

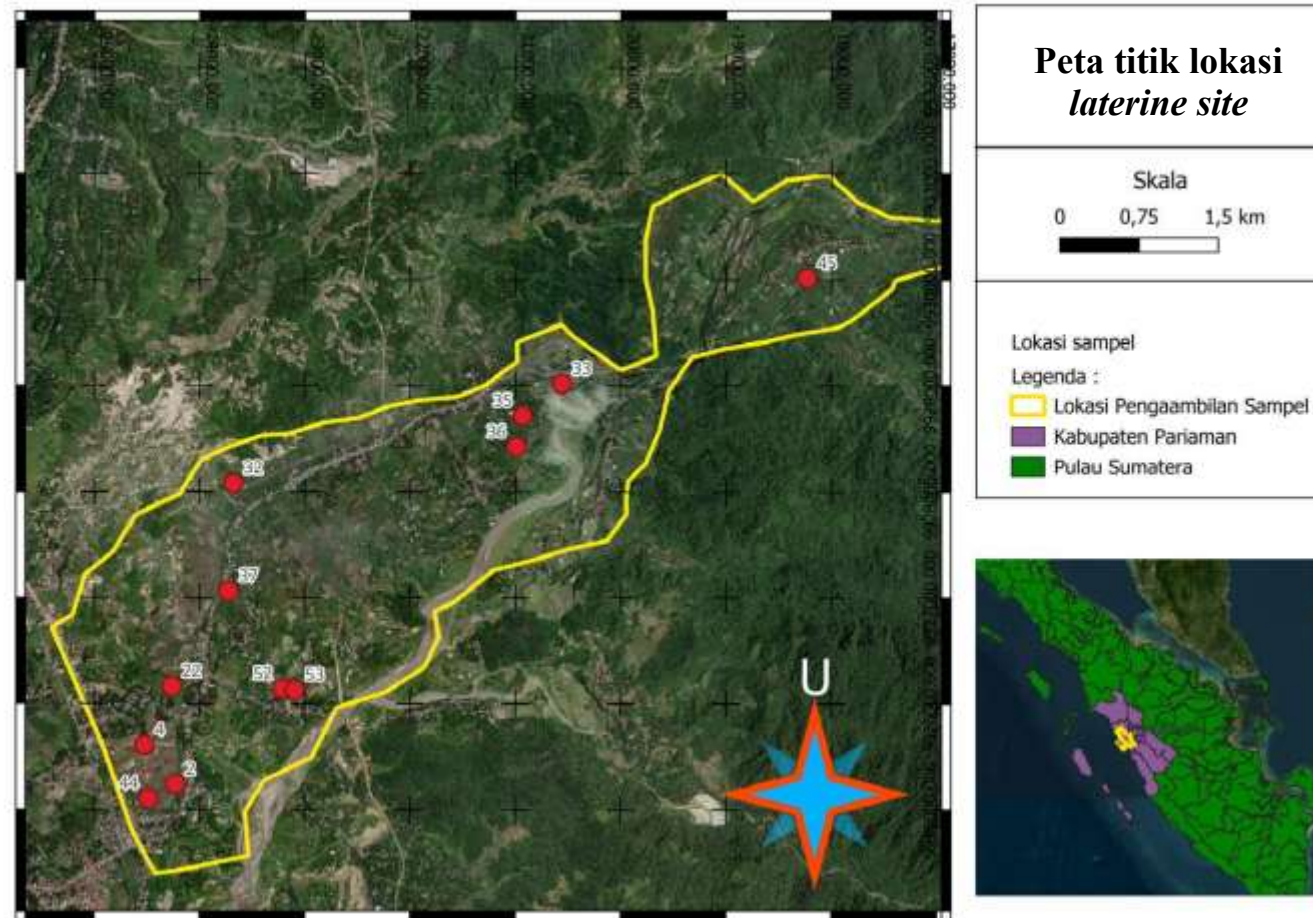
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 50 sampel feses *Aonyx cinereus* dikoleksi pada 12 titik *laterine site* (Tabel 6) di Persawahan Lubuk Alung, Sumatera Barat (Gambar 2). Sampel terbanyak ditemukan di titik *laterine site* LA 33 dengan total 11 sampel feses. Sementara itu, titik *laterine site* paling sedikit ditemukannya sampel feses yaitu LA 02 dan LA 45 yang mana masing-masing titik ditemukan 1 sampel, *laterine site* ini berada di dekat pondok dan pohon kelapa serta dekat dengan pemukiman penduduk.

Selain sampel DNA feses yang dikoleksi di persawahan Lubuk Alung, sampel kontrol juga dikoleksi dari jaringan otot *Aonyx cinereus* jantan dan betina. Sampel jaringan otot jantan dikoleksi dari bangkai *Aonyx cinereus* yang dipelihara di Kuranji, berasal dari persawahan di Pasaman. Sementara sampel jaringan betina dikoleksi dari jaringan rambut *Aonyx cinereus* yang berasal dari Probolinggo.

Tabel 6. *Laterine site* dan jumlah sampel feses yang dikumpulkan

No.	<i>Laterine site</i>	Total sampel
1.	LA 02	1
2.	LA 04	7
3.	LA 22	3
4.	LA 32	2
5.	LA 33	11
6.	LA 35	5
7.	LA 36	9
8.	LA 37	4
9.	LA 44	2
10.	LA 45	1
11.	LA 52	2
12.	LA 53	3
	Total	50



Gambar 2. Peta titik lokasi *laterine site* Sampel di Persawahan Lubuk Alung Sumatera Barat

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penentuan jenis kelamin *Aonyx cinereus* dan rasio kelimpahannya berdasarkan analisis DNA feses dengan menggunakan primer ZFX/ZFY dan SRY, maka didapatkan hasil sebagai berikut:

A. Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan feses telah dilakukan mengacu pada protokol QIAGEN QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, 2010). Berdasarkan hasil isolasi DNA, didapatkan rata-rata konsentrasi DNA dari 50 sampel feses *Aonyx cinereus* dengan rata-rata konsentrasi 8,637 ng/ μ L. Sementara itu, DNA pada sampel jaringan otot *Aonyx cinereus* berjenis kelamin jantan memiliki konsentrasi 286,05 ng/ μ L dan DNA pada sampel jaringan rambut *Aonyx cinereus* berjenis kelamin betina memiliki konsentrasi 3,85 ng/ μ L. (Tabel 7). Pengujian konsentrasi dan kemurnian DNA secara kuantitatif Spektrofotometer NanoDrop (Lampiran 1).

Hasil uji nanodrop pada 50 sampel feses *Aonyx cinereus* menunjukkan konsentrasi DNA feses yang rendah (7,3 ng/ μ L - 10,4 ng/ μ L). Menurut Thermo Fisher Scientific (2023), konsentrasi DNA dengan rentang 5-50 ng/ μ L sudah cukup baik untuk reaksi amplifikasi PCR. Dengan demikian rata-rata konsentrasi DNA feses *Aonyx cinereus* yang sudah diisolasi dapat dilanjutkan untuk amplifikasi PCR.

Perbedaan konsentrasi DNA yang berasal dari ekstraksi feses dan jaringan mamalia telah dibahas dalam beberapa studi (Murphy *et al.*, 2002; Panasci *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2017). DNA dari jaringan mamalia biasanya memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan DNA yang diekstraksi dari feses. Ekstrak feses mengandung kontaminasi (Nechvatal *et al.*, 2008 ; Opel *et al.*, 2010 yang dapat

berasal dari sisa makanan, protein dalam feses dapat mempengaruhi hasil ekstraksi, konsentrasi DNA yang diperolehpun menjadi sangat rendah (Forgacs, 2019).

Tabel 7. Data keterangan konsentrasi DNA dalam sampel

No.	Kode Sampel	Sampling	Isolasi DNA	Konsentrasi
1.	LA33.1A	05/10/2024	01/07/2025	8.35 ng/μL
2.	LA33.2A	05/10/2024	01/07/2025	8.7 ng/μL
3.	LA33.3A	05/10/2024	01/07/2025	8.4 ng/μL
4.	LA33.4A	05/10/2024	01/07/2025	9.4 ng/μL
5.	LA33.5A	05/10/2024	01/07/2025	9.4 ng/μL
6.	LA33.6A	05/10/2024	01/07/2025	8.75 ng/μL
7.	LA33.7A	05/10/2024	01/07/2025	9.25 ng/μL
8.	LA33.8A	05/10/2024	01/07/2025	8.65 ng/μL
9.	LA37.1A	05/10/2024	01/07/2025	8.65 ng/μL
10.	LA37.2A	05/10/2024	01/07/2025	9.3 ng/μL
11.	LA37.3A	05/10/2024	01/07/2025	9.25 ng/μL
12.	LA37.4A	05/10/2024	01/07/2025	9.55 ng/μL
13.	LA22.1A	10/09/2024	03/07/2025	8.95 ng/μL
14.	LA22.2A	10/09/2024	03/07/2025	9.35 ng/μL
15.	LA22.3A	10/09/2024	03/07/2025	8.25 ng/μL
16.	LA35.1A.15	15/08/2024	03/07/2025	8.35 ng/μL
17.	LA35.2B.15	15/08/2024	03/07/2025	8.9 ng/μL
18.	LA35.3A.15	15/08/2024	03/07/2025	8.35 ng/μL
19.	LA04.1A	14/08/2024	03/07/2025	8.45 ng/μL
20.	LA04.2A	14/08/2024	03/07/2025	8.2 ng/μL
21.	LA04.3A	14/08/2024	03/07/2025	8.3 ng/μL
22.	LA04.4A	14/08/2024	03/07/2025	8.4 ng/μL
23.	LA04.5B	14/08/2024	03/07/2025	9.5 ng/μL
24.	LA04.6A	14/08/2024	03/07/2025	8.3 ng/μL
25.	LA36.1A	01/08/2024	15/07/2025	8.25 ng/μL
26.	LA36.2A	01/08/2024	15/07/2025	7.65 ng/μL
27.	LA36.3A	01/08/2024	15/07/2025	7.3 ng/μL
28.	LA36.4A	01/08/2024	15/07/2025	7.8 ng/μL
29.	LA36.5A	01/08/2024	15/07/2025	8.35 ng/μL
30.	LA36.6A	01/08/2024	15/07/2025	8.1 ng/μL
31.	LA44.1A	31/07/2024	15/07/2025	7.95 ng/μL
32.	LA44.2A	31/07/2024	15/07/2025	8.25 ng/μL
33.	LA53.1A	14/05/2024	29/07/2025	9.2 ng/μL
34.	LA53.2A	14/05/2024	29/07/2025	8.25 ng/μL
35.	LA53.3A	14/05/2024	29/07/2025	10.4 ng/μL
36.	LA35.1B.14	14/08/2024	29/07/2025	8.65 ng/μL
37.	LA35.2B.14	14/08/2024	29/07/2025	8.65 ng/μL
38.	LA02.1A	14/05/2024	29/07/2025	9.5 ng/μL
39.	LA45.1A	14/05/2024	29/07/2025	9.4 ng/μL
40.	LA36.1A	06/07/2024	08/07/2024	8.8 ng/μL
41.	LA36.1B	06/07/2024	08/07/2024	8.4 ng/μL
42.	LA36.1C	06/07/2024	08/07/2024	8.85 ng/μL
43.	LA33.1	16/03/2024	10/06/2024	8 ng/μL
44.	LA33.3	16/03/2024	11/06/2024	8.5 ng/μL
45.	LA32.1	16/03/2024	10/06/2024	8.85 ng/μL
46.	LA32.2	16/03/2024	11/06/2024	8 ng/μL
47.	LA33.4	16/03/2024	08/07/2024	8.25 ng/μL
48.	LA04.1	04/07/2024	08/07/2024	8.4 ng/μL
49.	LA52.1.02	02/03/2024	08/07/2024	9.25 ng/μL
50.	LA52.2.02	02/03/2024	08/07/2024	7.9 ng/μL
51.	O.psm (jantan)	31/08/2025	03/09/2025	286.05 ng/μL
52.	O.pbg (betina)	29/10/2025	29/10/2025	3.85 ng/μL

Studi pengembangan konservasi mamalia liar menggunakan metodologi untuk mengoptimalkan ekstrak DNA, menunjukkan bahwa feses segar merupakan sumber sampel yang paling sesuai (Lampa *et al.*, 2013). Aristizábal (2025) merekomendasikan sampel feses dalam kondisi segar untuk menghindari efek paparan kondisi lingkungan yang tidak mendukung, mengumpulkan volume sampel yang cukup, dan menggunakan primer yang mengamplifikasi segmen pendek, serta menerapkan metode sampling atau penyimpanan yang sesuai untuk mencegah degradasi DNA.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa konsentrasi DNA mamalia dipengaruhi oleh jenis sampel yang digunakan serta metode ekstraksi yang diterapkan. Ramón-Laca *et al.* (2015) melaporkan bahwa ekstraksi DNA dari feses mamalia liar umumnya menghasilkan konsentrasi 1–100 ng/μL. Pokorska *et al.* (2016) menemukan bahwa sel somatik dalam susu mamalia dapat menghasilkan DNA berkualitas baik meskipun jumlahnya rendah. Selain itu, penelitian Peñafiel *et al.* (2019) menunjukkan bahwa sampel darah dan otot mamalia yang masih segar dapat menghasilkan konsentrasi DNA dalam jumlah tinggi, sehingga jaringan tubuh menjadi sumber DNA yang paling kaya.

Jika dibandingkan, konsentrasi DNA antara jenis sampel yang berbeda (sampel feses, otot, dan rambut) hasilnya sangat mencolok. Studi oleh Algriw *et al.* (2017) pada jaringan hati dan otot menghasilkan konsentrasi DNA yang sangat tinggi, terutama pada jaringan yang disimpan baik pada suhu rendah. Sebaliknya, penelitian pada sampel jaringan mamalia liar yang mengalami degradasi atau spesimen museum (Molbert *et al.*, 2023) menunjukkan bahwa meskipun

konsentrasi DNA dapat diekstrak dalam jumlah memadai, kualitas dan kuantitasnya jauh lebih rendah dibanding jaringan segar.

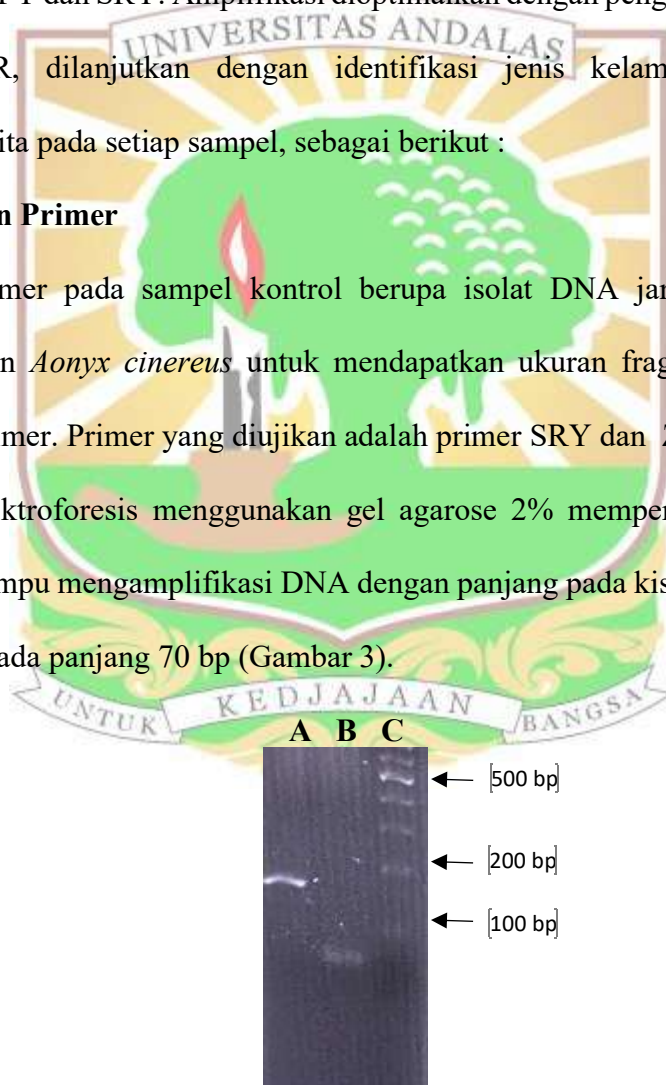
B. Amplifikasi dan Visualisasi DNA

1. Penentuan Jenis Kelamin

Penentuan jenis kelamin berang-berang cakar kecil ditentukan berdasarkan kemunculan pita pada setiap sampel DNA feses yang diuji dengan menggunakan primer ZFX/ZFY dan SRY. Amplifikasi dioptimalkan dengan pengujian primer dan *gradient* PCR, dilanjutkan dengan identifikasi jenis kelamin berdasarkan kemunculan pita pada setiap sampel, sebagai berikut :

a. Pengujian Primer

Pengujian primer pada sampel kontrol berupa isolat DNA jaringan otot dari individu jantan *Aonyx cinereus* untuk mendapatkan ukuran fragmen target dan spesifisitas primer. Primer yang diujikan adalah primer SRY dan ZFX/ZFY. Hasil visualisasi elektroforesis menggunakan gel agarose 2% memperlihatkan primer ZFX/ZFY mampu mengamplifikasi DNA dengan panjang pada kisaran 200 bp dan primer SRY pada panjang 70 bp (Gambar 3).



Gambar 3. Visualisasi pengujian PCR dengan elektroforesis ge agarose 2% menggunakan sampel DNA jaringan individu jantan *Aonyx cinereus*, A. primer ZFX/ZFY, B. primer SRY, C. penanda ukuran DNA (100 bp)

Penggunaan primer ZFX/ZFY dan SRY sebagai penanda penentu jenis kelamin telah berhasil dilakukan sebelumnya pada mamalia dan beberapa spesies dari famili Mustelidae (Statham *et al.*, 2007), termasuk spesies *Aonyx cinereus*. Hasil amplifikasi DNA otot *Aonyx cinereus* menggunakan primer ZFX/ZFY dan SRY dalam penelitian ini konsisten dengan yang dilaporkan oleh Teoh (2024) yang menunjukkan keberhasilan amplifikasi lokus ZFX/ZFY pada betina dan jantan, juga SRY pada jantan. Studi terhadap gen-gen pada kromosom seks Mustelidae menunjukkan bahwa sekuens ZFX dan ZFY bersifat konservatif serta konsisten digunakan untuk analisis identifikasi jenis kelamin (Yamada *et al.*, 2010). Temuan ini memperkuat validitas bahwa *marker* ZFX/ZFY sangat stabil secara evolusioner dan dapat berfungsi sebagai *marker* universal untuk penentuan jenis kelamin dalam Mustelidae.

Selain itu, pada penelitian ini, primer SRY yang oleh Butler (2014) juga dijadikan sebagai *marker* spesifik kromosom Y, juga menunjukkan tingkat konsistensi tinggi. Yang mana hasilnya konsisten dan spesifik, bahwa jantan 1 pita, sesuai dengan pola yang dilaporkan oleh Statham *et al.* (2007), yang mendeteksi pita tunggal spesifik jantan pada lima spesies dari famili Mustelidae yang diuji. Hasil yang akurat menjadikan SRY sering digunakan sebagai uji konfirmasi ketika diuji bersamaan dengan primer lainnya (Steinlechner *et al.*, 2002; Drobnič, 2006; Tozzo *et al.*, 2013) .

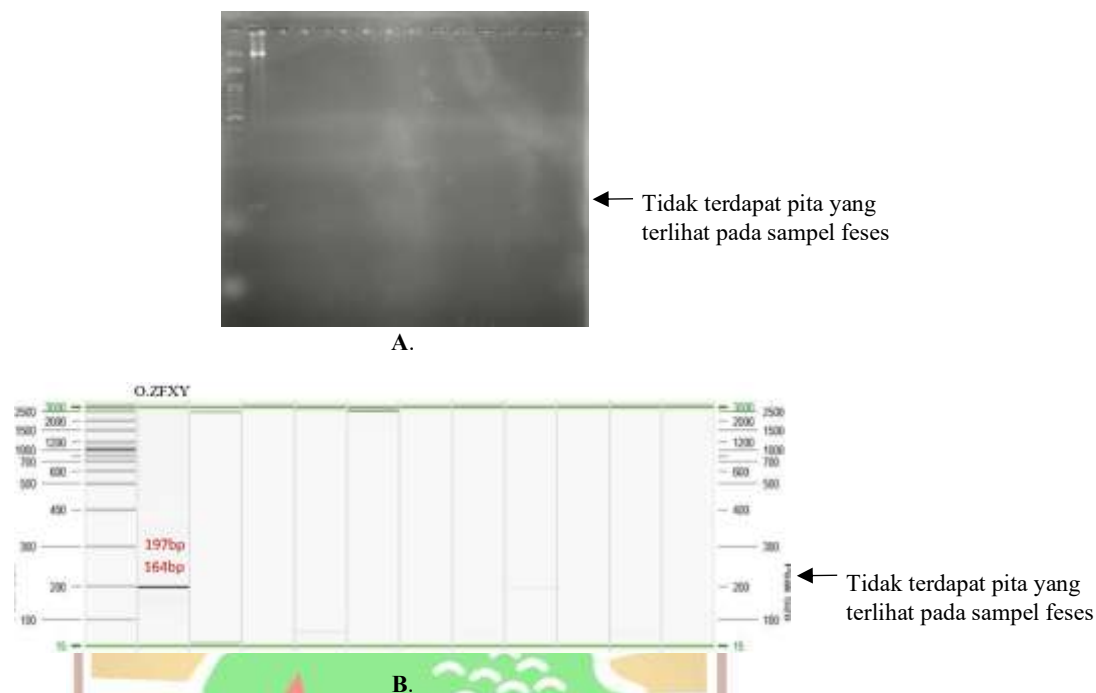
Pendekatan kedua *marker* ini juga direkomendasikan untuk memastikan akurasi pada DNA berkualitas rendah atau terdegradasi, seperti sampel feses, sebagaimana dalam penelitian Teoh *et al.* (2024) pada *A. cinereus* dan *L.*

perspicillata. Hasil visualisasi pada pengujian kontrol (Gambar 3) menegaskan bahwa primer bekerja dengan efisien pada DNA berkualitas tinggi sebelum diterapkan pada sampel *non-invasive*.

b. Optimasi Suhu Annealing Pada Sampel Feses

Hasil amplifikasi primer ZFX/ZFY dan SRY pada pengujian sampel isolat DNA feses tidak memperlihatkan adanya pita pada gel elektroforesis. Meskipun primer telah tervalidasi menggunakan DNA jaringan otot sebagai kontrol positif, amplifikasi pada DNA feses tidak dapat diamati bukan hanya karena tidak adanya sekuen target, akan tetapi dapat karena kondisi PCR, khususnya suhu annealing yang belum sesuai (Gambar 4). Untuk itu dilakukan pengujian PCR gradient untuk mengoptimalkan suhu annealing.

Penggunaan gradient PCR sebagai metode paling efektif untuk menentukan suhu annealing optimal. Dengan metode ini, satu reaksi PCR dijalankan pada rentang suhu annealing yang berbeda dalam satu kali siklus, sehingga memungkinkan identifikasi suhu yang menghasilkan pita paling jelas, spesifik, dan konsisten. Dengan *gradient* PCR, reaksi dijalankan pada beberapa suhu annealing secara bersamaan, Metode ini sangat berguna ketika sampel yang digunakan berpotensi terfragmentasi atau mengandung inhibitor, seperti DNA feses, sehingga kondisi annealing yang optimal dapat memaksimalkan efisiensi amplifikasi, (Thermo Fisher Scientific, 2019).

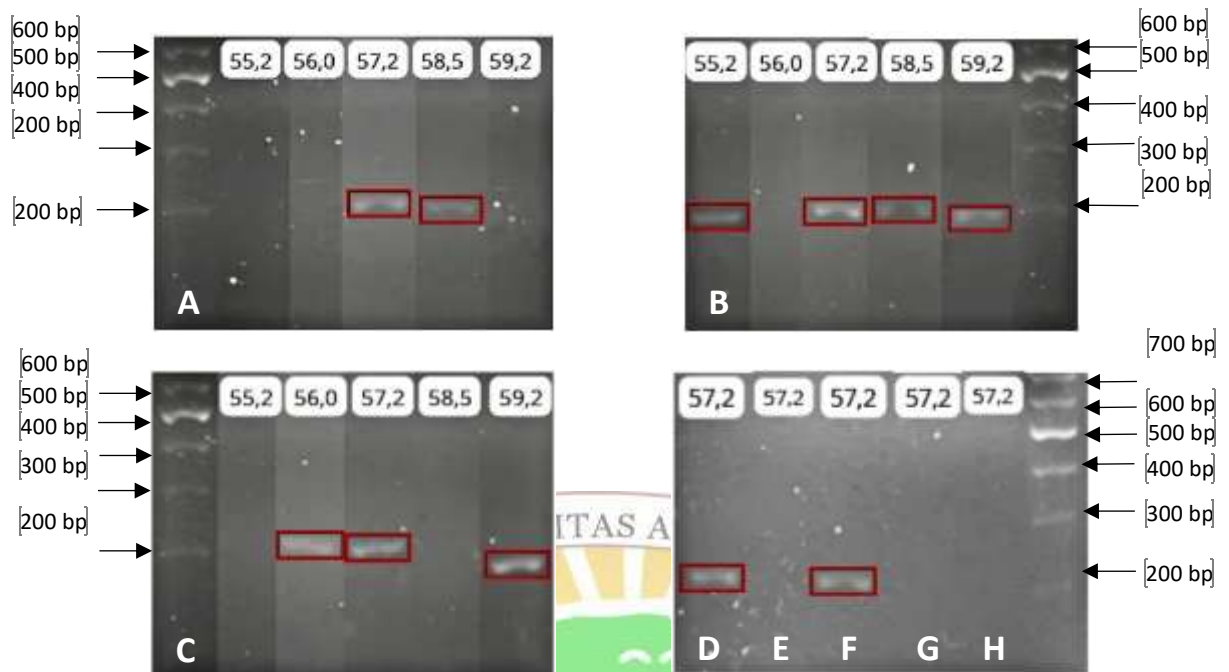


Gambar 4. Visualisasi pengujian PCR dengan elektroforesis pada sampel DNA feses tidak menampilkan pita, **A.** Visualisasi pengujian dengan elektroforesis gel agarose 2% pada primer SRY sampel DNA feses, **B.** Visualisasi pengujian dengan elektroforesis kapiler pada primer ZFX/ZFY sampel DNA feses

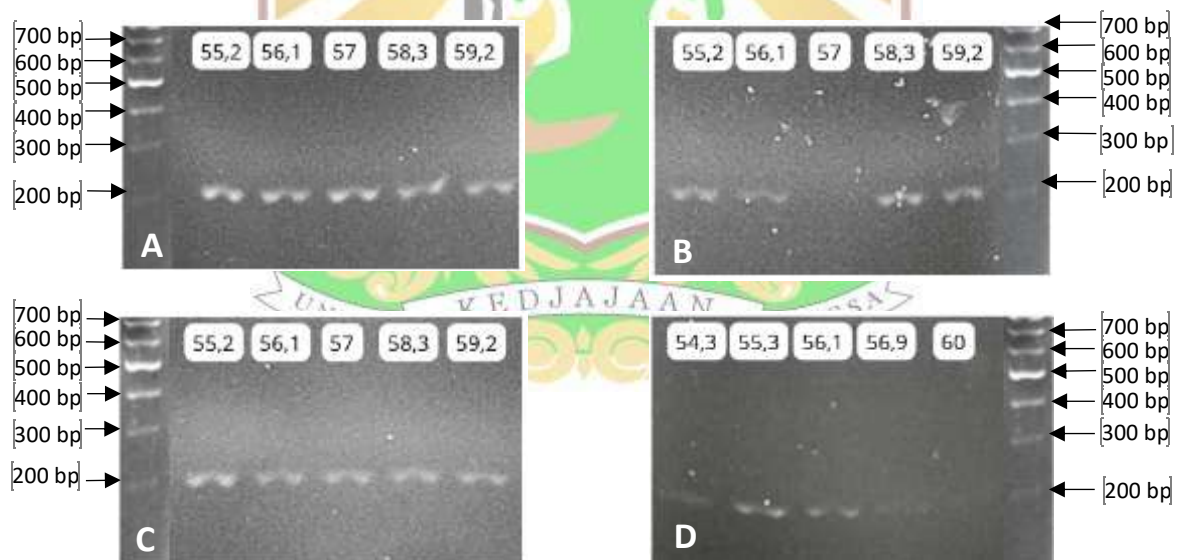
Suhu anealling optimal berbeda-beda pada setiap sampel meskipun dari jenis spesies yang sama, sehingga dilakukan optimasi dengan menggunakan metode *gradient* PCR. Pengujian pada 50 sampel feses dengan *gradient* PCR dan elektroforesis gel kemudian visualisasi berhasil dilakukan, semua sampel DNA feses mengamplifikasi dan terlihat jelas pita DNA (Gambar 5-7). Dapat diamati bahwa amplifikasi berhasil pada beberapa suhu annealing yang berkisar diantara 55.2°C- 59.2°C (Tabel 8). Optimasi suhu anealling dengan *gradient* PCR pada *Aonyx cinereus* pernah dilakukan sebelumnya (Sanes, 2024) menggunakan sampel isolat DNA feses untuk mendapatkan suhu optimal pada primer Mikrosatelit yaitu 48°C, 50°C, 52°C dan 54°C

Tabel 8. Data keterangan suhu dan keberhasilan visualisasi pita

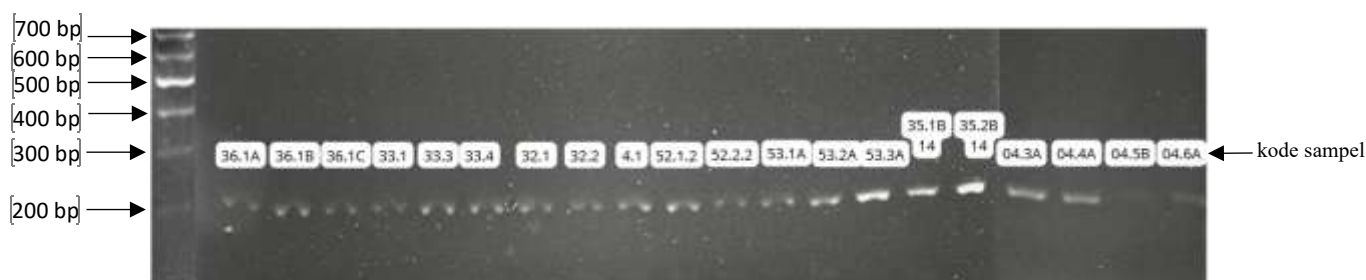
No.	Kode Sampel	Konsentrasi	ZFX/ZFY (°C)										SRY(°C)	
			55.2	55.3	56.0	56.1	57.0	57.2	58.2	58.3	58.5	59.2	60.5	
1.	LA33.1A	8.35 ng/μL	√			√	√			√		√		
2.	LA33.2A	8.7 ng/μL					√			√		√		
3.	LA33.3A	8.4 ng/μL	√			√				√		√		
4.	LA33.4A	9.4 ng/μL								√				
5.	LA33.5A	9.4 ng/μL								√				
6.	LA33.6A	8.75 ng/μL								√				
7.	LA33.7A	9.25 ng/μL							√		√			
8.	LA33.8A	8.65 ng/μL								√				
9.	LA37.1A	8.65 ng/μL								√				
10.	LA37.2A	9.3 ng/μL		√		√								
11.	LA37.3A	9.25 ng/μL								√				
12.	LA37.4A	9.55 ng/μL								√				
13.	LA22.1A	8.95 ng/μL						√			√			
14.	LA22.2A	9.35 ng/μL			√							√		
15.	LA22.3A	8.25 ng/μL			√							√		
16.	LA35.1A.15	8.35 ng/μL												
17.	LA35.2B.15	8.9 ng/μL												
18.	LA35.3A.15	8.35 ng/μL								√				
19.	LA04.1A	8.45 ng/μL						√						
20.	LA04.2A	8.2 ng/μL						√						
21.	LA04.3A	8.3 ng/μL						√						
22.	LA04.4A	8.4 ng/μL						√						
23.	LA04.5B	9.5 ng/μL						√						
24.	LA04.6A	8.3 ng/μL						√						
25.	LA36.1A	8.25 ng/μL								√				
26.	LA36.2A	7.65 ng/μL								√				
27.	LA36.3A	7.3 ng/μL								√				
28.	LA36.4A	7.8 ng/μL								√				
29.	LA36.5A	8.35 ng/μL								√				
30.	LA36.6A	8.1 ng/μL								√				
31.	LA44.1A	7.95 ng/μL								√				
32.	LA44.2A	8.25 ng/μL								√				
33.	LA53.1A	9.2 ng/μL						√						
34.	LA53.2A	8.25 ng/μL						√						
35.	LA53.3A	10.4 ng/μL						√						
36.	LA35.1B.14	8.65 ng/μL						√						
37.	LA35.2B.14	8.65 ng/μL						√						
38.	LA02.1A	9.5 ng/μL												
39.	LA45.1A	9.4 ng/μL												
40.	LA36.1A	8.8 ng/μL						√						
41.	LA36.1B	8.4 ng/μL						√						
42.	LA36.1C	8.85 ng/μL						√						
43.	LA33.1	8 ng/μL						√						
44.	LA33.3	8.5 ng/μL						√						
45.	LA32.1	8.85 ng/μL						√						
46.	LA32.2	8 ng/μL						√						
47.	LA33.4	8.25 ng/μL						√						
48.	LA4.1	8.4 ng/μL						√						
49.	LA52.1.02	9.25 ng/μL						√						
50.	LA52.2.02	7.9 ng/μL						√						
51.	O.psm (♂)	286 ng/μL							√					√
52.	O.pbg (♀)	3.85 ng/μL						√		√				
Total			3	1	2	3	2	28	2	22	2	5	1	



Gambar 5. Visualisai pengecekan PCR gradien dengan elektroforesis gel agarose 2% menggunakan primer ZFX/ZFY pada keterangan A. LA 22.1A B. LA 22.2A C. LA 22.3A D. LA 35.1A E. LA 35.2B F. LA 35.3A G. LA 4.1A H. LA 4. 2A



Gambar 6. Visualisai pengecekan PCR gradien dengan elektroforesis gel agarose 2% menggunakan primer ZFX/ZFY pada keterangan A. LA 33.1A, B. LA 33.2A, C. LA 33.3A, D. LA 37.2A



Gambar 7. Visualisasi pengecekan DNA feses dengan elektroforesis gel agarose 2 % menggunakan primer ZFX/ZFY pada suhu 57,2°C

Rendahnya konsentrasi DNA yang diperoleh dari sampel feses merupakan tantangan utama dalam amplifikasi PCR pada studi genetika non-invasif. Taberlet *et al.* (1996) menyatakan bahwa sampel dengan jumlah DNA yang sangat sedikit rentan menghasilkan amplifikasi yang tidak konsisten, termasuk kegagalan amplifikasi dan munculnya pita semu. Kondisi ini diperparah oleh keberadaan inhibitor PCR yang umum ditemukan dalam sampel feses, seperti garam empedu dan polisakarida, yang dapat mengganggu dan mengubah efisiensi amplifikasi secara berbeda pada setiap sampel (Taberlet *et al.*, 1999). Akibatnya, kondisi PCR yang optimal, termasuk suhu annealing, dapat bervariasi antar sampel tergantung pada kualitas dan kemurnian DNA masing-masing. Untuk mengatasi permasalahan ini, suhu annealing diturunkan secara bertahap dari suhu tinggi ke suhu target sehingga meningkatkan spesifisitas sekaligus sensitivitas amplifikasi pada template berkualitas rendah (Don *et al.*, 1991; Korbie & Mattick, 2008).

Sidstedt *et al.* (2020) menjelaskan bahwa inhibitor PCR yang terkandung dalam sampel biologis kompleks dapat mengganggu setiap tahapan kritis reaksi PCR, mulai dari denaturasi template, annealing primer, hingga aktivitas polimerisasi enzim, dan tingkat gangguan ini berbeda-beda tergantung komposisi

inhibitor pada tiap sampel. Kondisi serupa dijumpai pada sampel DNA yang mengalami degradasi dan mengandung inhibitor dalam jumlah tinggi, di mana keberhasilan amplifikasi bersifat *sampel-dependen* dan tidak dapat diprediksi dengan satu kondisi PCR yang seragam (Kemp *et al.*, 2020).

Keberhasilan amplifikasi sehingga pita terlihat jelas dapat terjadi karena tidak adanya keberadaan inhibitor dalam sampel yang dapat menghambat seluruh tahap PCR, termasuk denaturasi, penempelan primer (*annealing*), dan ekstensi, sehingga menyebabkan amplifikasi berhasil dan menghasilkan produk (Schrader *et al.* 2012), Menurut Opel *et al.* (2010), proses penempelan primer (*annealing*) dapat saja terganggu diakibatkan keberadaan inhibitor PCR. Inhibitor PCR pada sampel lingkungan beragam, seperti pada tanah terdapat *humic* dan *fulminic acids* (Ijzerman *et al.*, 1997), pada lumpur limbah ditemukan protein, polifenol serta logam berat yang menjadi inhibitor PCR dari sampel lingkungan, seperti sampel feses (Shieh *et al.*, 1995; Rock *et al.*, 2010). Pada sampel dengan kualitas DNA rendah seperti feses dengan banyak inhibitor PCR, DNA yang terfragmentasi, dan konsentrasi DNA rendah sehingga optimasi *annealing* menjadi penting untuk dilakukan.

Keberhasilan amplifikasi PCR sangat bergantung pada suhu *annealing*. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi menghambat pembentukan ikatan hidrogen antara primer dan template sehingga primer gagal menempel, menyebabkan amplifikasi tidak terjadi meskipun DNA target sebenarnya tersedia. Sebaliknya, suhu *annealing* yang terlalu rendah meningkatkan risiko penempelan non-spesifik sehingga menghasilkan pita tambahan atau *smear* pada gel elektroforesis. Prinsip

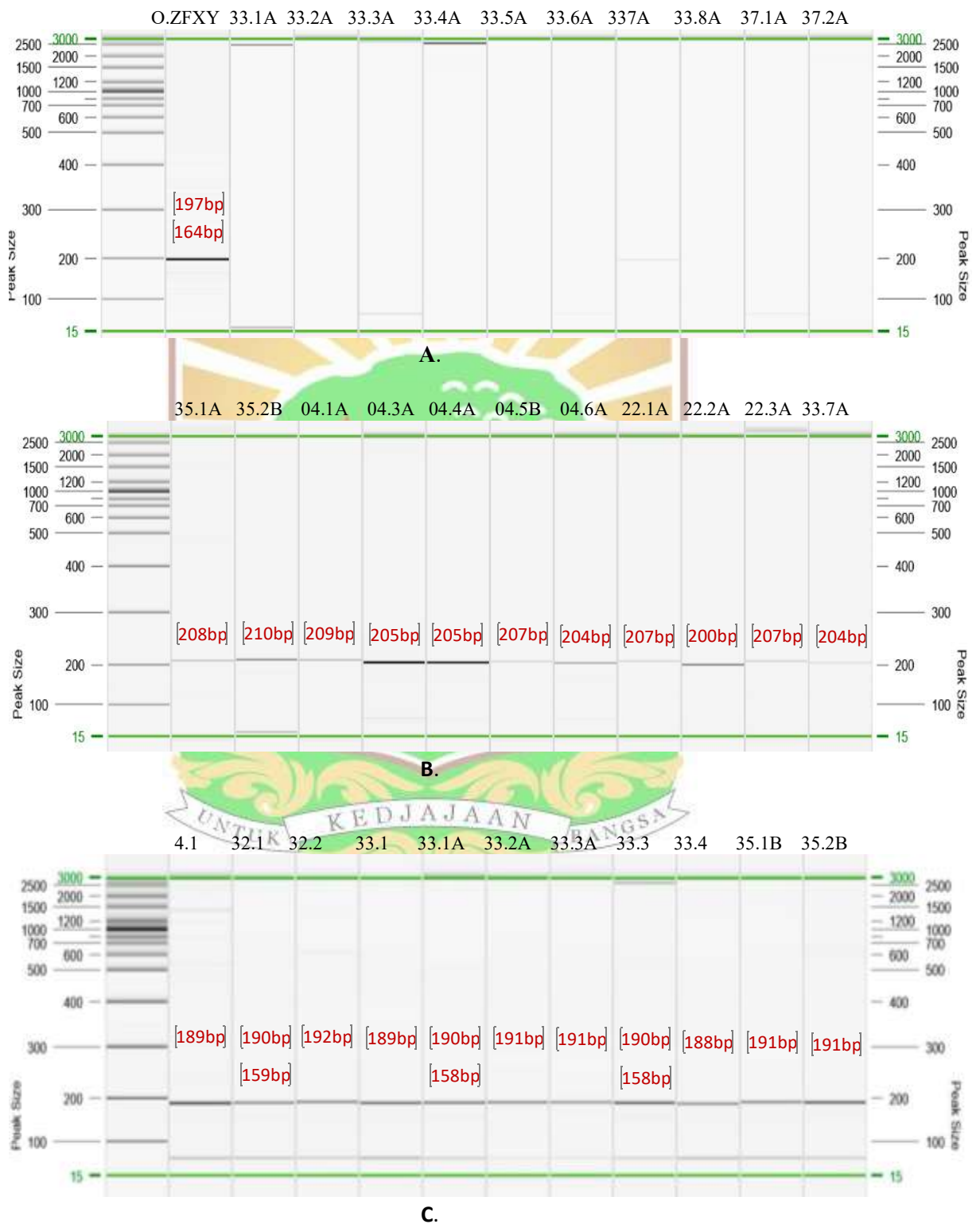
ini dijelaskan dalam panduan optimasi PCR dari Thermo Fisher Scientific (2019), yang merekomendasikan penggunaan *gradient PCR* untuk menentukan suhu annealing optimal.

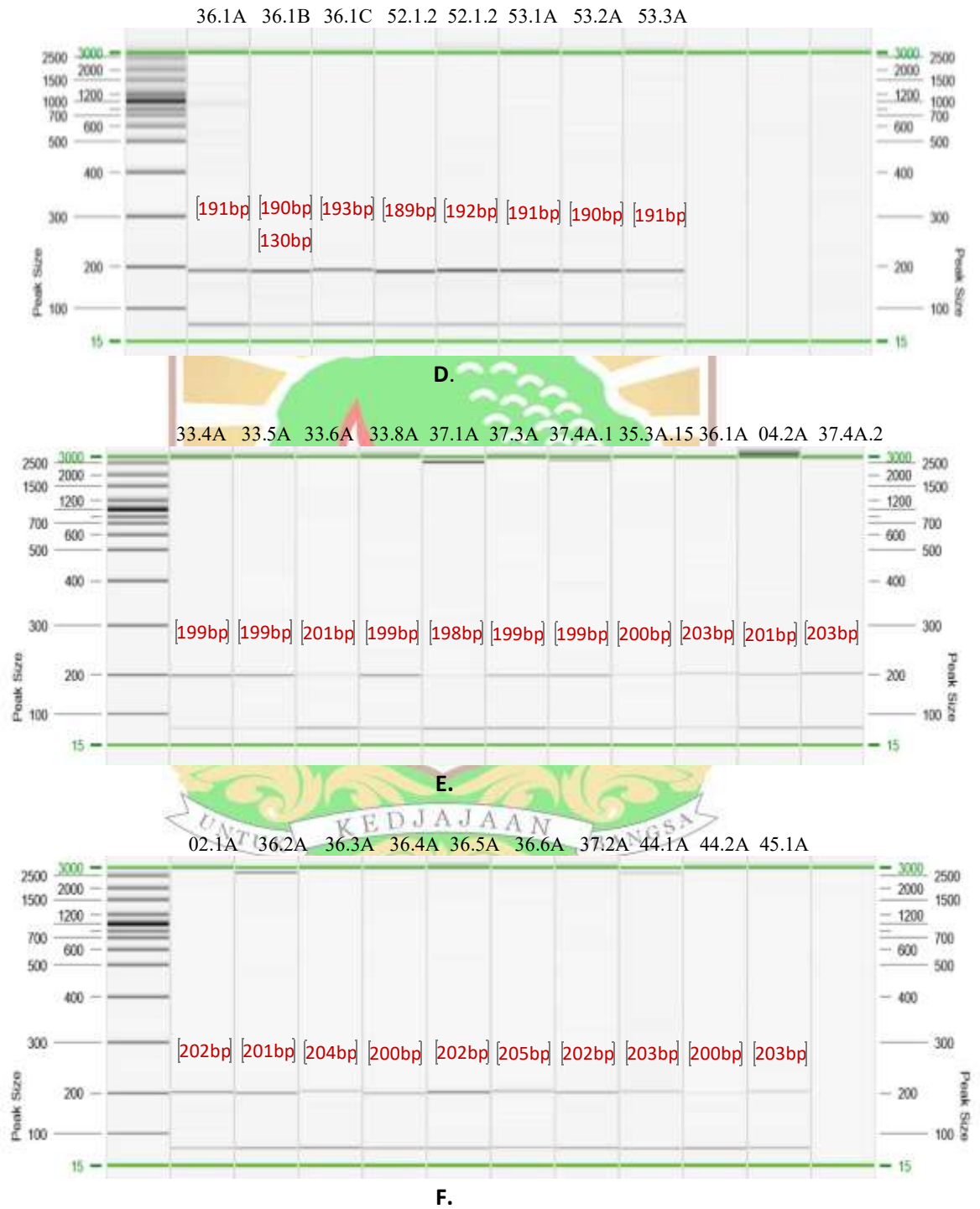
c. Identifikasi Jenis Kelamin

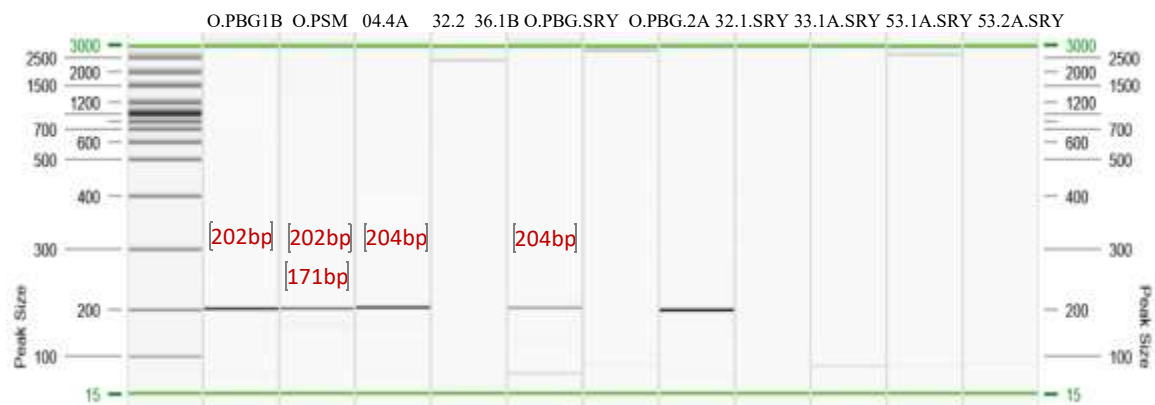
Hasil amplifikasi menggunakan primer ZFX/ZFY dan SRY menampilkan ukuran pita yang bervariasi pada gel elektroforesis. Sampel DNA jaringan individu jantan dan betina, yang merupakan sampel kontrol positif, dan 50 sampel isolat DNA feses divisualisasikan menggunakan elektroforesis kapiler yang lebih sensitif (Gambar 8). Sampel kontrol positif menghasilkan dua pita pada sampel jantan dan satu pita pada sampel betina. Mengacu pada pita yang muncul pada sampel kontrol, terdapat 46 sampel isolat DNA feses yang teridentifikasi sebagai betina dan 4 sebagai jantan. Pola pita sesuai dengan Mucci & Randi (2007) yang menunjukkan bahwa individu jantan memiliki dua fragmen amplifikasi (ZFX dan ZFY), sedangkan betina hanya memiliki satu fragmen (ZFX). Hasil amplifikasi dalam penelitian ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Statham (2007) yang menunjukkan pola pita yang konsisten dan spesifik pada sampel jantan (ZFX dan ZFY) serta satu pita pada betina (ZFX) dalam membedakan jenis kelamin secara akurat pada anggota famili Mustelidae. Temuan ini menunjukkan bahwa primer bekerja dengan baik pada spesies ini.

Hasil penelitian ini berbeda dengan laporan Teoh *et al.* (2024) (Gambar 9) walaupun menggunakan primer yang sama, tapi hanya mendeteksi satu fragmen baik pada jantan maupun betina menggunakan primer ZFX/ZFY. Sejalan dengan

Teoh (2024), hasil penelitian Aristizábal (2025) juga menampilkan pola pita satu fragmen pada jantan maupun betina (Gambar 10).







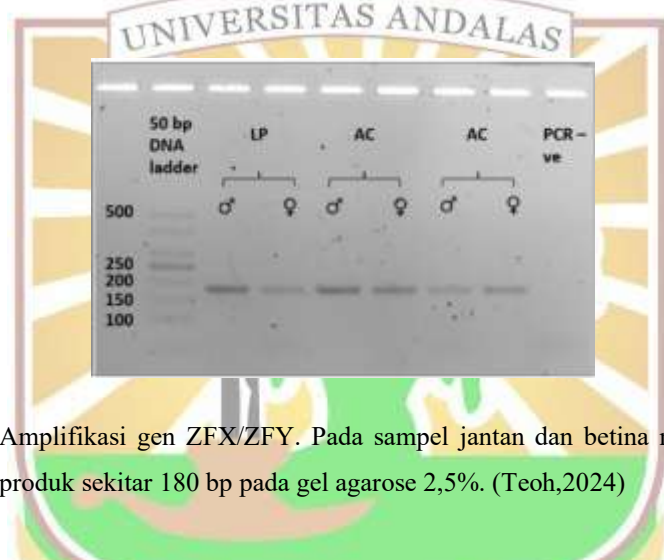
G.

Gambar 8. Visualisasi elektroforesis kapiler pada 50 sampel DNA feses *Aonyx cinereus*

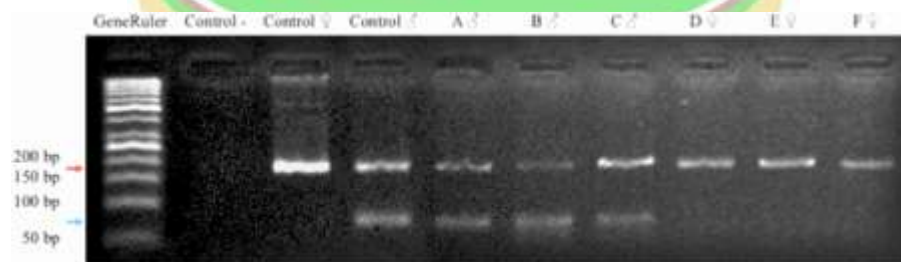
- Keterangan
- A. Kode sampel O.ZFX, 33.1A, 33.2A, 33.3A, 33.4A, 33.5A, 33.6A, 33.7A, 33.8A, 37.1A, 37.2A
 - B. Kode sampel 35.1A, 35.2B, 04.1A, 04.3A, 04.4A, 04.5B, 04.6A, 22.1A, 22.2A, 22.3A, 33.7A
 - C. Kode sampel 4.1, 32.1, 32.2, 33.1, 33.1A, 33.2A, 33.3A, 33.3, 33.4, 35.1B, 35.2B
 - D. Kode sampel 36.1A, 36.1B, 36.1C, 52.1.2, 52.1.2, 53.1A, 53.2A, 53.3A
 - E. Kode sampel 33.4A, 33.5A, 33.6A, 33.8A, 37.1A, 37.3A, 37.4A.1, 35.3A.15, 36.1A, 04.2A, 37.4A.2
 - F. Kode sampel 02.1A, 36.2A, 36.3A, 36.4A, 36.5A, 36.6A, 37.2A, 44.1A, 44.2A, 45.1A
 - G. Kode sampel O.PBG.1B, O.PSM, 04.4A, 32.2, 36.1B, O.PBG.SRY, O.PBG.2A, 32.1.SRY, 33.1A.SRY, 53.1A.SRY, 53.2A.SRY

Hasil amplifikasi yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis kapiler menghasilkan pita yang konsisten dan spesifik. Sampel kontrol jantan dengan kode O.PSM berhasil divalidasi dengan keberadaan dua pita berukuran 171 bp dan 202 bp, dan sampel kontrol betina dengan kode O.PBG.1B divalidasi dengan satu pita berukuran 202 bp (Gambar 8e). Sebanyak 46 sampel feses teridentifikasi sebagai betina dengan panjang satu pita berkisar antara 188 bp - 210 bp, sedangkan 4 sampel feses teridentifikasi sebagai jantan dengan panjang dua pita berkisar antara

130–159 bp dan 190 bp. Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan ukuran pita dengan penelitian Mucci & Randi (2007) yang mana individu jantan memiliki dua fragmen amplifikasi (ZFX dan ZFY) dengan panjang 119 bp dan 178 bp, sedangkan betina hanya memiliki satu fragmen dengan panjang 119 bp. Teoh *et al.* (2024) dan Aristizabal (2025) juga melaporkan ukuran pita yang berbeda dengan penelitian ini, dimana pita yang dihasilkan memiliki ukuran fragmen 180 bp baik pada jantan maupun betina dengan menggunakan primer ZFX/ZFY



Gambar 9. Amplifikasi gen ZFX/ZFY. Pada sampel jantan dan betina menunjukkan satu produk sekitar 180 bp pada gel agarose 2,5%. (Teoh,2024)



Gambar 10. Visualisasi produk PCR dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 3%. Pita-pita DNA diperoleh dari amplifikasi gen SRY dan ZFX/ZFY untuk sampel jaringan (kontrol ♀ dan ♂) dan sampel feses (A–F) dari *Lontra longicaudis* di area studi. Panah biru menunjukkan ukuran fragmen SRY (bp), sedangkan panah merah menunjukkan ukuran fragmen ZFX/ZFY (bp).

Perbedaan ukuran amplifikasi kemungkinan besar disebabkan oleh metode visualisasi yang digunakan. Teoh *et al.* (2024) menggunakan elektroforesis gel

konvensional untuk visualisasi pita DNA, fragmen ZFY yang tipis dapat tidak terdeteksi sehingga menyebabkan hasil yang tampak serupa antara jantan dan betina. Dengan demikian, penggunaan elektroforesis kapiler memberikan keuntungan signifikan dalam akurasi penentuan jenis kelamin, terutama pada spesies dengan fragmen ampikon yang berukuran mirip. Penelitian yang membandingkan metode elektroforesis kapiler dan elektroforesi gel salah satunya dilakukan oleh Gupta *et al.* (2010) pada uji klinis antimalaria di Uganda, menggunakan mikrosatelit pada elektroforesis kapiler dan elektroforesis gel agarose. Hasil menunjukkan bahwa elektroforesis kapiler mampu mendeteksi jumlah alel yang lebih banyak dan memiliki kemampuan membedakan alel yang lebih baik dibandingkan gel, sehingga memberikan hasil yang lebih akurat.

Selain penelitian yang dilakukan oleh Gupta *et al.* (2010), dalam penelitian oleh Sánchez-Velásquez *et al.* (2021) menggunakan dua metode, yaitu elektroforesis kapiler dan *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) untuk estimasi keragaman genetik. Hasil menunjukan elektroforesis kapiler memiliki keunggulan dalam mendeteksi perbedaan fragmen yang kecil (± 2 bp), sehingga lebih akurat. Studi ini menegaskan bahwa meskipun elektroforesis gel masih dapat digunakan untuk analisis genetik, akan tetapi elektroforesis kapiler memberikan resolusi yang lebih tinggi dan presisi lebih baik untuk studi populasi yang membutuhkan deteksi fragmen dari DNA dengan konsentrasi yang rendah seperti DNA feses (Butler, 2014). Dengan metode ini, pita yang sangat tipis yang mungkin tidak terlihat pada gel agarose dapat terdeteksi dengan jelas.

1. Rasio Kelimpahan Jenis Kelamin

Penghitungan rasio kelimpahan jenis kelamin diperoleh berdasarkan hasil identifikasi terhadap 50 sampel feses menggunakan primer ZFX/ZFY (Tabel 9).

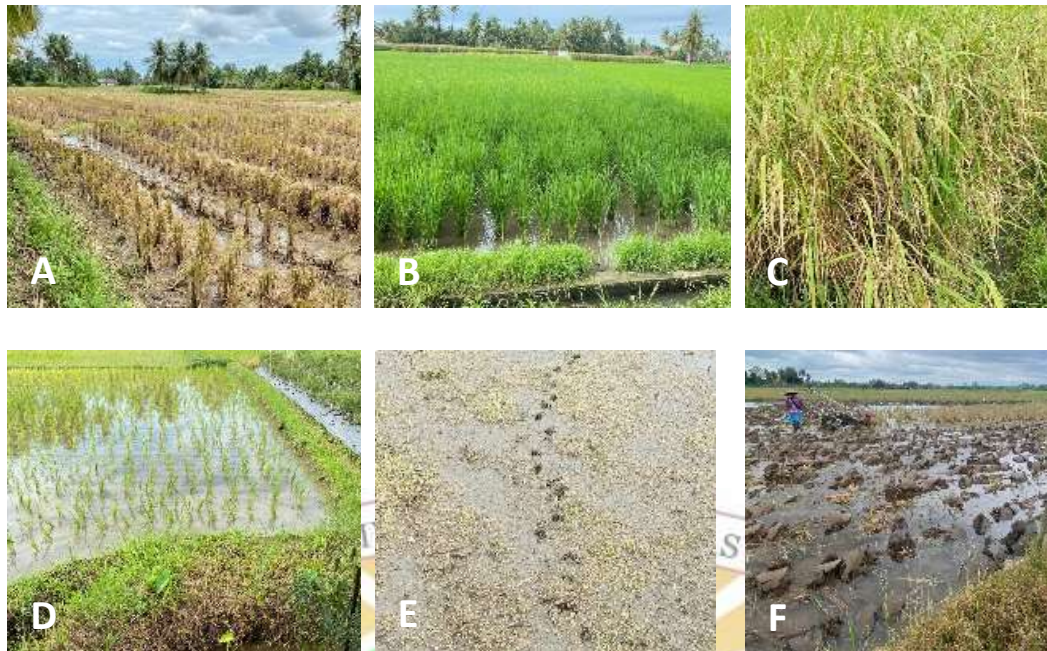
Tabel 9 . Data ukuran dan jumlah pita sampel DNA feses *Aonyx cinereous*

No.	Kode Sampel	Pita (bp)	Total	Jenis kelamin
1.	LA 33.1A	158, 190	2	Jantan
2.	LA 33.2A	191	1	Betina
3.	LA 33.3A	191	1	Betina
4.	LA 33.7A	204	1	Betina
5.	LA 22.1A	207	1	Betina
6.	LA 22.2A	200	1	Betina
7.	LA 22.3A	207	1	Betina
8.	LA 35.1A.15	208	1	Betina
9.	LA 35.2B.15	210	1	Betina
10.	LA 04.1A	209	1	Betina
11.	LA 04.3A	205	1	Betina
12.	LA 04.4A	205	1	Betina
13.	LA 04.5B	207	1	Betina
14.	LA 04.6A	204	1	Betina
15.	LA 53.1A	191	1	Betina
16.	LA 53.2A	190	1	Betina
17.	LA 53.3A	191	1	Betina
18.	LA 35.1B.14	191	1	Betina
19.	LA 35.2B.14	191	1	Betina
20.	LA 36.1A	191	1	Betina
21.	LA 36.1B	130, 190	2	Jantan
22.	LA 36.1C	193	1	Betina
23.	LA 33.1	189	1	Betina
24.	LA 33.3	158, 190	2	Jantan
25.	LA 32.1	159, 190	2	Jantan
26.	LA 32.2	192	1	Betina
27.	LA 33.4	188	1	Betina
28.	LA 4.1	189	1	Betina
29.	LA 52.1.02	189	1	Betina
30.	LA 52.2.02	192	1	Betina
31.	LA 02.1A	202	1	Betina
32.	LA 36.2A	201	1	Betina
33.	LA 36.3A	204	1	Betina
34.	LA 36.4A	200	1	Betina
35.	LA 36.5A	202	1	Betina
36.	LA 36.6A	205	1	Betina
37.	LA 37.2A	202	1	Betina
38.	LA 44.1A	203	1	Betina
39.	LA 44.2A	200	1	Betina
40.	LA 45.1A	203	1	Betina
41.	LA 33.4A	199	1	Betina
42.	LA 33.5A	199	1	Betina
43.	LA 33.6A	201	1	Betina
44.	LA 33.8A	199	1	Betina
45.	LA 37.1A	198	1	Betina
46.	LA 37.3A	199	1	Betina
47.	LA 37.4A	199	1	Betina
48.	LA 35.3A.15	200	1	Betina
49.	LA 36.1A	203	1	Betina
50.	LA 04.2A	201	1	Betina
51.	O.PBG (kontrol betina)	202	1	Betina
52.	O.PSM (kontrol jantan)	164, 202	2	Jantan

Keterangan : warna merah merupakan sampel yang teridentifikasi jantan

Dari penelitian yang telah dilakukan ini, diperoleh sebanyak 46 sampel feses teridentifikasi betina dan 4 sampel feses jantan, dengan demikian rasio kelimpahan antar jantan dan betina pada penelitian ini adalah 11.5 : 1. Hasil identifikasi menunjukkan ada perbedaan yang signifikan antara rasio sampel betina dan jantan (11.5 :1). Menurut Smith (2006) penanda yang terhubung dengan kromosom seks (ZFX/ZFY) digunakan untuk memperkirakan rasio jenis kelamin dalam suatu populasi. Penelitian ini mengidentifikasi jenis kelamin berdasarkan sampel feses sehingga rasio kelimpahan yang didapatkan belum mewakili jumlah rasio individu di habitat alaminya.

Habitat persawahan di Lubuk Alung, Sumatra Barat, menyediakan berbagai sumber pakan bagi *Aonyx cinereus*, seperti ikan kecil yang ditemukan di saluran irigasi, keong sawah, dan kepiting. Kegiatan budidaya padi yang berlangsung tidak serempak antarpetak menyebabkan kondisi persawahan selalu terdiri atas berbagai fase budidaya, mulai dari persemaian, penanaman, fase vegetatif dan generatif, hingga pascapanen (Gambar 11). Ketidakterserempakan tersebut memungkinkan sebagian petak tetap memiliki genangan air dan menyediakan sumber pakan ketika petak lainnya memasuki masa panen. Kondisi ini berpotensi mempertahankan ketersediaan sumber pakan dan habitat bagi *A. cinereus* sepanjang periode budidaya padi.



Gambar 11. Fase pertumbuhan dan kondisi lahan persawahan Lubuk Alung, Sumatera Barat, A. Pascapanen, B. Fase vegetatif, C. Fase generatif, D. Fase awal tanam, E. Fase persemaian, F. Fase pembajakan sawah (Dokumentasi pribadi)

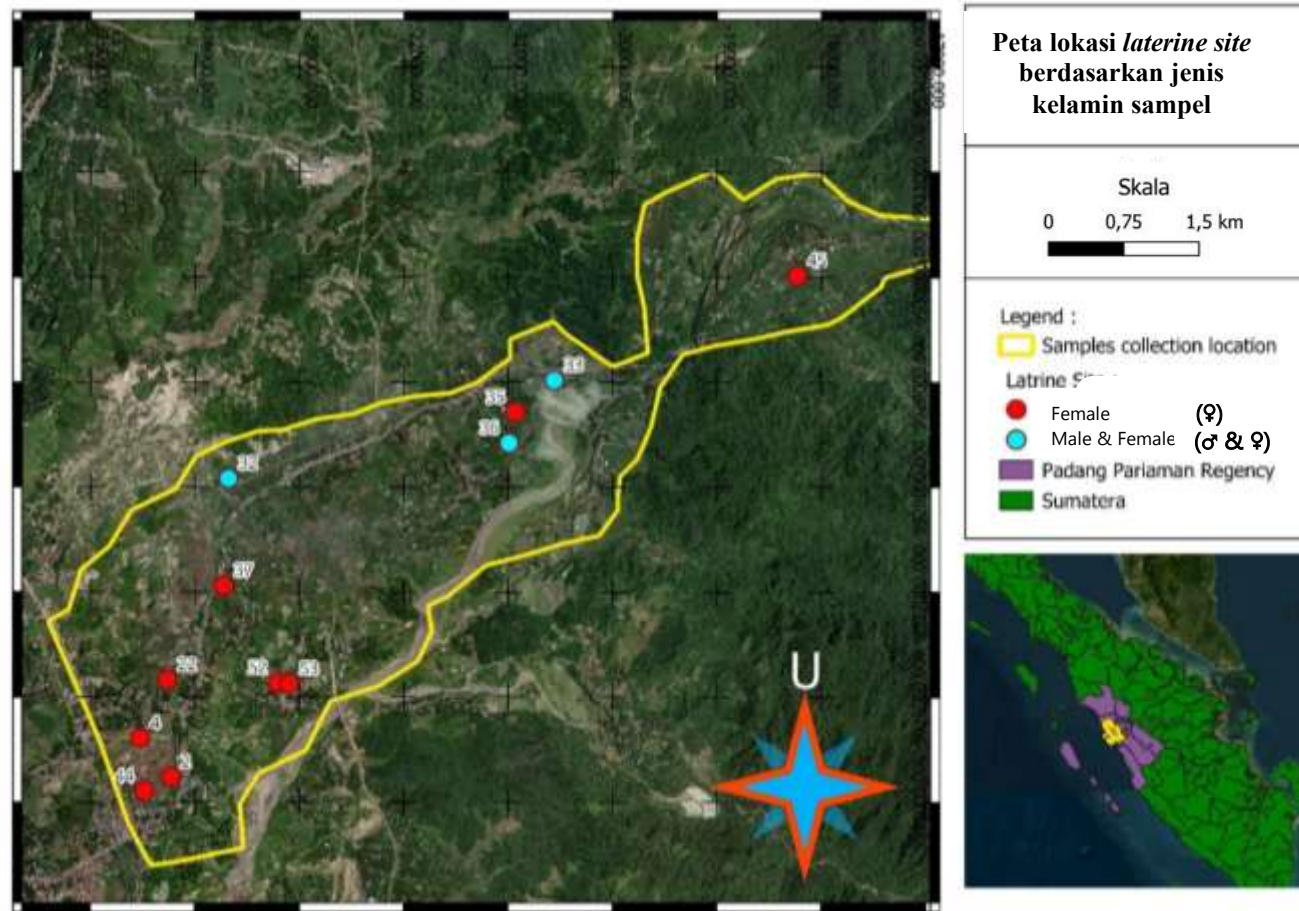
Hal ini menjawab persoalan banyaknya ditemukan feses dari jenis kelamin betina yang cenderung menetap di area asal (dekat sarang) dan memiliki kelimpahan banyak makanan. Ketidakseimbangan jumlah kelimpahan sampel betina dan jantan ini dapat dijelaskan dengan mengacu pada Quaglietta (2013) yang menyatakan bahwa jantan lebih cenderung berpindah tempat, (dengan jarak antara 11-25 km), sementara betina menunjukkan philopatri, tetap tinggal di dekat area asalnya. Dengan demikian, pada habitat alamnya lebih banyak ditemukan betina daripada jantan (Gambar 12).

Penelitian lain yang menemukan ketidakseimbangan rasio kelimpahan jantan dan betina dilaporkan oleh Aristizábal (2025) pada sampel feses 40 individu *Lontra longicaudis annectens*. Dilaporkan bahwa rasio kelimpahan betina dan jantan yang diperoleh yaitu 22 betina dan 18 jantan, sehingga rasio betina terhadap

jantan 2:1.4. Hasil tersebut menunjukkan adanya pola *sex-biased ratio* dan perbedaan perilaku ruang antara jenis kelamin, informasi yang penting untuk memahami dinamika populasi dan strategi konservasi spesies ini.

Secara keseluruhan hasil penelitian ini berpotensi mengalami bias yang disebabkan karena individu yang sama dapat saja meninggalkan beberapa feses di lokasi yang berbeda. Oleh karena itu, jumlah total sampel feses belum tentu mencerminkan jumlah individu di lapangan, sehingga diperlukan metode lanjutan untuk membedakan individu.





Gambar 12. Peta *laterine site* sampel berdasarkan jenis kelamin sampel di Persawahan Lubuk Alung, Sumatera Barat