

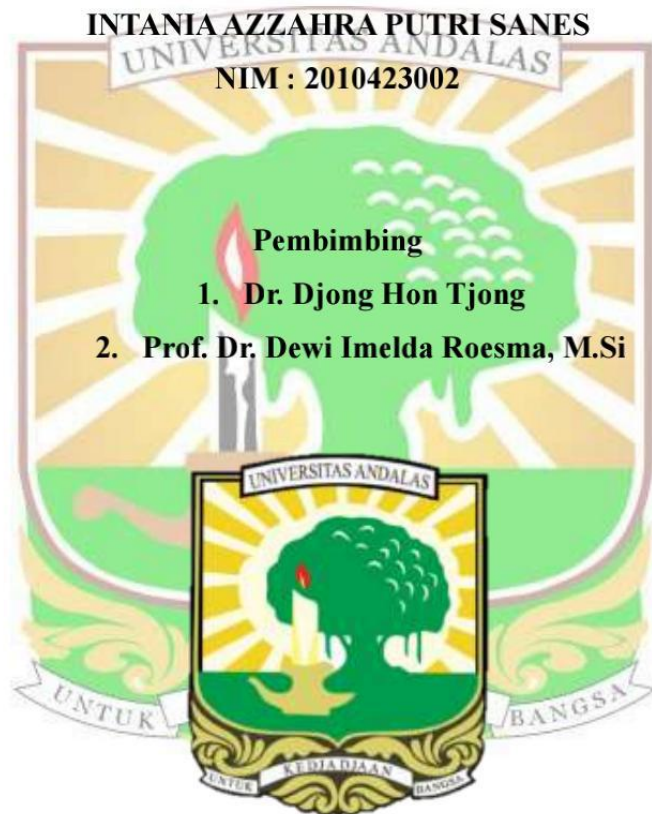
**SELEKSI DAN OPTIMASI PRIMER MIKROSATELIT PADA BERANG-  
BERANG CAKAR KECIL (*Aonyx cinereus* ILLIGER, 1815) DI LUBUK  
ALUNG, SUMATERA BARAT**

**SKRIPSI SARJANA BIOLOGI**

**OLEH :**

**INTANIA AZZAHRA PUTRI SANES**

**NIM : 2010423002**



**Pembimbing**

- 1. Dr. Djong Hon Tjong**
- 2. Prof. Dr. Dewi Imelda Roesma, M.Si**

**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2024**

**SELEKSI DAN OPTIMASI PRIMER MIKROSATELIT PADA BERANG-  
BERANG CAKAR KECIL (*Aonyx cinereus* ILLIGER, 1815) DI LUBUK  
ALUNG, SUMATERA BARAT**

**SKRIPSI SARJANA BIOLOGI**

**OLEH :**

**INTANIA AZZAHRA PUTRI SANES**

**NIM : 2010423002**



**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS**

**PADANG**

**2024**

**SELEKSI DAN OPTIMASI PRIMER MIKROSATELIT PADA BERANG-  
BERANG CAKAR KECIL (*Aonyx cinereus* ILLIGER, 1815) DI LUBUK  
ALUNG, SUMATERA BARAT**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains Bidang  
Studi Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

**Universitas Andalas Padang**

**Oleh :**

**Intania Azzahra Putri Sanes**

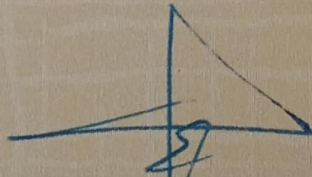
**2010423002**

**Padang, 22 Agustus 2024**

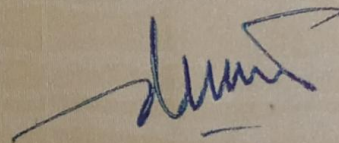
**Disetujui oleh :**

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

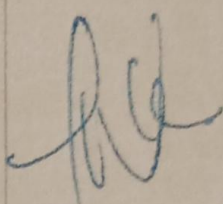
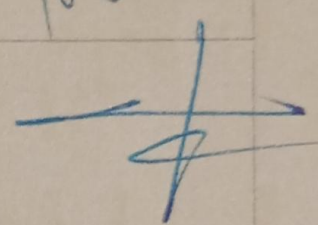
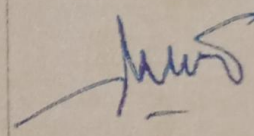
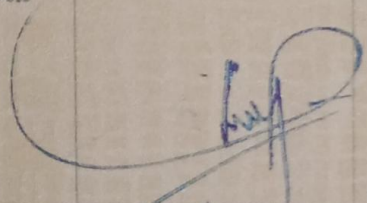
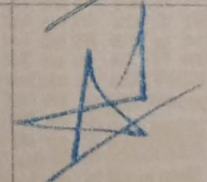


**Dr. Djong Hon Tjong, M.S**  
**NIP. 196810111995121001**



**Prof. Dr. Dewi Imelda Roesma, M.Si**  
**NIP. 195803041985032001**

Skripsi ini telah dipertahankan didepan panitia ujian sarjana Biologi Fakultas  
Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang pada  
Hari Rabu, 31 Juli 2024

No	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Dr. Wilson Novarino	Ketua	
2	Dr. Djong Hon Tjong	Sekretaris	
3	Prof. Dewi Imelda Roesma, M.Si	Anggota	
4	Prof. Dr. Mansyurdin	Anggota	
5	Dr. Aadrean	Anggota	

Alhamdulillah.... dengan ridha-Mu ya Allah.....

Dengan izinmu kuberhasil menyelesaikan karya tulis ini

Tak hentinya aku mengucap rasa syukur atas kemudahan dan jalan yang Engkau beri dan selalu yakin bahwa Engkau selalu memberikan yang terbaik

Dengan kerendahan hati,

Kupersembahkan karya kecil ini untuk

Mama Amnestyear Dan Papa Salman yang tercinta

Tiada cinta yang paling tulus selain kasih sayang Mama dan Papa

Doamu kekuatan untukku, memberikan tuntun cahaya mengarungi lelahku

Takkan pernah lu lupa semua jerih lelah dan pengorbanan yang engkau berikan

Ku berjanji akan membahagiakanmu sampai akhir hayat ku,

Kakak Dea, adek Bila dan Abang Ihsan, saudara dan saudari yang senantiasa

memberikan support

Kepada Akang yang selalu memberikan semangat dan siap siaga membantu

uda uni Labor Genetika dan kawan-kawan Albatros

Terima kasih atas bantuan dan dukungannya

Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi orang banyak dan menjadi amal

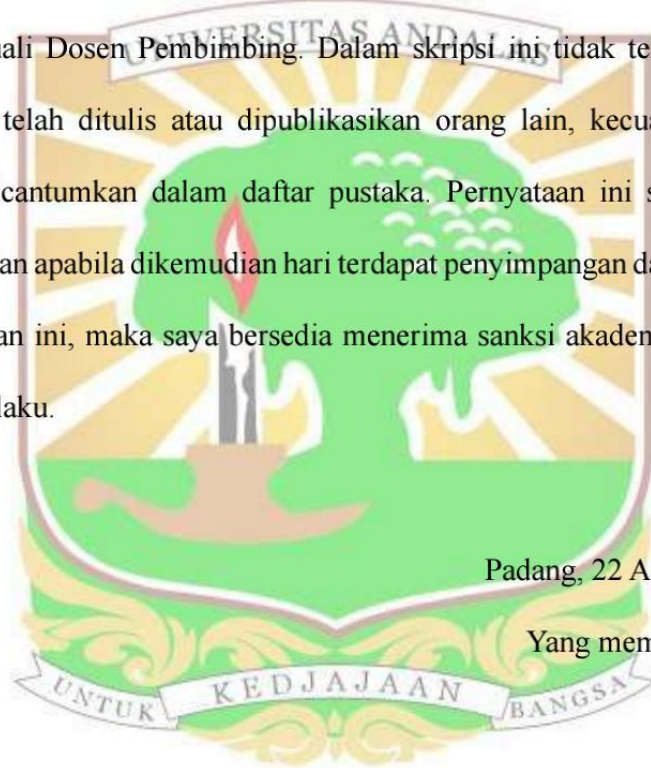
kedepannya

~intan~

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa:

Skripsi saya ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik sarjana baik di Universitas Andalas maupun di perguruan tinggi lain. Skripsi ini adalah murni gagasan rumusan dan penelitian saya sendiri tanpa bantuan orang lain kecuali Dosen Pembimbing. Dalam skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan dalam daftar pustaka. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik sesuai dengan aturan yang berlaku.



Padang, 22 Agustus 2024

Yang membuat pernyataan

Intania Azzahra Putri Sanes

2010423002

## KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan nikmat kesehatan dan kesempatan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“Seleksi dan Optimasi Primer Mikrosatelit Pada Berang-Berang Cakar Kecil (*Aonyx Cinereus Illiger, 1815*) Di Lubuk Alung, Sumatera Barat”** yang merupakan salah satu syarat dalam memperoleh gelar sarjana Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang. Shalawat dan salam tidak lupa penulis sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW. Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian dalam mata ajaran Genetika dan Biomolekuler.

Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada orangtua atas do'a, bimbingan, arahan, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis kemudian kepada Bapak Dr. Djong Hon Tjong sebagai pembimbing I dan Ibu Prof. Dr. Dewi Imelda Roesma sebagai pembimbing II yang telah membimbing dan memberikan banyak masukan kepada penulis dimulai dari penyusunan proposal sampai selesainya penelitian dan skripsi ini. Selanjutnya penulis juga mengucapkan terimakasih juga kepada:

1. Bapak Dr. Wilson Novarino selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA Universitas Andalas, Padang.
2. Bapak Prof. Mansyurdin, Bapak Dr. Wilson Novarino, Bapak Dr. Aadrean selaku dosen Penguji yang telah memberikan saran dan masukan dalam penulisan skripsi ini.

3. Ibu Dr. Solfiyeni selaku Pembimbing Akademik bimbingan dan motivasi kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan studi ini.
4. Ibu Prof. Dr. Dewi Imelda Roesma selaku kepala laboratorium genetika dan biomolekuler, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas.
5. Bapak dan Ibu Dosen staf pengajar serta karyawan dan karyawan di lingkungan Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.
6. Teman-teman seperjuangan Biologi 2020 “ALBATROS” yang telah membantu dan memberikan semangat serta semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan dapat berkontribusi demi kemajuan dan perkembangan khazanah ilmu pengetahuan. Semoga Allah melimpahkan rahmat dan nikmat-Nya kepada kita semua.

Padang, 21 Agustus 2024

Penulis



## ABSTRAK

Penelitian mengenai seleksi dan optimasi primer mikrosatelit berang-berang cakar kecil telah dilakukan pada bulan April 2024 sampai Juli 2024, di area persawahan Lubuk Alung menggunakan metode survei dan observasi secara molekuler dengan penanda DNA Mikrosatelit. Dari hasil pengamatan didapatkan empat primer mikrosatelit yang mengamplifikasi pada sampel feses *Aonyx cinereus* yaitu Lut435 pada suhu 48°C, 49°C, 50°C dan 52°C, primer Lut453 dan Lut457 pada suhu 49°C serta primer Lut615 pada suhu 49°C dan 50°C.

Kata Kunci : *Berang-berang cakar kecil, Mikrosatelit, Primer*



## ABSTRACT

Research on primer selection and optimization microsatellites was carried out from April 2024 to July 2024, in the Lubuk Alung rice field area using survey and molecular observation methods. molecular observation with Microsatellite DNA markers. From the results observations, four microsatellite primers were obtained that amplified the *Aonyx cinereus* feces samples, namely Lut435 at 48 ° C, 49 ° C, 50 ° C and 52 ° C, primers Lut453 and Lut457 at 49°C and primer Lut615 at 49°C and 50°C.

Keywords: *Small-clawed otter, Microsatellites, Primers*



## DAFTAR ISI

<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Berang-berang Cakar Kecil ( <i>Aonyx cinereus</i> ) .....	5
2.2 DNA Mikrosatelit .....	7
<b>BAB III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>11</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	11
3.2 Metode Penelitian.....	11
3.3 Bahan dan Alat .....	11
3.4 Cara kerja .....	11
3.4.1 Di Lapangan.....	12
3.4.2 Di Laboratorium .....	12
3.5 Analisis Data.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>20</b>

4.1 Isolasi DNA.....	20
4.2 Seleksi Primer DNA Mikrosatelit.....	22
4.3 Profil Pita DNA Hasil Amplifikasi dengan Penanda Mikrosatelit.....	26
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>31</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>32</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>37</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. <i>Aonyx cinereus</i> illiger 1815.....	5
Gambar 2. Cara scoring pita.....	17
Gambar 3. Visualisasi primer hasil elektroforesis.....	24
Gambar 4. Visualiasi pita DNA dengan elektroforesis otomatis.....	26



## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Informasi tentang sepuluh pasang primer pengapit DNA Mikrosatlit.....	14
Tabel 2. Komposisi reaksi PCR.....	15
Tabel 3. Siklus amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR.....	15
Tabel 4. Data konsentrasi dan kualitas DNA dalam sampel.....	20
Tabel 5. Data keterangan primer yang menghasilkan amplikon pada PCR Gradien...22	
Tabel 6. Temperatur <i>Anneling</i> masing-masing primer.....	25
Tabel 7. Keterangan sampel dan urutan pita yang muncul .....	28
Tabel 8. Jenis primer yang digunakan dan ukuran pita yang dihasilkan.....	29



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Lokasi laterine site pengambilan sampel.....	37
Lampiran 2. Pengambilan sampel feses <i>Aonyx cinereus</i> .....	37
Lampiran 3. Hasil NanoDrop spektrofotometri.....	38



## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Berang-berang merupakan salah satu spesies mamalia yang masuk ke dalam famili Mustelidae dengan sub famili Lutrinae. Hewan ini dibedakan dari anggota famili Mustelidae lainnya berdasarkan telapak kaki yang memiliki selaput renang dan tubuh yang ditutupi rambut yang rapat, sehingga memudahkannya dalam berenang untuk mencari mangsa. Jumlah spesies ini dilaporkan sebanyak 13 spesies di dunia dan 4 spesies diantaranya ditemukan di Indonesia (Pramudianto, 2020) yaitu di Jawa (Rihaidini *et al.*, 2022), Aceh (Abdullah *et al.*, 2015) dan di Sumatera Barat. Salah satu spesies belang-berang yang terdapat di Indonesia yaitu *Aonyx cinereus* (Aadrean *et al.*, 2010).

*Aonyx cinereus* adalah belang-berang terkecil di dunia dengan panjang sekitar 0,9 meter dan beratnya sekitar 5 kg. Spesies ini merupakan spesies yang paling sedikit berinteraksi dengan air dibandingkan spesies belang-berang lainnya dengan habitat utamanya adalah persawahan (Ma'aruf, 2020). Berdasarkan organisasi *The International Otter Survival Fund* (IOSF) (2013) yang dibentuk untuk upaya konservasi belang-berang di seluruh dunia, spesies *Aonyx cinereus* memiliki status rentan (*vulnerable*). Penyebaran spesies ini dari kaki Bukit Himalaya di Himachal Pradesh ke arah timur di seluruh Asia Selatan, sampai ke Filipina dan Indonesia.

Populasi spesies ini terus mengalami penurunan dari waktu ke waktu (IUCN, 2015c). Penurunan populasi terjadi diduga karena alih fungsi lahan, pencemaran



lingkungan dan juga perburuan yang dilakukan manusia (Duplaix dan Savage, 2018). Selain itu, permintaan masyarakat terhadap beragam-beragam cukup tinggi terutama untuk hewan peliharaan dan untuk diambil bagian tubuhnya (kulit dan organ) (IOSF, 2014; Kitade dan Naruse, 2018). Penurunan populasi terus menerus akan berdampak negatif pada kelangsungan hidup suatu spesies. Penurunan populasi menjadi awal kepunahan suatu spesies yang akan mengakibatkan terjadinya penurunan keragaman genetik (Nuryanto dan Kochzius 2009). Jika jumlah populasi menurun terus menerus maka akan mengurangi variasi genetik secara drastis karena sedikitnya anggota individu pada populasi yang kecil untuk meneruskan gen pada keturunannya (*bottle neck*). Ukuran populasi yang kecil menyebabkan peningkatan perkawinan berkerabat (*inbreeding*), sehingga hilangnya alel secara acak (*genetic drift*) dan meningkatkan frekuensi alel resesif yang merugikan (Frankham, 2010). Kemampuan populasi untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan akan berkurang dan mengancam keberlangsungan hidup anggota populasi.

Berdasarkan penjelasan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian pada tingkat DNA dalam populasi *Aonyx cinereus* di Lubuk Alung dengan marka molekuler, salah satunya menggunakan DNA mikrosatelit. DNA Mikrosatelit merupakan urutan basa nukleotida pada DNA dalam bentuk ulangan tandem basa yang menunjukkan variasi urutan DNA tertentu. Penanda DNA Mikrosatelit memiliki tingkat polimorfik yang tinggi sehingga cocok digunakan untuk mengetahui tingkat variasi genetik individu dalam populasi dengan menggunakan primer mikrosatelit yang spesifik (Allendorf dan Luikart, 2007).

Primer merupakan segmen pendek dari DNA yang digunakan sebagai titik awal untuk sintesis DNA selama proses *polymerase chain reaction*. Primer biasanya terdiri dari 18 hingga 25 nukleotida yang spesifik terhadap urutan target DNA yang akan diamplifikasi atau diidentifikasi (Watson, 2014). Primer mikrosatelit untuk *Aonyx cinereus* belum pernah dilaporkan sebelumnya. Berbeda dengan *Lutra-lutra* yang sudah pernah dilaporkan oleh Huang (2005) mengenai desain 8 primer tetramikrosatelit dan Dallas & Piertney (1998) mengenai 10 desain primer mikrosatelit.

Penelitian analisis DNA mikrosatelit pada subfamili Lutrinae telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Moritte (2017) melaporkan bahwa *Aonyx cinereus* di Singapura sebagai spesies hibrida *Lutrogale perspicillata* dengan *Aonyx cinereus*, yang menjadi kasus hibridisasi pertama yang dilaporkan pada berang-berang di alam liar. Posonby (2019) melaporkan penelitian menggunakan DNA mikrosatelit menunjukkan terjadinya penurunan variasi genetik pada *Aonyx capensis* di Afrika Selatan akibat adanya ekspansi perkotaan.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat dirumuskan masalah yang hendak dijawab pada penelitian ini yaitu:

1. Bagaimanakah optimasi primer mikrosatelit pada populasi *Aonyx cinereus* di Lubuk Alung Sumatera Barat
2. Bagaimanakah seleksi primer mikrosatelit pada populasi *Aonyx cinereus* di Lubuk Alung Sumatera Barat .

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk optimasi primer Mikrosatelit pada populasi *Aonyx cinereus* di Lubuk Alung Sumatera Barat
2. Untuk menyeleksi primer Mikrosatelit pada populasi *Aonyx cinereus* di Lubuk Alung Sumatera Barat .

### 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai sumber informasi bagi peneliti mengenai marka DNA mikrosatelit *Aonyx cinereus* di Lubuk Alung, Sumatera Barat.



## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Berang-berang Cakar Kecil (*Aonyx cinereus*)

Secara taksonomi spesies ini termasuk ke dalam:

Kingdom : Animalia  
Filum : Chordata  
Kelas : Mamalia  
Ordo : Carnivora  
Family : Mustelidae  
Genus : *Aonyx*  
Spesies : *Aonyx cinereus* (Illiger, 1815)



Gambar 1. *Aonyx cinereus*  
(Sumber : IUCN, 2021)

*Aonyx cinereus* memiliki beberapa sinonim yaitu *Lutra cinerea* Illiger, 1815; *Lutra leptonyx* Horsfield, 1823; *Amblonyx concolor* Rafinesque, 1832; *Lutra indigitatus* Hodgson, 1839; *Leptonyx barang* Lesson, 1842; *Aonyx horsfieldii* Gray, 1843; *Aonyx sikimensis* Horsfield, 1855; *Lutra (Hydrogale) swinhoei* Gray, 1867; *Amblonyx cinereus* Pocock, 1921; *Amblonyx cinerea*: Pocock, 1921; *Amblyocix sernaria* Nelson, 1983 (Larivière, 2003)

*Aonyx cinereus* juga dikenal sebagai *Amblonyx cinereus*, dan sebelumnya sebagai *Aonyx cinerea*. Berdasarkan Analisa DNA spesies ini memiliki hubungan yang dekat dengan *Aonyx capensis* dan *Aonyx congicus*, sehingga berang-berang cakar kecil sekarang bernama *Aonyx cinereus* (IUCN, 2009).

*Aonyx cinereus* adalah berang-berang terkecil di dunia, dengan panjang sekitar 0,9 meter dan berat sekitar 5 kilogram. Spesies ini sangat sosial dan sering hidup dalam kelompok yang dapat mencapai lebih dari 20 individu dalam satu kelompok. Mereka menggunakan tangan mereka untuk mencari moluska dan krustasea di batu, tumbuhan

air, dan lumpur. Hewan ini cenderung memiliki perilaku yang kurang beradaptasi dengan lingkungan air dibandingkan dengan berang-berang spesies lain (IUCN, 2009; Duplaix and Savage, 2018).

*Aonyx cinereus* memiliki jari-jari yang berselaput, dengan jari ketiga dan keempat lebih panjang daripada jari kedua dan kelima pada setiap kakinya. Semua cakarinya berukuran lebih kecil dan tidak mencuat. Ukuran tubuh *A. cinereus* lebih kecil dibandingkan dengan spesies lain, dengan panjang kepala dan tubuh berkisar antara 406 hingga 635 mm, panjang ekor antara 246 hingga 304 mm, dan panjang total dari moncong hingga ekor sekitar 652 hingga 939 mm (IUCN, 2009). Berat badan *A. cinereus* berkisar antara 2,7 hingga 5,4 kg. Warna bagian atas tubuhnya berupa coklat tua, dengan sentuhan kuning kecoklatan yang lembut. Ujung rambutnya agak lebih pucat, memberikan kesan abu-abu. Bagian samping perut cenderung lebih terang coklat di bagian atas dan seringkali berwarna abu-abu. Bibir atas, dagu, pipi, leher samping, dan tenggorokannya berwarna abu-abu atau hampir putih, kadang-kadang kontras tajam, terkadang menciptakan perbedaan yang nyata dengan warna lebih gelap pada kepala dan leher bagian atas (Hussain *et al.*, 2011).

Keberadaan *Aonyx cinereus* tersebar secara luas dari India hingga Asia Selatan meliputi Bangladesh, Myanmar, Thailand, Indonesia di Asia Tenggara hingga Filipina dan Taiwan di Timur dan Cina Selatan di Utara (Hussain *et al.*, 2011). Di Sumatra Barat, *A. cinereus* ditemukan di lahan padi yang ditandai oleh keberadaan jejak kaki, feses, area pembuangan kotoran (*sprainting sites*), area luncur (*sliding site*) dan rumpun padi yang rusak (Aadrean *et al.*, 2010). *A. cinereus* menyukai karakteristik habitat persawahan, dekat dengan lokasi sarang, ketersediaan pakan banyak, dan dekat

dengan sumber air, (Abdullah *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian Raha and Hussein (2016) preferensi habitat *A. cinereus* di India dicirikan dengan sungai-sungai sempit di dataran tinggi dengan ketinggian > 950 M dengan tutupan herba yang tinggi serta padat.

Berdasarkan pada pola makan, berang-berang dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe, yaitu pemakan ikan dan pemakan invertebrata. *A. cinereus* termasuk dalam kategori berang-berang pemakan invertebrata. Hal ini dipermudah oleh keberadaan dua gigi depan besar pada *A. cinereus* yang digunakan untuk membuka eksoskeleton kepiting dan mangsa berkulit lainnya (Hussain *et al.*, 2011). Hasil pemeriksaan feses *A. cinereus* menunjukkan adanya cangkang operkulum siput keemasan (*Pomaceae canaliculata*) di sekitar feses *A. cinereus* dan terkadang juga terdapat telur siput keemasan yang belum tercerna (Aadreaan *et al.*, 2011).

## 2.2 DNA Mikrosatelit

DNA Mikrosatelit merupakan sebagian kecil dari daerah yang khas pada DNA dan merupakan tipe polimorfisme dalam bentuk ulangan tandem base yang menunjukkan variasi urutan DNA tertentu. Tingginya tingkat polimorfik merupakan ciri penting dari penanda ini sehingga dapat digunakan untuk mengetahui tingkat variasi genetik individu antar dan dalam populasi (Allendorf dan Luikart, 2007).

Pengulangan sekuen DNA Mikrosatelit mengikuti rumus (CA)<sub>n</sub> yang terdiri atas pola pengulangan mono-, di, tri, dan tetranukleotid yang terwakilkan dalam genom. DNA Mikrosatelit memiliki motif pengulangan dari satu nukleotida sampai enam nukleotida. Seperti (CA)<sub>n</sub>:(GT)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>:(CT)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub>:(CG)<sub>n</sub> dan (AT)<sub>n</sub>:(TA)<sub>n</sub>

(misalnya, cgctgctgctgctgct, yang dapat direpresentasikan dengan (CGT) $n$  dengan  $n$  adalah jumlah pengulangan = 5) (Allendorf dan Luikart, 2007; Buschiazzo, 2008).

DNA Mikrosatelit memiliki tingkat mutasi yang tinggi, sehingga menghasilkan perubahan dalam jumlah pengulangan basa (Lee et al., 2002; Allendorf dan Luikart, 2007). Laju mutasi mikrosatelit berkisar antara  $10^{-6}$  sampai  $10^{-2}$  per lokus per generasi (Jehle dan Arntzen, 2002; Allendorf dan Luikart, 2007; Takezaki 2010), dengan laju rata-rata  $5 \times 10^{-4}$  (Selkoe dan Toonen 2006). Laju mutasi mikrosatelit dipengaruhi oleh panjang unit berulang, komposisi basa, jumlah ulangan, dan kemurnian pengulangan (Kashi dan King, 2006).

Penanda molekuler dapat digunakan baik sebagai alat diagnostik untuk identifikasi individu dan pemantauan populasi tradisional, maupun untuk memperkirakan perubahan dalam parameter genetik populasi, memberikan informasi tentang keragaman genetik, perkawinan sekerabat, ukuran populasi efektif, atau migrasi (Schwartz et al. 2007).

Analisis DNA Mikrosatelit pada *Aonyx cinereus* belum pernah dilakukan sebelumnya, tapi penelitian Moritte (2017) menggunakan salah satu penanda genetik yaitu DNA Mikrosatelit untuk filogeografi *Lutrogale perspicillata* hasil hibridisasi oleh *Aonyx cinereus* dan penelitian Posonby (2019) mengenai diversitas genetik *Aonyx capensis* di Afrika Selatan yang juga menggunakan penanda DNA Mikrosatelit.

## BAB III. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April 2024 – Juli 2024. Pengoleksian sampel feses *A. cinereus* dilakukan secara langsung di Lubuk Alung. Identifikasi secara molekuler dilakukan di Laboratorium Genetika dan Biomolekular, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan juga di Laboratorium Sentral Universitas Andalas.

### 3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif pada hasil analisis DNA yang dilakukan menggunakan teknik analisis DNA Mikrosatelit atau SSR (*Simple sequence repeat*) untuk mengetahui diversitas genetik secara molekuler pada *Aonyx cinereus* yang dikoleksi di Lubuk Alung, Sumatera Barat.

### 3.3 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah sampel feses *A. cinereus*, QIAamp DNA Stool Mini Kit yang terdiri dari (QiAamp Mini *spin column*, *collection tube*, *inhibitEX* Tablets, buffer AL, buffer ASL, buffer AW 1, buffer AW 2, buffer TAE, proteinase K, *quick start protocol*), alkohol 96%, silica gel, gel agarose 1,2%, gel agarose 2%, KIT Isolasi DNA, DNA *ladder*, Kit PCR, primer DNA Mikrosatelit, aquades, larutan SyBr, dan *loading dye*.

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah plastik sampel, sarung tangan, masker, spidol permanen, pinset, gunting, tissue, gelas ukur, GelDoc, GPS



(*Global Positioning System*), kamera digital, mikropipet, rak tube, *micro tube*, *hot plate*, Inkubator BIOSAN, tabung Eppendorf, mesin Vortex Maxi Mix II, Sentrifugator KITMAN, Tube PCR, Mesin PCR SENSOQUEST dan PCE MULTIGENE, kertas label, seperangkat alat elektroforesis, parafilm, foto DNA BIOSTEP, laptop, elektroforesis otomatis dan logbook.

### **3.4 Cara Kerja**

Prosedur kerja penelitian dilakukan dengan tahapan pengoleksian sumber DNA berupa feses *A. cinereus* di lapangan dan memperoleh DNA di laboratorium.

#### **3.4.1 Di Lapangan**

##### **3.4.1.1 Pengoleksian Sampel**

Sampel feses *A. cinereus* dikoleksi secara langsung di lokasi penelitian yaitu di Lubuk Alung. Sampel diambil masing-masing 2 sampel untuk setiap titik lokasi, kemudian sampel diawetkan menggunakan dua langkah yaitu etanol/alcohol 96%-silica gel dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Ang *et al.*, 2020)

#### **3.4.2 Di Laboratorium**

##### **3.4.2.1 Isolasi DNA**

Isolasi DNA mengikuti protokol QIAamp DNA Stool Mini Kit. Sampel feses sebanyak 180 – 220 mg dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 2 ml dan letakkan tabung diatas es. Kemudian, ditambahkan 1 ml InhibitEX ke setiap sampel dan vortex secara terus menerus selama 1 menit atau sampai tablet ditangguhkan. Sentrifus sampel dengan kecepatan penuh selama 1 menit hingga membentuk partikel pelet feses. Pipet 25 $\mu\text{l}$  proteinase K ke dalam mikrosentrifus 2 ml yang baru dan pipet 600 $\mu\text{l}$  supernatan

dari sebelumnya ke tabung mikrosentrifus 2 ml yang berisi proteinase K. Tambahkan 600µl Buffer AL dan vortex selama 15 detik dan diinkubasi pada suhu 70 °C selama 10 min. Tambahkan 600µl etanol (96 - 100 %) ke lisat, dan dicampur kemudian di vortek. Oleskan lisat 600µl dengan hati hati dari langkah sebelumnya ke kolom putar QIAamp. Tutup sentrifus dengan kecepatan penuh selama 1 menit. Tempatkan QIAamp putar kolom dalam tabung koleksi 2 ml yang baru, dan buang tabung yang berisi filtrat. Ulangi langkah sebelumnya hingga semua lisat telah dimuat di kolom. Buka dengan hati – hati QIAamp kolom putar dan tambahkan 500µl Buffer AW1. Tutup tutupnya dan sentrifus dengan kecepatan penuh selama 1 menit. Tempatkan QIAamp kolom putar dalam tabung koleksi dan buang filtrat yang ada di tabung koleksi. Buka dengan hati – hati QIAampin kolom putar dan tambahkan 500µl Buffer AW2. Tutup tutupnya dan sentrifus dengan kecepatan penuh selama 3 menit. Buang filtrat yang ada di dalam tabung koleksi. Tempatkan QIAamp kolom putar ke dalam tabung koleksi 2 ml yang baru dan buang tabung koleksi lama dengan filtrat. Sentrifus dengan kecepatan penuh selama 3 menit. Pindahkan kolom putar QIAamp ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml yang baru dan berlabel. Pipet 200µl buffer ATE langsung ke membrane QIAamp. Inkubasi selama 1 menit di suhu ruang, kemudian sentrifus dengan kecepatan penuh selama 1 menit untuk melulusi DNA.

#### **3.4.2.2 Primer**

Primer merupakan molekul pendek Tunggal DNA yang akan menempel pada DNA cetakan di tempat spesifik. Primer DNA Mikrosatelit yang digunakan berdasarkan primer yang ditemukan Dallas and Piertney, (1998) dan Huang et al., (2005), yaitu

terdiri dari beberapa lokus. Informasi tentang sepuluh pasang primer pengapit DNA Mikrosatelit disajikan dalam tabel.

Tabel 1. Informasi tentang sepuluh pasang primer Pengapit DNA Mikrosatelit

Lokus	Ta(°C)	Runutan Primer (5'-3')	Motif Pengulangan	Pasang Basa (bp)	Jumlah Alel
<i>Lut435</i>	48	F: TGAAGCCCAGCTTGGTACTTC R: ACAGACAGTATCCAAGGGACCTG	(CA)15	113-133	11
<i>Lut615</i>	TD 52-48	F: TGCAAATTAGGCATTTTCATTCC R: ATTCTCTTTTGCCCTTTGCTTC	(GT)12	223-249	10
<i>Lut818</i>	TD 52-48	F: AAGGATGTGAAACAGCATTG R: CCATTTTATACACATAAATCGGAT	(GATA)3	142-184	8
<i>Lut457</i>	TD 52-48	F: CAGGTTTATGGCTTTATGGCTTTC R: CAGGGTTTGATTTCTGGTGAGG	(CA)9	153-175	8
<i>Lut701</i>	TD 55-52	F: GGAAACTGTAAAGGAGCTCACC R: CAGTGTTTCATAAGGATGCTCCTAC	(CCTT)2...(CTAT)9	152-180	10
<i>Lut453</i>	TD 52-48	F: AGTGCTTTGTAAGTGGTAAATGG R: AGACTGAAAGCTCTGTGAGGTC	(CA)9	97-131	9
<i>OT19</i>	TD 55-52	F: ATAGGTCTCTCAGCACGGTGTCT R: TTAAATCCACATCTGTGACTCTGCA	(GGAA)6...(GAAA)7	203-223	6
<i>Lut832</i>	TD 52-48	F: TGATACTTTCTACCCAGGTGTC R: TCCTTAGCATTAICTTATTIACCAC	(GATA)8	176-192	5
<i>Lut604</i>	TD 55-52	F: TATGATCCTGGTAGATTAACCTTTGTG R: TTTCAACAATTCATGCTGGAAC	(GT)7	97-109	6
<i>OT17</i>	TD 55-52	F: ATCAGGTATGAGGATACATTACCT R: TGCAACCTACTTCTATATGAATTT	(CTTT)6	144-162	4

### 3.4.2.3. Amplifikasi DNA Mikrosatelit dengan Teknik polimerase Chain Reaction (PCR)

Tabel 2. Komposisi reaksi PCR

Reagen	Volume ( $\mu$ l)
PCR <i>Supermix</i> <i>Bioline</i>	12,5
<i>Nuclease Free Water</i>	2,5
Primer <i>Forward</i>	1
Primer <i>Reverse</i>	1
DNA <i>Template</i>	8
Total	25

Campuran tersebut dihomogenkan dengan DNAeasy mini spin dan dimasukkan ke dalam mesin PCR yang sudah di program.

Tabel 3. Siklus amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR

Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus
Pre-denaturasi	95 <sup>0</sup> C	5 menit	1
Denaturasi	95 <sup>0</sup> C	45 detik	38
Annealing	** <sup>0</sup> C	30 detik	38
Extention	72 <sup>0</sup> C	30 detik	38
Last Extention	72 <sup>0</sup> C	20 menit	1

Keterangan:

\*\* = Suhu Anneling tergantung pada lokus primer yang digunakan

Hasil PCR divisualisasikan dengan elektroforesis, kemudian dimasukkan pada sumur gel agarose yang sudah dibuat. Gel agarose dibuat sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan yaitu 2% dengan komposisi agarose 1,6 gram dan dilarutkan dalam larutan TBE sebanyak 70 ml dan ditambah 6  $\mu$ l larutan Ethidium Bromida (EtBr). Agarose berbentuk bubuk dilarutkan dengan buffer TBE dan dipanaskan di atas *hot plate* selama beberapa menit hingga berwarna bening. Larutan agarose yang telah menjadi bening ditambahkan 6  $\mu$ l larutan Ethium Bromida (EtBr). Larutan dihomogenkan, lalu diangkat dan dituangkan dalam cetakan. Gel yang sudah terbentuk dimasukkan ke

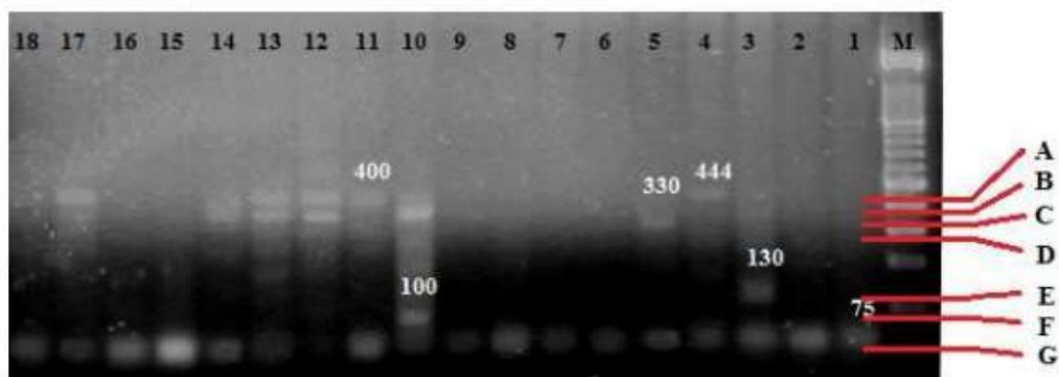
dalam alat elektroforesis yang berisi buffer TBE yang volumenya lebih tinggi dari gel agarose. DNA hasil PCR diambil sebanyak 3  $\mu$ l dan dimasukkan satu persatu ke dalam sumur-sumur yang ada pada gel agarose. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V, arus listrik 200 mA selama 45 menit. Gel kemudian diletakkan di atas illuminator UV, dan didokumentasi.

### 3.5 Analisis Data

Pencarian kondisi optimal untuk annealing sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitifitas produk PCR. Kurang tepatnya suhu pada fase annealing akan menyebabkan primer gagal melekat sehingga tampilan pita menjadi tidak jelas. Innis dan Gelfand (1990), Becks (1998) serta, Cheng dan Kolmodin (1997) menambahkan bahwa selain faktor suhu annealing, amplifikasi PCR juga sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor lain yaitu : (1) kondisi deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP), (2) oligonukleotida primer, (3) DNA template, (4) komposisi larutan buffer, (5) jumlah siklus reaksi, (6) enzim yang digunakan, dan (7) faktor teknis dan non-teknis lainnya, misalnya kontaminasi

Pita yang muncul pada gel pada masing-masing lokus diasumsikan sebagai alel DNA mikrosatelit. Kuantifikasi hasil amplifikasi dengan teknik pemberian skor pada alel dilakukan berdasarkan metoda yang dikemukakan oleh Hauge dan Litt (1993). Alel ganda yang ditemukan pada hasil elektroforesis merupakan penggandaan atau *copy* dari alel sesungguhnya sehingga pada proses pemberian skor tidak keseluruhan alel dihitung melainkan pada band yang terang saja (Hauge dan Litt, 1993).

Penentuan jenis alel yang muncul pada gel didasarkan pada asumsi bahwa semua pita DNA dengan laju migrasi yang sama adalah homolog (Leung *et al.*, 1993). Alel dengan laju migrasi paling lambat ditetapkan sebagai alel A, berikutnya alel B, dan seterusnya. Setiap lokus DNA mikrosatelit menunjukkan alel yang berbeda meskipun alelnya sama (misalnya, alel A pada lokus *Lut435* berbeda dengan alel A pada lokus *Lut615*). Cara scoring pita diasjikan pada Gambar 2.



18	17	16	15	14	13	12	11	10	99	18	17	16	15	14	13	12	11
GG	BG	GG	GG	CG	BC	BC	BG	CF	GG	GG	GG	GG	CG	AG	EG	GG	GG

Gambar 2. Cara scoring pita DNA



## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan feses telah dilakukan dengan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA secara kuantitatif dengan menggunakan NanoDrop spektrofotometri. Berdasarkan hasil isolasi didapatkan rata-rata konsentrasi DNA 8.595 dan kemurnian 7,680 dari sampel disajikan dalam tabel 4.

Tabel 4. Data keterangan konsentrasi DNA dalam sampel

Kode sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	A260	A280	A260/A280
LA 33.1.1603	8.000	0,164	0,019	10,670
LA 33.1.0407	8.250	0,166	0,013	13,750
LA 52.1.A	9.250	0,192	0,028	8,810
LA 52.1.B	7.900	0,157	0,026	5,852
LA 52.1	9.250	0,197	0,039	6,852
LA 4.1	8.400	0,174	0,029	7,304
LA 32.1	8.850	0,181	0,028	7,375
LA 36.1.A	8.800	0,180	0,025	8,381
LA 36.1.B	8.400	0,173	0,063	2,897
LA 36.1.C	8.850	0,184	0,043	4,917
Rata-rata	8.595			7,680

Pengujian DNA kuantitatif adalah analisis untuk mengetahui kandungan/kuantitas DNA yang terkandung dalam zat yang diketahui memiliki DNA dalam larutan sampel atau komponen zat melalui pengujian (Sinaga, 2010). Spektrofotometer Nanodrop adalah alat yang memiliki prinsip dengan menghitung perbedaan penyerapan cahaya UV, pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm sedangkan kontaminan berupa protein dan fenol akan menyerap cahaya dengan panjang gelombang 280 nm. Konsentrasi DNA yang didapatkan sangat rendah dengan rata-rata konsentrasi 8.595 dengan kualitas yang jauh dari baik yaitu 7,680. Menurut Aminah (2019) DNA

berkualitas baik memiliki konsentrasi diatas 100 ng/ $\mu$ l berdasarkan pengukuran dengan spektrofotometer. Rendahnya konsentrasi yang diperoleh dari pengujian dengan Spektrofotometer NanoDrop dapat disebabkan karena kontaminasi, pada panjang gelombang 260 nm tidak hanya double strain DNA (dsDNA) yang dapat menyerap panjang gelombang namun juga jenis asam nukleat lain seperti single strain DNA (ssDNA) dan RNA. Apabila DNA terkontaminasi protein dan polisakarida, nilai absorbansinya kurang dari 1,8 dan apabila DNA terkontaminasi RNA maka nilai absorbansinya lebih dari 2,0 (Beveridge, 1997).

Konsentrasi dan kemurnian yang tidak dalam kualitas yang baik dapat diakibatkan karena sumber ekstraksi sampel yang berasal dari feses. Perbedaan kualitas DNA dari segi konsentrasi dan kemurnian yang berasal dari ekstraksi feses dan jaringan pada tubuh mamalia telah dibahas dalam beberapa studi (Murphy, 2002; Panasci, 2011; Zhu, 2017). DNA dari jaringan mamalia biasanya memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dan kemurnian yang lebih baik dibandingkan DNA yang diekstraksi dari feses. Hal ini disebabkan oleh kandungan kontaminan yang lebih rendah dalam jaringan yang memungkinkan ekstraksi DNA dalam jumlah besar dan kualitas tinggi (Forgacs, 2019).

Ekstrak feses mungkin mengandung bahan kimia yang menghambat PCR karena adanya kontaminasi (Kohn dan Wayne, 1997; Nechvatal *et al.*, 2008). Kontaminasi dapat berasal dari sisa makanan, protein, dan komponen lainnya dalam feses dapat mempengaruhi hasil ekstraksi, yang menyebabkan variasi dalam konsentrasi DNA yang diperoleh menjadi sangat rendah (Forgacs, 2019).



Hasil pengujian kuantitatif DNA dengan NanoDrop didapatkan kemurnian 7,680 dinilai DNA tidak dalam kualitas yang baik, karena nilai kemurnian yang berkualitas baik akan memiliki rasio A260/A280 dari rentang 1,8 -2,0 (Koopae, 2014).

DNA yang diekstraksi dari feses cenderung memiliki kemurnian yang lebih rendah, dengan rasio A260/A280 sering kali di bawah atau lebih dari 1.8. Feses yang mengandung banyak penghambat PCR seperti polifenol, humic acid, dan senyawa pengganggu lainnya yang dapat menurunkan kemurnian DNA. Penggunaan DNA dari feses untuk analisis lebih lanjut sering kali membutuhkan prosedur pemurnian tambahan untuk menghilangkan kontaminan ini (Ahmed, 2022).

#### 4.2 Seleksi Primer DNA Mikrosatelit

Berdasarkan hasil seleksi yang dilakukan dari sepuluh primer dapat diketahui bahwa hanya empat primer yang menghasilkan amplikon, yaitu primer Lut435, Lut453, Lut615, dan Lut457 dengan keterangan disajikan dalam tabel 5.

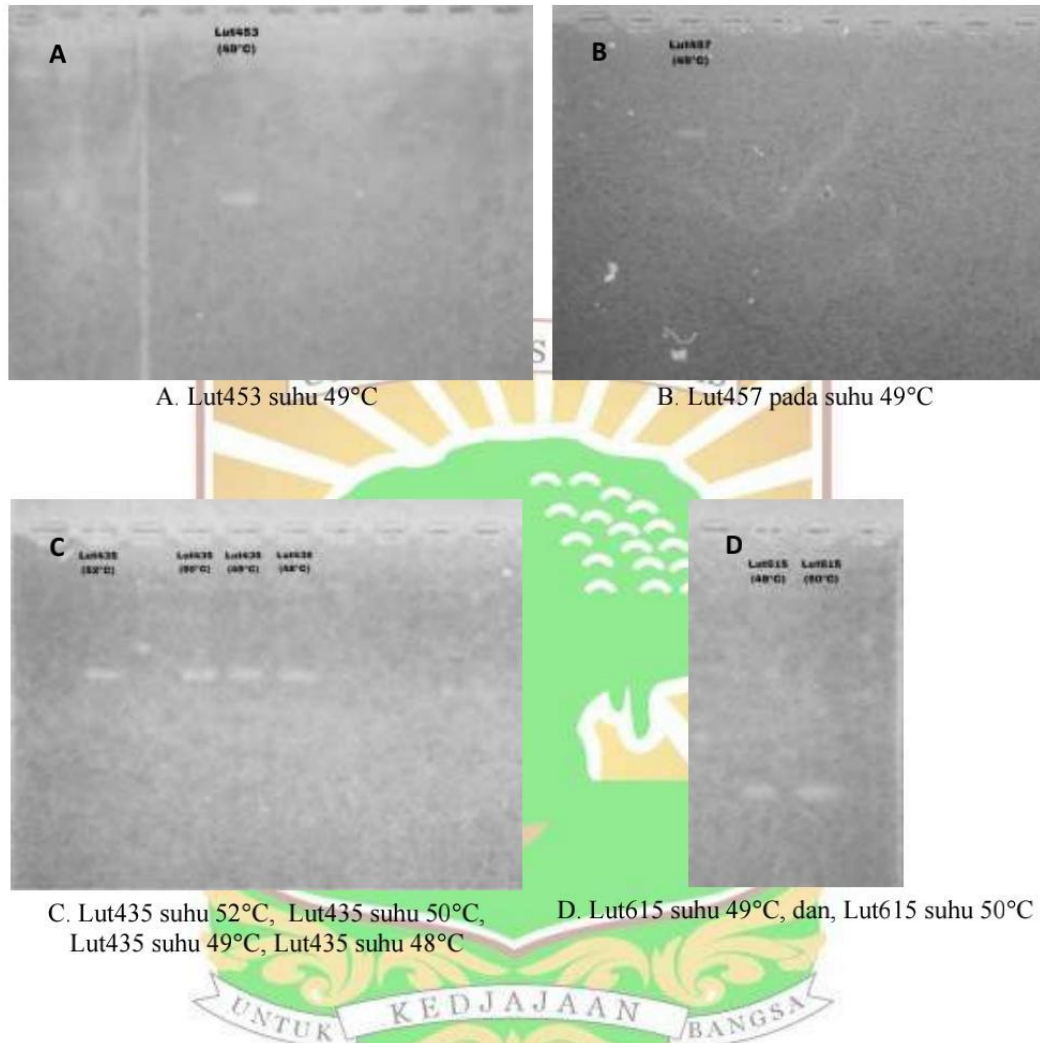
Tabel 5. Data keterangan primer yang menghasilkan amplikon pada PCR Gradien

Primer	Suhu aneling (°C)					
	48	49	50	51	52	53
Lut435	V	V	V	.	V	.
Lut615	.	V	V	.	.	.
Lut818	.	.	.	.	.	.
Lut457	.	V	.	.	.	.
Lut701	.	.	.	.	.	.
Lut453	.	V	.	.	.	.
OT19	.	.	.	.	.	.
Lut832	.	.	.	.	.	.
Lut604	.	.	.	.	.	.
OT17	.	.	.	.	.	.

Pencarian suhu optimal sebelumnya telah dilakukan untuk kesepuluh primer, dengan menggunakan suhu *annealing* yang berbeda dari rentang 48-52°C untuk primer Lut435, Lut453, Lut615, Lut832 dan Lut457 dan 51-55°C untuk primer OT19, OT17, Lut701, Lut604 dan Lut818 berdasarkan Dallas & Piertney (1998) dan Huang *et al.*, (2005), dengan menggunakan PCR Gradien. Proses ini bertujuan untuk mendapatkan tampilan pita yang terlihat jelas. Asy'ari dan Noer (2005) menjelaskan suhu *annealing* adalah suhu dimana primer akan menempel pada DNA template. Pencarian kondisi optimal untuk *annealing* sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitifitas produk PCR. Kurang tepatnya suhu pada fase *annealing* akan menyebabkan primer gagal melekat sehingga tampilan pita menjadi tidak jelas.

Pencarian kondisi optimal untuk *annealing* sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitifitas produk PCR. Kurang tepatnya suhu pada fase *annealing* akan menyebabkan primer gagal melekat sehingga tampilan pita menjadi tidak jelas. Innis dan Gelfand (1990), Becks (1998) serta, Cheng dan Kolmodin (1997) menambahkan bahwa selain faktor suhu *annealing*, amplifikasi PCR juga sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor lain yaitu : (1) kondisi deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP), (2) oligonukleotida primer, (3) DNA template, (4) komposisi larutan buffer, (5) jumlah siklus reaksi, (6) enzim yang digunakan, dan (7) faktor teknis dan non-teknis lainnya, misalnya kontaminasi. Visualisasi primer hasil elektroforesis gel pada gambar 3.

Gambar 3. Visualisasi primer hasil elektroforesis



Meskipun telah melalui prosedur pencarian suhu optimal, keenam primer lainnya tetap tidak menghasilkan amplikon. Keenam primer tersebut adalah primer Lut818, Lut832, Lut701, Lut604, OT17 dan OT19. Tidak munculnya amplikon dapat disebabkan oleh DNA yang tidak memiliki situs penempelan primer yang cocok, sedangkan keempat primer yang menghasilkan amplikon (Lut434, Lut453, Lut615, dan Lut457) menampilkan pita dengan ukuran, jumlah dan intensitas pita yang bervariasi.

Keempat primer tersebut menghasilkan sampai 3 pita dengan rata-rata 1,6 pita per primer (Tabel 8). Caetano (2004) menyatakan bahwa bervariasinya jumlah dan intensitas pita DNA hasil amplifikasi tergantung bagaimana primer tersebut mengenal urutan DNA komplementernya pada DNA template.

Terdapat perbedaan keberhasilan primer menghasilkan ampikon dengan penelitian Posonby (2019) yang menggunakan primer yang sama pada *Aonyx capensis*. Primer Lut453 tidak menghasilkan ampikon pada *Aonyx capensis*, sementara pada *Aonyx cinereus* ampikon dihasilkan pada suhu 49°C dengan primer tersebut. Meskipun kedua spesies berada dalam genus yang sama hasil amplifikasi primer bisa berbeda. Hal ini dikarenakan adanya variasi sekuens mikrosatelit sehingga menghasilkan spesifisitas primer yang berbeda karena primer dirancang untuk urutan spesifik (Selkoe, 2006)

Suhu *annealing* yang diperoleh untuk keempat primer sama dalam rentang suhu yang telah ditetapkan oleh Dallas dan Piertney (1998). Daftar suhu *annealing* yang cocok untuk keempat primer tersebut dapat dilihat pada Tabel 6.

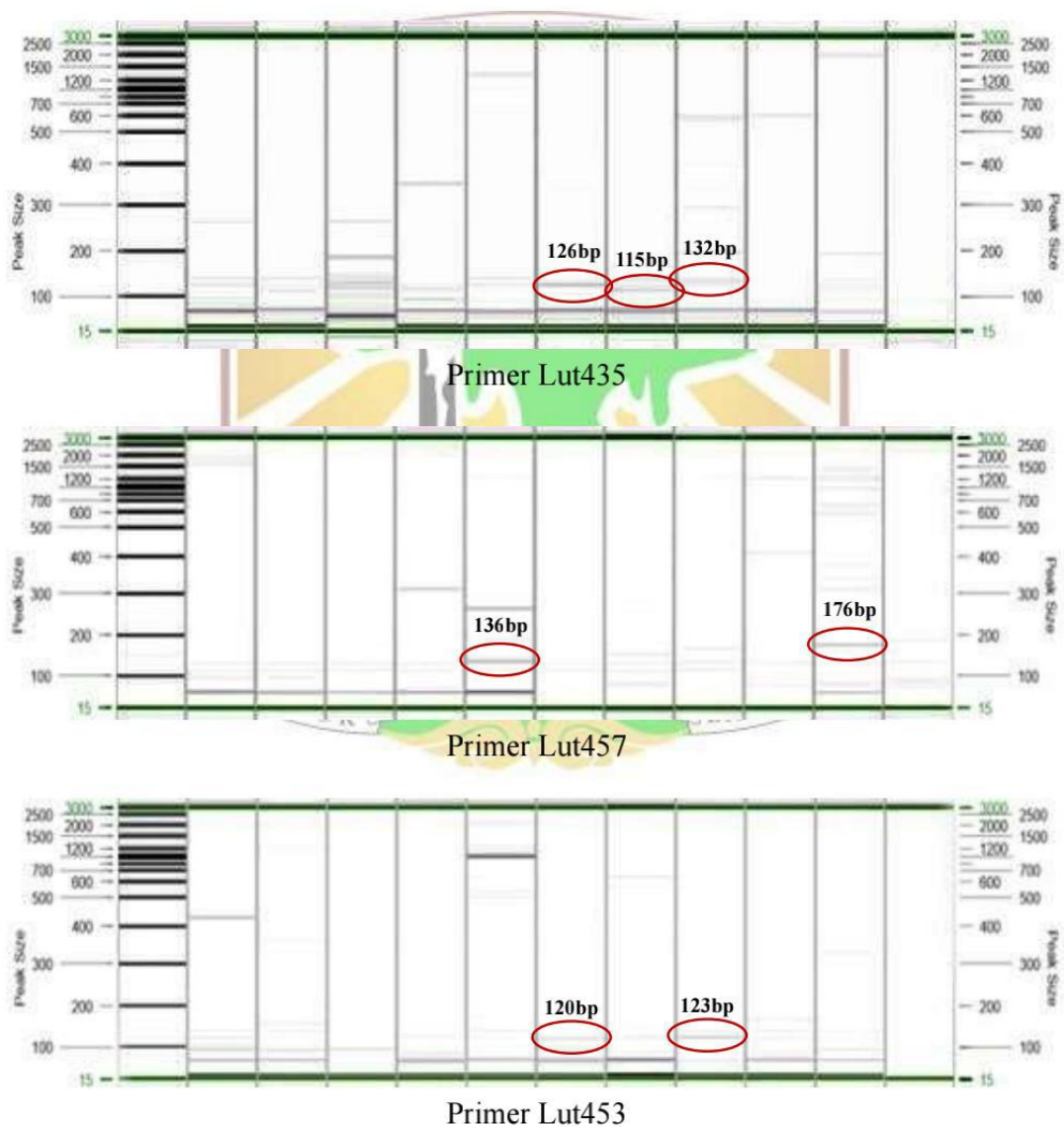
Tabel 6. Temperatur *Anneling* masing-masing primer

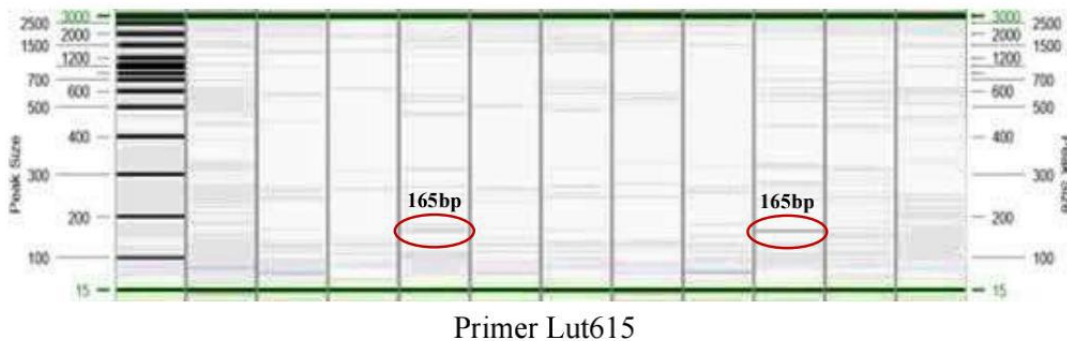
No.	Nama	Runutan Primer (Polimerase arah 5'-3')	Ta
1.	Lut435	F: TGAAGCCCAGCTTGGTACTTC R: ACAGACAGTATCCAAGGGACCTG	48
2.	Lut453	F: AGTGCTTTGTACTTGGTAATGG R: AGACTGAAAGCTCTGTGAGGTC	49
3.	Lut457	F: CAGGTTTATGGCTTTATGGCTTTC R: CAGGTTTGATTCTGGTGAGG	49
4.	Lut615	F: TGCAAATTAGGCATTTTCATTCC R: ATTCTCTTTTGCCCTTTGCTTC	49

### 4.3 Profil Pita DNA Hasil amplifikasi PCR dengan Penanda DNA Mikrosatelit

Visualisasi profil pita DNA dilakukan dengan elektroforesis otomatis untuk analisis DNA dari sumber yang kompleks seperti feses, dimana kualitas DNA bisa rendah dan sulit dideteksi dengan elektroforesis gel. Hasil visualisasi dan keterangan empat primer yang digunakan dengan 10 sampel terdapat pada gambar 4 dan tabel 7

Gambar 4. Visualisasi pita DNA dengan Elektroforesis otomatis





Hasil visualisasi pita DNA yang terbaca beragam, dengan panjang basa kurang atau lebih panjang dari yang seharusnya berdasarkan jenis primer yang digunakan. Primer Lut435 dengan panjang basa (bp) berkisar diantara 113-133 dan pada hasil didapatkan urutan pita dengan panjang 115,126 dan 132. Primer Lut453 dengan panjang basa (bp) berkisar diantara 97-131 dan pada hasil didapatkan urutan pita dengan panjang 120, dan 123. Primer Lut457 dengan panjang basa (bp) berkisar diantara 153-175 dan pada hasil didapatkan urutan 136 dan 176. Primer Lut615 dengan panjang basa (bp) berkisar diantara 223-249 dan pada hasil didapatkan pita pada urutan 165.

Terdapat banyak urutan pita yang terlihat berdempet (mirip tangga) diluar kisaran panjang basa pada primer. Liu et al. (2003) menjelaskan kejadian multi-alel dalam bentuk multi pita DNA mirip tangga (ladder like bands) merupakan salah satu gambaran peristiwa unik dari DNA Mikrosatelit. Alel ganda ataupun multi-copy tersebut merupakan penggandaan atau copy dari alel sesungguhnya. Strachan dan Read (1999); Blankeship et al. (2002) menambahkan munculnya multi alel dalam satu lokus disebabkan oleh replication slippage selama amplifikasi PCR. Replication slippage merupakan kesalahan dalam mereplikasi sekuen DNA tandem yang berulang sehingga

menghasilkan sintesis untai DNA baru yang mengalami kehilangan atau penambahan unit berulang, tergantung pada untai DNA yang menjadi tempat terjadinya slippage. Replication slippage akan menghasilkan gambaran pita yang kurang jelas (pita semu) pada gel sehingga sulit untuk dibaca.

Tabel 7. Keterangan sampel dan urutan pita yang muncul

Sampel	Urutan pita (bp)			
	Primer Lut435	Primer Lut457	Primer Lut453	Primer Lut615
LA 33.1.1603	.	.	.	.
LA 33.1.0407	.	.	.	.
LA 52.1.A	.	.	.	.
LA 52.1.B	.	.	.	165
LA 52.1	.	136	.	.
LA 4.1	126	.	120	.
LA 32.1	115	.	.	.
LA 36.1.A	132	.	123	.
LA 36.1.B	.	.	.	165
LA 36.1.C	.	176	.	.

Berdasarkan hasil visualisai yang didapatkan, tidak semua sampel menghasilkan pita dari keempat jenis primer yang digunakan. Sampel LA 33.1.1603, LA 33.1.0407 dan LA 33.1.0407 sama sekali tidak menghasilkan pita. Sedangkan sampel lainnya seperti LA 52.1.B menghasilkan amplikon dengan panjang 165 bp pada primer Lut615, sampel LA 52.1 dengan panjang 136 bp pada primer Lut457, sampel LA 4.1 dengan panjang 126 pada primer Lut435 dan 120 pada primer Lut453, selanjutnya sampel LA 32.1 dengan panjang 115 pada primer Lut435, sampel LA 36.1.A dengan panjang pita 132 pada primer Lut435 dan 123 pada primer Lut453, sampel LA 36.1.B dengan panjang 165 pada primer Lut615 dan yang terakhir sampel LA 36.1.C dengan panjang 176 pada primer Lut457.

Kegagalan sampel dalam menghasilkan amplicon dapat diakibatkan oleh ekstraksi DNA yang berasal dari sampel feses, kualitasnya sering kali rendah karena degradasi, kontaminasi, dan kehadiran inhibitor PCR. Faktor-faktor ini dapat menyebabkan amplifikasi PCR yang tidak konsisten, meskipun menggunakan primer yang sama pada spesies yang sama. Degradasi DNA dapat mempengaruhi panjang fragmen yang tersedia untuk amplifikasi, sementara kontaminasi dan inhibitor dapat menghambat proses PCR, menyebabkan kegagalan dalam menghasilkan amplicon (Barbaro, 2021).

Kemurnian sampel LA 33.1.1603, LA 33.1.0407 dan LA 33.1.0407 yaitu 8,810-13,750 memiliki angka yang jauh lebih tinggi dari sampel lainnya, tidak menghasilkan amplicon pada keempat jenis primer. Sementara sampel lainnya yang berkisar diantara 2,897-8,381 masih menghasilkan amplicon. Kemurnian bernilai dalam kualitas yang baik akan memiliki rasio A260/A280 dari rentang 1,8 -2,0 (Koopae, 2014).

Profil pita DNA hasil amplifikasi dapat digunakan untuk menentukan tingkat keragaman suatu populasi berdasarkan perhitungan jumlah dan ukuran pita. Hasil amplifikasi PCR terhadap empat primer menampilkan ukuran pita yang bervariasi. Kisaran ukuran pita antara 115-176 bp (Tabel 8).

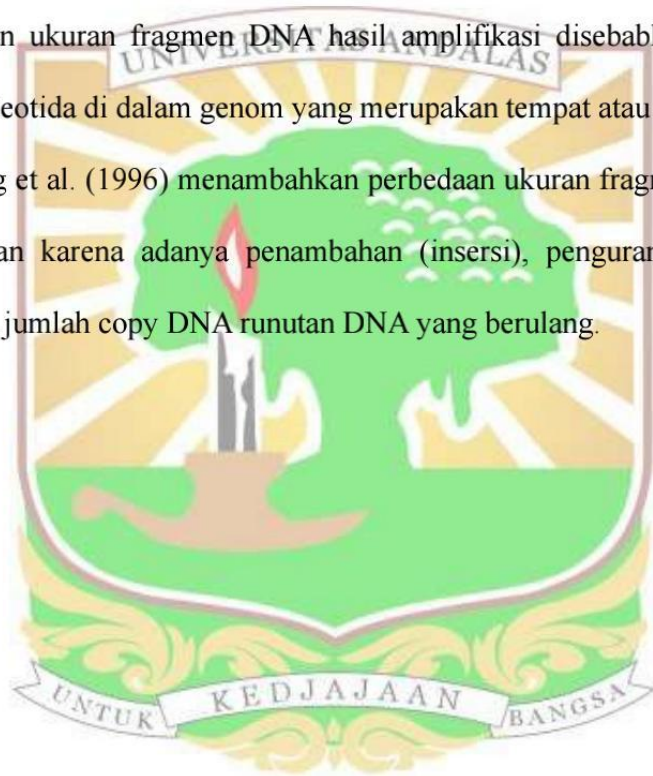
Tabel 8. Jenis primer yang digunakan dan ukuran pita yang dihasilkan

No.	Primer	Urutan pita (bp)	Jumlah pita total
1.	Lut435	115, 126, 132,	3
2.	Lut453	120, 123	2
3.	Lut457	136, 175	2
4.	Lut615	165	1
Total			8
Rata - rata			1,6



Berdasarkan hasil amplikon dari lima primer yang digunakan, diperoleh total pita sebanyak 8 pita dengan rata-rata 1,6 pita per primer. Jumlah pita pada masing-masing primer bervariasi yaitu tiga pita untuk primer Lut435, dua pita untuk primer Lut453 dan satu pita primer Lut615, dua pita untuk primer Lut457. Berdasarkan hasil yang telah diperoleh dapat diketahui bahwa primer Lut435 memiliki jumlah pita DNA yang lebih banyak dibandingkan dengan primer lainnya.

Perbedaan ukuran fragmen DNA hasil amplifikasi disebabkan oleh sebaran lokasi basa nukleotida di dalam genom yang merupakan tempat atau situs penempelan primer. Dowling et al. (1996) menambahkan perbedaan ukuran fragmen tersebut juga dapat disebabkan karena adanya penambahan (insersi), pengurangan (dilesi) dan perubahan pada jumlah copy DNA runutan DNA yang berulang.



## BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

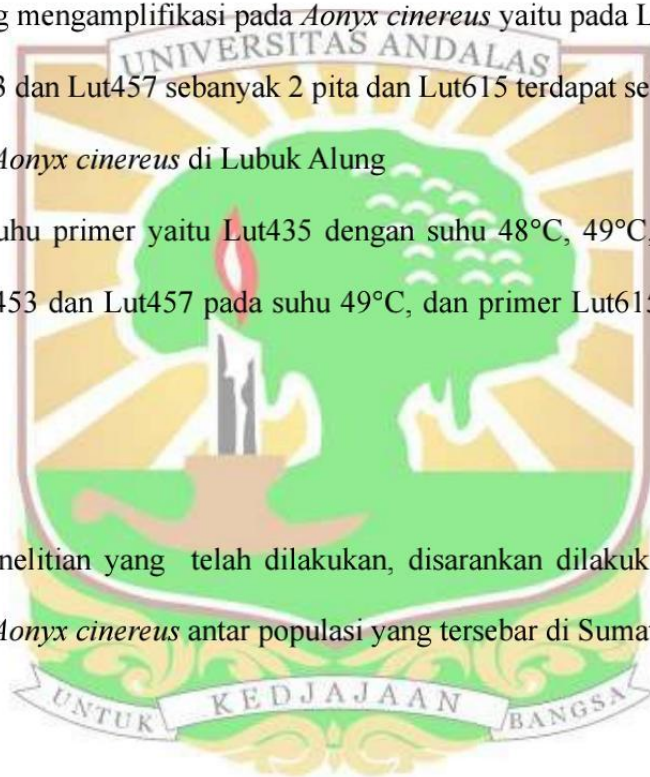
### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian seleksi dan optimasi primer mikrosatelit pada berang-berang cakar kecil (*Aonyx cinereus* illiger, 1815) di Lubuk Alung, Sumatera Barat didapatkan kesimpulan sebagai berikut.

1. Primer yang mengamplifikasi pada *Aonyx cinereus* yaitu pada Lut435 sebanyak 3 pita, Lut453 dan Lut457 sebanyak 2 pita dan Lut615 terdapat sebanyak 1 pita dari 10 sampel *Aonyx cinereus* di Lubuk Alung
2. Optimasi suhu primer yaitu Lut435 dengan suhu 48°C, 49°C, 50°C dan 52°C, primer Lut453 dan Lut457 pada suhu 49°C, dan primer Lut615 pada suhu 49°C dan 50°C

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disarankan dilakukan kajian tentang variasi genetik *Aonyx cinereus* antar populasi yang tersebar di Sumatera Barat.



## DAFTAR PUSTAKA

- Aadrean. 2009. *Ekologi Makan Berang-Berang Cakar Kecil (Aonyx cinereus) di Area Persawahan Kabupaten Padang Pariaman*. Tesis. Pascasarjana Biologi FMIPA Universitas Andalas. Padang.
- Aadrean, A. S. Salmah, A. Salsabila, Rizaldi, M. N. Janra. 2010. *Track and Other Signs of Otter Rice in Rice Fields in Padang Pariaman, West Sumatra: A Preliminary Study*. *IUCN Otter Spec. Group Bull.* 27(1): 6-11.
- Aadrean, A. W. Novarino dan J. Nurdin. 2011. *A Record Of Small-Clawed Otters (Aonyx cinereus) Foraging On An Invasive Pest Species, Golden Apple Snails (Pomacea canaliculata) In A West Sumatra Rice Field*. *IUCN Otter Spec. Group Bull.* 28(1): 34-38.
- Abdullah. M. Ali S., U. H. Ar Rasyid. 2015. *Habitat Characteristic of Small Clawed-Otter (Aonyx cinereus) in Ujong Nga, Samatiga, West Aceh*. *Natural.* 15(1): 5-9.
- Ahmed Gamal, dkk. 2022. *Analysis of Gut Microbiome Using Fecal Samples*
- Allendorf, F. W dan G. H. Luikart. 2007. *Conservation And The Genetics Of Populations*. Blackwell Publishing. USA
- Aminah, A., Ramadini, R., & Naid, T. 2019. *Analisis Cemarkan DNA Tikus pada Bakso Daging Sapi yang Beredar di Makassar dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 5(1), 93–100. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2019.v5.i1.12036>
- Barbaro, A. 2012. *Challenges in DNA Extraction from Forensic Samples*. *Forensic Science International*. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.08.020>
- Beck, S., 1998, *High Fidelity PCR: Enhancing the Accuracy of DNA Amplification*, *The Scientist* 12[1]: 17
- Bennet, P. 2000. *Microsatellites*. *Molecular Pathology* ;53:177-183
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. *Human Genetic.* 32 : 314–331
- Buschiazzo, E. 2008. *Conservation and Evolution of Microsatellites in Vertebrate Genomes*. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biological Sciences in the University of Canterbury
- Cheng, S., and Kolmodin, L.A., 1997, *XL PCR amplification of long targets from genomic DNA*, *Methods in Molecular Biology: PCR Cloning Protocols*, edited by Bruce A. White, 67, Humana Press, Totowa, New Jersey, page 17 – 29

- Dallas, J. F. & Piertney, S. B. 1998. *Microsatellite primers for Eurasian otter*. Mol. Ecol. 7, 1247–1251
- De Silva, P. K. 2011. *Status of Otter Species In The Asian Region Status For 2007*. IUCN Otter Spec. Group Bull. 28(A): 97 -107.
- Duplaix, N. and Savage, M. 2018. *The Global Otter Conservation Strategy*. IUCN/SSC Otter Specialist Group, Four Corners Institute, Salem, Oregon, USA. Available at: [www.otterspecialistgroup.org](http://www.otterspecialistgroup.org)
- Forgacs David, Rick L. Wallen, Amy L, Boedeker and James N. Deer. 2019. *Evaluation of fecal samples as a valid source of DNA by comparing paired blood and fecal samples from American bison (Bison bison, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA*. 2
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. 2010. *Introduction to Conservation Genetics* (pp. 50-80, 150-180). Cambridge University Press
- Gomez, L., B. T. C. Leupen, M. The Eng, K. Fernandez, and M. Savage. 2016. *Illegal Otter Trade: An Analysis Of Seizures In Selected Asian Countries (1980-2015)*. TRAFFIC. Petaling Jaya, Selangor, Malaysia
- Hajeer, A., J. Worthington dan S. John (eds.). 2000. *SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis*. Biotechniques: Molecular Laboratory Methods Series. Eaton Publishing, Manchester, UK.
- Hauge, Y. and M. A. Litt. 1993. *A Study Of The Origin Of 'Shadow Bands' Seen When Typing Dinucleotide Repeat Polymorphisms By The PCR*. Human Molecular and Genetic ; 2:411-415.
- Huang, C. C., Hsu, Y. C., Lee, L. L. & Li, S. H. 2005. *Isolation and characterization of tetra microsatellite DNA markers in the Eurasian otter (Lutra lutra)*. Mol. Ecol. 5, 314–316.
- Hussain, S. A., S. K. Gupta, dan P. K. De Silva. 2011. *Biology and Ecology of Asian Small-Clawed Otter Aonyx cinereus (Illiger, 1815)*. A Review. IUCN Otter Spec. Group Bull. 28(2) : 63-75
- Innis, M.A., and Gelfand. D.H., 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Optimazition of PCR's*, Academic Press, Inc., San Diego, California
- IOSF. 2013. *Indonesia Training Workshop Report*. Broadford, Skye (GB): IOSF. [IUCN] The International Union for Conservation of Nature.
- IOSF. 2014. *The Shocking Fact of the Illegal Trade in Otter*. Scotland: International Otter Survival Fund.
- IUCN. 2021. *IUCN Red List of Threatened Species*. <http://www.iucnredlist.org>. 25 April 2023.

- IUCN/SSN Otter Specialist Group. 2009. *Caring for Asian small-clawed, Cape clawless, Nearctic, and spotted-necked otters*. Diakses 26 Maret, 2021, dari [https://www.otterspecialistgroup.org/Library/TaskForces/OCT/OCT\\_version\\_of\\_otter\\_care\\_manual\\_V3\\_Dec09.pdf](https://www.otterspecialistgroup.org/Library/TaskForces/OCT/OCT_version_of_otter_care_manual_V3_Dec09.pdf)
- J. R. Beveridge and E. M. Riseman. 1997. *How easy is matching 2D line models using local search?*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 19, pp. 564-579
- Kashi, Y and D. G. King. 2006. *Simple Sequence Repeats as Advantageous Mutators in Evolution*. Trends Genetic. 22: 253-257
- Kitade, T., dan Y. Naruse. 2018. *A Rapid Assessment of Illegal Trade and Booming Demand in Japan*. TRAFFIC Report, Japan
- Kohn MH, Wayne RK. 1997. *Facts from feces revisited*. Trends Ecol Evol.;12:223–227
- Koopae, H. K., & Koshkoiyeh, A. E. 2014. *SNPs genotyping technologies and their applications in farm animals breeding Programs: Review*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57(1), 87–95. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100013>
- Ma'aruf, H. 2020. *Jenis-jenis hewan vertebrata yang mengunjungi lokasi kotoran belang-belang cakar kecil (Aonyx cinereus) di area persawahan Lubuk Alung*. Skripsi Sarjana Biologi Universitas Andalas. Padang.
- Melisch, R., Asmoro, P.B. and Kusumawardhami, L. 1994. *Major Steps taken towards Otter Conservation in Indonesia*. IUCN/SSC Otter Specialist Group Bulletin, 10: 21 – 24.
- Moretti, B. et al. 2017. *Phylogeography of the smooth-coated otter (Lutrogale perspicillata): distinct evolutionary lineages and hybridization with the Asian small-clawed otter (Aonyx cinereus)*. Sci. Rep. 7, 41611; doi: 10.1038/srep41611.
- Morgan, M. J., D. Hunter, R. Pietsch, W. Osborne and J. S. Keogh. 2008. *Assessment of genetic diversity in the critically endangered Australian corroboree frogs, Pseudophryne corroboree and Pseudophryne pengilleyi, identifies four evolutionarily significant units for conservation*. Molecular Ecology (2008) 17, 3448–3463.
- Murphy MA, Waits LP, Kendall KC, Wasser SK, Higbee JA, Bogden R. 2002. *An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (Ursus arctos) faecal DNA samples*. Cons Genet.;3(4):435–40
- Nechvatal JM, Ram JL, Basson MD, et al. 2008. *Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces*. J Microbiol Meth.;72:124–132.

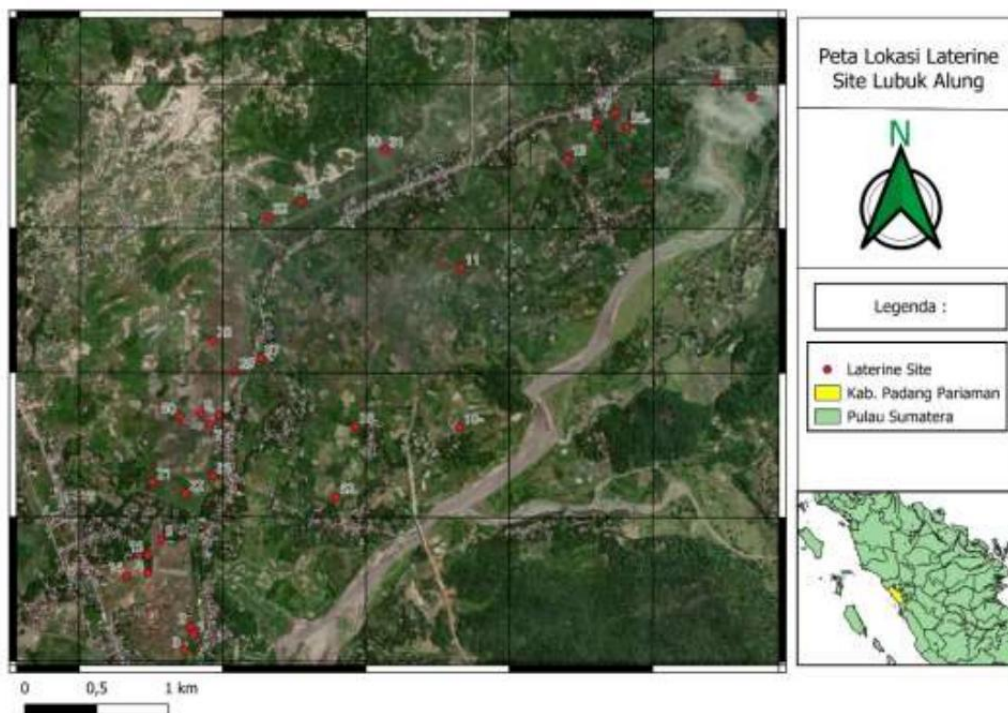
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York. Columbia University Press
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York : Oxford University Press.
- Nikovola, J. N and J. Jaworska. 2005. *An approach to determining applicability domains for QSAR group contribution models: An analysis of SRC KOWWIN*. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* 33 (5): pp. 461-470.
- Nuryanto, A & M. Kochzius. 2009. *Highly restricted gene flow and deep evolutionary lineages in the giant clam *Tridacna maxima**. *Coral Reefs*, 28: 607–619.
- Panasci M, Ballard WB, Breck S, Rodriguez D, Densmore LD III, Wester DB, Baker RJ. 2011. *Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success*. *J Wildl Manag.*;75(7): 1616–24.
- Pocock, R.I. 1941. *The Fauna of British India including Ceylon and Burma. Vol II*. Taylor and Francis: London. 503 pp.
- Ponsonby DW, Madisha MT, Schwaibold U, Dalton DL. 2019. *Genetic diversity of African clawless otters (*Aonyx capensis*) occurring in urbanised areas of Gauteng, South Africa*. *S Afr J Sci*. 2019;115(7/8), Art. #4889, 8 pages. <https://doi.org/10.17159/sajs.2019/4889aad>
- Pramudianto, A. 2020. *Perlindungan hukum internasional dan nasional satwa berang-berang (otter)*. Universitas Indonesia.
- Raha, A., and S. A. Hussain. 2016. *Factors affecting habitat selection by three sympatric otter species in the southern Western Ghats, India*. *Acta Ecologica Sinica*. 36 : 45 – 49.
- Rihadini, R., Appel, A., Handono, C.D., and Febrianto, I. 2022. *First Photographic Records of the Small-Clawed Otter *Aonyx cinereus* (Illiger, 1815) in Eastern Java, Indonesia*. *IUCN Otter Spec. Group Bull.* 39 (1): 3 – 15
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS 2007. *Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management*. *Trends Ecol Evol* 22:25–33
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. 2006. *Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers*. *Ecology Letters*, 9(5), 615-629.
- Strachan, T. and Read, A.P. 1999. *Instability of Human Genome Mutation and DNA Repair in Human Molecular Genetics*. Published by John Wiley and Sons Inc
- Sinaga, E. 2010. *Biologi Molekuler Ekspresi Gen*. Fakultas Biologi Universitas Nasional. Diakses dari <http://repository.unas.ac.id/1546/1/Lamp.%20A33-Diktat-Biomol-Regulasi%20Ekspresi%20gen.pdf>
- Walker, E.P. 1975. *Mammals of the World. 3<sup>th</sup> edition*. Baltimore: Johns Hopkins Press.

Zhu Y, Liu H, Yang H, Li Y, Zhang H. 2017. *Factors affecting genotyping success in giant panda fecal samples*. PeerJ.;5:e3358



## LAMPIRAN

Lampiran 1. Lokasi laterine site pengambilan sampel



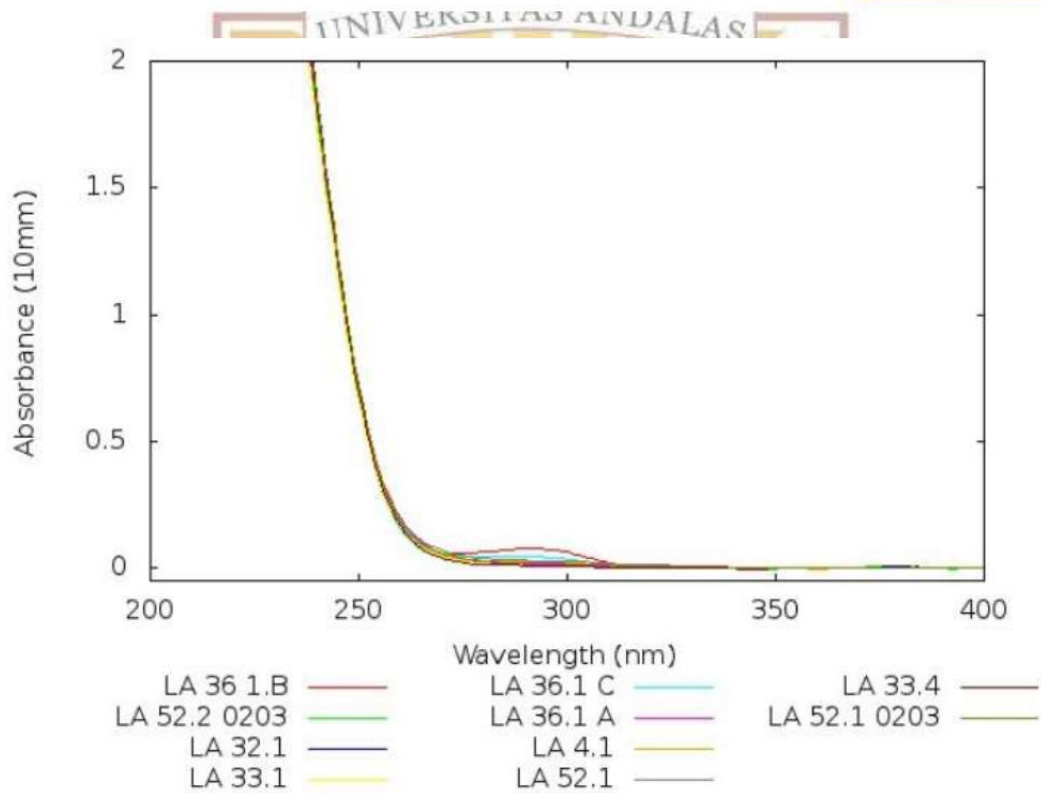
Lampiran 2. Pengambilan sampel feses *Aonyx cinereus*





Lampiran 3. Hasil NanoDrop spektrofotometri

#	Name	Conc.	Units	A230	A260	A280	A320	A260/A280	A260/A230
1	Blank 1	0.0000	ng/ul	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	LA36.1B	8.4000	ng/ul	3.180	0.173	0.063	0.005	2.897	0.053
3	LA52.2 0203	7.9000	ng/ul	3.073	0.157	0.026	-0.001	5.852	0.051
4	LA32.1	8.8500	ng/ul	3.213	0.181	0.028	0.004	7.375	0.055
5	LA33.1	8.0000	ng/ul	3.011	0.164	0.019	0.004	10.67	0.053
6	LA36.1 C	8.8500	ng/ul	3.192	0.184	0.043	0.007	4.917	0.056
7	LA36.1 A	8.8000	ng/ul	3.114	0.180	0.025	0.004	8.381	0.057
8	LA4.1	8.4000	ng/ul	3.156	0.174	0.029	0.006	7.304	0.053
9	LA52.1	9.2500	ng/ul	3.139	0.197	0.039	0.012	6.852	0.059
10	LA33.4	8.2500	ng/ul	3.166	0.166	0.013	0.001	13.75	0.052
11	LA52.1 0203	9.2500	ng/ul	3.189	0.192	0.028	0.007	8.810	0.058



## BIODATA PENULIS



Nama : Intania Azzahra Putri Sanes  
NIM : 2010423002  
Tempat Tanggal Lahir : 21 April 2001  
Jenis Kelamin : Perempuan  
Agama : Islam  
Alamat : Toboh kuranji, Campago Selatan, Kecamatan V Koto Kp. Dalam, Kabupaten Padang Pariaman, Sumatera Barat  
Alamat Email : caniintan2104@gmail.com  
Nama Orang Tua :  
Ayah : Drs. Salman  
Ibu : Amnestiyear S.pd

### RIWAYAT PENDIDIKAN

2007-2012 : SD Negeri 13 Kp. Dalam  
2012-2016 : SMP Negeri 1 Kp. Dalam  
2016-2019 : SMA Negeri 1 Pariaman  
2020-2024 : S1 Departemen Biologi Universitas Andalas