	ACTACGGTTCCTACTTATACAAAGAAACCTGA	155
Sbjct	311	ACTACGGTTCCTACTTATACAAAGAAACCTGA	342

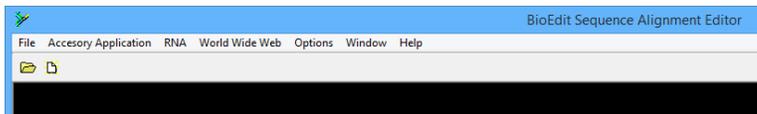
Gambar hasil BLAST gen cyt b nukleotida sampel J2 terhadap urutan nukleotida dari Database NCBI dengan sequence ID: AF013763.1 Pavo muticus.

Keterangan: 94% Query coverage, 96,5% Ident

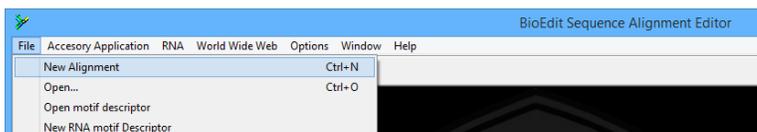


## Lampiran 6. Pembacaan Hasil Sekuensing Menggunakan Bioedit Tools

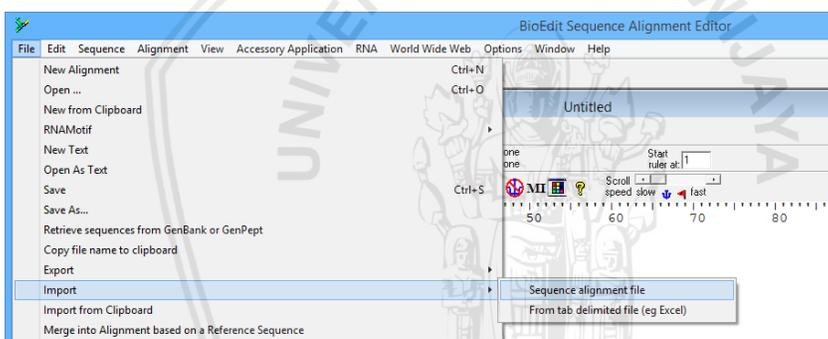
1. Dibuka aplikasi BioEdit Tools hingga muncul tampilan seperti gambar di bawah.



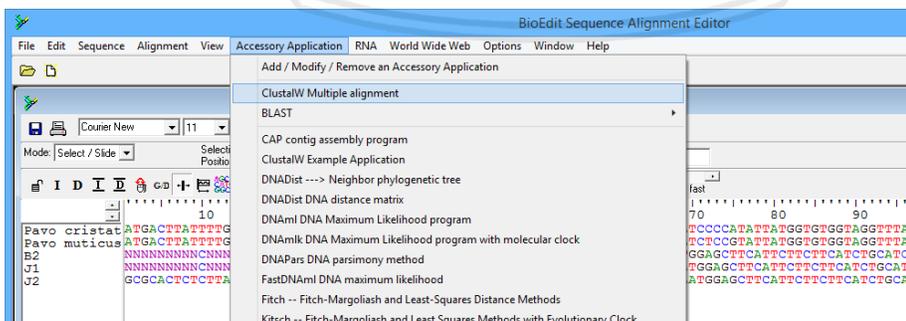
2. Pilih file > new alignment



3. Selanjutnya pilih file > import > sequence alignment file. Buka semua file yang akan disejajarkan.



4. Pilih semua sekuens untuk disejajarkan kemudian pilih accessory application > ClustalW Multiple alignment.

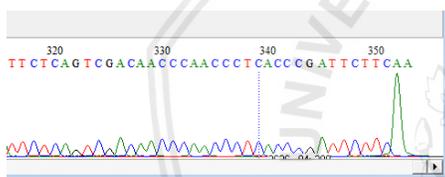
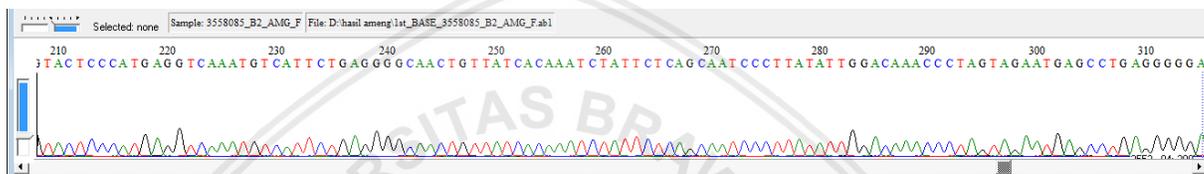
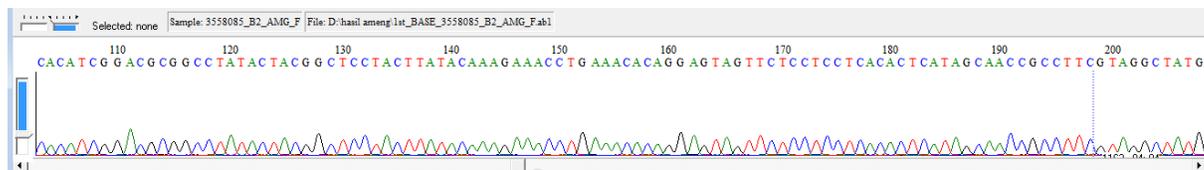
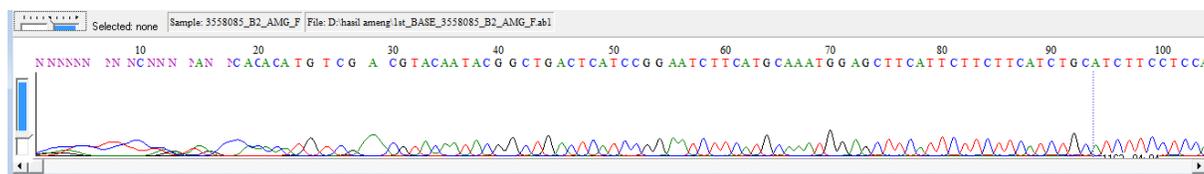


5. Klik Run ClustalW untuk melihat hasil penyejajaran sekuen.

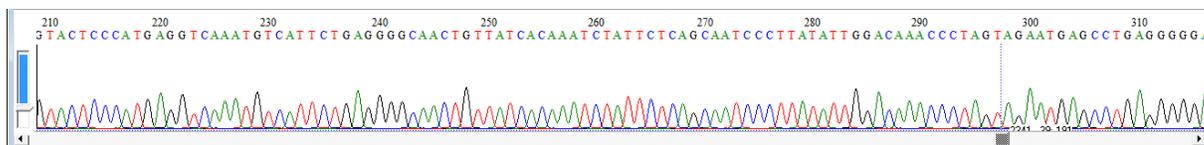
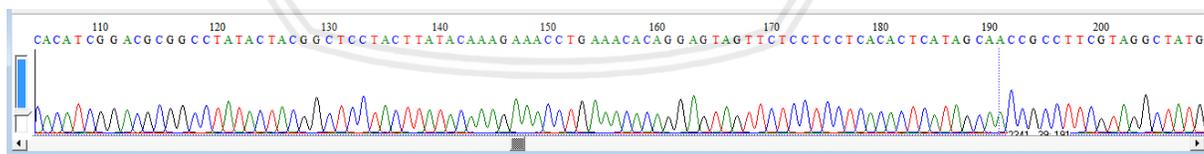
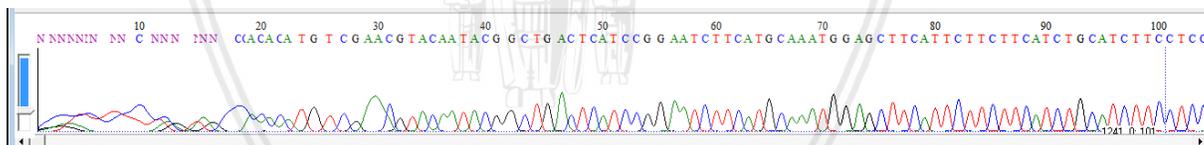


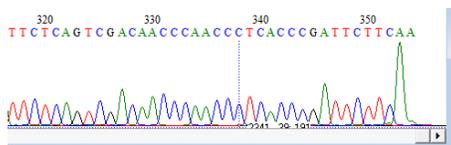
## Lampiran 7. Grafik Elektroferogram Sekuen Sampel.

### Sampel B1



### Sampel J1





Sampel J2

