

**IDENTIFIKASI VARIASI GENETIK BERDASARKAN GEN D-LOOP  
PADA RUSA TIMOR (*Rusa timorensis*) DARI JAWA TIMUR DAN BALI**

**TUGAS AKHIR SKRIPSI**

Diajukan kepada  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta  
untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan Guna Memperoleh Gelar Sarjana Sains



Oleh:

M. Hafizhul Iman

18308144006

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
JURUSAN PENDIDIKAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA**

**2022**

## Identifikasi Variasi Genetik Berdasarkan Gen D-Loop pada Rusa Timor (*Rusa Timorensis*) dari Jawa Timur dan Bali

Oleh :

M. Hafizhul Iman  
NIM. 18308144006

### ABSTRAK

Saat ini, populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) dilaporkan cenderung mengalami penurunan, menurunnya populasi rusa timor diakibatkan oleh perburuan liar dan perusakan habitat. Di sisi lain, rusa timor (*Rusa timorensis*) memiliki potensi yang besar sebagai alternatif sumber protein hewani dan sumber daya genetik di Indonesia. Rusa dimanfaatkan dagingnya sebagai sumber pangan telah banyak dilakukan di berbagai daerah persebaran rusa, Namun sayangnya untuk memenuhi kebutuhan tersebut masyarakat pada umumnya hanya mengandalkan dari hasil berburu dan mengambil dari alam. Maka dari itu, dibutuhkan manajemen konservasi yang tepat untuk menjaga kelestarian rusa timor di habitatnya. Manajemen konservasi yang efektif dapat diupayakan dengan mempelajari latar belakang genetik spesies yang terancam. Penelitian ini dilakukan untuk berkontribusi terhadap penentuan manajemen konservasi yang komprehensif.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat variasi genetik D-Loop mtDNA pada populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo. Analisis variasi genetik D-Loop (*displacement loop*) DNA mitokondria ini dilakukan menggunakan sampel noninvasif berupa feses yang diperoleh dari kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo. Sebanyak 20 sampel berhasil diekstraksi dan diamplifikasi dengan proses PCR. Sebanyak  $\pm 1200$  bp berhasil dibaca menggunakan mesin sanger sequencer. Namun hanya 769 bp yang berhasil dibaca jelas dan disejajarkan menggunakan *software* BioEdit versi 7.2.5 kemudian digunakan untuk proses analisis. Analisis keragaman nukleotida ( $\pi$ ), keragaman haplotipe (Hd) menggunakan *software* DnaSP versi 6.12.03, dan rekonstruksi pohon filogeografi dan estimasi jarak genetik dilakukan menggunakan *software* MEGA-X versi 10.2.5. Dari 20 sampel yang dianalisis, haplotipe yang berhasil ditemukan sebanyak 11 haplotip dan terdapat 30 situs polimorfisme.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi genetik D-Loop mtDNA pada populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo masih tergolong tinggi dengan nilai keragaman haplotip (Hd) sebesar 0.88421 dan keragaman nukleotida ( $\pi$ ) sebesar 0.00588. Keragaman haplotip (Hd) tertinggi ditemukan di kawasan Taman Nasional Alas Purwo dengan Hd = 0.83333, sedangkan keragaman nukleotida tertinggi ditemukan di kawasan Taman Nasional Baluran dengan  $\pi = 0.00950$ . Hal tersebut mengindikasikan bahwa keragaman genetik masih cukup tinggi dan adanya aliran gen.

**Kata kunci :** *D-loop, rusa timor, Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo.*

## Identification of Genetic Variations Based on the D-Loop Gene in Timor Deer (*Rusa Timorensis*) from East Java and Bali

By:

M. Hafizhul Iman  
NIM. 18308144006

### ABSTRACT

Currently, the population of Timor deer (*Rusa timorensis*) is reported to tend to decrease, the decline in the population of Timor deer is caused by illegal hunting and habitat destruction. On the other hand, Timor deer (*Rusa timorensis*) has great potential as an alternative source of animal protein and genetic resources in Indonesia. The use of deer meat as a food source has been widely carried out in various areas of deer distribution, but unfortunately to meet these needs, people in general only rely on hunting and taking from nature. Therefore, proper conservation management is needed to preserve the Timor deer in their habitat. Effective conservation strategies and management can be pursued by studying the genetic background of threatened species. This research was conducted to contribute to the determination of comprehensive conservation management. This information on the genetic diversity of the Timor deer is also expected to be a base line for comparing genetic diversity in the wild and genetic diversity in captivity.

This study aims to determine the level of genetic variation of D-Loop mtDNA in the population of Timor deer (*Rusa timorensis*) in the West Bali, Baluran, and Alas Purwo National Parks. The analysis of D-Loop genetic variation (displacement loop) of mitochondrial DNA was carried out using non-invasive samples in the form of feces obtained from the West Bali, Baluran, and Alas Purwo National Parks. A total of 20 samples were successfully extracted and amplified by the PCR process. A total of  $\pm 1200$  bp was successfully read using a sanger sequencer machine. However, only 769 bp were read clearly and aligned using BioEdit software version 7.2.5 and then used for the analysis process. Analysis of nucleotide diversity ( $\pi$ ), haplotype diversity (Hd) using DnaSP software version 6.12.03, and phylogeographic tree reconstruction and genetic distance estimation were performed using MEGA-X software version 10.2.5. Of the 20 samples analyzed, 11 haplotypes were found and there were 30 polymorphism sites.

The results showed that the genetic variation of D-Loop mtDNA in the timor deer population (*Rusa timorensis*) in the West Bali, Baluran, and Alas Purwo National Parks was still relatively high with a haplotype diversity value (Hd) of 0.88421 and a nucleotide diversity ( $\pi$ ) of 0.00588. The highest haplotype diversity (Hd) was found in the Alas Purwo National Park with Hd = 0.83333, while the highest nucleotide diversity was found in the Baluran National Park with = 0.00950. This indicates that genetic diversity is still quite high and there is gene flow.

**Keywords:** *D-loop, Timor deer, West Bali, Baluran, and Alas Purwo National Park.*

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini, saya :

Nama : M. Hafizhul Iman

NIM : 18308144006

Prodi : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Judul : Identifikasi Variasi Genetik Berdasarkan Gen D-Loop pada Rusa Timor (*Rusa timorensis*) dari Jawa Timur dan Bali

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar karya sendiri, di bawah tema penelitian payung dosen atas nama Dr. Sena Adi Subrata, S.Hut., M.Sc., Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada Tahun 2022.

Dan sepanjang sepengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata cara penulisan karya tulis ilmiah yang lazim.

Yogyakarta, 8 September 2022

Yang menyatakan,



M. Hafizhul Iman  
NIM. 18308144006

**HALAMAN PERSETUJUAN**

Tugas Akhir Skripsi dengan Judul

**Identifikasi Variasi Genetik Berdasarkan Gen D-Loop pada Rusa Timor**

**(*Rusa timorensis*) dari Jawa Timur dan Bali**

Disusun oleh :

M. Hafizhul Iman

NIM. 18308144006

Telah memenuhi syarat dan disetujui oleh Dosen Pembimbing untuk dilaksanakan

Ujian Tugas Akhir Skripsi bagi yang bersangkutan.

Yogyakarta, 8 September 2022

Mengetahui,

Disetujui,

Ketua Program Studi

Dosen Pembimbing



Dr. drh. Heru Nurcahyo, M. Kes.

Paramita C. K., S.P., M.Sc., Ph.D.

NIP. 19620414 198803 1 003

NIP. 19781022 201012 2 001

## HALAMAN PENGESAHAN

Tugas Akhir Skripsi

### IDENTIFIKASI VARIASI GENETIK BERDASARKAN GEN D-LOOP PADA RUSA TIMOR (*Rusa timorensis*) DARI JAWA TIMUR DAN BALI

Disusun oleh :


M. Hafizhul Iman  
NIM. 18308144006

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji Tugas Akhir Skripsi Program Studi  
Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Yogyakarta  
Pada Tanggal 20 September 2022

#### TIM PENGUJI

Nama/Jabatan	Tanda Tangan	Tanggal
Paramita C. K., S.P., M.Sc., Ph.D. Ketua Penguji		21 September 2022
Dr. Evy Yulianti, S.Si., M.Sc. Penguji I		21 September 2022
Dr. Sena Adi Subrata, S.Hut., M.Sc. Penguji II		21 September 2022

Yogyakarta, 22 September 2022  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Yogyakarta  
Dekan,



Prof. Dr. Ariswan, M.Si.  
NIP. 195909141988031003

## MOTTO

مَنْ أَرَادَ الدُّنْيَا فَعَلَيْهِ بِالْعِلْمِ وَمَنْ أَرَادَ الْآخِرَةَ فَعَلَيْهِ بِالْعِلْمِ وَمَنْ أَرَادَهُمَا فَعَلَيْهِ بِالْعِلْمِ

“Siapapun yang menghendaki (keberhasilan ) dunia maka ia harus berilmu, Siapapun yang menghendaki (keberuntungan) akhirat, ia pun harus berilmu, dan siapapun yang menghendaki keduanya, tentu ia harus berilmu”

**-Nabi Muhammad SAW-**

Orang yang benar-benar hebat dalam sejarah tidak pernah ingin menjadi hebat untuk diri mereka sendiri. Yang mereka inginkan hanyalah kesempatan untuk berbuat baik bagi orang lain dan dekat dengan Tuhan

**-Muhammad Ali-**

Jangan lelah mencoba. Tidak ada jaminan kesuksesan, tetapi memilih untuk tidak mencoba adalah jaminan kegagalan

**-BJ Habibie-**

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan rasa syukur ke hadirat Allah SWT dan sholawat kepada Nabi Muhammad SAW, karya tulis ini penulis persembahkan kepada :

- ❖ Abah Saeroji & Mama Sofuroh selaku orang tua penulis, budhe Masrukhatun dan seluruh keluarga penulis yang telah mendukung semua usaha dalam menyelesaikan Tugas Akhir Skripsi ini.
- ❖ Bapak Dr. Sena Adi Subrata, S.Hut., M.Sc. selaku kepala tim penelitian rusa timor yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk ikut serta dalam penelitian.
- ❖ Ibu Paramita Cahyaningrum Kuswandi, S.P., M.Sc., Ph.D. selaku pembimbing Tugas Akhir Skripsi yang telah banyak memberikan semangat, motivasi, dorongan, dan bimbingan selama penyusunan Tugas Akhir Skripsi ini.
- ❖ Ibu Nur Aeni Ariyanti, SP., MP., M.Agr., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memberikan bantuan, nasihat, dan semangat sepanjang perkuliahan di Program Studi Biologi FMIPA UNY.
- ❖ Bapak Tatag Bagus Putra Prakarsa, S.Si., M.Sc. selaku fasilitator antara penulis dan tim penelitian rusa timor yang telah mempromosikan penulis untuk masuk ke dalam tim penelitian tersebut.
- ❖ Ibu drh. Diana Indrasanti, M.Biotech., Woro Laras, S.Hut., Luthfia Dwi Rachmawati S.Si. & Titan Dwikama S. Si., selaku anggota tim peneliti rusa timor dan rekan selama di laboratorium yang selalu membantu dan mendukung penyusunan Tugas Akhir Skripsi ini.



- ❖ Mutiara Nurul Azkia selaku support system utama penulis dalam mengerjakan Tugas Akhir Skripsi ini yang selalu memberikan semangat dan membantu dalam segi pikiran juga tenaga. Semoga Allah selalu memberikan kebahagiaan selalu untuknya.
- ❖ Keluarga besar Biologi E 2018 yang selalu bersama-sama dalam suka dan duka selama perkuliahan. Terima kasih untuk kenangan, pengalaman, dan perjalanan indah selama perkuliahan.
- ❖ Almamater Universitas Negeri Yogyakarta yang telah memberikan kesempatan untuk berada sampai tahap ini.
- ❖ Universitas Gadjah Mada yang telah berkenan menyediakan tempat belajar dan menyusun Tugas Akhir Skripsi ini.
- ❖ Pembaca yang senantiasa membuka cakrawala, tanpa kalian karya ini hanyalah seongkok kertas tak bermakna.

Terima kasih semuanya, kalian adalah salah satu sejarah terpenting dalam perjalanan hidup penulis.

## KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

اللَّهُمَّ صَلِّ وَسَلِّمْ وَبَارِكْ عَلَى سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ الْفَاتِحِ لِمَا أُغْلِقَ وَالْحَاتِمِ لِمَا سَبَقَ وَالتَّائِصِرِ الْحَقِّ بِالْحَقِّ  
وَالهَادِي إِلَى صِرَاطٍ مُسْتَقِيمٍ، صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَعَلَى آلِهِ وَأَصْحَابِهِ حَقَّ قَدْرِهِ وَمِقْدَارِهِ الْعَظِيمِ.

اللَّهُمَّ صَلِّ وَسَلِّمْ عَلَى سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ مِفْتَاحِ بَابِ رَحْمَةِ اللَّهِ، عَدَدَ مَا فِي عِلْمِ اللَّهِ،

صَلَاةً وَسَلَامًا دَائِمِينَ بِدَوَامِ مُلْكِ اللَّهِ، وَعَلَى آلِهِ وَصَحْبِهِ وَمَنْ وَآلِهِ.

اللَّهُمَّ صَلِّ عَلَى سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ وَآلِهِ، اللَّهُمَّ صَلِّ عَلَى سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ وَعَلَى آلِهِ.

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, yang telah memberikan rahmat serta hidayah-Nya, sehingga pada kesempatan ini penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir Skripsi tepat pada waktunya. Tidak lupa pula sholawat serta salam selalu diarturkan kepada junjungan Nabi Agung Muhammad SAW. Tugas Akhir Skripsi yang berjudul “ **Identifikasi Variasi Genetik Berdasarkan Gen D-Loop pada Rusa Timor (*Rusa timorensis*) dari Jawa Timur dan Bali** ” disusun guna memenuhi sebagian persyaratan untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains. Tugas Akhir Skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik tidak lepas dari bantuan dan kerja sama dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu tersusunnya laporan ini.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Dr. Sena Adi Subrata, S.Hut., M.Sc. selaku kepala tim penelitian rusa timor yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk ikut serta dalam penelitian.

2. Ibu Paramita Cahyaningrum Kuswandi, S.P., M.Sc., Ph.D. selaku pembimbing Tugas Akhir Skripsi yang telah banyak memberikan semangat, motivasi, dorongan, dan bimbingan selama penyusunan Tugas Akhir Skripsi ini.
3. Ibu Dr. Evy Yulianti, S.Si., M.Sc dan Bapak Dr. Sena Adi Subrata, S.Hut., M.Sc. selaku dosen penguji yang banyak memberikan masukan untuk kesempurnaan skripsi penulis.
4. Bapak Prof. Dr. Ariswan, M. Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang memberikan persetujuan pelaksanaan Tugas Akhir Skripsi.
5. Bapak Dr. drh. Heru Nurcahyo, M. Kes. selaku Ketua Jurusan Pendidikan Biologi dan Koordinator Program Studi Biologi yang telah memberikan bantuan dan fasilitas selama proses penyusunan praproposal sampai dengan selesainya Tugas Akhir Skripsi ini.
6. Ibu Nur Aeni Ariyanti, SP., MP., M.Agr., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memberikan nasihat dan semangat sepanjang perkuliahan di Program Studi Biologi FMIPA UNY.
7. Bapak Tatag Bagus Putra Prakarsa, S.Si., M.Sc. selaku fasilitator antara penulis dan tim penelitian rusa timor yang telah mempromosikan penulis untuk masuk ke dalam tim penelitian tersebut.
8. Ibu drh. Diana Indrasanti, M.Biotech., Woro Laras, S.Hut., Titan Dwikama S. Si., & Luthfia Dwi Rachmawati S.Si. selaku tim peneliti rusa timor dan rekan selama di laboratorium yang selalu membantu dan mendukung penulis.

9. Abah Saeroji & Mama Sofuroh selaku orang tua penulis, budhe Masrukhatun dan seluruh keluarga penulis yang telah mendukung semua usaha dalam menyelesaikan Tugas Akhir Skripsi ini.
10. Mutiara Nurul Azkia selaku *support system* utama penulis dalam mengerjakan Tugas Akhir Skripsi ini yang selalu memberikan semangat dan membantu dalam segi pikiran juga tenaga. Semoga Allah selalu memberikan kebahagiaan selalu untuknya.
11. Semua pihak, secara langsung maupun tidak langsung, yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu dalam kelancaran praktik kerja lapangan ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga dukungan, bantuan, bimbingan, dan kebaikan yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Penulis berharap semoga Tugas Akhir Skripsi ini bermanfaat untuk diri sendiri dan para pembaca.

Yogyakarta, 6 Agustus 2022

Penulis,



M. Hafizhul Iman

NIM. 1830814406

## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL .....	i
ABSTRAK .....	ii
ABSTRACT .....	iii
SURAT PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
MOTTO.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	viii
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang .....	1
B. Identifikasi Masalah.....	5
C. Batasan Masalah.....	5
D. Rumusan Masalah .....	5
E. Tujuan Penelitian .....	6
F. Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II KAJIAN PUSTAKA .....</b>	<b>7</b>
A. Tinjauan Pustaka .....	7
1. Rusa Timor ( <i>Rusa timorensis</i> ).....	7
2. Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo .....	12
3. Analisis Genetika Populasi.....	18
4. Teknik Biologi Molekuler .....	29
B. Kerangka Berfikir.....	36
C. Hipotesis.....	36
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>37</b>
A. Desain Penelitian.....	37
B. Waktu dan Tempat Penelitian .....	37
C. Populasi dan Sampel Penelitian .....	38
D. Variabel Penelitian .....	38
E. Alat dan Bahan.....	38
F. Langkah Penelitian.....	39

G. Teknik Pengambilan Data.....	47
H. Teknik Analisis Data.....	48
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>50</b>
A. Ekstraksi dan kuantifikasi DNA.....	50
B. Amplifikasi DNA dengan metode PCR.....	54
C. Pembacaan urutan nukleotida melalui sekuensing.....	58
D. Analisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dan SNPs (Single Nucleotide Polymorphisme).....	60
E. Tingkat variasi genetik dan distribusi variasi genetik di dalam populasi.....	65
F. Analisis filogeografi dan estimasi jarak genetik.....	68
<b>BAB V SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>72</b>
A. Simpulan .....	72
B. Saran.....	72
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>73</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>81</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Rusa timor ( <i>Rusa timorensis</i> ) jantan di kawasan pantai Taman Nasional Bali Barat .....	7
Gambar 2. Persebaran populasi rusa timor ( <i>Rusa timorensis</i> ) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo .....	16
Gambar 3. Struktur mtDNA Mamalia & Posisi D-Loop .....	23
Gambar 4. Skema D-Loop mtDNA pada Mamalia.....	27
Gambar 5. Skema Kerangka Berpikir .....	36
Gambar 6. Prinsip kerja ekstraksi DNA menggunakan Qiagen® DNeasy Power Soil Pro Kit .....	42
Gambar 7. Peta lokasi pengambilan sampel .....	50
Gambar 8. Visualisasi hasil amplifikasi DNA .....	55
Gambar 9. Letak polimorfisme pada setiap haplotip .....	64
Gambar 10. Rekonstruksi pohon filogeografi rusa timor.....	69
Gambar 11. Estimasi jarak genetik .....	70

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kode Pengelompokan Sampel Feses Rusa Timor .....	40
Tabel 2. Komposisi Untuk PCR.....	45
Tabel 3. Hasil BLAST gen D-Loop .....	61
Tabel 4. Persebaran haplotipe gen D-Loop mtDNA rusa timor hasil analisis .....	63
Tabel 5. Keragaman genetik berdasarkan gen D-Loop mtDNA rusa timor ( <i>Rusa timorensis</i> ) di Jawa dan Bali .....	65



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel hasil ekstraksi sampel feses rusa timor.....	81
Lampiran 2. Hasil sekuensing menggunakan mesin sanger sekuenser .....	87
Lampiran 3. Hasil multiple allignment atau pensejajaran 20 sampel terhadap sekuens rusa timor ( <i>Rusa timorensis</i> ) dari NCBI (AF291883) .....	95
Lampiran 4. Tabel letak SNPs (Single Nucleotide Polymorphisme) per sampel dengan data dari NCBI (AF291883).....	99
Lampiran 5. Pohon Filogeografi antar haplotip <i>Rusa timorensis</i> dan data dari NCBI (AF291883) serta dibandingkan dengan out grup <i>Rusa nippon</i> dan <i>Rusa unicolor</i> .....	100
Lampiran 6. Foto Kegiatan Penelitian .....	101

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Rusa timor (*Rusa timorensis*) merupakan salah satu hewan ruminansia yang terdapat di Indonesia. Rusa ini memiliki potensi besar sebagai alternatif sumber protein hewani dan sumber daya genetik di Indonesia (Maha *et al.*, 2021; Zein *et al.*, 1998). Pemanfaatan daging rusa sebagai sumber pangan telah banyak dilakukan di berbagai daerah persebaran rusa, seperti di daerah Papua, Bengkulu, Lampung Barat, dan Aceh (Antara, 2020; Pattiselanno *et al.*, 2013; Wahyudi, 2017; Wibisono, 2010). Namun sayangnya, untuk memenuhi kebutuhan tersebut hanya mengandalkan dari hasil berburu dan mengambil dari alam (Wirdateti, 2012). Selain itu, habitat rusa timor juga dilaporkan mengalami penyusutan akibat konversi hutan menjadi lahan pertanian serta adanya tekanan pertumbuhan penduduk yang lambat laun semakin besar sehingga menggeser habitat rusa timor (Santosa *et al.*, 2008). Perburuan dan perusakan habitat yang dilakukan secara terus menerus justru akan menyebabkan penurunan populasi dan penurunan kualitas genetik rusa di alam liar serta akan menghilangkan keanekaragaman hayati (Wirdateti, 2012).

Saat ini, populasi rusa timor dilaporkan cenderung mengalami penurunan terutama di daerah persebaran aslinya yaitu di pulau Jawa dan Bali (IUCN, 2015), sebagaimana tercantum dalam lampiran Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia nomor P.20/MENLHK/SETJEN/KUM.1/6/2018 tentang Penetapan Jenis Tumbuhan dan Satwa yang dilindungi. Demikian pula

*Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) mengklasifikasikan *Rusa timorensis* dalam daftar rentan atau *vulnerable* (Hedges, S. *et al.*, 2014). Menurunnya populasi rusa timor diakibatkan oleh perburuan liar dan perusakan habitat. Oleh karena itu, keberhasilan dalam memelihara populasi rusa ini sangat bergantung pada manajemen konservasi (Sutrisno, 1993).

Strategi dan manajemen konservasi yang efektif dapat diupayakan dengan mempelajari latar belakang genetik spesies yang terancam. Dengan mempelajari latar belakang genetik spesies yang terancam misalnya mempelajari variasi genetiknya maka ditentukan bagaimana langkah selanjutnya untuk menurunkan risiko kepunahan spesies tersebut. Misalnya di kawasan konservasi *in situ* ditemukannya variasi genetik yang rendah maka dapat dilakukan mitigasi berupa perlindungan satwa dari perburuan liar oleh pihak konservasi dan juga penjagaan terhadap habitat satwa yang variasi genetiknya rendah, hal tersebut dilakukan agar tidak terjadi penurunan populasi yang dapat menyebabkan punahnya satwa tersebut. Beberapa tahun terakhir, sudah banyak penanda genetik yang telah dikembangkan untuk mengatasi masalah pelestarian sumber daya genetik spesies yang terancam punah. Beberapa penanda genetik, termasuk daerah kontrol atau *control region* DNA mitokondria telah terbukti berhasil dalam mempelajari variasi genetik antar spesies, hal tersebut dikarenakan *control region* memiliki susunan genetik yang sangat bervariasi dan terjadi banyak mutasi (Wirdateti, 2012).

Manajemen konservasi pada dasarnya mempunyai tujuan untuk menjaga populasi yang masih *viable* atau mampu untuk bertahan hidup dan masih dapat berfungsi secara baik dalam ekologi, salah satu komponen terpenting untuk

memperkirakan kemampuan bertahan hidup dari suatu populasi adalah variasi genetik (Ahlering *et al.*, 2011) Semakin tinggi variasi genetik maka semakin tinggi pula kemampuan bertahan hidup suatu spesies karena menyediakan pilihan untuk terjadinya evolusi, sehingga yang dapat bertahan dan beradaptasi itulah yang akan bisa tetap bertahan hidup. Begitu pula sebaliknya, jika variasi genetik rendah maka peluang untuk bertahan hidup menjadi lebih rendah, hal tersebut dikarenakan ketika terdapat suatu penyakit yang menyerang ataupun terjadinya tekanan lingkungan dan spesies tersebut tidak dapat beradaptasi sehingga tidak akan mampu untuk bertahan hidup. Oleh karena itu, analisis terhadap keragaman genetik rusa timor di Jawa Timur dan Bali sangat diperlukan, karena wilayah tersebut merupakan wilayah asal rusa timor itu sendiri (IUCN, 2015).

Selain itu, distribusi keragaman genetik juga dibutuhkan karena data tersebut bisa menunjukkan pola distribusi spasial satwa liar (Savira, 2012). Informasi keragaman genetik rusa timor ini juga diharapkan menjadi *base line* untuk membandingkan antara keragaman genetik di alam liar dan keragaman genetik di penangkaran. Karena upaya penangkaran rusa timor itu sendiri merupakan salah satu upaya untuk menghindari kepunahan rusa timor (Tandirerung, 2020).

Permasalahan perburuan dan perusakan habitat rusa timor ini juga dapat menjadikan rusa timor terperangkap di dalam populasi-populasi yang ukurannya kecil di alam liar. Hal tersebut memunculkan kekhawatiran akan penurunan variasi genetik rusa timor di dalam populasi yang berukuran kecil tersebut. Karena populasi yang memiliki ukuran kecil cenderung mempunyai variasi genetik yang rendah akibat dari peningkatan risiko *inbreeding* dan *genetic drift* (Archie *et al.*,

2011; Savira, 2012). Penurunan variasi genetik memiliki dampak negatif untuk viabilitas populasi dikarenakan dapat mengurangi kemampuan suatu individu dalam menghadapi ancaman seleksi alam misalnya akibat perubahan lingkungan. Kondisi yang demikian dapat meningkatkan risiko kepunahan pada generasi selanjutnya (Ahlering *et al.*, 2011; Frankham *et al.*, 2002).

Dalam pengambilan sampel, salah satu upaya yang dilakukan agar tidak menyakiti rusa timor adalah dengan memperoleh sampel menggunakan metode noninvasif. Teknik analisis molekuler dengan menggunakan sampel feses merupakan cara terbaik untuk menghindari pengambilan sampel secara langsung atau invasif. Sampel feses mengandung sel epitel usus pada bagian luarnya, dari sel epitel tersebut dapat diperoleh berbagai informasi penting untuk mencari asal keturunan, pola perkawinan, hubungan antar serta inter populasi, ataupun pola kekerabatan. Hal demikian juga dapat digunakan untuk studi analisis DNA baik untuk DNA mitokondria maupun DNA inti sebagai upaya *evolutionary significant unit* dan pengembangan manajemen konservasi (Nayasilana *et al.*, 2010).

DNA mitokondria (mtDNA) merupakan salah satu marka molekuler yang sering digunakan untuk sampel non-invasif, hal tersebut dikarenakan jumlah mtDNA lebih banyak dibandingkan DNA pada organel lain misalnya yaitu nukleus yang jumlah DNA-nya lebih sedikit dibandingkan mtDNA. Dalam analisis variasi genetik, DNA mitokondria yang sering digunakan adalah fragmen D-Loop. D-Loop DNA mitokondria telah terbukti berhasil digunakan dalam mempelajari variasi genetik, hal tersebut dikarenakan daerah ini memiliki susunan genetik yang sangat bervariasi dan terjadi banyak mutasi (Wirdateti, 2012).

## **B. Identifikasi Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan yang dapat teridentifikasi adalah sebagai berikut:

1. Terjadi penurunan jumlah Rusa timor (*Rusa timorensis*) di daerah persebaran aslinya (Jawa dan Bali)
2. Perburuan dan perusakan habitat menyebabkan penurunan populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) dan dikhawatirkan dapat mengurangi variasi genetiknya
3. Manajemen konservasi dengan melakukan analisis keragaman genetik perlu dilakukan sebagai upaya untuk mencegah penurunan populasi rusa timor (*Rusa timorensis*).

## **C. Batasan Masalah**

Penelitian ini terfokus pada variasi genetik populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di Jawa Timur dan Bali tepatnya yaitu di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo dengan melihat variasi sekuens dari D-Loop DNA mitokondria rusa timor (*Rusa timorensis*) yang diambil dari sampel feses.

## **D. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu ; Bagaimana tingkat variasi genetik D-Loop mtDNA pada populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo?

### **E. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat variasi genetik D-Loop mtDNA pada populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo.

### **F. Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai variasi genetik D-Loop mtDNA pada populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo yang dapat menjadi sumber informasi untuk menentukan manajemen konservasi rusa timor baik secara *in situ* maupun *ex situ*.

## BAB II

### KAJIAN PUSTAKA

#### A. Tinjauan Pustaka

##### 1. Rusa Timor (*Rusa timorensis*)



Gambar 1. Rusa timor (*Rusa timorensis*) jantan di kawasan pantai Taman Nasional Bali Barat  
(Sumber : Laporan Kinerja 2018 Ditjen KSDAE-KLHK, © Phillipe Ganz)

##### a. Klasifikasi

Rusa timor (*Rusa timorensis*) merupakan satwa endemik asli Indonesia yang tersebar di berbagai kawasan di Indonesia. Satwa ini memiliki nama ilmiah *Rusa timorensis* atau *Cervus timorensis* dan memiliki nama lokal Rusa Timor (Maryanto *et al.*, 2019). Adapun klasifikasi rusa timor (*Rusa timorensis*) menurut (Putri, 2021) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Phylum : Vertebrata



Sub Phylum	: Chordata
Class	: Mammalia
Ordo	: Artiodactyla
Family	: Cervidae
Genus	: Rusa
Spesies	: <i>Rusa timorensis</i>
Nama Indonesia	: Rusa Timor

Rusa timor (*Rusa timorensis*) memiliki beberapa subspecies berdasarkan daerah persebarannya (Bammel, 1949), yaitu :

- 1) *Rusa timorensis timorensis*, terdapat di Timor, Roti, Semau, Pulau Kambing, Alor, Pantar, Pulau Rusa.
- 2) *Rusa timorensis russa*, terdapat di Jawa dan Kalimantan (S.E. Borneo).
- 3) *Rusa timorensis renschi*, terdapat di Bali.
- 4) *Rusa timorensis florensiensis*, terdapat di Lombok, Sumbawa, Rinca, Komodo, Flores, Adonara, Solor dan Sumba.
- 5) *Rusa timorensis macassaricus*, terdapat di Sulawesi, Banggai, Selayar.
- 6) *Rusa timorensis jonga*, terdapat di Pulau Buton dan Pulau Muna.
- 7) *Rusa timorensis moluccensis*, terdapat di Ternate, Mareh, Moti, Halmahera, Bacan, Parapotan, Buru, Seram dan Ambon.
- 8) *Rusa timorensis laronesiotes*, terdapat di Pulau Peucang.

## b. Karakteristik

Secara umum rusa timor memiliki beberapa karakter morfologi yang khas. Pola warna rusa timor betina lebih cerah dibanding jantan, warna dasar pada rusa timor jantan adalah kuning kecokelatan yang terdapat pada seluruh area tubuhnya dan tidak memiliki corak tertentu, sedangkan pada rusa timor betina warna dasarnya yaitu coklat keabuan, terutama pada bagian ventral yaitu pada perut, kaki, bagian bawah leher, dan dagu (Maha *et al.*, 2021). Rusa timor dewasa mempunyai ukuran badan antara 195-210 cm dengan tinggi badan antara 91-110 cm serta berat badan sekitar 103-115 kg (Hunaepi & Firdaus, 2017). Secara statistik, rusa timor tidak mempunyai perbedaan ukuran panjang telinga, lebar telinga, serta panjang kaki belakang antara rusa timor jantan dan rusa timor betina (Tandirerung, 2020). Rusa timor jantan memiliki tanduk yang akan tumbuh pada saat umur 8 bulan. Pada saat dewasa, tanduk tersebut menjadi semakin sempurna dengan munculnya 3 ujung runcing (Hunaepi & Firdaus, 2017).

Apabila merasa terancam, rusa timor akan berdiri dengan tegang sambil menatap ke arah ancaman serta mengeluarkan suara lenguhan dan pada akhirnya melarikan diri (Silalahi, Samsudewa, Setiatin, & Ondho, 2021). Rusa timor merupakan satwa yang dapat aktif di malam hari (nokturnal) maupun di siang hari (diurnal), tergantung dengan kondisi habitatnya. Sebagaimana rusa pada umumnya, rusa timor termasuk hewan ruminansia yang menyukai dedaunan dan berbagai macam buah-buahan. Karakteristik reproduksi rusa timor bersifat poligamus, yaitu beberapa

betina akan dikawini oleh satu pejantan. Setiap tahunnya rusa timor betina dapat melahirkan satu ekor anak pada sekali musim (Hunaepi & Firdaus, 2017).

c. Habitat dan Distribusi Populasi

Secara umum, rusa timor (*Rusa timorensis*) dapat hidup di berbagai tipe habitat, diantaranya yaitu habitat hutan pantai, hutan mangrove, dan padang rumput. Pada habitat padang rumput dan hutan mangrove, rusa timor memperoleh kebutuhan pakannya. Sedangkan untuk memperoleh kebutuhan minumannya, rusa timor meminum air dari sungai dan kubangan air yang terdapat di kawasan habitat hutan mangrove, padang rumput, maupun hutan pantai (Rumakar, Puttileihalat, & Tuhumury, 2019). Rusa timor dapat beradaptasi mulai dari dataran rendah sampai dataran tinggi, tetapi jarang ditemukan pada ketinggian lebih dari 2500 mdpl (Kwatrina *et al.*, 2009).

Rusa timor (*Rusa timorensis*) adalah satwa endemik asli dari Indonesia. Menurut Bammel (1949), rusa timor berasal dari pulau Jawa, Malaka, dan Kepulauan Sunda Kecil. Akan tetapi para ahli yang lain mengatakan bahwa rusa timor ini hanya berasal dari pulau Jawa dan Bali (IUCN, 2015). Kemudian dalam perkembangannya, rusa timor tersebar ke berbagai wilayah di Indonesia, yaitu di Papua, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, dan beberapa pulau kecil di Indonesia bagian timur (Maryanto *et al.*, 2019). Selain tersebar di berbagai wilayah Indonesia, rusa timor juga tersebar ke berbagai negara lain, yaitu Australia (1868-1912), Brasil (akhir

abad ke 19), Kep. Komoro (1870) di Afrika, Mandagascar (1928), Selandia Baru (1907, lewat negara Kaledonia Baru), Mauritius (1639), Kaledonia Baru (1870), Kepulauan Reunion (abad 17), Papua New Guinea (1900), Malaysia (1985) dan Thailand (1990). Persebaran dan pengiriman ke luar negeri ini dilakukan pada zaman penjajahan Belanda (Semiadi & Nugraha, 2004).

#### d. Struktur Sosial

Menurut Samsudewa & Susanti (2006), Rusa timor dapat dijumpai hidup berkelompok dengan setiap kelompoknya terdiri dari 5-6 individu. Sementara itu, menurut Kwatrina *et al.* (2009) rusa timor dapat dijumpai pada kelompok yang jumlahnya dapat mencapai 25 individu. Terkadang rusa timor juga dapat dijumpai dalam kelompok besar yaitu di padang penggembalaan dengan jumlah individu sekitar 75-100 ekor (Megumi, 2019).

Dalam melakukan aktivitas sehari-hari secara berkelompok yang paling mendominasi adalah rusa timor dewasa sedangkan dalam melakukan aktivitasnya secara soliter adalah rusa timor yang masih muda. (Rumakar *et al.*, 2019). Rusa timor jantan dan betina umumnya hidup terpisah dalam kelompok tertentu, kecuali pada saat musim kawin. Rusa timor jantan menjadi lebih agresif dan menghiasi tanduknya dengan daun dan cabang untuk menarik perhatian betina dan mengintimidasi jantan lain pada saat musim kawin berlangsung (Reyes, 2002).

Struktur sosial rusa sangat menentukan usia reproduksi awal

mereka. Dalam kawanan besar, rusa timor betina muda (usia 1-2 tahun) harus dipisahkan dari betina yang lebih tua ketika musim kawin. Hal ini karena kondisi fisik induk betina yang sedang berkembang biak dapat memburuk selama musim kawin karena persaingan dengan induk betina yang lebih tua (Basuni, 1989).

e. Status Konservasi

Rusa timor (*Rusa timorensis*) merupakan salah satu hewan yang dilindungi di Indonesia sesuai dengan Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia Nomor 106 Tahun 2018. Hal tersebut didasarkan pada kategori daftar merah International Union for Conservation of Nature (IUCN Red List) sejak 2008, rusa timor (*Rusa timorensis*) termasuk satwa yang tergolong rentan (*vulnerable*). Pada tahun 1996 rusa timor memiliki status risiko rendah (*lower risk*). Perubahan kondisi ini disebabkan jumlah populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di daerah asal yang diperkirakan kurang dari 10.000 ekor dewasa. Setidaknya 10% penurunan selama tiga generasi diperkirakan sebagai akibat dari perburuan dan hilangnya habitat (IUCN, 2015).

2. Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo

a. Populasi Rusa Timor

Taman Nasional Bali Barat (TNBB) merupakan satu-satunya taman nasional yang terletak di pulau Bali. Secara astronomis, kawasan ini terletak pada koordinat antara 8°5' - 8°13' LS dan 114°26' - 114°35' BT dan terletak di dalam wilayah administrasi kecamatan Gerokgak,

Kabupaten Buleleng dan kecamatan Melaya, Kabupaten Jembrana, Provinsi Bali. TNBB terletak sejauh 60 km ke arah barat laut dari Ibu Kota Bali, Denpasar. Luas kawasan TNBB adalah 19.002,89 hektar yang terbagi pada kabupaten Buleleng dan Jembrana (Tomi, 2022).

Secara umum, rusa timor (*Rusa timorensis*) di Indonesia dibagi menjadi delapan sub spesies, rusa timor di pulau Bali diklasifikasikan sebagai sub spesies *Rusa timorensis renschi*. Meskipun data terkini mengenai status dan sebaran populasi rusa timor di seluruh Indonesia termasuk di Taman Nasional Bali Barat (TNBB) belum tersedia, namun secara umum mengalami penurunan dari waktu ke waktu karena perburuan dan rusaknya habitat. Ada juga indikasi bahwa pola sebaran di kawasan hutan-hutan termasuk TNBB telah berubah (Masy'ud, Wijaya, & Santoso, 2007). Akan tetapi menurut Masy'ud (2007), pada tahun 2007 jumlah total populasi rusa timor di Taman Nasional Bali Barat diperkirakan sebanyak 713 ekor sampai 1320 ekor dengan komposisi umur anak 28 % dan dewasa 72 %.

Taman Nasional Baluran merupakan kawasan lindung dengan berbagai macam satwa dan habitat alaminya. Secara astronomis, Taman Nasional Baluran terletak antara 7°29'10" - 7°55'55" LS dan 114°29'10" - 114°39'10" BT di Kabupaten Situbondo, Jawa Timur. Taman Nasional Baluran memiliki luas sekitar 25.000 hektar, dengan batas daerah yaitu sebelah timur selat Bali dan sebelah utara selat Madura, sebelah selatan dan barat sungai Klokoran dan Bajulmati (Pradana, 2015). Menurut

Semiadi (2006), rusa timor yang ada di pulau Jawa (Taman Nasional Baluran dan Alas Purwo) diklasifikasikan sebagai sub spesies *Rusa timorensis russa*.

Populasi rusa timor telah menurun secara substansial di beberapa daerah di pulau Jawa, yang pada dasarnya adalah daerah asal rusa timor itu sendiri (Semiadi, 2006), termasuk juga pada 1990-an di Taman Nasional Baluran setidaknya memiliki populasi rusa timor terbesar dalam kisaran alaminya. Pada tahun 1996, sebanyak 2.500-3.000 rusa timor ditemukan selama sensus ketika beberapa tim pengamat dikerahkan secara bersamaan di seluruh habitat rusa. Antara 12 September 1998 dan 18 Januari 1999, populasi diperkirakan lebih dari 1.000 ekor dan kemungkinan besar akan terus menurun (IUCN, 2015).

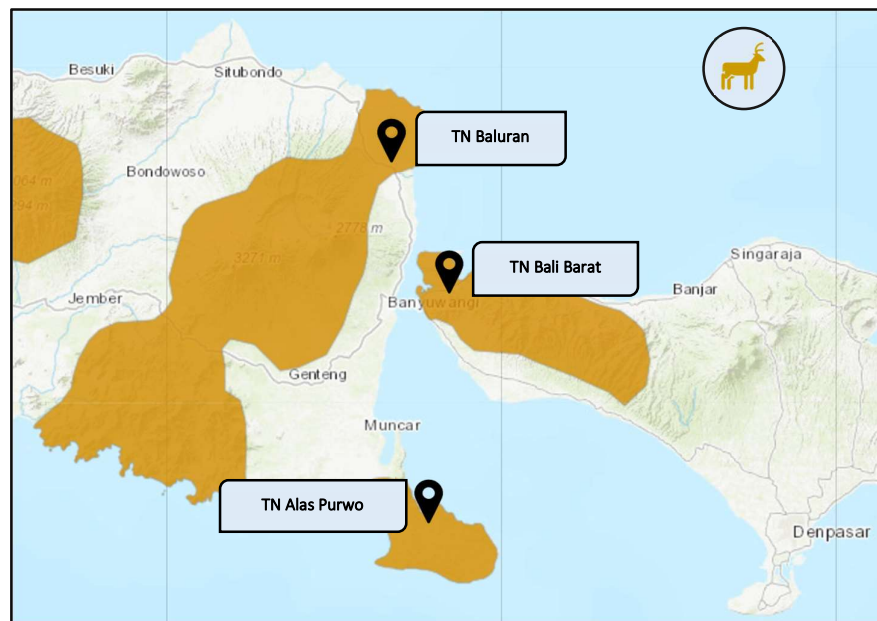
Taman Nasional Alas Purwo (TNAP) merupakan salah satu Taman Nasional yang ada di Jawa Timur. Sebelum menjadi taman nasional, Alas Purwo awalnya adalah Suaka Margasatwa Banyuwangi Selatan. Luas taman nasional ini adalah 44.037,30 Hektar dengan letak geografis di ujung timur Pulau Jawa tepatnya pada wilayah pantai selatan. Secara astronomis, letak TNAP antara 8,446456°-8,780444° LS dan 114,224625°-114,605157° BT dan secara administrasi masuk dalam wilayah pemerintahan Kecamatan Purwoharjo dan Kecamatan Tegaldlimo Kabupaten Banyuwangi Provinsi Jawa Timur. Taman Nasional Alas Purwo merupakan kawasan hutan dengan berbagai tipe ekosistem yang tergolong utuh di Pulau Jawa. Ekosistemnya terbentang dari pesisir (hutan

pantai) hingga hutan hujan dataran rendah, sabana, hutan bambu, hutan bakau, dan hutan tanaman. Kawasan Taman Nasional Alas Purwo juga memiliki keanekaragaman satwa yang sangat tinggi, baik kelas aves, herpetofauna (reptil dan amfibi) maupun kelas mamalia. Sampai saat ini teridentifikasi 45 jenis mamalia di Taman Nasional Alas Purwo. Mamalia yang dapat dijumpai di kawasan TN Alas Purwo diantaranya yaitu Rusa Timor (*Rusa timorensis*), Kijang (*Muntiacus muntjak*), Banteng (*Bos javanicus*), Ajag (*Cuon alpinus*), Macan Tutul Jawa (*Panthera pardus melas*), Babi Hutan (*Sus scrofa*), Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*), dan Lutung Budeng (*Tracypithecus auratus*) dan. Kelas aves teridentifikasi lebih dari 250 jenis burung. Beberapa jenis burung yang dapat dijumpai yaitu Elang Ular Bido (*Spilornis cheela*), Elang Laut Perut Putih (*Haliaeetus leucogaster*), Ayam Hutan Merah (*Gallus gallus*), Ayam Hutan Hijau (*Galus varius*), Rangkong Badak (*Buceros rhinoceros*), Kuntul Kecil (*Egreta garzeta*), Dara Laut Jambul (*Sterna bergii*), Cekakak Jawa (*Halcyon cyanoventris*), dan Merak Hijau Jawa (*Pavo muticus muticus*). Herpetofauna terdiri dari kelas amfibi dan reptil. Sampai saat ini telah teridentifikasi 70 jenis herpetofauna yang terdiri 17 jenis amfibi dan 53 jenis reptil. Diantara jenis yang ditemukan terdapat 7 jenis reptil yang dilindungi yaitu Penyu Hijau (*Chelonia mydas*), Penyu Lekang/Abu-Abu (*Lepidochelys olivacea*), Penyu Belimbing (*Dermochelys coriacea*), Penyu Sisik (*Eretmochelys imbricata*), Ular Sanca Bodo (*Python bivittatus*), Buaya Muara (*Crocodylus porosus*), dan Biawak Abu-Abu



(*Varanus nebulosus*) (TNAP, 2017).

Penurunan populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) secara besar-besaran juga terjadi di Taman Nasional Alas Purwo (IUCN, 2015). Menurut Santosa *et al* (2008), pada tahun 2006 ukuran populasi rusa timor di Taman Nasional Alas Purwo sebesar  $8157 \pm 1224$  ekor dengan kepadatan populasi sebesar  $0,02 \pm 0,03$  ekor/hektar. Dan juga ukuran populasi per kelompok secara keseluruhan berkisar antara 1-8 ekor.



Gambar 2. Persebaran populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo (Sumber : IUCN, 2015)

b. Ancaman Terhadap Populasi Rusa Timor di Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo

Ancaman yang nyata terhadap populasi rusa timor di Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo adalah adanya perburuan

liar yang semakin marak karena rusa timor termasuk salah satu satwa yang memiliki potensi cukup tinggi sebagai sumber protein hewani selain daging kambing dan sapi (Silalahi *et al.*, 2021). Ancaman lain juga datang dari rusaknya habitat rusa timor akibat konversi hutan menjadi lahan pertanian serta adanya tekanan pertumbuhan penduduk yang lambat laun semakin besar sehingga menggeser habitat rusa timor (Santosa *et al.*, 2008).

Struktur populasi rusa timor yang berbentuk piramida terbalik juga menjadi ancaman tersendiri terhadap populasi rusa timor di Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo. Menurut Masy'ud *et al* (2007), persentase umur rusa timor di Taman Nasional Alas Purwo adalah 28% untuk usia anakan dan 72% untuk usia dewasa yang artinya jumlah populasi rusa timor anakan lebih kecil dibandingkan rusa timor dewasa, perbandingan populasi tersebut disebut struktur populasi rusa berbentuk piramida terbalik. Hal tersebut mengindikasikan bahwa proses regenerasi tidak berjalan baik.

Pada struktur populasi berbentuk piramida terbalik tersebut, komposisi populasi rusa dewasa lebih banyak dari rusa betina, yang artinya memiliki potensi tingkat kerentanan dan peluang ancaman kepunahan yang lebih tinggi. Secara demografik, rusa timor lebih rentan terhadap peluang ancaman kepunahan (Masy'ud *et al.*, 2007).

### 3. Analisis Genetika Populasi

Genetika populasi merupakan suatu kajian ilmiah mengenai komposisi genetik pada suatu populasi. Genetika populasi memiliki fungsi utama untuk memperkirakan frekuensi alel pada lokus gen yang berbeda pada suatu populasi alami. Suatu populasi dapat dicari berdasarkan frekuensi alel dalam lokus gen tertentu (Passarge, 2007). Bahasan khusus dalam genetika populasi di antaranya adalah indeks perbedaan antara dua populasi, pertukaran gen, dan mutasi netral yang bermanfaat untuk mengkaji keragaman hayati pada tingkat molekuler. Genetika populasi menggunakan pendekatan statistika yang berdasarkan pada beberapa asumsi yang berhubungan dengan sifat-sifat biologis suatu makhluk hidup seperti misalnya sistem perkembangbiakan, asumsi mengenai sifat-sifat genetika makhluk hidup tersebut, misalnya mutasi gen, serta asumsi mengenai keadaan demografinya. Dalam usaha perlindungan keragaman hayati, kajian genetika populasi digunakan sebagai dasar untuk memetakan interaksi genetika antara individu beserta kemungkinannya untuk melanjutkan generasinya secara langgeng. Dalam konteks pelestarian keragaman hayati, interaksi gen dan struktur populasi ini juga digunakan sebagai landasan untuk mencandra unit-unit manajemen (*management units*) yang akan berguna misalnya sebagai sumber untuk mengentaskan suatu populasi di daerah lain yang hampir punah. (Arida, 2009).

Metode pengambilan sampel yang digunakan untuk analisis genetika populasi menggunakan marka molekuler ada dua, yaitu teknik invasif dan noninvasif. Analisis DNA noninvasif melibatkan DNA yang dikoleksi tanpa

menangkap atau biasanya bahkan menyentuh binatang. Ini berarti mengumpulkan DNA dari barang-barang yang ditinggalkan hewan, termasuk kotoran, rambut, bulu, air liur atau kulit yang terlepas. Barang-barang ini tidak sama dengan sumber DNA yang diperoleh menggunakan teknik invasif dan diambil dengan cara mengambil dari darah atau jaringan hewan, teknik invasif ini memang dapat memperoleh lebih banyak DNA tetapi cara mengambilnya lebih konvensional, sedangkan teknik noninvasif cenderung memperoleh hasil serta kualitas DNA yang lebih rendah (Bragg & Gamero, 2022). Keragaman genetik populasi dapat diungkap pada tingkat DNA melalui analisis molekuler. Penggunaan DNA ini akan memberikan resolusi lebih baik karena DNA merupakan materi genetik yang diturunkan pada generasi selanjutnya (Monica *et al.*, 2012).

a. Metode Pengambilan Sampel Noninvasif

Salah satu metode untuk analisis molekuler populasi satwa liar yaitu menggunakan teknik pengambilan sampel noninvasif. Tidak seperti pengambilan sampel invasif, pengambilan sampel noninvasif tidak memerlukan penangkapan atau kontak langsung dengan hewan uji karena untuk menghilangkan risiko stres fisiologis atau efek samping yang berbahaya dari penggunaan anestesi untuk hewan tersebut (Savira, 2012).

Sampel yang dapat digunakan dalam metode noninvasif yaitu berupa bulu dan rambut yang sudah terlepas, kotoran, dan cangkang telur (Lomi, 2020). Kotoran atau feses merupakan salah satu sampel yang dapat digunakan dalam metode noninvasif. Satu gram feses berpotensi

mengandung sejumlah DNA feses yang berasal dari sel epitel usus yang ikut terlepas bersama feses selama mekanisme pencernaan berlangsung (Savira, 2012). Penggunaan DNA feses telah berhasil diterapkan pada beberapa jenis ungulata seperti Alpine ibex (*Capra ibex*), bison (*Bison bison*), bighorn sheep (*Ovis canadensis*), corsican mouflon (*Ovis musimo*), serigala, beruang, serta gajah asia dan afrika (Gardipee, 2007).

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kuantitas dan kualitas DNA feses adalah umur feses yang digunakan sebagai sampel. Umur feses menjadi penting karena menentukan berapa lama feses tersebut terkena kondisi lingkungan, termasuk kelembaban, suhu, dan paparan sinar matahari. Kondisi lingkungan tersebut menentukan aktivitas bakteri pengurai yang dapat mempengaruhi kuantitas dan kualitas amplifikasi DNA. Pada dasarnya, cukup sulit untuk menentukan batas umur feses yang dapat digunakan sebagai sampel. Disarankan agar feses yang digunakan untuk sampel ekstraksi DNA berumur kurang dari 24 jam dan ditemukan pada lingkungan yang cukup kering (Fernando *et al.*, 2003). Faktor lain yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas DNA feses adalah metode pengawetan sampel dan suhu lingkungan. Suhu lingkungan pada suhu tinggi yaitu sekitar 37°C dapat memicu aktivitas endonuklease dan enzim hidrolitik lain yang dapat menurunkan kuantitas dan kualitas DNA yang diperoleh dari sampel feses tersebut (Nsubuga *et al.*, 2004). Agar sampel feses yang dikoleksi kualitasnya tetap terjaga dengan baik, metode pengawetan sampel yang digunakan biasanya berupa ethanol, pengawet

buffer RNAase later dan EDTA (Badruzaufari *et al.*, 2021; Nayasilana *et al.*, 2010).

Umumnya, metode kerja yang digunakan pada teknik molekuler nonivasif untuk deteksi DNA menggunakan sampel feses adalah sebagai berikut ; 1) ekstraksi DNA dari feses, 2) kuantifikasi DNA menggunakan *Nanodrop spectrophotometer*, 3) menentukan/mendesain primer sesuai DNA target, 4) PCR untuk amplifikasi DNA, 5) purifikasi produk PCR, 6) *cycle sequencing*, 7) presipitasi DNA, 8) pengurutan nukleotida melalui analisis sekuensing, 9) dan yang terakhir yaitu pengolahan data (Savira, 2012).

Sampel DNA yang telah berhasil terkoleksi sangat dibutuhkan untuk mencapai tujuan konservasi. Beberapa hal yang dapat dilakukan untuk mencapai tujuan tersebut yaitu berupa analisis DNA mengenai tingkat keragaman genetik, keragaman nukleotida, struktur genetik, diferensiasi populasi, dan demografi historis, serta juga untuk melihat struktur populasi yang kemudian dianalisis dan dijadikan *base line* untuk menyusun strategi konservasi yang tepat (Fang *et al.*, 2022; Usman, 2016).

#### b. DNA Mitokondria Sebagai Marka Molekuler

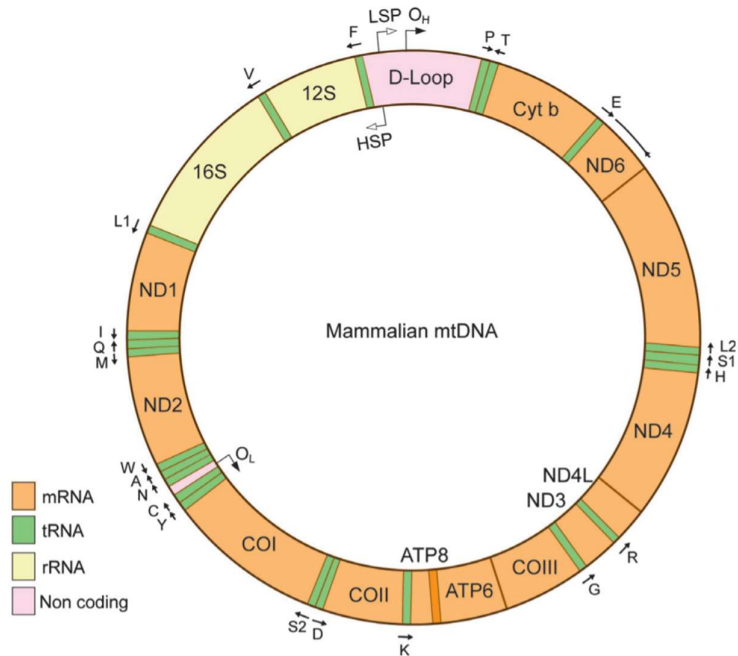
Mitokondria merupakan organel sel yang jumlahnya banyak di temukan di dalam sel. DNA yang terkandung di dalam mitokondria juga jauh lebih banyak dibandingkan yang berasal dari inti sel. Dengan demikian, mtDNA lebih tepat digunakan sebagai marka molekuler dari sampel yang berasal dari feses. Karena pada umumnya, DNA yang

diperoleh dari sampel feses kuantitasnya lebih sedikit daripada DNA yang diperoleh dari sampel darah ataupun jaringan.

#### 1) Karakteristik DNA Mitokondria

Mitokondria merupakan organel sel yang berperan penting untuk reaksi pemindahan elektron, siklus asam trikarboksilat, dan metabolisme energi di dalam sel. Mitokondria mempunyai fungsi sebagai penghasil energi menggunakan mekanisme fosforilasi oksidatif untuk menghasilkan produk samping radikal oksigen atau *reactive oxygen spesies* (ROS). Mitokondria memiliki suatu komponen genetik tersendiri yang disebut *mitochondrial genome* (mtDNA) (Wandia, 2001).

DNA Mitokondria (mtDNA) adalah molekul DNA *double-helix* yang mempunyai bentuk sirkuler atau melingkar yang ditransmisikan secara maternal. MtDNA terletak di organel penghasil energi yaitu matriks mitokondria dan berfungsi sebagai penyandi protein rantai respirasi yang diperlukan untuk menghasilkan ATP (Susmiarsih, 2010). Pada mamalia, DNA Mitokondria memiliki panjang antara 15.000-17.000 pasang basa. mtDNA (Gambar 3) mempunyai 2 untai, yaitu untai ringan atau (*L*)-*Strand* dan untai berat atau (*H*)-*Strand* (Li & Graur, 1991; Wolfe, 1993).



Gambar 3. Struktur mtDNA Mamalia & Posisi D-Loop  
(Sumber : Lagouge & Larsson, 2013)

DNA Mitokondria mempunyai struktur yang padat dan hampir tidak mempunyai *non coding region* (intron) yang berarti 93% dari struktur mtDNA adalah *coding region* atau daerah penyandi (exon) (Asnar, 2005). MtDNA menyandi 37 gen, 9 gen disandi oleh *L-strand* dan 28 gen disandi oleh *H-strand*. 37 gen tersebut terdiri dari 13 polipeptida yang berperan penting dalam proses OXPHOS, 2 rRNA, dan 22 tRNA yang berperan penting untuk translasi protein mitokondria. D-Loop *non coding region* berperan sebagai promotor untuk untai H dan L (HSP dan LSP) serta awal replikasi untai utama mtDNA ( $O_H$ ). Transkripsi dari HSP menghasilkan dua rRNA (12S dan 16S), 10 mRNA (monocistronic; ND1, ND2, ND3, ND5, Cyt b & COI, COII, COIII, dan biscistronic ND4/ND4L dan ATP6/ATP8) dan



14 tRNA (F, V, L1, I, M, W, D, K, G, R, H, S1, L2, dan T). Transkripsi dari LSP menghasilkan satu mRNA (ND6) dan delapan tRNA (P, E, S2, Y, C, N, A, dan Q) (Gambar 3) (Lagouge & Larsson, 2013; Wallace, 1992).

DNA Mitokondria mempunyai karakteristik tersendiri dibandingkan dengan DNA inti (nukleus), yaitu :

- a) mtDNA memiliki kandungan salinan per sel lebih banyak dibandingkan dengan salinan DNA inti, yaitu sekitar 1.000 sampai 10.000. Hal ini sangat berguna apabila jumlah DNA sampel yang digunakan sangat terbatas, misalnya sampel yang berasal dari kasus kriminal (rambut, gigi, tulang, maupun cairan-cairan tubuh) (Hoong & Lek, 2005; Morin, Chambers, Boesch, & Vigilant, 2001; Pakendorf & Stoneking, 2005; Ratnayani, Wirajana, & Laksmiwati, 2007; Tapio & Grigaliunaite, 2003).
- b) MtDNA tidak mempunyai protein histon dan enzim untuk memperbaiki kerusakan DNA atau kesalahan replikasi sehingga dapat lebih mudah terjadi mutasi. MtDNA mempunyai laju mutasi tinggi yang dapat mengakumulasi polimorfisme 5 sampai 10 kali lebih cepat dari DNA inti sehingga dapat membuat variasi genetik yang tinggi pada berbagai tingkatan level, baik antar individu maupun populasi (Ratnayani *et al.*, 2007). Mutasi yang terjadi biasanya berupa

mutasi titik, tetapi bisa juga berupa delesi atau insersi. Laju mutasi yang tinggi ditimbulkan karena mtDNA rentan terhadap kasus mutagenik dan produksi *Radical Oxydative Species* (ROS) yang berasal dari proses fosforilasi oksidatif pada organel tersebut (Rose *et al.*, 2007).

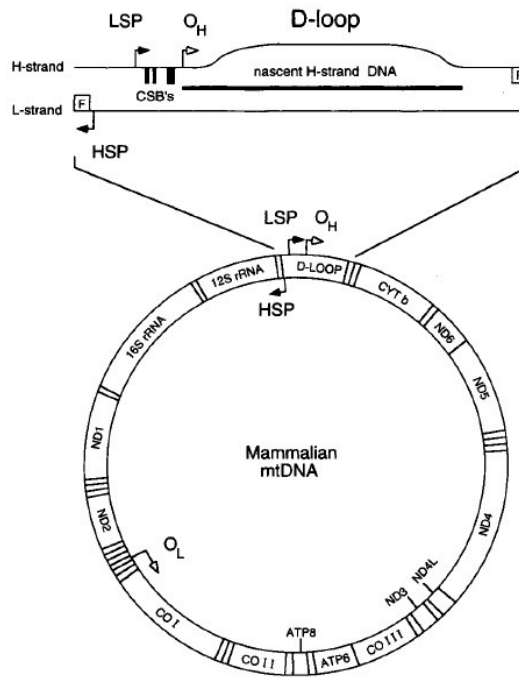
- c) MtDNA diturunkan secara maternal atau berasal dari ibu, hal ini disebabkan karena pada saat fertilisasi, mitokondria sel sperma tidak ikut menembus ovum. Hal ini mengindikasikan bahwa mtDNA yang diturunkan bukanlah hasil dari rekombinasi, sehingga penganekaragaman genetik hanya terjadi lewat mutasi. Setiap individu dari garis ibu yang sama akan memiliki tipe mtDNA yang identik. Pewarisan uniparental seperti itu akan memudahkan untuk mengungkap silsilah kerabat masa lalu berdasarkan garis keturunan maternal, tanpa membingungkan efek yang timbul dari pewarisan biparental dan rekombinasi (Galtier, Nabholz, Glémin, & Hurst, 2009; Pakendorf & Stoneking, 2005; Ratnayani *et al.*, 2007).

## 2) Daerah D-Loop Mitokondria

Daerah D-Loop (*displacement loop*) atau disebut juga daerah kontrol (*control region*) merupakan salah satu struktur MtDNA yang terletak pada *non coding region* atau daerah tidak menyandi yang berperan dalam proses awal replikasi dan transkripsi mtDNA yang

terdiri dari *triple-strand* DNA. (Wallace, 1992). Daerah D-loop (Gambar 4) memiliki kandungan ujung replikasi untai berat ( $O_H$ ), promotor transkripsi untai ringan (LSP), dan promotor transkripsi untai berat (HSP) (Lagouge & Larsson, 2013). Menurut Sumida (dalam Savira, 2012: 14) D-loop berisi urutan DNA paling beragam dari seluruh genom mtDNA hewan. Hipervariabilitas ini disebabkan oleh tingkat laju mutasi yang tinggi (sekitar  $0,075-0,165 \times 10^6$  substitusi/situs/tahun).

Daerah ini mempunyai karakteristik yang sangat polimorfik dan mempunyai 3 bagian hipervariabel yaitu HVI, HVII, dan HVIII yang mempunyai urutan sangat bervariasi antar individu. Di dalam D-Loop, posisi HVI terletak pada nukleotida 57 sampai 372, sedangkan HVII terletak pada urutan nukleotida 438 sampai 594, dan HVIII terletak pada urutan nukleotida 16.024 sampai 16.383. Ketiga bagian ini mempunyai laju mutasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan daerah penyandi (*coding region*). Laju mutasinya yaitu 1 banding 33 generasi. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan urutan nukleotida terjadi setiap 33 generasi. Individu yang tidak memiliki keterkaitan hubungan maternal akan mempunyai urutan sekuen berbeda sedangkan yang memiliki keterkaitan hubungan maternal akan memiliki urutan sekuen yang sama. (Hoong & Lek, 2005).



Gambar 4. Skema D-Loop mtDNA pada Mamalia  
(Sumber : Clayton, 2000)

D-Loop DNA mitokondria telah terbukti berhasil dalam mempelajari variasi genetik, hal tersebut dikarenakan daerah ini memiliki susunan genetik yang sangat bervariasi dan terjadi banyak mutasi (Wiradateti, 2012). Zein (2007) melaporkan adanya keragaman genetik berdasarkan D-Loop mtDNA rusa timor (*Rusa timorensis*) di Pulau Timor, Pantar, dan Alor. Tingkat keragamannya cukup tinggi dengan keragaman nukleotida antara 0,016 – 0,037, keragaman haplotipe sebesar 0 – 0,5575, dan jarak genetik berkisar antara 0.014 - 0.021.

3) Parameter statistik DNA Mitokondria sebagai marka molekul

a) Keragaman nukleotida dan haplotipe

Pada umumnya, parameter statistik yang digunakan untuk mengukur keragaman D-loop mtDNA adalah keragaman haplotipe. Pola yang ditampilkan oleh haplotipe mengandung informasi penting, termasuk sejarah evolusi organisme dan variasi genetik yang berperan dalam membentuk karakteristik organisme. Pengukuran keragaman haplotipe ini dapat dilakukan menggunakan rumus :

$$h = \frac{n \sum_{i=1}^l x_i^2}{(n - 1)}$$

dengan keterangan n adalah ukuran sampel dan  $x_i$  adalah frekuensi haplotipe sekuens ke-i (M. Nei & Tajima, 1981).

Parameter statistik lain yang dapat digunakan untuk mengukur keragaman D-loop mtDNA adalah pengukuran variasi genetik pada mtDNA menggunakan perbedaan nukleotida per situs antara dua sekuens DNA yang dipilih secara acak atau disebut juga keragaman nukleotida. Pengukuran ini dapat dilakukan menggunakan rumus :

$$\Pi = \sum_{ij} x_i x_j \Pi_{ij}$$

dengan keterangan  $x_i$  dan  $x_j$  adalah frekuensi haplotipe ke-i dan ke-j di dalam suatu populasi, sedangkan  $\Pi_{ij}$  adalah jumlah perbedaan nukleotida per situs nukleotida antara sekuens ke-i dan ke-j

(Mertens *et al.*, 2008; M. Nei & Tajima, 1981; Sekino, Hara, & Taniguchi, 2002).

b) Rekonstruksi pohon filogenetik

Metode yang biasa digunakan dalam rekonstruksi filogenetik adalah metode bootstrap. Pengulangan tertentu dari kumpulan data yang dihasilkan oleh metode bootstrap membantu dalam memperkirakan topologi pohon filogeni. Berdasarkan hal tersebut maka *bootstrap value* atau persentase hasil replikasi metode bootstrap yang dihasilkan dapat dijadikan acuan untuk menentukan tingkat kepercayaan pada pohon filogeni. Semakin tinggi nilai bootstrap (*bootstrap value*) maka semakin tinggi pula kepercayaan topologi terhadap hasil rekonstruksi (M. Nei & Li, 1979).

4. Teknik Biologi Molekuler

a. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

*Polymerase chain reaction* (PCR) merupakan suatu teknik untuk mereplikasi urutan DNA tertentu secara *in vitro* dengan memperpanjang primer sebagai prekursor menggunakan DNA polimerase. Metode PCR pertama kali diperkenalkan oleh Mullis *et al* dari Cetus Corporation (Williams *et al.*, 1988).

Komponen yang dibutuhkan dalam proses PCR adalah DNA *template*; sepasang primer (*forward* dan *reverse*), yaitu oligonukleotida pendek yang urutan nukleotidanya komplementer dengan urutan nukleotida DNA *template*; dNTP (deoksinukleotida trifosfat); magnesium

klorida ( $MgCl_2$ ); penyangga PCR dan enzim DNA polimerase (Handoyo & Rudiretna, 2001).

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: pra-denaturasi DNA *template*, denaturasi DNA *template*, penempelan primer pada templat (*annealing*), pemanjangan primer (*extension*), dan pemantapan (*postextension*). Tahap denaturasi sampai dengan *ekstension* merupakan tahapan berulang (siklus) yang setiap siklusnya terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo & Rudiretna, 2001). Denaturasi adalah tahap pembukaan ikatan *double helix* atau rantai ganda DNA hingga menjadi ikatan tunggal dan juga membuat reaksi enzimatik berhenti. Denaturasi biasanya dilakukan pada temperatur  $94^{\circ}C$  sampai  $95^{\circ}C$ . *Annaeling* adalah proses pelekatan primer pada DNA *template*, proses ini membutuhkan temperatur pada kisaran *melting temperatur* ( $T_m$ ). *Melting temperatur* ( $T_m$ ) dapat ditentukan menggunakan rumus :

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Umumnya temperatur ideal tahap *annaeling* yaitu kisaran  $52^{\circ}C$  sampai  $65^{\circ}C$ . Temperatur *annaeling* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan primer yang digunakan tidak melekat secara sempurna, sedangkan jika temperaturnya terlalu rendah akan menyebabkan pelekatan primer yang tidak spesifik. Hal demikian dapat menyebabkan amplifikasi dari segmen DNA yang tidak diharapkan (Brock, 1994; Rychlik & Rhoads, 1989). Tahap *ekstensi* merupakan tahap pemanjangan primer. Proses ini dikatalisasi oleh enzim DNA polimerase yang sifatnya termostabil, yaitu

pada temperatur sekitar 72—78°C (Brock, 1994).

PCR merupakan teknik yang terdiri dari beberapa langkah (siklus) yang berulang dan pada setiap siklus jumlah DNA target yang beruntai ganda akan diduplikasi. DNA templat untai ganda (*unamplified DNA*) dipisahkan oleh denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga suhu tertentu untuk memberikan waktu bagi primer (*anneal primers*) untuk menempel ke daerah tertentu dari DNA target. Primer (*extend primers*) diperpanjang oleh Polimerase DNA dengan menggunakan dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) serta buffer yang sesuai. Pada umumnya, kondisi ini dicapai antara 20 sampai 40 siklus. DNA target yang diharapkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial sesudah siklus keempat dan DNA nontarget (*long product*) akan meningkat secara linier (Newton & Graham, 1994).

*Thermal cycler* merupakan komponen yang berperan penting dalam PCR. *Thermal cycler* adalah mesin yang dapat diatur untuk meningkatkan dan menurunkan suhu sesuai urutan dan waktu yang diinginkan. Mesin ini bisa menjalankan perubahan suhu dengan siklus yang sebelumnya sudah diprogram secara otomatis. Siklus PCR yang sudah diprogram sebelumnya dapat dijalankan dengan variasi suhu yang berbeda dengan perubahan yang drastis sekalipun (Weaver & Hedrick, 1999).

#### b. Analisis Sekuensing

Sekuensing adalah proses untuk menentukan urutan nukleotida dari fragmen tertentu suatu DNA. Metode yang digunakan dalam sekuensing



terdiri dari metode Maxam-Gilbert, metode Sanger, dan *automated DNA sequencing* (Campbell, Reece, & Mitchell, 2002; Griffin & Griffin, 1993).

Metode yang pertama adalah metode Maxam-Gilbert. Seperti namanya, metode ini dikembangkan oleh Allan Macam dan Walter Gilbert. Prinsip dasar metode ini berupa pemotongan ujung molekul DNA berlabel dengan menggunakan agen kimiawi yang spesifik. Agen spesifik yang digunakan untuk basa-basa purin adalah dimetilsulfat (DMS), sedangkan untuk basa-basa pirimidin adalah hidrazin. Penggunaan agen kimiawi mengakibatkan pembentukan empat jenis kombinasi yang mengandung basa tertentu, yaitu A, G+A, C, dan C+T. Kombinasi dari basa-basa tersebut yang kemudian digunakan untuk mengetahui jenis basa yang terdapat pada suatu DNA fragmen. Pengecekan fragmen hasil dari PCR dengan metode Maxam-Gilbert dilakukan dengan elektroforesis, lalu dideteksi dengan autoradiografi (Alberts *et al.*, 2002).

Metode Sanger pertama kali dikembangkan oleh Frederick Sanger pada tahun 1977. Prinsip kerjanya adalah dengan terminasi sintesis DNA oleh dideoksinukleotida yang ditempatkan pada empat tabung berbeda. Proses ini akan menghasilkan *chain terminating dideoxynucleotide* sehingga terbentuk beberapa fragmen dengan ukuran yang bermacam-macam. Pengecekan fragmen tersebut dilakukan dengan cara elektroforesis, proses elektroforesis tersebut mengidentifikasi dideoksinukleosida yang digunakan untuk terminasi (Cooper, 1997; Fairbanks & Andersen, 1999).

Metode *automated DNA sequencing* merupakan pengembangan dari metode Sanger. Persamaan keduanya terdapat pada penggunaan prinsip terminasi replikasi dengan komponen reaksinya ditempatkan pada tabung yang sama (Wolfe, 1993). Metode tersebut dapat diotomatisasi menggunakan mesin sekuensing DNA. Setiap dideoksiribonukleotida yang dibaca akan diidentifikasi berdasarkan pewarna fluoresen yang muncul setelah disinari oleh laser. Setiap pewarna fluoresen mewakili basa spesifik dan data dideteksi dengan menggunakan detektor (Griffin & Griffin, 1993; Weaver & Hedrick, 1999). Metode *automated DNA sequencing* memiliki banyak keunggulan, yaitu kemampuan mengurutkan sekuens dan rantai DNA berukuran besar, kemampuan mengotomatisasi proses sekuensing menggunakan komputer, dan kemampuan memperoleh hasil berupa sekuens DNA dalam waktu yang relatif singkat (Weaver & Hedrick, 1999).

Proses sekuensing menggunakan metode *automated DNA sequencing* dilakukan dalam proses yang disebut *cycle sequencing* terhadap amplifikasi PCR. Proses *cycle sequencing* dengan proses PCR menggunakan prinsip yang serupa, yaitu ekstensi fragmen DNA dengan pengaturan suhu menggunakan *thermal cyclers*. Perbedaan dari kedua proses itu adalah *cycle sequencing* hanya menggunakan satu jenis primer dan mengikutsertakan ddNTP (dideonukleotida), selain dNTP (deoksinukleotida) sebagai basa komplementer (Weaver & Hedrick, 1999).

### c. Analisis Filogeografi

Filogeografi merupakan ilmu yang menggabungkan filogenetik dan geografi, serta mempelajari proses distribusi geografis dari garis keturunan suatu spesies (Hilhanif, 2018). Kajian filogeografi lebih menekankan pada variasi geografi yang mencakup berbagai jenis karakter seperti genetik, fisiologi, morfologi, dan etologi (Lougheed *et al.*, 1993). Kajian tersebut mempunyai peranan penting untuk mengetahui proses-proses terjadinya evolusi, karena variasi-variasi yang diturunkan merupakan materi dasar yang mempengaruhi proses terjadinya adaptasi dan seleksi alam. Penyebaran populasi suatu spesies dimulai dari keragaman-keragaman geografi yang semakin lama semakin berkembang. Filogeografi pada tingkatan intraspesies dapat memberikan informasi mengenai keragaman pada spesies, mulai dari tingkat populasi, subpopulasi, subspecies, sampai spesies (Surata, 2000).

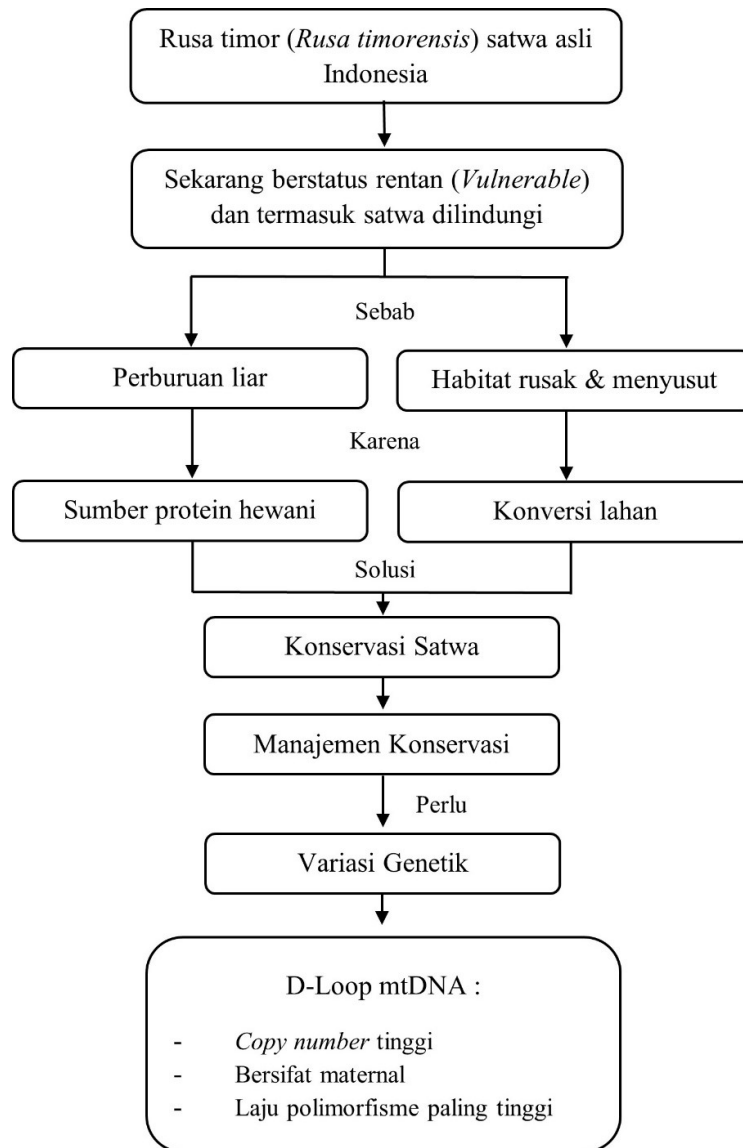
Kajian filogeografi tidak terlepas dari filogenetik yang merupakan bagian inti dari kajian itu sendiri. Filogenetik adalah salah satu hal yang paling penting dan menarik dalam penelitian evolusi. Ada beberapa metode untuk membuat pohon filogenetik dari data molekuler (asam amino atau nukleotida) (Saitou & Imanishi, 1989). Analisis filogenetik dari famili sekuens asam amino atau sekuens nukleotida adalah analisis untuk menentukan bagaimana famili tersebut diwariskan dari generasi ke generasi selama evolusi. Hubungan evolusioner antara urutan dijelaskan dengan menempatkan mereka sebagai cabang dalam pohon. Hubungan

cabang-cabang di dalam pohon mencerminkan tingkat interkoneksi dari berbagai urutan. Dua urutan yang sangat mirip terletak sebagai tetangga luar dari cabang (*neighboring outside*) dan saling berhubungan pada cabang umum (*Common branch*) (Mount, 2001).

Filogenetik dapat dideskripsikan sebagai klasifikasi organisme secara taksonomi berdasarkan sejarah evolusinya, yaitu filogeni mereka. Filogenetik juga merupakan bagian dari integral ilmu pengetahuan yang sistematis dengan tujuan untuk menentukan filogeni dari organisme berdasarkan karakteristik mereka. Definisi lebih lanjut Filogenetik adalah pusat evolusi biologi dimulai dari bagaimana organisme hidup dan berkembang di alam (Mount, 2001).

Analisis filogenetik sekuen protein dan asam amino umumnya akan menjadi hal yang penting pada analisis sekuen. Selain itu, dalam analisis filogenetik bisa juga menganalisis evolusi pada organisme yang berbeda terkait perubahannya. Berdasarkan analisis tersebut, sekuen akan memiliki cabang yang bertetangga pada sebuah pohon filogenetik. Ketika keluarga gen ditemukan dalam suatu organisme atau kelompok organisme, hubungan filogenetik antara gen-gen tersebut dapat memprediksi kemungkinan bahwa suatu gen akan memiliki fungsi yang setara atau ekuivalen. Prediksi fungsi ini dapat diuji dengan eksperimen genetik. Analisis filogenetik juga digunakan untuk melacak perubahan yang terjadi dengan cepat yang dapat mengubah suatu spesies, misalnya virus (McDonald & Kreitman, 1991; Nielsen & Yang, 1998).

## B. Kerangka Berfikir



Gambar 5. Skema Kerangka Berpikir

## C. Hipotesis

Ditemukannya variasi genetik pada sekuens daerah D-loop DNA mitokondria mtDNA pada populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif yang mengangkat fenomena alam sebagai salah satu masalah dalam penelitian, sehingga dapat menerangkan arti dan kejelasan terhadap fenomena tersebut.

Penelitian ini juga bersifat eksploratif dengan pendekatan molekuler, yaitu melihat variasi genetik rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo. Penelitian ini menggunakan sampel feses yang kemudian diekstraksi dan dilakukan proses PCR menggunakan primer spesifik D-Loop mtDNA rusa timor.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### **1. Waktu Penelitian**

Pengambilan sampel feses rusa timor (*Rusa timorensis*) dilakukan pada tanggal 20-29 September 2021. Sedangkan penelitian analisis variasi D-Loop DNA Mitokondria rusa timor (*Rusa timorensis*) dilaksanakan pada bulan November 2021 – Februari 2022.

##### **2. Tempat Penelitian**

Pengambilan sampel feses rusa timor (*Rusa timorensis*) dilakukan di Jawa Timur (Taman Nasional Baluran dan Taman Nasional Alas Purwo) serta di pulau Bali yaitu di kawasan Taman Nasional Bali Barat (TNBB). Penelitian analisis variasi D-Loop DNA Mitokondria rusa timor (*Rusa*

*timorensis*) dilaksanakan di Laboratorium Pengelolaan Satwa Liar Fakultas Kehutanan UGM.

### **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

#### 1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo.

#### 2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah feses rusa timor (*Rusa timorensis*) yang diperoleh dari kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo dan diawetkan menggunakan etanol 96%.

### **D. Variabel Penelitian**

Variabel penelitian ini yaitu variasi urutan nukleotida yang terdapat pada sekuens D-Loop mtDNA rusa timor (*Rusa timorensis*).

### **E. Alat dan Bahan**

#### 1. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

Tabung plastik 50 ml, GPS, Sendok plastik, Plastik wrap, Alat tulis, Sarung, Tangan Lateks, Pinset, Autoklaf, Kulkas atau *Freezer*, Timbangan Analitik, Cetakan Gel Agarose, Inkubator, *Vortex*, *Spinner*, Tabung Erlenmeyer, Rak *tube*, Fluorometer (Promega® Quantus Fluorometer), Kamera, Seperangkat Alat Elektroforesis, Mesin PCR MultiGene™ Optimax *Thermal Cycle*, Sentrifuse (Microspin® 12),

Mikropipet P10 (0.5-10ul), P100/(10-100ul ), P1000 (100-1000 ul), Laptop.

2. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

Feses Rusa Timor (*Rusa timorensis*), Kit Ekstraksi DNA (Qiagen<sup>®</sup> DNeasy Power Soil Pro Kit), Seperangkat Uji Kuantifikasi DNA (QuantiFluor<sup>®</sup> ONE dsDNA Dye & 0,5 Tube Biologix<sup>®</sup>), Bubuk Agarose, TBE (1×), ddH<sub>2</sub>O, Etanol 96%, DNA Ladder (Smobio<sup>®</sup> DM2400), PCR Mix (2×Taq Tiangen<sup>®</sup> PCR Mix), Gel Staining (10.000 ×), Tube 0.5 ml / Tube Strip 0,5 ml g., Tip (*Blue, Yellow, White*), Aquadest (*Nuclease Free Water*), Primer *forward & reverse* (RTF & RTR)

## F. Langkah Penelitian

### 1. Pengambilan dan Seleksi Sampel

#### a. Pengambilan Sampel

Proses pengambilan sampel dilakukan dengan cara menelusuri taman nasional. Jika menemukan feses herbivor maka diamati dan diidentifikasi apakah itu feses rusa dengan membuka referensi, setelah yakin bahwa itu feses rusa maka dilakukan dokumentasi menggunakan kamera dan mendata titik lokasi ditemukannya sampel menggunakan GPS serta mencatat waktunya.

Cara preservasi sampel yaitu dengan cara memasukkan  $\pm$  10 pellet feses rusa yang ditemukan ke dalam botol sampel yang sudah diisikan etanol 96%. Lalu botol sampel diberi keterangan kode nomor dan tempat



ditemukannya sampel beserta keterangan kode kesegaran sampel (K1/K2/K3).

b. Seleksi dan Penataan Sampel

Sampel diseleksi berdasarkan kualitas atau kesegaran feses. Kualitas feses yang dimaksud yaitu berdasarkan kode K1, K2, dan K3 yang tertulis di botol sampel (Tabel 1). Sampel yang akan digunakan untuk ekstraksi DNA adalah sampel K1 dan K2. Sampel ditata dan dikelompokkan sesuai dengan kode lokasi masing-masing sampel tersebut didapatkan.

Tabel 1. Kode Pengelompokan Sampel Feses Rusa Timor

<i>Kode</i>	<i>Keterangan</i>
<i>K1</i>	Kualitas sampel terbaik, feses diperoleh dalam keadaan segar atau baru dikeluarkan oleh rusa
<i>K2</i>	Kualitas sampel sedang, tidak terlalu lama maupun tidak terlalu baru
<i>K3</i>	Kualitas sampel kurang baik, feses yang sudah lama atau sudah agak kering ketika diperoleh di alam liar.

2. Analisis Variasi D-Loop DNA Mitokondria

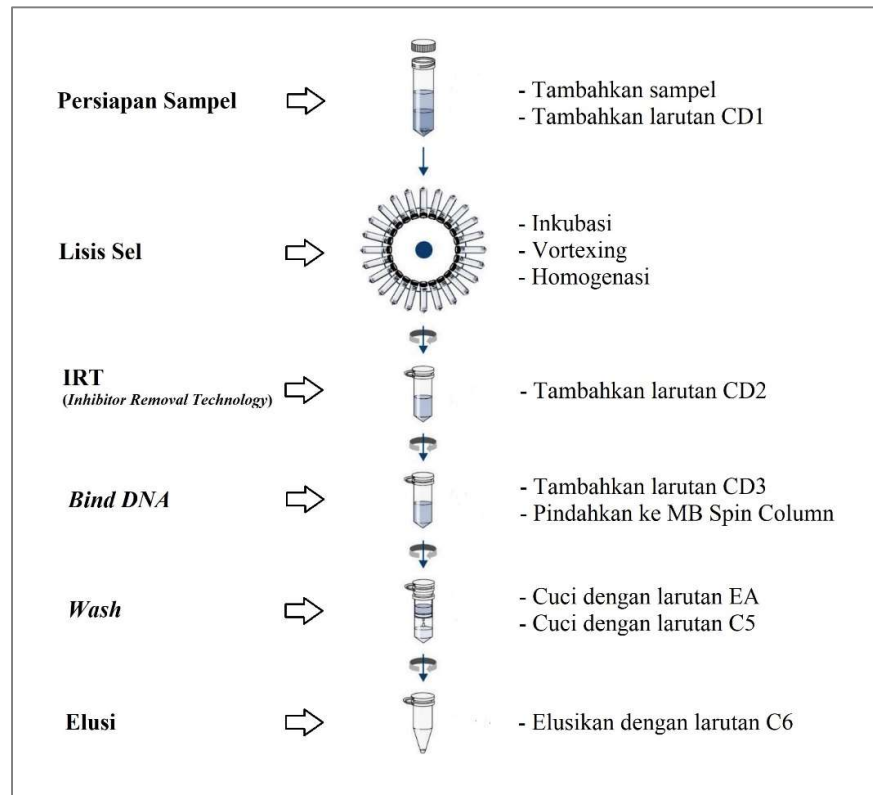
Alat-alat disterilkan dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama  $\pm$  15 menit sebelum digunakan untuk tahap ini

a. Ekstraksi DNA dari sampel feses

Ekstraksi DNA dari sampel feses dilakukan menggunakan Qiagen<sup>®</sup> DNeasy Power Soil Pro Kit. Kit tersebut telah dirancang untuk ekstraksi

bakteri dan fungi dari *stool* (sampel dari kotoran) dan bisa juga untuk DNA hewan, kit tersebut digunakan untuk mengekstraksi DNA Rusa dan juga tanaman yang dimakan rusa, mikrobium, yeast/jamur maupun patogen-patogen yang ada di feses rusa tersebut.

Proses ekstraksi dimulai dengan cara mengambil 1 butir sampel feses dari *tube* yang berisi etanol (sebagai pengawet) dan diletakkan di kertas. Kemudian kertas dilipat hingga menutupi sampel dan feses ditumbuk hingga hancur kemudian dicampur dan diratakan agar lekas kering. Sembari menunggu kering, PowerBead Pro *tube* di-*spin down* secara singkat untuk membuat *beads* berada di dasar *tube*. Lalu menimbang 75 mg sampel feses yang sudah kering, kemudian memasukkan sampel yang sudah ditimbang tersebut ke dalam *tube* PowerBead Pro dan ditambahkan 800 uL larutan CD1 serta divortex secara singkat agar tercampur. Setelah itu, sampel diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit.



Gambar 6. Prinsip kerja ekstraksi DNA menggunakan Qiagen® DNeasy Power Soil Pro Kit

PowerBead Pro Tube kemudian dipasang secara horizontal pada Adaptor Vortex untuk tabung 1,5–2 ml (cat. no. 13000-V1-24), dan divortex dengan kecepatan maksimal selama 10 menit. Lalu PowerBead Pro Tube disentrifugasi pada 12.400 x g selama 2 menit. Setelah selesai, sekitar 500–600 µl supernatan dipindahkan ke dalam Tabung Microcentrifuge 2 ml yang bersih (disediakan) lalu ditambah 600 µl cairan CD3 dan divortex selama 5 detik. Setelah itu, sekitar 650 µl *lysate* (hasil lisis sel) dipindahkan ke dalam MB Spin Column dan disentrifugasi pada 12.400 x g selama 2 menit. Kemudian *flow-through* (cairan bekas) dibuang

dan mengulangi langkah sebelumnya, sisa *lysate* yang ada dituangkan semua untuk memastikan bahwa semua *lysate* telah melewati MB Spin Column. Kemudian MB Spin Column ditempatkan dengan hati-hati ke dalam Collection Tube 2 ml yang bersih (tersedia) dan selalu menghindari untuk memercikkan aliran apa pun ke MB Spin Column. Setelah itu, 500  $\mu$ l larutan/solution EA ditambahkan ke dalam MB Spin Column dan disentrifugasi pada 12.400 x g selama 2 menit. Kemudian *flow-through* dibuang dan MB Spin Column MB Spin Column ditempatkan kembali ke dalam Collection Tube 2 ml yang sama. 500  $\mu$ l C5 ditambahkan ke MB Spin Coloumn lalu disentrifugasi pada 12.400 x g selama 2 menit. Langkah selanjutnya adalah membuang *flow-through* dan menempatkan MB Spin Column ke dalam Collection Tube 2 ml yang baru (disediakan). lalu disentrifugasi hingga 12.400 x g selama 3 menit dan menempatkan MB Spin Column dengan hati-hati ke dalam *Elutin Tube* (Tabung Elusi) 1,5 ml yang baru (tersedia). Setelah itu menambahkan 75  $\mu$ l C6 ke tengah membran filter putih dan mensentrifugasi pada 12.400 x g selama 2 menit. Setelah itu, MB spin column dibuang. Dan proses ekstraksi DNA telah selesai dan dilakukan uji kuantifikasi DNA.

b. Uji kuantifikasi DNA menggunakan Fluorometer

Pengujian dilakukan dengan menggunakan Fluorometer dari Promega<sup>®</sup> Quantus Fluorometer. Protokol yang digunakan sesuai dengan protokol alat tersebut. Hal yang dilakukan pertama kali yaitu memberi identitas sampel pada *tube* berukuran 0,5 ml, setelah itu memasukkan

cairan *fluoro dye* (QuantiFluor<sup>®</sup> ONE dsDNA Dye) sebagai pewarna DNA sebanyak 200 µl dengan menghindari dari terkena cahaya matahari karena dapat merusak cairan *fluoro dye* tersebut. Setelah itu, 1 µl DNA yang sudah diekstraksi diambil dan dimasukkan ke dalam *tube* 0,5 ml dengan cara diresuspensikan dan dihomogenkan menggunakan vortex secukupnya setelah itu dispin. Kemudian dimasukkan ke dalam alat Fluorometer dan hasil akan langsung muncul dengan satuan ng/µl.

### c. PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Target PCR kali ini adalah fragmen gen D-Loop mtDNA rusa timor (*Rusa timorensis*). Primer yang digunakan adalah primer RTF (*forward*) 5''AAACCAGAAAAGGAGAGCAAC3'' dengan  $T_m = 57,4^{\circ}\text{C}$  dan RTR (*reverse*) 5''TCATCTAGGCATTTTCAGTGCC3'' dengan  $T_m = 60,3^{\circ}\text{C}$  yang menempel pada fragmen D-Loop mtDNA. Primer ini diperoleh dari penelitian Zein (2007) dengan panjang target produk PCR  $\pm 1200$  bp.

Tahap pertama yang dilakukan adalah mensterilkan tempat yang akan dipakai untuk mencampur komposisi PCR menggunakan etanol, kemudian memberi identitas pada *tube* yang akan digunakan, dan meracik semua komposisi dan dimasukkan ke dalam *tube* dengan urutan sebagai berikut; 1). Water/ddH<sub>2</sub>O, 2). PCR mix, 3). Primer, 4). DNA Template/sampel DNA. PCR mix yang digunakan adalah merek Tiangen.

Komposisi yang digunakan adalah sebagai berikut;

Tabel 2. Komposisi Untuk PCR

<b>Komponen</b>	<b>Volume</b>
DNA Template	3 $\mu$ L
Primer (F+R) (0.2 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
PCR Mix	12,5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O ( <i>Nuclease Free Water</i> )	8,5 $\mu$ L
<b>Total Volume</b>	<b>25 <math>\mu</math>L</b>

Setelah semua komposisi dimasukkan ke dalam *tube*, kemudian sampel dihomogenkan menggunakan vortex dan di-*spin down* menggunakan *spinner* agar cairan turun ke dasar *tube*. Dan setelah itu dimasukkan ke dalam *Thermal Cycle*.

PCR ini dilakukan dengan mesin *Thermal Cycle* dengan konfigurasi sebagai berikut; Pra denaturasi selama 5 menit dengan suhu 95°C, Denaturasi selama 30 detik dengan suhu 95°C, suhu *Annaeling* 60°C selama 30 detik, Elongasi suhunya 72°C selama 1 menit dan post elongasi suhunya 72°C selama 10 menit. Setelah itu suhunya turun menjadi 4°C sampai ke proses selanjutnya. Siklus dari mulai denaturasi hingga elongasi sebanyak 35 kali.

d. Elektroforesis hasil PCR

Produk PCR perlu dianalisis dengan melihat ada atau tidaknya pita

DNA target yang berhasil teramplifikasi. Cara untuk memvisualisasikan hal tersebut adalah dengan cara menggunakan elektroforesis.

Hal yang pertama kali dilakukan dalam proses elektroforesis adalah membuat gel agarose terlebih dahulu, gel agarose yang digunakan untuk melihat hasil PCR kali ini konsentrasinya yaitu 2%. Gel tersebut dibuat dari bubuk agarose yang ditimbang sebanyak 1 gram (untuk hasil 50 ml gel agarose), dan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer serta ditambahkan larutan TBE 1x sebanyak 50 ml. Setelah agak tercampur lalu tabung erlenmeyer dimasukkan ke dalam microwave/oven selama 2 menit dengan suhu medium. Kemudian tabung erlenmeyer diangkat, dikeluarkan dan didiamkan sebentar pada suhu ruangan. Selanjutnya ditambahkan gel staining dengan konsentrasi 10000x sebagai pewarna untuk DNA sebanyak 5  $\mu$ l dan dihomogenkan dengan cara menggoyangkan tabung erlenmeyer secara perlahan agar tidak ada gelembung udara. Jika dirasa sudah tercampur dengan rata dan agak dingin, lalu cairan gel dituangkan ke dalam cetakan lalu cetakan sumur dipasang secara presisi.

Setelah gel mengeras, lalu cetakan sumur dicabut dan gel tersebut dimasukkan ke dalam alat elektroforesis yang sudah diisi oleh larutan TBE 1x. Proses elektroforesis selanjutnya adalah memasukkan produk PCR ke dalam sumur-sumur yang ada di gel. Sebelum memasukkan produk PCR, terlebih dahulu memasukkan DNA *ladder* sebagai patokan panjang pita DNA target. DNA *ladder* dimasukkan sebanyak 5  $\mu$ l dan produk PCR sebanyak 7,5  $\mu$ l. Setelah semuanya siap, lalu pasang kabel dan juga kamera

untuk memulai elektroforesis. Dan juga mengatur voltase arus listrik yang akan digunakan sebesar 100 volt selama 30 menit. Lalu tekan tombol start pada mesin elektroforesis dan tunggu hasilnya selama 30 menit. Setiap 10 menit proses elektroforesis dilakukan pemotretan gel menggunakan kamera yang sudah dipasang sembari menekan tombol lampu ultraviolet pada mesin.

e. Sekuensing

Proses sekuensing dilakukan dengan mengirimkan sampel ke LPPT UGM dengan menggunakan metode Sanger Sekuenser. Sebanyak 20 sampel dengan volume masing-masing sebesar 25 ul dan primer *forward* dan *reverse* masing-masing sebesar 15 ul dikirimkan ke LPPT UGM untuk dilakukan proses sekuensing.

## G. Teknik Pengambilan Data

1. Pengambilan sampel di lapangan dilakukan dengan mendata menggunakan Microsoft Excel berdasarkan lokasi ditemukannya dan kualitas sampel yang didapatkan, juga mendata titik posisi ditemukannya sampel menggunakan GPS.
2. Pemilihan sampel dilakukan dengan melihat kode kualitas sampel yang ada tabung penyimpanan sampel untuk memilih sampel terbaik yang akan diekstraksi. Hasil seleksi sampel juga didata menggunakan software Microsoft Excel.
3. Data hasil ekstraksi DNA dilakukan setelah tahap kuantifikasi DNA yaitu menghitung konsentrasi DNA yang didapatkan dari proses ekstraksi



menggunakan alat Flourometer, kemudian dicatat dan dimasukkan datanya ke dalam software Micosoft Excel.

4. Pengambilan data hasil PCR dilakukan dengan cara visualisasi produk PCR menggunakan elektroforesis, hasil elektroforesis di foto menggunakan kamera. Hasil foto diberi identitas sampel dengan menggunakan *software* Adobe Photoshop.
5. Analisis data sekuensing berupa Scoring/basecaller dilakukan dengan *SeqA software* oleh petugas LPPT UGM.

#### **H. Teknik Analisis Data**

*Sequence alignment* dan perbaikan data hasil sekuensing diproses menggunakan *software* BioEdit versi 7.2.5. Urutan hasil sekuensing dibandingkan dengan *data base* yang ada di GenBank (NCBI) menggunakan analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk mencari mencari spesies yang paling mendekati kemiripannya dengan sekuens sampel, berbasis kesamaan antara urutan sekuens sampel dan sekuens dari *data base*. Posisi SNPs (*Single Nucleotid Polymorphism*) dan estimasi jarak genetik diidentifikasi dengan membandingkan semua sekuens sampel yang diperoleh dari penelitian ini dan dari sekuens rusa timor yang diperoleh dari GenBank (NCBI) dengan nomor akses AF291883.

Pengukuran keragaman nukleotida, kergaman haplotipe menggunakan *software* DnaSP versi 6.12.03, dan rekonstruksi pohon filogeografi dan estimasi jarak genetik dilakukan menggunakan *software*

MEGA-X versi 10.2.5. Rekonstruksi pohon filogeografi dilakukan dengan membandingkan semua sampel sekuens rusa timor (*Rusa timorensis*) pada penelitian ini dengan sekuens rusa timor (*Rusa timorensis*) yang diperoleh dari GenBank (NCBI) dengan nomor akses AF291883, serta membandingkan dengan *outgrup* yang diperoleh dari GenBank (NCBI) yaitu jenis rusa sambar (*Rusa unicolor*) dari Sumatra (MF177004), Timor (MF177003), dan Jawa (MF177009), serta rusa sika dari Jepang *Rusa nippon nippon* (AF291878), Vietnam *Rusa nippon pseudaxis* (AF291881), Taiwan *Rusa nippon taiouanus* (AF291879).

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Ekstraksi dan kuantifikasi DNA

Sampel feses yang berhasil terkoleksi berasal dari 15 titik lokasi yang tersebar di Taman Nasional Baluran, Alas Purwo, dan Bali Barat (Gambar 7). Setelah diseleksi kualitas sampelnya, didapatkan hanya 13 titik lokasi yang sampelnya layak untuk dilakukan proses ekstraksi. Sampel feses yang diekstraksi termasuk ke dalam kategori segar (K1) dan sedang (K2) yang diperoleh dari 13 lokasi yang tersebar di Taman Nasional Baluran, Alas Purwo, dan Bali Barat. Sampel yang berhasil terekstraksi sebanyak 211 sampel (Lampiran 1). Sampel tersebut terdistribusi secara merata pada 13 titik lokasi di ketiga taman nasional, sehingga diharapkan telah mewakili populasi rusa timor di ketiga lokasi tersebut (Gambar 7).



Gambar 7. Peta lokasi pengambilan sampel feses rusa timor di Jawa dan Bali

Ekstraksi DNA dari sampel feses dilakukan menggunakan protokol dari Qiagen<sup>®</sup> DNeasy Power Soil Pro Kit yang telah dimodifikasi, kemudian dikuantifikasi menggunakan Promega<sup>®</sup> Quantus Fluorometer (lampiran 1). Rerata kuantitas DNA yang diperoleh dari tahap kuantifikasi yaitu 58,14 ng/ $\mu$ l, dengan nilai tertinggi yaitu 281 ng/ $\mu$ l dan nilai terendah yaitu 3,48 ng/ $\mu$ l.

Prinsip dasar dari ekstraksi DNA yaitu serangkaian proses yang dilakukan untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen lainnya seperti protein dan lain-lain. Hasil ekstraksi tersebut merupakan tahap awal dan penting untuk proses selanjutnya, seperti tahap PCR dan sekuensing (Lante, 2010). Proses ekstraksi dilakukan dengan mengacu pada instruksi buku manual yang disediakan oleh Qiagen<sup>®</sup> DNeasy Power Soil Pro Kit. Kit ini utamanya diperuntukkan untuk isolasi DNA mikroba dari semua jenis tanah, termasuk sampel yang sulit seperti: kompos, sedimen, dan pupuk kandang. Tetapi bisa juga digunakan untuk *stool sample* seperti feses rusa yang digunakan pada penelitian ini.

Tim penelitian rusa yang dilakukan oleh penulis juga meneliti tentang semua jenis DNA yang ada di dalam feses rusa, diantaranya yaitu DNA mikroba, yeast/jamur, patogen-patogen yang ada di feses rusa, tanaman yang dimakan rusa, dan pada penelitian ini utamanya adalah digunakan untuk mengisolasi DNA dari rusa itu sendiri. Maka dari itu, Qiagen<sup>®</sup> DNeasy Power Soil Pro Kit dipilih sebagai kit yang ideal untuk mengisolasi semua jenis DNA yang diinginkan oleh tim penelitian.

Modifikasi yang dilakukan adalah dengan mengganti berat sampel yang dimasukkan ke dalam *tube*, pada protokol aslinya sampel yang disarankan tidak lebih dari 250 mg, akan tetapi modifikasi yang dilakukan yaitu dengan meringankan berat sampel menjadi 75 mg, hal ini dilakukan karena untuk lebih mengoptimalkan kerja reagen yang dipakai untuk ekstraksi. Modifikasi lain yang dilakukan adalah dengan menambahkan inkubasi pada tahapan ekstraksi yang pada protokol aslinya tidak ada, inkubasi dilakukan selama 15 menit pada suhu 65°C, hal tersebut bertujuan untuk membantu melisiskan sel. Menurut Langga *et al* (2012), penambahan proses inkubasi 65°C dapat memaksimalkan keluarnya DNA dari sel dan protein dapat terdegradasi dari dinding sel secara optimal.

Protokol ekstraksi DNA Qiagen® DNeasy Power Soil Pro Kit memiliki 6 tahap utama, yaitu tahap persiapan sampel, lisis sel, IRT (*Inhibitor Removal Technology*), *bind* DNA, *wash*, dan elusi (Gambar 6). Setelah sampel dan larutan CD1 dimasukkan ke dalam PowerBead Pro Tube (tahap persiapan), langkah berikutnya yaitu homogenisasi dan prosedur lisis. PowerBead Pro Tube yang berisi larutan CD1 berfungsi membantu menyebarkan partikel sampel, melarutkan asam humat, dan melindungi asam nukleat dari degradasi. Proses inkubasi 65°C selama 15 menit membantu mengoptimalkan proses lisinya sel. Vortexing dilakukan untuk mencampur komponen dalam PowerBead Pro Tube dan mulai menyebarkan dan menghomogenkan sampel dalam reagen untuk melisiskan sel.

Setelah itu, supernatan dipindahkan ke dalam Tabung Microcentrifuge 2 ml yang bersih (disediakan) lalu ditambah larutan CD2 dan divortex selama 5 detik. larutan CD2 mengandung IRT (*Inhibitor Removal Technology*) yang merupakan

reagen yang dapat mengendapkan bahan organik non-DNA dan anorganik termasuk zat humat, kotoran atau debris sel, serta protein. reagen ini berfungsi untuk menghilangkan bahan organik dan anorganik yang mencemari DNA sehingga dapat mengurangi kemurnian DNA.

Tahap *binding* DNA yaitu tahap pengikatan DNA, tahap ini dilakukan dengan cara menambahkan larutan CD3 yang merupakan larutan garam ber-konsentrasi tinggi. Karena DNA dapat berikatan erat dengan silika pada konsentrasi garam tinggi, reagen CD3 akan menyesuaikan konsentrasi larutan garam DNA untuk memungkinkan pengikatan DNA, tetapi bukan bahan organik non-DNA dan anorganik yang mungkin masih ada. Kemudian 600  $\mu$ l *lysate* dipindahkan ke dalam MB Spin Column yang mempunyai membran filter silika. DNA secara selektif terikat pada membran filter silika di MB Spin Column dengan adanya larutan garam tinggi. Sedangkan kontaminan melewati membran filter, dan hanya menyisakan DNA yang terikat pada membran.

Tahap *wash* dilakukan untuk mencuci dan membersihkan DNA dari kontaminan-kontaminan yang masih terbawa. Tahap ini dilakukan dengan dua larutan, yaitu larutan EA dan larutan C5. Larutan EA adalah buffer pencuci yang berfungsi menghilangkan protein dan kontaminan non-air lainnya dari membran filter MB Spin Column. Sedangkan larutan C5 adalah larutan pencuci berbasis etanol yang digunakan untuk lebih membersihkan DNA yang terikat pada membran filter silika pada MB Spin Column. Larutan pencuci ini menghilangkan sisa garam, asam humat, dan kontaminan lainnya sambil membiarkan DNA tetap terikat pada membran silika. Sebelum lanjut ke tahap terakhir, MB Spin Column yang berisi

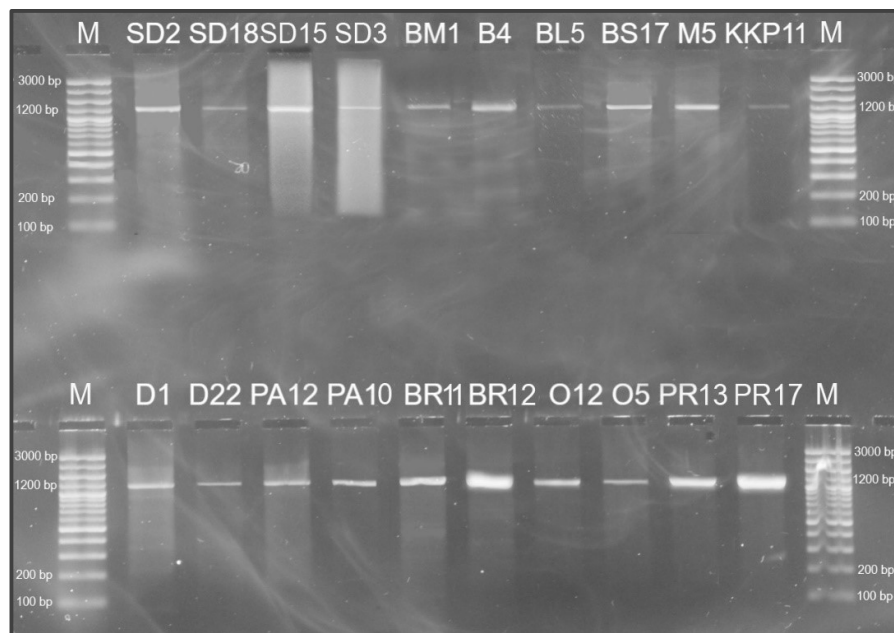
DNA tersebut disentrifugasi sebanyak dua kali, hal itu dilakukan dengan tujuan untuk memastikan tidak ada lagi larutan C5 yang tersisa karena etanol di dalamnya dapat mengganggu proses aplikasi DNA pada tahap selanjutnya, seperti PCR maupun elektroforesis gel.

Tahap terakhir yaitu tahap elusi, tahap ini bertujuan untuk melepaskan DNA dari membran filter silika. Larutan C6 yang mengandung 10 mM Tris yang diteteskan di tengah membran putih kecil akan memastikan seluruh membran basah, hal ini akan menghasilkan pelepasan DNA yang lebih efisien dan lengkap dari membran filter MB Spin Column. Saat Larutan C6 melewati membran silika, DNA yang terikat oleh adanya konsentrasi garam yang tinggi secara selektif dilepaskan oleh larutan C6. Setelah itu dilakukan uji kuantifikasi dan sisanya disimpan pada *freezer* pada suhu  $-30$  sampai  $-15^{\circ}\text{C}$  atau  $-90$  sampai  $-65^{\circ}\text{C}$  karena larutan C6 tidak mengandung EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*) yang berperan menginaktivasi enzim DNase yang dapat mendenaturasi DNA yang telah terekstraksi, EDTA menginaktivasi enzim nuklease dengan cara mengikat kalsium dan ion magnesium yang dibutuhkan sebagai kofaktor enzim DNase (Iqbal *et al.*, 2016).

## **B. Amplifikasi DNA dengan metode PCR**

Amplifikasi fragmen DNA mitokondria berhasil dilakukan pada 20 sampel feses rusa timor dengan menggunakan primer RTF (*forward*) 5"AAACCAGAAAAGGAGAGCAAC3" dan RTR (*reverse*) 5"TCATCTAGGCATTTTCAGTGCC3" yang diperoleh dari penelitian M. Syamsul Arifin Zein (2007). Visualisasi hasil amplifikasi DNA dengan metode

PCR dilakukan menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarose 2%. Hasil visualisasi 20 sampel memperlihatkan pita DNA tunggal pada posisi 1200 bp (Gambar 8).



Gambar 8. Visualisasi hasil amplifikasi DNA gen D-Loop mtDNA rusa timor (M=Marker/Ladder; SD2, SD18, SD15, SD3=Sampel dari TN Alas Purwo; BM1, B4, BL5, BS17, M5, KKP11, D1, D22=Sampel dari TN Baluran; PA12, PA10, BR11, BR12, O12, O5, PR13, PR17=Sampel dari TN Bali Barat)

Prinsip teknik PCR adalah memperbanyak bagian spesifik dengan enzim DNA polimerase yang diinisiasi oleh pelekatan primer dengan menghubungkan deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dalam reaksi termal (Raven dan Johson, 2002 dalam Yustinadewi *et al.*, 2018). Komponen-komponen yang dibutuhkan dalam proses PCR adalah DNA sampel sebagai DNA tamplate, Deoxynucleotide trifosfat (dNTP), sepasang primer yaitu nukleotida pendek untuk mengawali reaksi polimerisasi, enzim DNA polymerase untuk mengkatalis reaksi pemanjangan



primer, ddH<sub>2</sub>O, magnesium klorida (MgCl<sub>2</sub>), dan *buffer* PCR sebagai pelarut (Handoyo & Rudiretna, 2001; Innis *et al.*, 2014). Dalam penelitian ini menggunakan primer forward RTR sepanjang 21 bp dan primer reverse RTF sepanjang 22 bp, mesin PCR yang digunakan adalah MultiGene™ Optimax *Thermal Cycle* dan enzim yang digunakan yaitu 2×Taq Tiangen® PCR Mix.

Tahapan proses amplifikasi fragmen D-Loop mtDNA rusa timor menggunakan teknik PCR dimulai dari tahap pra denaturasi selama 5 menit dengan suhu 95°C, tahap ini dilakukan guna memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifkan DNA Polymerase (Oktafiani, 2013). Kemudian dilanjutkan ke tahap denaturasi selama 30 detik dengan suhu 95°C, tahap ini bertujuan untuk membuka untai ganda DNA menjadi untai tunggal (Aminah *et al.*, 2019). Tahap ini sangat penting dalam proses PCR, jika waktu denaturasi terlalu lama maka akan mempengaruhi enzim yang ada di dalam PCR Mix dan akan mempengaruhi keberhasilan proses PCR (Kurniawati *et al.*, 2019). Selanjutnya suhu diturunkan menjadi 60°C selama 30 detik, suhu dan waktu tersebut optimum untuk tahap *annaeling*, penurunan suhu (*annealing*) merupakan pelekatan primer pada DNA untai tunggal. Primer RTF akan menempel pada pangkal (*forward*) dan primer RTR pada ujung (*reverse*) masing-masing DNA tunggal. Tahap ini berfungsi untuk penempelan primer setelah rantai ganda DNA terbuka. Pemilihan suhu *annaeling* yang terlalu rendah akan menyebabkan penempelan primer tidak spesifik dan jika suhu terlalu tinggi maka akan menyebabkan ikatan primer dan DNA template sulit terbentuk (Amanda *et al.*, 2019; Kurniawati *et al.*, 2019). Setelah tahap *annaeling* kemudian suhu dinaikan ke 72°C selama 1 menit, maka primer dengan bantuan

enzim yang terdapat di dalam PCR mix akan membentuk untai DNA sesuai dengan runutan DNA yang terbelah, sehingga akan membentuk dua buah DNA tunggal yang baru dan tahapan ini disebut *elongasi/extension* (Kurniawati *et al.*, 2019). Tahap terakhir yaitu *post elongasi* atau *post extension*, suhu pada tahap ini yaitu 72°C dan waktunya selama 10 menit. Tahap ini memberi kesempatan bagi enzim yang terdapat di dalam PCR mix yang belum menyelesaikan reaksinya sehingga tidak ada pembentukan DNA baru yang belum selesai (Kurniawati *et al.*, 2019). Siklus dari mulai denaturasi hingga *elongasi* dilakukan sebanyak 35 kali, di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Aminah *et al.*, 2019). Setelah proses amplifikasi selesai, suhunya turun menjadi 4°C untuk mengakhiri proses amplifikasi sekaligus melanjutkan ke proses selanjutnya yaitu visualisasi produk PCR.

Produk PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Proses elektroforesis dijalankan dengan menghubungkan tank elektroforesis dengan sumber listrik. Kabel merah sebagai penghubung arus positif dihubungkan pada stop kontak negatif (katoda) dan kabel hitam sebagai penghubung arus negatif dihubungkan pada stop kontak positif (anoda). Tegangan listrik yang digunakan 100-150 volt dengan waktu  $\pm 30$  menit. Dengan adanya arus listrik ini, membuat molekul DNA bermigrasi dari kutub negatif ke kutub positif sesuai dengan ukuran pasangannya (Kurniawati *et al.*, 2019). Kemudian hasil elektroforesis tersebut didokumentasikan dengan cara menyalakan sinar UV yang ada di alat elektroforesis dan memfotonya menggunakan kamera.

Pada (Gambar 7) tampak bahwa hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA tunggal pada posisi 1200 bp. Beberapa sampel pitanya ada yang tampak tebal dan ada yang tampak pudar. Hal tersebut menunjukkan konsentrasi DNA yang berhasil diamplifikasi. Pita yang tampak tebal menunjukkan konsentrasi DNA yang berhasil diamplifikasi banyak, begitu pula sebaliknya. Pita yang tampak tipis yaitu pada sampel SD18, BL5, dan KKP11. Ketiga sampel tersebut memiliki konsentrasi DNA yang sedikit berdasarkan visualisasi elektroforesis. Hal tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu konsentrasi DNA template rusa timor di ketiga sampel tersebut memang sedikit atau tidak optimalnya proses PCR.

### **C. Pembacaan urutan nukleotida melalui sekuensing**

Sebanyak 20 sampel yang telah diamplifikasi dengan PCR kemudian disekuensing menggunakan primer RTF dan RTR. Panjang sekuens yang diperoleh dari hasil sekuensing yaitu  $\pm$  1200 bp (Lampiran 2). Sedangkan yang terbaca dengan jelas dan digunakan untuk analisis yaitu 769 bp (Lampiran 3).

Sekuensing DNA merupakan metode untuk membaca urutan basa nukleotida dalam suatu fragmen DNA yang telah diamplifikasi melalui proses PCR (Ghaffar, 2007). Urutan basa nukleotida yang dibaca melalui proses sekuensing adalah adenin, timin, guanin, dan sitosin. Metode sekuensing yang dilakukan pada penelitian ini adalah metode Sanger. Metode ini prinsip kerjanya yaitu dengan terminasi sintesis DNA oleh dideoksinukleotida yang ditempatkan pada empat tabung berbeda. Proses ini akan menghasilkan *chain terminating dideoxynucleotide* sehingga terbentuk beberapa fragmen dengan ukuran yang bermacam-macam (Cooper, 1997; Fairbanks & Andersen, 1999). Metode Sanger mempunyai nama

lain metode terminasi rantai, metode ini dimulai dari memperbanyak fragmen DNA melalui reaksi PCR untuk. Guna membentuk molekul DNA, diperlukan *Deoxynucleoside Triphosphates* (dNTP) sebagai bahan utamanya, sedangkan untuk menghentikan pembentukan molekul DNA diperlukan *Dideoxynucleoside Triphosphates* (ddNTP) (Muladno, 2002). Metode ini bekerja dengan memanfaatkan dua sifat enzim DNA polymerase, yaitu kemampuan dalam membentuk molekul DNA dengan adanya dNTP dan ketidakmampuan membedakan antara dNTP dan ddNTP (Sanger *et al.*, 1977).

Pembacaan urutan nukleotida dilakukan di LPPT UGM melalui analisis sekuensing menggunakan mesin sekuensing Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer 2500 (Lampiran 2). Hasil pembacaan urutan nukleotida menggunakan analisis sekuensing cukup baik, meskipun masih ditemukan pembacaan yang kurang jelas khususnya pada 20 – 50 basa pertama. Sebelum ke tahap selanjutnya, dilakukan analisis kualitas pembacaan terlebih dahulu terhadap hasil sekuensing, yaitu dengan melihat kromatogramnya. Analisis ini dilakukan menggunakan perangkat lunak BioEdit versi 7.2.5. Beberapa sampel menampakkan kromatogram yang tumpang tindih sehingga pembacaan urutan nukleotidanya tidak jelas. Kromatogram yang berkualitas tinggi ditandai dengan puncak yang dihasilkan jelas dan tidak saling tumpang tindih antara puncak satu dengan puncak yang lain (Taariwuan *et al.*, 2021).

Hasil baca yang kurang begitu jelas itu cukup sering terjadi pada proses sekuensing yang umumnya disebabkan oleh separasi fragmen yang belum optimal pada proses awal sekuensing di mesin sekuensing Applied Biosystem 3500 Genetic

Analyzer 2500. Penggunaan primer PCR untuk primer sekuensing juga dapat mengakibatkan hasil baca yang kurang jelas. Hal tersebut dikarenakan produk nonspesifik yang berada pada produk PCR akan terakumulasi pada saat proses sekuensing akibat penggunaan primer yang sama (Savira, 2012). Oleh sebab itu, permasalahan tersebut umumnya dapat diatasi dengan cara menggunakan primer internal untuk meningkatkan spesifitas karena primer internal tidak akan melekat pada produk PCR nonspesifik (Eton Bioscience, 2003). Namun demikian, sekuensing dua arah menggunakan primer *forward* dan *reverse* yang telah dilakukan dapat menampakkan hasil baca yang cukup jelas sehingga penelitian tetap dilanjutkan menggunakan primer yang sama dengan primer yang digunakan pada proses PCR.

#### **D. Analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dan SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisme*)**

Urutan hasil sekuensing dibandingkan dengan *data base* yang ada di GenBank (NCBI) menggunakan analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), hal ini dilakukan guna mengidentifikasi spesies dari sekuens yang dianalisis dengan cara mencari spesies yang paling mendekati tingkat kemiripannya dengan sekuens sampel. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa seluruh sekuens fragmen D-Loop mtDNA pada penelitian ini terkonfirmasi milik spesies *Rusa timorensis* dengan melihat *percent identity* semua sampel >98% (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil BLAST gen D-Loop

Lokasi	Kode Sampel	Spesies	Alligment BLAST-n gen D-Loop			
			Query -cover	Ident (%)	Nomor Akses	Deskripsi
TN Alas Purwo	SD2	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.10%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	SD3	<i>Rusa timorensis</i>	100%	98.97%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	SD15	<i>Rusa timorensis</i>	100%	98.97%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	SD18	<i>Rusa timorensis</i>	100%	98.84%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
TN Baluran	BM1	<i>Rusa timorensis</i>	100%	98.97%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	BM4	<i>Rusa timorensis</i>	100%	98.10%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	BL5	<i>Rusa timorensis</i>	100%	98.97%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	BS17	<i>Rusa timorensis</i>	100%	98.97%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	M5	<i>Rusa timorensis</i>	100%	98.97%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	KKP11	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.36%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	D1	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.23%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
	D22	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.45%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
TN Bali Barat	PA10	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.48%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome

PA12	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.23%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
BR11	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.23%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
BR12	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.10%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
O5	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.23%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
O12	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.23%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
PR13	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.23%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome
PR17	<i>Rusa timorensis</i>	100%	99.23%	JN632699	<i>Rusa timorensis</i> isolate CYTO mitochondrion, complete genome

Hasil analisis BLAST menunjukkan *percent identity* semua sampel >98%, hal ini menunjukkan bahwa sekuens D-Loop mtDNA pada penelitian ini milik spesies *Rusa timorensis* yang mempunyai tingkat kemiripan urutan sekuens dengan data sekuens *Rusa timorensis* isolate CYTO mitochondrion, complete genome (Kode akses : JN632699). Presentase *Query-cover* pada semua sampel penelitian ini menunjukkan hasil 100%, hal ini menandakan bahwa semua sekuens yang dianalisis dapat disejajarkan seluruhnya dengan sekuens yang berada di GenBank (NCBI). *Percent identity* suatu sampel yang dianalisis dapat dikatakan spesies yang sama jika presentase kemiripannya >97%, hal ini seperti yang diungkapkan oleh Hebert *et al* (2003) bahwa jika identitas genetik spesies mempunyai perbedaan sebesar >3% maka spesies tersebut merupakan spesies yang berbeda.

Selain analisis BLAST, sekuens hasil sekuensing kemudian juga dibandingkan dengan sekuens genom D-Loop mtDNA dari rusa timor (*Rusa timorensis*) yang diperoleh dari GenBank (NCBI) dengan nomor akses AF291883. Analisis SNPs menghasilkan 30 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisme*) dan 11 Haplotipe (Tabel 4). 11 Haplotipe tersebut berhasil diidentifikasi pada posisi basa ke- 6, 7, 12, 29, 74, 75, 126, 127, 128, 154, 155, 158, 187, 251, 343, 474, 568, 642, 645, 655, 665, 678, 695, 700, 710, 24, 734, 749, 756, dan 763 dari sekuens yang dianalisis (Gambar 9).

Tabel 4. Persebaran haplotipe gen D-Loop mtDNA rusa timor hasil analisis

Haplotipe	Kode Sampel	Lokasi
Haplotipe 1	SD2, SD15	TN Alas Purwo
Haplotipe 2	SD3	
Haplotipe 3	SD18	
Haplotipe 4	BM1, BL5, BS17, M5	TN Baluran
Haplotipe 5	B4	
Haplotipe 6	KKP11	
Haplotipe 7	D1	
Haplotipe 8	D22	
Haplotipe 9	PA10	TN Bali Barat
Haplotipe 10	PA12, BR11, O5, O12, PR13, PR17	
Haplotipe 11	BR12	



		Nomor situs basa nukleotida																													
No.	Haplotip	1 1 1 1 1 1 1 2 3 4 5 6 6 6 6 6 7 7 7 7 7 7																													
		1	2	7	7	2	2	2	5	5	8	5	4	7	6	4	4	5	6	7	9	0	1	2	3	4	5	6			
		6	7	2	9	4	5	6	7	8	4	5	8	7	1	3	4	8	2	5	5	5	8	5	0	0	4	4	9	6	3
1	AF291883	A	G	T	G	G	C	A	G	T	C	C	C	T	T	C	C	T	C	A	T	C	T	A	C	T	A	T	G	C	C
2	Haplotip 1	G	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	T	T	.	T	G	.	.	G	.	.	G	.	.	G	.	.	.
3	Haplotip 2	.	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	T	T	.	T	G	.	.	G	.	.	G	.	.	G	.	.	.
4	Haplotip 3	.	.	C	T	T	T	G	A	C	.	G	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	G	.	.
5	Haplotip 4	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	.	.	T	T	.	T	G	.	.	G	.	.	G	.	.	G	.	T	.
6	Haplotip 5	.	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	C	T	T	.	T	G	.	.	G	.	.	G	.	.	G	.	.
7	Haplotip 6	.	A	C	T	.	.	.	A	.	T	.	.	C	.	T	T	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	G	.	.
8	Haplotip 7	.	.	C	T	.	.	.	A	.	T	.	.	C	.	T	T	G	.	G	.	.	.	.	.	G	.	.	G	.	T
9	Haplotip 8	.	.	C	T	.	.	.	A	.	T	.	.	C	.	T	T	.	G	G	T	G	.	G	G	C	G	T	.	T	
10	Haplotip 9	.	.	C	T	.	.	.	A	.	T	.	.	C	.	T	T	.	G	.	.	.	.	.	G	.	.	G	.	.	
11	Haplotip 10	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	T	.	.	T	T	.	T	G	.	.	G	.	.	G	.	.	G	.	.
12	Haplotip 11	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	.	.	T	T	.	T	G	.	.	G	.	.	G	.	.	G	.	.	

TN ALAS PURWO
  TN BALURAN
  TN BALI BARAT

Gambar 9. Letak polimorfisme pada setiap haplotipe gen D-Loop mtDNA rusa timor (AF291883 = sekuens rusa timor dari GenBank NCBI)

Variasi genetik merupakan variasi atau keragaman yang terjadi pada genom suatu organisme baik pada kromosom, gen, maupun basa nukleotida. Pada tingkat dasar, variasi genetik ditunjukkan oleh perbedaan urutan basa nukleotida yang terdiri dari adenin, guanin, timin, dan sitosin yang membentuk DNA dalam suatu sel (Harrison *et al.*, 2004).

Panjang sekuens yang diperoleh dari penelitian ini dan dapat dianalisis dengan baik adalah sepanjang 769 bp (Lampiran 3). Hasil sekuensing menunjukkan keberadaan 30 SNPs, yang semuanya terdistribusi pada daerah D-loop. Daerah D-loop (*control region*) merupakan daerah yang paling banyak terjadi variasi dari keseluruhan genome mtDNA mamalia. Hal tersebut disebabkan karena daerah D-loop lebih mudah mengakumulasi mutasi akibat dari pemaparan terhadap produk sampingan respirasi (radikal bebas) yang tidak diimbangi dengan adanya sistem

perbaikan yang berakibat pada lebih mudahnya daerah D-loop untuk mengakumulasi substitusi nukleotida (Stewart & Baker, 1994 dan Fernando *et al.*, 2000 dalam Savira, 2012).

#### E. Tingkat variasi genetik dan distribusi variasi genetik di dalam populasi

Analisis tingkat variasi genetik dan distribusi variasi genetik di dalam populasi dilakukan dengan menggunakan 20 sampel dengan 4 sampel berasal dari TN Alas Purwo, 8 sampel berasal dari TN Baluran, dan 8 sampel berasal dari TN Bali Barat. Dan jumlah haplotipe yang berhasil diidentifikasi sebanyak 11 haplotipe. Variasi genetik pada semua populasi mempunyai nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) sebesar 0.00588, dan keragaman haplotipe (Hd) sebesar 0.88421 (Tabel 5).

Tabel 5. Keragaman genetik berdasarkan gen D-Loop mtDNA rusa timor (*Rusa timorensis*) di Jawa dan Bali

Lokasi	Keragaman genetik			
	n	Hn	Hd	$\pi$
Alas Purwo	4	3	0.83333	0.00261
Baluran	8	5	0.78571	0.00950
Bali Barat	8	3	0.46429	0.00228
Semua Populasi	20	11	0.88421	0.00588

Keterangan : n = jumlah sekuens, Hn = jumlah haplotipe, Hd = keragaman haplotipe,  $\pi$  = keragaman nukleotida

Taman Nasional Baluran memiliki keragaman nukleotida ( $\pi$ ) yang paling tinggi dengan nilai  $\pi = 0.00950$ , sedangkan keragaman haplotipe (Hd) yang paling tinggi ditemukan pada Taman Nasional Alas Purwo dengan nilai Hd = 0.83333.

Jumlah haplotipe paling banyak terdapat di Taman Nasional Baluran dengan jumlah haplotipe yang berhasil dianalisis sebanyak 5 haplotipe (Tabel 5).

Salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur variasi genetik adalah keragaman nukleotida ( $\pi$ ). Kelebihan menggunakan parameter ini yaitu tidak tergantung pada besarnya populasi dan sampel (Hartl & Clark, 1990). Keragaman nukleotida ( $\pi$ ) pada penelitian ini menunjukkan hasil 0.00588. Menurut Nei (1987), besarnya keragaman nukleotida umumnya bervariasi antara 0,002 sampai 0,019.

Selain menggunakan parameter keragaman nukleotida ( $\pi$ ), keragaman genetik rusa timor (*Rusa timorensis*) di taman nasional Alas Purwo, Baluran, dan Bali Barat juga menggunakan parameter keragaman haplotipe ( $H_d$ ), hasil keragaman haplotipe ( $H_d$ ) yang diperoleh cukup tinggi yaitu 0.88421. Hasil tersebut lebih tinggi dibandingkan dari hasil yang dilaporkan oleh M Syamsul A Zein (2007) bahwa keragaman haplotipe rusa timor di Pulau Timor sebesar 0,5575.

Keragaman yang tinggi ini bisa disebabkan karena sampel yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari alam liar dan bukan berasal dari penangkaran, sampel yang diambil dari alam liar mempunyai daya jelajah yang cukup luas sehingga memungkinkan untuk kawin acak sehingga tidak terjadi *inbreeding* yang dapat menyebabkan variasi genetik menjadi rendah. Selain itu, ditemukan hasil variasi genetik tertinggi yang diperoleh dari satu pulau yang sama yaitu di pulau Jawa (Taman Nasional Alas Purwo :  $H_d = 0.83333$ ,  $\pi = 0.00261$ , dan Baluran :  $H_d = 0.78571$ ,  $\pi = 0.00950$ ). Hal ini mengindikasikan bahwa tingginya variasi genetik di kedua lokasi tersebut disebabkan oleh adanya migrasi dan *gene flow* karena

lokasinya yang masih satu pulau. Begitu pula sebaliknya, rendahnya variasi genetik di pulau Bali (Taman Nasional Bali Barat :  $Hd = 0.46429$ ,  $\pi = 0.00228$ ) disebabkan oleh tidak adanya *gene flow* antar populasi karena isolasi wilayah yang dibatasi oleh selat Bali. Tinggi rendahnya variasi genetik tidak hanya dipengaruhi oleh faktor-faktor yang telah disebutkan di atas, namun ada juga faktor lain yang dapat mempengaruhi tinggi rendahnya variasi genetik, diantaranya yaitu ukuran populasi, mutasi, rekombinasi dan migrasi (Griffiths *et al.*, 2000).

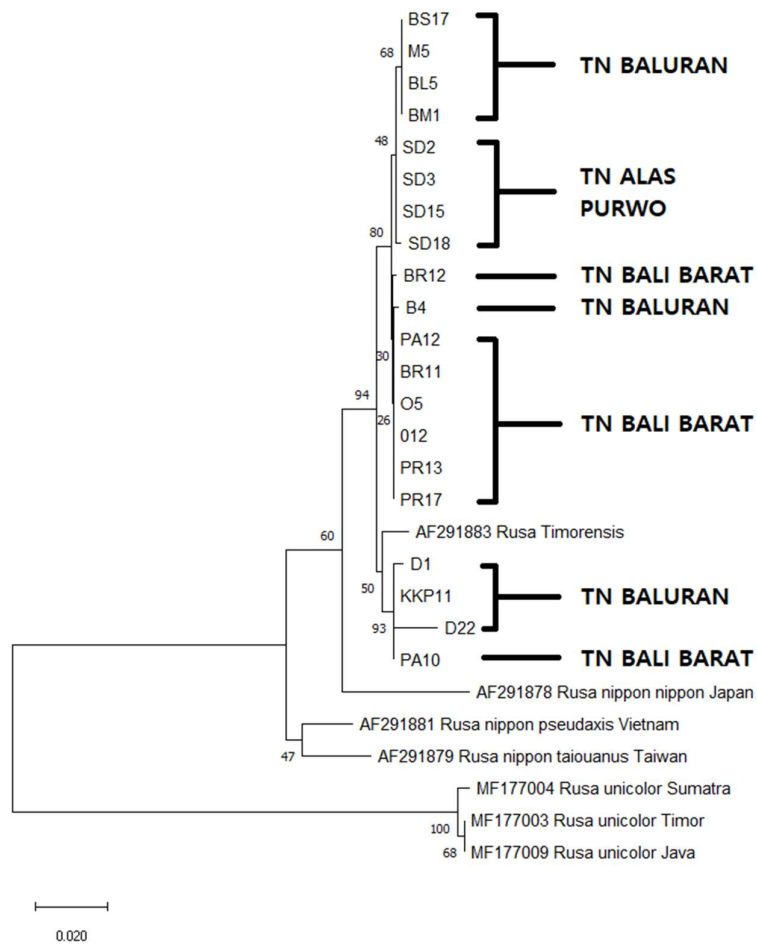
Keragaman haplotipe yang tinggi akan diikuti dengan keragaman genetik yang tinggi pula dan begitu juga sebaliknya. Keragaman haplotipe dan keragaman nukleotida mtDNA merupakan dua indikator penting untuk menilai polimorfisme populasi dan diferensiasi genetik (Pereira *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2013). Liu *et al.* (2006) dan Liu *et al.* (2007) mengungkapkan bahwa keragaman populasi yang tinggi ditunjukkan oleh nilai keragaman haplotipe dan keragaman nukleotida mtDNA yang tinggi. Keragaman genetik yang rendah menunjukkan adanya *inbreeding*.

Informasi mengenai variasi genetik, baik keragaman haplotipe maupun keragaman nukleotida sangatlah penting untuk memprediksi keadaan populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di ketiga kawasan konservasi ini. Penerapan DNA marker ini akan memberikan informasi yang lebih jelas dalam mengamati struktur populasi maupun menyusun manajemen konservasi. Hal ini dikarenakan analisis molekuler menggunakan DNA marker merupakan indikator yang akurat dalam melihat dinamika dan struktur populasi (Avise *et al.*, 1987; Hishe *et al.*, 1998 dalam Zein, 2007).

## **F. Analisis filogeografi dan estimasi jarak genetik**

Filogeografi merupakan ilmu yang menggabungkan filogenetik dan geografi, serta mempelajari proses distribusi geografis dari garis keturunan suatu spesies (Hilhanif, 2018b). Metode yang digunakan untuk mengukur jarak genetik adalah *Neighbor-Joining* yang didasarkan pada prinsip evolusi minimum dengan perkiraan panjang cabang atau *branch length* (Nei & Kumar, 2000).

Rekonstruksi pohon filogeografi dilakukan dengan membandingkan semua sampel sekuens rusa timor (*Rusa timorensis*) dari penelitian ini dengan sekuens rusa timor (*Rusa timorensis*) yang diperoleh dari GenBank (NCBI) dengan nomor akses AF291883. Serta juga membandingkan dengan *outgrup* yang diperoleh dari GenBank (NCBI) yaitu jenis rusa Sambar (*Rusa unicolor*) dari Sumatra (MF177004), Timor (MF177003), dan Jawa (MF177009), serta rusa Sika dari Jepang *Rusa nippon nippon* (AF291878), Vietnam *Rusa nippon pseudaxis* (AF291881), Taiwan *Rusa nippon taiouanus* (AF291879). Analisis filogeografi dilakukan dengan membuat pohon filogenetik menggunakan metode Neighbor-joining berdasarkan Kimura-2 parameter dengan perhitungan *bootstrap* sebanyak 1000 kali menggunakan *software* MEGA-X versi 10.2.5.



Gambar 10. Rekonstruksi pohon filogeografi rusa timor hasil dari analisis filogenetik

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada masing-masing populasi memiliki nenek moyang yang sama (Gambar 10). Sekuens rusa timor yang diperoleh dari NCBI (AF291883) memiliki cabang yang paling panjang dibandingkan dengan sekuens rusa timor yang diperoleh dari penelitian ini (Gambar 10). Hal ini menunjukkan bahwa AF291883 telah mengalami evolusi yang paling panjang dibandingkan dengan sekuens rusa timor lainnya, sehingga terdapat banyak perubahan basa nukleotida yang dimilikinya. Begitu pula sebaliknya, cabang yang

terpendek mempunyai proses evolusi yang relatif singkat dan memiliki perubahan basa nukleotida yang sedikit (Sinaga, 2018). Analisis filogeografi juga memperlihatkan bahwa masing-masing populasi dengan letak geografis yang berbeda-beda memiliki jalur evolusinya masing-masing. *Out grup* yang ditambahkan membuktikan bahwa rusa timor (*Rusa timorensis*) masih berkerabat dengan rusa sambar (*Rusa unicolor*) dan rusa sika (*Rusa nippon*) meskipun berbeda grup karena berbeda spesies.

Estimasi jarak genetik diidentifikasi dengan membandingkan semua sekuens sampel yang diperoleh dari penelitian ini dan dari sekuens rusa timor yang diperoleh dari GenBank (NCBI) AF291883. Estimasi jarak genetik dianalisis berdasarkan Kimura-2 parameter dengan perhitungan *bootstrape* sebanyak 1000 kali menggunakan *software* MEGA-X versi 10.2.5.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 AF291883																					
2 SD2	0.0158																				
3 SD3	0.0172	0.0013																			
4 SD15	0.0158	0.0000	0.0013																		
5 SD18	0.0172	0.0039	0.0052	0.0039																	
6 BM1	0.0172	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052																
7 B4	0.0158	0.0026	0.0039	0.0026	0.0066	0.0039															
8 BL5	0.0172	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052	0.0000	0.0039														
9 BS17	0.0172	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052	0.0000	0.0039	0.0000													
10 M5	0.0172	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052	0.0000	0.0039	0.0000	0.0000												
11 KKP11	0.0132	0.0105	0.0118	0.0105	0.0118	0.0118	0.0105	0.0118	0.0118	0.0118											
12 D1	0.0145	0.0118	0.0132	0.0118	0.0132	0.0092	0.0132	0.0132	0.0132	0.0039											
13 D22	0.0225	0.0198	0.0211	0.0198	0.0212	0.0211	0.0198	0.0211	0.0211	0.0211	0.0118	0.0131									
14 PA10	0.0118	0.0092	0.0105	0.0092	0.0105	0.0105	0.0092	0.0105	0.0105	0.0105	0.0013	0.0026	0.0105								
15 PA12	0.0145	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052	0.0026	0.0013	0.0026	0.0026	0.0026	0.0092	0.0105	0.0185	0.0079							
16 BR11	0.0145	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052	0.0026	0.0013	0.0026	0.0026	0.0026	0.0092	0.0105	0.0185	0.0079	0.0000						
17 BR12	0.0158	0.0026	0.0039	0.0026	0.0066	0.0039	0.0026	0.0039	0.0039	0.0039	0.0105	0.0118	0.0198	0.0092	0.0013	0.0013					
18 O5	0.0145	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052	0.0026	0.0013	0.0026	0.0026	0.0026	0.0092	0.0105	0.0185	0.0079	0.0000	0.0000	0.0013				
19 O12	0.0145	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052	0.0026	0.0013	0.0026	0.0026	0.0026	0.0092	0.0105	0.0185	0.0079	0.0000	0.0000	0.0013	0.0000			
20 PR13	0.0145	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052	0.0026	0.0013	0.0026	0.0026	0.0026	0.0092	0.0105	0.0185	0.0079	0.0000	0.0000	0.0013	0.0000	0.0000		
21 PR17	0.0145	0.0013	0.0026	0.0013	0.0052	0.0026	0.0013	0.0026	0.0026	0.0026	0.0092	0.0105	0.0185	0.0079	0.0000	0.0000	0.0013	0.0000	0.0000	0.0000	

Gambar 11. Estimasi jarak genetik sampel rusa timor dari Jawa dan Bali dengan menggunakan gen D-Loop mtDNA

Hasil penelitian menunjukkan rentang estimasi jarak genetik mulai dari 0,0000 sampai dengan 0,0225. Menurut Juliantari (2015), semakin tinggi nilai estimasi jarak genetiknya maka hubungan kekerabatan antar spesies tersebut

semakin jauh, begitu pula sebaliknya. Jarak genetik yang paling jauh yaitu antara AF291883 (NCBI) dan D22 dengan estimasi jarak genetik 0,0225. Jarak genetik yang cukup jauh juga dimiliki oleh beberapa sampel yaitu KKP11, D1, dan D22 dengan nilai estimasi jarak genetik terhadap setiap sampel lain adalah  $> 0,0100$  (Gambar 11). Selain itu, sekuens yang diperoleh dari NCBI (AF291883) juga memiliki nilai estimasi jarak genetik  $> 0,0100$  yang menandakan bahwa rentang jarak genetik cukup jauh dibandingkan dengan sampel yang lainnya.



## BAB V

### SIMPULAN DAN SARAN

#### A. Simpulan

Variasi genetik D-Loop mtDNA pada populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo masih tergolong tinggi dengan nilai keragaman haplotipe ( $H_d$ ) sebesar 0.88421 dan keragaman nukleotida ( $\pi$ ) sebesar 0.00588. Keragaman haplotipe ( $H_d$ ) tertinggi ditemukan di kawasan Taman Nasional Alas Purwo dengan  $H_d = 0.83333$ , sedangkan keragaman nukleotida tertinggi ditemukan di kawasan Taman Nasional Baluran dengan  $\pi = 0.00950$ . Hal tersebut mengindikasikan bahwa keragaman genetik masih cukup tinggi dan adanya aliran gen.

#### B. Saran

Jumlah sampel yang disertakan dalam analisis perlu diperbanyak sehingga gambaran representatif mengenai populasi rusa timor (*Rusa timorensis*) di kawasan Taman Nasional Bali Barat, Baluran, dan Alas Purwo dapat diperoleh lebih baik.

Analisis menggunakan marka molekul biparental misalnya mikrosatelit perlu ditambahkan untuk dapat memperoleh informasi yang lebih lengkap dan komprehensif, tidak hanya mengenai variasi genetik tetapi juga agar dapat melihat individu-individu di dalam populasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahlering, M. A., Hedges, S., Johnson, A., Tyson, M., Schuttler, S. G., & Eggert, L. S. (2011). Genetic diversity, social structure, and conservation value of the elephants of the Nakai Plateau, Lao PDR, based on non-invasive sampling. *Conservation Genetics*, 12(2), 413–422.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Publishing, Inc.
- Amanda, K., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Optimalisasi Suhu Annealing Proses PCR Amplifikasi Gen shv Bakteri *Escherichia coli* Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1–6.
- Aminah, 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.
- Antara. (2020). Lokasi Berburu Rusa di Bengkulu Jadi Perlintasan Harimau Sumatera. *tempo.co*.
- Archie, E. A., Moss, C. J., & Alberts, S. C. (2011). The Amboseli Elephants: A Long-Term Perspective on a Long-Lived Mammal.
- Arida, E. A. (2009). Genetika Populasi dan peranannya dalam usaha pelestarian Biawak Komodo. *LIPI*. Diambil dari <http://u.lipi.go.id/1249395173>.
- Asnar, B. M. (2005). *Skrining Delesi 9pb DNA Mitokondria Pada Manusia*. Universitas Airlangga.
- Badruzsaufari, Sasmita, R., Rezeki, A., & Yanti, W. R. (2021). Metode non invasif untuk identifikasi bekantan (*Nasalis larvatus*) sungai Barito secara molekuler. *Lingkungan Lahan Basah*, 6(April), 1–7.
- Bammel, A. C. V. Van. (1949). Revision of The Rusine Deer in The Indo-Australiaan Archipelago. *Treubia* 20, 191.
- Basuni, S. (1989). Manajemen Perkembangbiakan dalam Usaha Penangkaran Rusa (*Cervus spp.*) Ditinjau dari Aspek Perilakunya. *Media Konservasi*, 2(4), 11–16.
- Bragg, M., & Gamero, E. E. (2022). Non-invasive DNA. *Smithsonian's National Zoo & Conservation Biology Institute*. Diambil dari <https://nationalzoo.si.edu/center-for-conservation-genomics/non-invasive-dna>
- Brock, T. D. (1994). *Biology of microorganisms* (7th ed.). New Jersey: Prentice Hall, Inc.
- Campbell, N. A., Reece, J. ., & Mitchell, L. . (2002). *Biologi* (5th ed.). Jakarta:

Erlangga.

- Clayton, D. A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reproduction*, 15(SUPPL. 2), 11–17.
- Cooper, G. M. (1997). *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Ekosistem, D. J. K. S. D. A. dan. (2018). *Laporan kinerja 2018*. Jakarta.
- Eton Bioscience. (2003). Troubleshooting. Diambil April 15, 2022, dari <http://www.etonbio.com/troubleshooting.php>
- Fairbanks, D. J., & Andersen, W. R. (1999). *Genetics: The continuity of life*. New York: Brooks/Cole Publishing Company.
- Fang, D. A., Luo, H., He, M., Mao, C., Kuang, Z., Qi, H., Xu, D., et al. (2022). Genetic Diversity and Population Differentiation of Naked Carp (*Gymnocypris przewalskii*) Revealed by Cytochrome Oxidase Subunit I and D-Loop. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10(April), 1–11.
- Fernando, P., Vidya, T. N. C., Rajapakse, C., Dangolla, A., & Melnick, D. J. (2003). Reliable noninvasive genotyping: Fantasy or reality? *Journal of Heredity*, 94(2), 115–123.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22), 4541–4550. England.
- Gardipee, F. M. (2007). *Development of Fecal Dna Sampling Methods To Assess Genetic Population Structure*. The University of Montana.
- Ghaffar, S. (2007). *Buku Ajar Bioteknologi Molekuler*.
- Griffin, H. G., & Griffin, A. M. (1993). *DNA Sequencing Protocols*. Totowa, New Jersey: Human Press, Inc.
- Griffiths, D., Uchiyama, M., Nurse, P., & TS, W. (2000). A novel mutant allele of the chromatin-bound fission yeast checkpoint protein Rad17 separates the DNA structure checkpoints. *Journal of cell science*, 113 ( Pt 6, 1075–1088.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17–29.
- Harrison, I. M., Laverty, & E, S. (2004). Genetic Diversity. *Connexions module: m12158*.
- Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1990). *Principles of Population Genetics*. (4th Edition, Ed.) Sinauer Associates. Massachusetts.

- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings. Biological sciences*, 270 Suppl(Suppl 1), S96-9.
- Hedges, S., Duckworth, J.W., Timmins, R., Semiadi, G. & Dryden, G. (2014). *Rusa timorensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. *Rusa timorensis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T41789A22156866*. Diambil Januari 16, 2022, dari <https://www.iucnredlist.org/species/41789/22156866>
- Hilhanif, F. (2018a). *Studi Filogeografi Calotes versicolor (Daudin, 1802) di Pulau Jawa dan Madura*. Universitas Airlangga.
- Hilhanif, F. (2018b). *Studi Filogeografi Calotes versicolor (Daudin, 1802) di Pulau Jawa dan Madura*. Universitas Airlangga.
- Hoong, L. L., & Lek, K. C. (2005). Genetic polymorphisms in mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III of the Malaysian population. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 13(2), 79–85.
- Hunaepi, & Firdaus, L. (2017). *Ekologi Berbasis Kearifan Lokal*. (A. Sukri & Suhirman, Ed.) *Duta Pustaka Ilmu*. Lombok: Duta Pustaka Ilmu.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (2014). “*Optimization of PCRs*”. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. St. Louis: Elsevier Science.
- Iqbal, M., Buwono, I. D., & Kurniawati, N. (2016). Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Comparative Analysis of DNA Isolation Methods for Detection White Spot Syndrome Virus (WSSV) in White Shrimp (*Litopenaeus vann*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, VII(1), 54–65.
- IUCN. (2015). IUCN : Geographic Range of Javan Deer. *iucnredlist.org*. Diambil Januari 25, 2021, dari <https://www.iucnredlist.org/species/41789/22156866#geographic-range>
- Juliantari, E. (2015). *Studi Filogenetik Mangifera Sumatera Tengah Berdasarkan Sekuen rbcL*. Universitas Riau.
- KEHUTANAN, M. L. H. D. (2018). *No Title* (hal. 1–24). REPUBLIK INDONESIA.
- Kurniawati, M. D., Sumaryam, S., & Hayati, N. (2019). APLIKASI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) KONVENSIONAL DAN REAL TIME- PCR UNTUK DETEKSI VIRUS VNN (Viral Nervous Necrosis) PADA IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Techno-Fish*, 3(1), 19–30.
- Kwatrina, R. T., Santosa, Y., & Kartono, A. P. (2009). *Penentuan Kuota Panenan dan Ukuran Populasi Awal Rusa Timor di Penangkaran Hutan Penelitian*

*Dramaga*. Bogor Agricultural University.

- Lagouge, M., & Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and aging. *Journal of internal medicine*, 273.
- Langga, I. F., Restu, M., & Kuswinanti, T. (2012). Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi dna tanaman bitti (. *J Sains & Teknologi*, 12(3), 265–276.
- Lante, S. (2010). *Analisis Keragaman Genetik Populasi Ikan Baronang (Siganus guttatus) di Selat Makassar dan Teluk Bone*. Universitas Hasanuddin Makassar.
- Li, W., & Graur, D. (1991). *Fundamentals of molecular evolution*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Liu, R.-Y., Yang, G.-S., & Lei, C.-Z. (2006). The Genetic Diversity of mtDNA D-loop and the Origin of Chinese Goats. *Acta Genetica Sinica*, 33(5), 420–428.
- Liu, R. Y., Lei, C. Z., Liu, S. H., & Yang, G. S. (2007). 2007 Genetic Diversity and Origin of Chinese Domestic Goats, 20(2), 178–183.
- Lomi, Y. N. K. (2020). *Molecular Sexing pada Aves dengan Sumber DNA dari Pengambilan Sampel secara Invasif dan Non-invasif*. Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Lougheed, S. C., Handford, P., & Baker, A. J. (1993). Mitochondrial DNA Hyperdiversity and Vocal Dialects in a Subspecies Transition of the Rufous-Collared Sparrow. *The Condor*, 95(4), 889–895. American Ornithological Society.
- Maha, I. T., Manafe, R. Y., Amalo, F. A., & Selan, Y. N. (2021). Karakteristik Morfologi Rusa timor (*Rusa timorensis*) dengan Pemeliharaan Ex Situ di Kota Kupang. *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 9(1), 1–13.
- Maryanto, I., Maharadatunkamsi, Achmadi, A. S., Wiantoro, S., Sulistyadi, E., Yoneda, M., Suyanto, A., et al. (2019). *Checklist of The Mammals of Indonesia* (Third Edit.). Bogor: Research Center For Biology LIPI.
- Masy'ud, B., Wijaya, R., & Santoso, I. B. (2007). Pola Distribusi, Populasi dan Aktivitas Harian Rusa Timor (*Cervus timorensis*, De Blainville 1822) di Taman Nasional Bali Barat. *Media Konservasi*, 12(3).
- McDonald, J. H., & Kreitman, M. (1991). Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature*, 351(6328), 652–654.
- Megumi, S. R. (2019). Rusa Timor, Rusa Asli Indonesia dengan Daya Adaptasi Tinggi. *Greeners.co*. Diambil Januari 26, 2022, dari <https://www.greeners.co/flora-fauna/rusa-timor-rusa-asli-indonesia-dengan-daya-adaptasi-tinggi/>
- Mertens, G., Rand, S., Jehaes, E., Leijnen, G., Jacobs, W., & Marck, E. Van. (2008).

- Forensic Evaluation and Population data of 11 Y-STRs in Moroccan immigrants in Belgium. *The Open Forensic Science Journal*, 1, 19–25.
- Monica, W. S., Wandia, I. N., & Widyastuti, S. K. (2012). Keragaman Genetik Populasi Monyet Ekor Panjang Di Pura Pulaki Menggunakan Marka Molekul Mikrosatelit D13S765. *Indonesia Medicus Veterinus*, 1(1), 37–54.
- Morin, P. A., Chambers, K. E., Boesch, C., & Vigilant, L. (2001). Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular ecology*, 10(7), 1835–1844. England.
- Mount, D. W. (2001). *Phylogenetic Prediction In: Bioinformatic, Sequence and Genome Analysis*. New York: Coul Spring Harbor Laboratory.
- Muladno. (2002). *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.
- Nayasilana, I., Atmoko, S., & Firman. (2010). Teknik Analisis Non-Invasif Mitokondria Dna (Mtdna) Bilou (*Hylobates Klossii*, Miller 1903) Melalui Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Primatologi Indonesia*, 7(1), 27–33.
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273.
- Nei, M., & Tajima, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97(1), 145–163.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Genetics*. New York: Oxford University Press.
- Nei, Masatoshi. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Newton, C. R., & Graham, A. (1994). *PCR* (2th ed.). New York: BIOS Scientific Publishers.
- Nielsen, R., & Yang, Z. (1998). Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics*, 148(3), 929–936.
- Nsubuga, A. M., Robbins, M. M., Roeder, A. D., Morin, P. A., Boesch, C., & Vigilant, L. (2004). Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular ecology*, 13(7), 2089–2094. England.
- Oktafiani, N. E. (2013). Polymerase chain reactions (PCR). <https://www.slideshare.net>. Diambil Juli 6, 2022, dari <https://www.slideshare.net/07101991/polymerase-chain-reactions-pcr-15887240>

- Pakendorf, B., & Stoneking, M. (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6, 165–183.
- Passarge, E. (2007). *Color Atlas of Genetics*. New York: Theime Stuttgart.
- Pattiselanno, F., Maryen, B., & Burako, Y. (2013). Perburuan Rusa: Sumber Pendapatan Alternatif Masyarakat di Kepala Burung, Papua. *Warta Konservasi Lahan Basah*, 21 No.3(2), 12–13.
- Pereira, F., Pereira, L., Van Asch, B., Bradley, D. G., & Amorim, A. (2005). The mtDNA catalogue of all Portuguese autochthonous goat (*Capra hircus*) breeds: high diversity of female lineages at the western fringe of European distribution. *Molecular Ecology*, 14(8), 2313–2318.
- Petersen, J. L., Mickelson, J. R., Cothran, E. G., Andersson, L. S., Axelsson, J., Bailey, E., Bannasch, D., et al. (2013). Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-Wide SNP Data. *PLOS ONE*, 8(1), 1–15. Public Library of Science.
- Pradana, H. A. (2015). *Estimasi Simpanan Karbon di Kawasan Taman Nasioanal Baluran. Digital Repository Universitas Jember*. Universitas Jember.
- Purwo, T. N. A. (2017). Profil Taman Nasional Alas Purwo. *Tnalaspurwo.org*. Diambil Februari 3, 2021, dari <https://tnalaspurwo.org/taman-nasional-alas-purwo>
- Putri, I. F. M. D. (2021). *Perilaku Harian Rusa Timor (Rusa Timorensis De Blainville, 1822) dan Tingkat Keberhasilan Pengembangbiakan di Penangkaran Wana Raharja Taman Hutan Raya Raden Soerjo, Mojokerto*. Universitas Muhamadiyah Malang.
- Ratnayani, K., Wirajana, I. N., & Laksmiwati, A. A. I. A. M. (2007). nalisis Variasi Nukleotida Daerah D-loop DNA Mitokondria pada Satu Individu Suku Bali Normal. *Jurnal Kimia*, 1(1), 7–14.
- Reyes, E. (2002). Rusa timorensis Javan rusa (Also: Timor deer). *animaldiversity.org*. Diambil Februari 2, 2022, dari [https://animaldiversity.org/accounts/Rusa\\_timorensis/](https://animaldiversity.org/accounts/Rusa_timorensis/)
- Rose, G., Passarino, G., Scornaienchi, V., Romeo, G., Dato, S., Bellizzi, D., Mari, V., et al. (2007). The mitochondrial DNA control region shows genetically correlated levels of heteroplasmy in leukocytes of centenarians and their offspring. *BMC Genomics*, 8, 1–10.
- Rumakar, S., Puttileihalat, M. M. ., & Tuhumury, A. (2019). Populasi dan Habitat Rusa Timor (*Cervus timorensis*). *Makilaz: Jurnal Penelitian Kehutanan*, 13(1), 40–56.
- Rychlik, W., & Rhoads, R. E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonudeotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 17(21), 8543–8551.

- Saitou, N., & Imanishi, T. (1989). Relative Efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution, and Neighbor-joining Methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining the Correct Tree. *Molecular Biology and Evolution*, 6(5), 514.
- Samsudewa, D., & Susanti, S. (2006). *Study Tingkah Laku Reproduksi Rusa Timor (Cervus timorensis) di Kepulauan Karimun Jawa*. Semarang.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Santosa, Y., Auliyani, D., & Kartono, A. P. (2008). Pendugaan Model Pertumbuhan dan Penyebaran Spasial Populasi Rusa Timor (*Cervus Timorensis* De Blainville, 1882) Di Taman Nasional Alas Purwo Jawa Timur. *Media Konservasi*, 13(1), 1–7.
- Savira, M. (2012). *Analisis Variasi D-Loop DNA Mitokondria pada Populasi Gajah Sumatera (Elephas Maximus Sumatranus) di Taman Nasional Way Kambas*. Universitas Indonesia.
- Sekino, M., Hara, M., & Taniguchi, N. (2002). Genetic Diversity Within and Between Hatchery Strains of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* Assessed by Means of Microsatellite and Mitochondrial DNA Sequencing Analysis. *Journal of Heredity*, 93(4), 303–308.
- Semiadi, G. (2006). *Biologi Rusa Tropis*. Bogor: Pusat Penelitian Biologi.
- Semiadi, G., & Nugraha, R. T. P. (2004). *Panduan pemeliharaan rusa tropis* (Vol. Cetakan 2).
- Silalahi, S. S., Samsudewa, D., Setiatin, E. T., & Ondho, Y. S. (2021). Tingkah laku agresif rusa Timor (*Cervus timorensis*) jantan di penangkaran pada fase diurnal dan nokturnal. *Livestock and Animal Research*, 19(1), 40.
- Sinaga, P. (2018). *Analisis Filogenetik Mangga (Mangifera) di Pulau Sumatera Berdasarkan Sekuen aptB-rbcL intergenic spacer*. Universitas Riau.
- Surata, S. P. K. (2000). *Filogeografi Intraspesies Gelatik (Padda Oryzivora (L.)) (Passeriformes : Ploceidae) di Pulau Bali*. Institut Pertanian Bogor.
- Susmiarsih, T. (2010). Peran Genetik DNA Mitokondria ( mtDNA ) Pada Motilitas Spermatozoa. *Majalah Kesehatan PharmaMedika*, (2), 178–184.
- Sutrisno, E. (1993). *Population Ecology of the Javan Deer (Cervus timorensis) in Menipo Island, East Nusa Tenggara. Indonesia*. University of the Philippines, Los Banos.
- Taariwuan, M. B., Ngangi, J., Mokusuli, Y., & Gedoan, S. (2021). DNA Barcoding Dalugha (*Cyrtosperma Merkusii*) di Kepulauan Talaud dan Minahasa Selatan Berdasarkan Gen rbcL. *Jurnal Bios Logos*, 11(2), 134.



- Tandirerung, C. (2020). *Identifikasi Endoparasit pada Feses Rusa Timor (Cervus Timorensis) di Kebun Binatang Konservasi Citra Satwa Celebes Sulawesi Selatan*. Universitas Hasanuddin.
- Tapio, M., & Grigaliunaite, I. (2003). Use of mitochondrial DNA as a genetic marker in domesticated mammals. *Ekologija (Vilnius)*, 1, 31–33.
- Tomi, A. (2022). Taman Nasional Bali Barat: Letak, Luas, Sejarah, Biodiversitas, dan Wisata Alam. *Forester Act*. Diambil Februari 1, 2022, dari <https://foresteract.com/taman-nasional-bali-barat/>
- Usman, M. Y. (2016). *Analisis Variasi Genetik Ikan Penja Indigenous Perairan Polewali Mandar dan Ikan Nike (Awaous sp.) Indigenous Perairan Gorontalo*. Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Wahyudi, R. (2017). Tradisi Berburu Rusa Dalam Masyarakat Kluet : Kajian Etnografi Di Kecamatan Kluet Tengah. *Adabiya*, 19(2), 101–124.
- Wallace, D. C. (1992). Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science (New York, N.Y.)*, 256(5057), 628–632. United States.
- Wandia, I. N. (2001). Genom Mitokondria. *Veteriner*, 2(4), 131–137.
- Weaver, R. F., & Hedrick, P. W. (1999). *Genetics*. (P. W. Hedrick, Ed.) (3rd ed.). Dubuque: MCB Wn. C Brown Publishers.
- Wibisono, K. (2010). Rusa Lampung Barat Terancam Punah Oleh Perburuan Liar. *antaranews.com*.
- Williams, C., Williamson, R., Coutelle, C., Loeffler, F., Smith, J., & Ivinson, A. (1988). Same-Day, First-Trimester Antenatal Diagnosis For Cystic Fibrosis By Gene Amplification. *The Lancet*, 332(8602), 102–103.
- Wirdateti. (2012). Keragaman Genetik Rusa Sambar (*Rusa unicolor*), Pemanfaatan dan Implikasinya Untuk Konservasi. *Jurnal Biologi Indonesia*, 8(1), 131–139.
- Wolfe, S. . (1993). *Molecular & Cellular Biology*. California: Wardsworth Inc.
- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). Mdr-1 Gene 1199 Variant Primer Design Techniques in Pediatric Patient Buffy Coat Samples With Lla. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 5(1), 105.
- Zein, M Syamsul A. (2007). Keragaman Daerah Kontrol DNA Mitokondria Rusa Timor (*Cervus timorensis timorensis*) di Pulau Timor, Alor, dan Pantar. *Biota*, 12(3), 138–144.
- Zein, M Syamsul Arifin, Surjobroto, B., Solihin, D. D., & Prijono, S. N. (1998). Study on Characteristic of Genetic of the Timor Deer ( *Cervus timorensis timorensis* ), 4(i), 117–125.

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel hasil ekstraksi sampel feses rusa timor

No	Kode Sampel	Lokasi	Nama TN	Kualitas	Jumlah DNA (ng/ $\mu$ l)
1	B1	Bekol	TN Baluran	K2	47
2	B2b	Bekol	TN Baluran	K2	92
3	B3	Bekol	TN Baluran	K1	66
4	B4	Bekol	TN Baluran	K2	58
5	B5	Bekol	TN Baluran	K2	67
6	B6	Bekol	TN Baluran	K2	37
7	B7	Bekol	TN Baluran	K2	55
8	B8	Bekol	TN Baluran	K2	82
9	B9	Bekol	TN Baluran	K2	92
10	B10	Bekol	TN Baluran	K2	55
11	B11	Bekol	TN Baluran	K1	84
12	B12	Bekol	TN Baluran	K2	48
13	B13	Bekol	TN Baluran	K2	48
14	B14	Bekol	TN Baluran	K2	66
15	B15	Bekol	TN Baluran	K2	68
16	B16	Bekol	TN Baluran	K2	39
17	B17	Bekol	TN Baluran	K2	11
18	B18	Bekol	TN Baluran	K2	78
19	B19	Bekol	TN Baluran	K2	92
20	B20	Bekol	TN Baluran	K2	118
21	B21	Bekol	TN Baluran	K2	93
22	B22	Bekol	TN Baluran	K2	72
23	B23	Bekol	TN Baluran	K2	154
24	B24	Bekol	TN Baluran	K2	53
25	B25	Bekol	TN Baluran	K2	58
26	B26	Bekol	TN Baluran	K2	82
27	B27	Bekol	TN Baluran	K2	69
28	B28	Bekol	TN Baluran	K2	100
29	B29	Bekol	TN Baluran	K2	84
30	B30	Bekol	TN Baluran	K1	76
31	KKP11	Kakapa	TN Baluran	K2	17
32	KKP13	Kakapa	TN Baluran	K2	20
33	BL1	Bilik	TN Baluran	K2	14
34	BL2	Bilik	TN Baluran	K2	9.3
35	BL3	Bilik	TN Baluran	K2	30

Lampiran 1 (lanjutan)

36	BL4	Bilik	TN Baluran	K2	15
37	BL5	Bilik	TN Baluran	K2	25
38	BS1	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	10
39	BS3	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	5.8
40	BS4	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	31
41	BS5	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	15
42	BS6	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	44
43	BS7	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	6.5
44	BS8	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	8.4
45	BS9	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	60
46	BS10	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	16
47	BS11	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	55
48	BS12	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	24
49	BS13	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	19
50	BS14	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	78
51	BS15	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	47
52	BS16	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	45
53	BS17	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	87
54	BS18	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	76
55	BS19	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	36
56	BS20	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	35
57	BS21	Bilik Sijile	TN Baluran	K2	32
58	M1	Merak	TN Baluran	K1	102
59	M2	Merak	TN Baluran	K1	93
60	M4b	Merak	TN Baluran	K2	33
61	M5	Merak	TN Baluran	K1	120
62	M6	Merak	TN Baluran	K1	119
63	M7	Merak	TN Baluran	K1	161
64	M8b	Merak	TN Baluran	K2	151
65	M9	Merak	TN Baluran	K1	143
66	M10	Merak	TN Baluran	K1	62
67	M12	Merak	TN Baluran	K1	84
68	M13	Merak	TN Baluran	K1	57
69	M14	Merak	TN Baluran	K1	65
70	M15	Merak	TN Baluran	K1	61
71	M16	Merak	TN Baluran	K1	64
72	M17	Merak	TN Baluran	K1	56
73	M18	Merak	TN Baluran	K2	7.8

Lampiran 1 (lanjutan)

74	M19	Merak	TN Baluran	K1	76
75	M20	Merak	TN Baluran	K2	30
76	M21	Merak	TN Baluran	K1	76
77	M22	Merak	TN Baluran	K2	22
78	M23	Merak	TN Baluran	K1	40
79	M24	Merak	TN Baluran	K2	16
80	M25	Merak	TN Baluran	K1	85
81	D1	Datuk	TN Baluran	K1	88
82	D2	Datuk	TN Baluran	K2	12
83	D3	Datuk	TN Baluran	K2	12
84	D4	Datuk	TN Baluran	K2	6.9
85	D5	Datuk	TN Baluran	K2	14
86	D6	Datuk	TN Baluran	K2	21
87	D7	Datuk	TN Baluran	K1	19
88	D8	Datuk	TN Baluran	K2	8.1
89	D9	Datuk	TN Baluran	K2	7.2
90	D10	Datuk	TN Baluran	K2	5.9
91	D11	Datuk	TN Baluran	K2	3.48
92	D15	Datuk	TN Baluran	K2	10
93	D16	Datuk	TN Baluran	K2	4.72
94	D17	Datuk	TN Baluran	K2	13
95	D19	Datuk	TN Baluran	K2	14
96	D22	Datuk	TN Baluran	K2	38
97	D24	Datuk	TN Baluran	K2	6.6
98	D25	Datuk	TN Baluran	K2	4.01
99	D26	Datuk	TN Baluran	K2	12
100	BM1	Bama	TN Baluran	K2	32
101	BM2a	Bama	TN Baluran	K2	66
102	BM3	Bama	TN Baluran	K2	99
103	BM4	Bama	TN Baluran	K2	71
104	BM9	Bama	TN Baluran	K1	49
105	BM10	Bama	TN Baluran	K2	82
106	BM11	Bama	TN Baluran	K2	67
107	BM12	Bama	TN Baluran	K2	63
108	BM13	Bama	TN Baluran	K2	49
109	BM15	Bama	TN Baluran	K2	78
110	BM16	Bama	TN Baluran	K2	74
111	BM17	Bama	TN Baluran	K2	59

Lampiran 1 (lanjutan)

112	SD1	Sadengan	TNAP	K1	74
113	SD2	Sadengan	TNAP	K1	199
114	SD3	Sadengan	TNAP	K2	100
115	SD4	Sadengan	TNAP	K2	35
116	SD5	Sadengan	TNAP	K2	71
117	SD6	Sadengan	TNAP	K2	52
118	SD7	Sadengan	TNAP	K2	55
119	SD8	Sadengan	TNAP	K2	41
120	SD 10	Sadengan	TNAP	K2	44
121	SD11	Sadengan	TNAP	K2	29
122	SD12	Sadengan	TNAP	K2	50
123	SD14	Sadengan	TNAP	K2	62
124	SD15	Sadengan	TNAP	K2	47
125	SD16	Sadengan	TNAP	K2	36
126	SD17	Sadengan	TNAP	K2	70
127	SD18	Sadengan	TNAP	K2	108
128	SD19	Sadengan	TNAP	K1	225
129	SD20	Sadengan	TNAP	K1	79
130	PK1	Plengkung	TNAP	K2	43
131	PK2	Plengkung	TNAP	K2	66
132	PK5	Plengkung	TNAP	K2	63
133	PK6	Plengkung	TNAP	K2	74
134	PK7	Plengkung	TNAP	K2	34
135	PK8	Plengkung	TNAP	K2	34
136	PK9	Plengkung	TNAP	K2	40
137	PK10	Plengkung	TNAP	K2	33
138	PK11	Plengkung	TNAP	K2	29
139	PK12	Plengkung	TNAP	K2	27
140	PK13	Plengkung	TNAP	K2	40
141	PK14	Plengkung	TNAP	K2	27
142	PK15	Plengkung	TNAP	K2	24
143	PK16	Plengkung	TNAP	K2	34
144	PK17	Plengkung	TNAP	K2	25
145	PK18	Plengkung	TNAP	K2	107
146	PK19	Plengkung	TNAP	K2	55
147	PK20	Plengkung	TNAP	K2	20
148	PA1	Prapat Agung	TNBB	K2	17
149	PA3	Prapat Agung	TNBB	K3	9.7

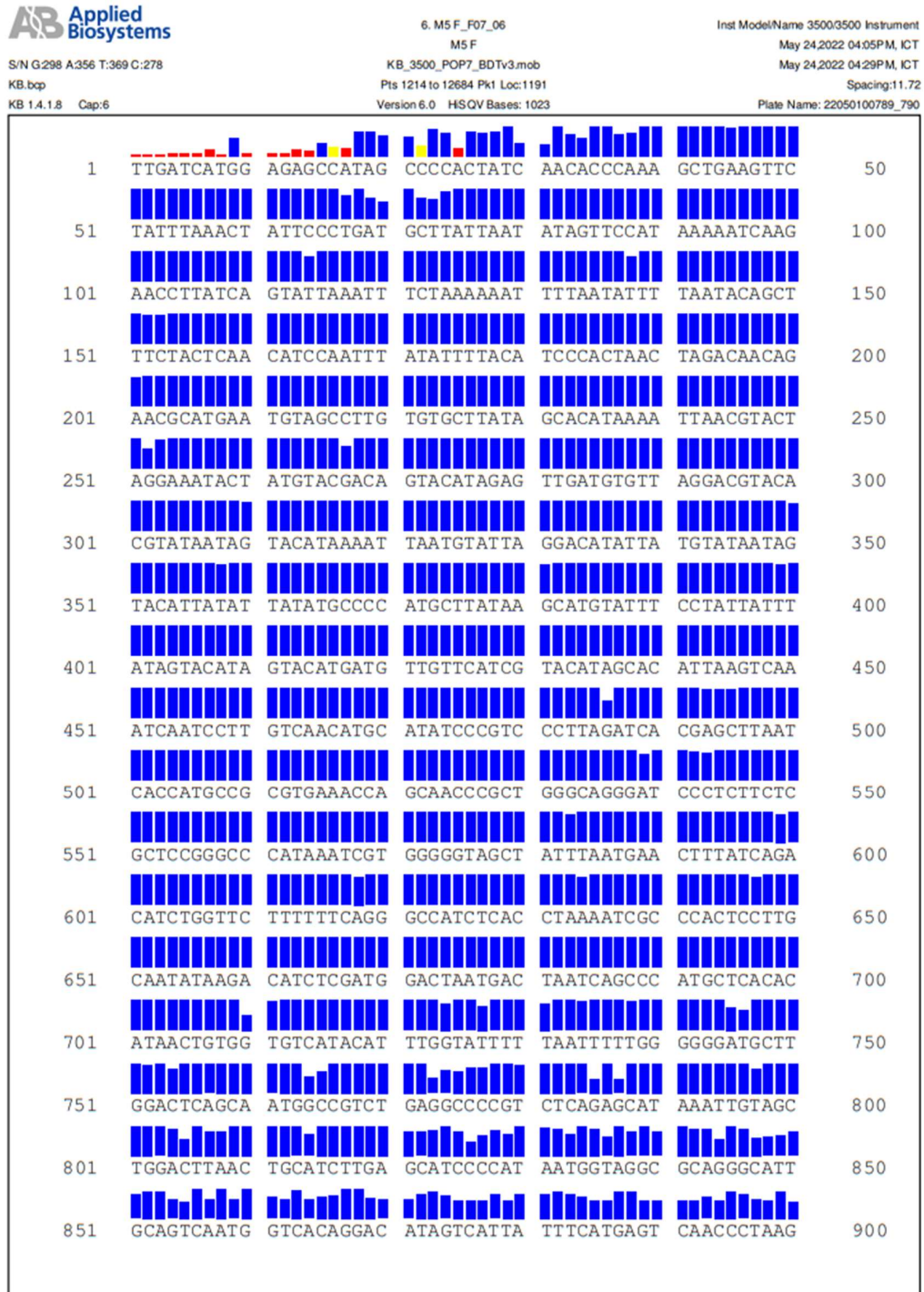
Lampiran 1 (*lanjutan*)

150	PA6	Prapat Agung	TNBB	K3	16
151	PA8	Prapat Agung	TNBB	K2	19
152	PA10	Prapat Agung	TNBB	K2	77
153	PA11	Prapat Agung	TNBB	K2	13
154	PA12	Prapat Agung	TNBB	K2	95
155	PA13	Prapat Agung	TNBB	K1	64
156	PA14	Prapat Agung	TNBB	K2	13
157	PA15	Prapat Agung	TNBB	K2	29
158	PA16	Prapat Agung	TNBB	K2	14
159	PA17	Prapat Agung	TNBB	K2	30
160	PA18	Prapat Agung	TNBB	K2	19
161	PA19	Prapat Agung	TNBB	K2	31
162	PA20	Prapat Agung	TNBB	K2	29
163	BR1	Brumbun	TNBB	K1	223
164	BR2	Brumbun	TNBB	K2	44
165	BR3	Brumbun	TNBB	K2	118
166	BR4	Brumbun	TNBB	K2	48
167	BR5	Brumbun	TNBB	K1	254
168	BR6	Brumbun	TNBB	K1	101
169	BR7	Brumbun	TNBB	K1	179
170	BR8	Brumbun	TNBB	K2	18
171	BR9	Brumbun	TNBB	K1	281
172	BR10	Brumbun	TNBB	K2	50
173	BR11	Brumbun	TNBB	K1	159
174	BR12	Brumbun	TNBB	K1	185
175	BR13	Brumbun	TNBB	K2	42
176	BR14	Brumbun	TNBB	K2	40
177	BR15	Brumbun	TNBB	K1	125
178	BR16	Brumbun	TNBB	K2	43
179	BR17	Brumbun	TNBB	K2	67
180	BR18	Brumbun	TNBB	K2	52
181	BR19	Brumbun	TNBB	K2	23
182	BR20	Brumbun	TNBB	K2	48
183	BR21	Brumbun	TNBB	K2	44
184	BR22	Brumbun	TNBB	K2	38
185	O1	Octagon	TNBB	K2	31
186	O2	Octagon	TNBB	K1	23
187	O3	Octagon	TNBB	K2	63

Lampiran 1 (*lanjutan*)

188	O4	Octagon	TNBB	K2	43
189	O5	Octagon	TNBB	K2	45
190	O6	Octagon	TNBB	K2	40
191	O7	Octagon	TNBB	K1	76
192	O8	Octagon	TNBB	K2	78
193	O9	Octagon	TNBB	K1	94
194	O10	Octagon	TNBB	K2	73
195	O11	Octagon	TNBB	K2	25
196	O12	Octagon	TNBB	K2	54
197	O13	Octagon	TNBB	K1	122
198	O14	Octagon	TNBB	K1	27
199	O17	Octagon	TNBB	K2	11
200	PR1	Pura Segara	TNBB	K2	56
201	PR2	Pura Segara	TNBB	K2	48
202	PR3	Pura Segara	TNBB	K2	58
203	PR4	Pura Segara	TNBB	K2	43
204	PR5	Pura Segara	TNBB	K2	66
205	PR6	Pura Segara	TNBB	K2	39
206	PR7	Pura Segara	TNBB	K2	60
207	PR8	Pura Segara	TNBB	K2	35
208	PR9	Pura Segara	TNBB	K2	53
209	PR10	Pura Segara	TNBB	K2	63
210	PR13	Pura Segara	TNBB	K1	139
211	PR17	Pura Segara	TNBB	K1	175

## Lampiran 2. Hasil sekuensing menggunakan mesin sanger sekuenser





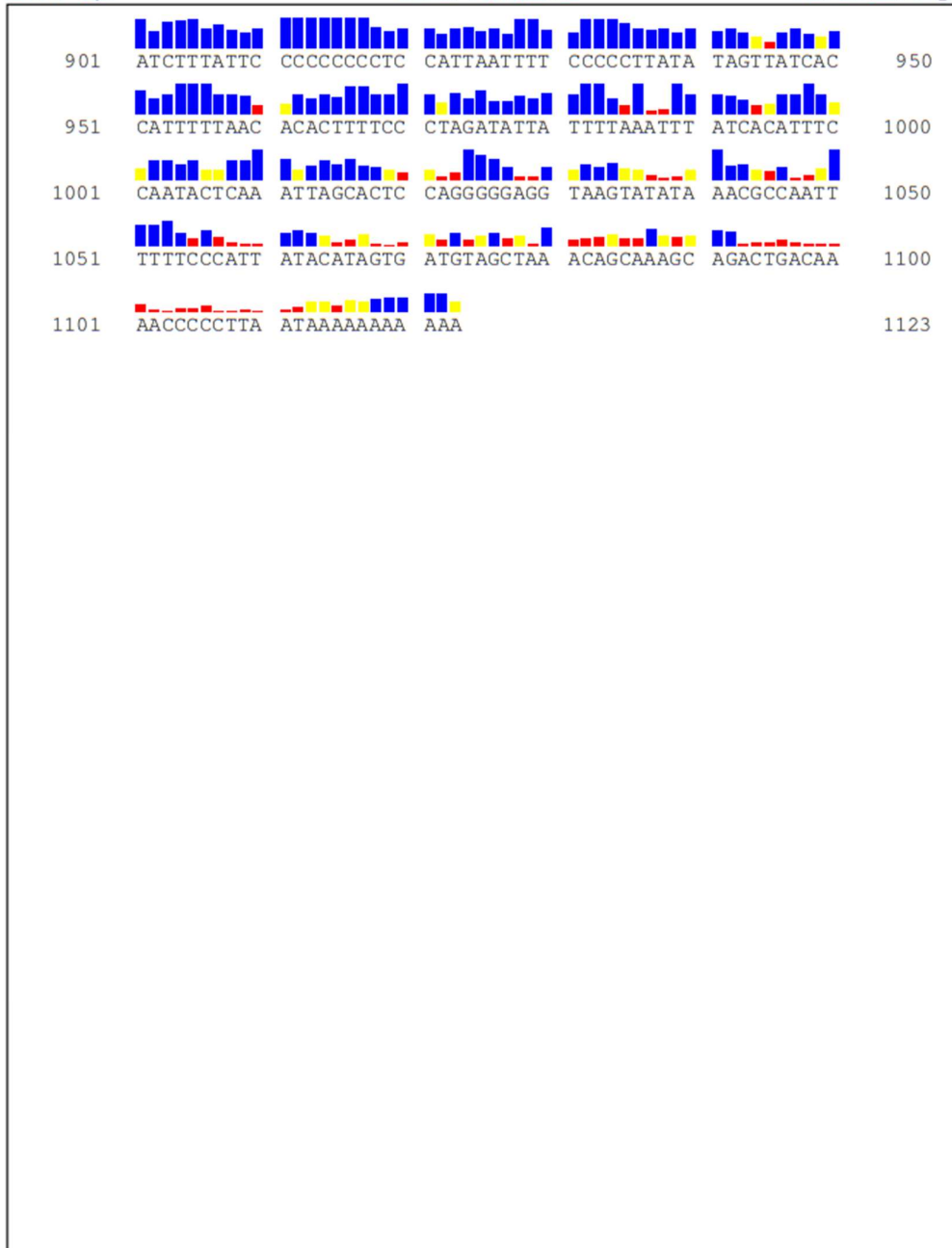
Lampiran 2 (lanjutan)



S/N G298 A356 T:369 C:278  
 KB.bcp  
 KB 1.4.1.8 Cap:6

6. M5 F\_F07\_06  
 M5 F  
 KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob  
 Pts 1214 to 12684 Pk1 Loc:1191  
 Version 6.0 HiSQV Bases: 1023

Inst ModelName 3500/3500 Instrument  
 May 24, 2022 04:05PM, ICT  
 May 24, 2022 04:29PM, ICT  
 Spacing:11.72  
 Plate Name: 22050100789\_790



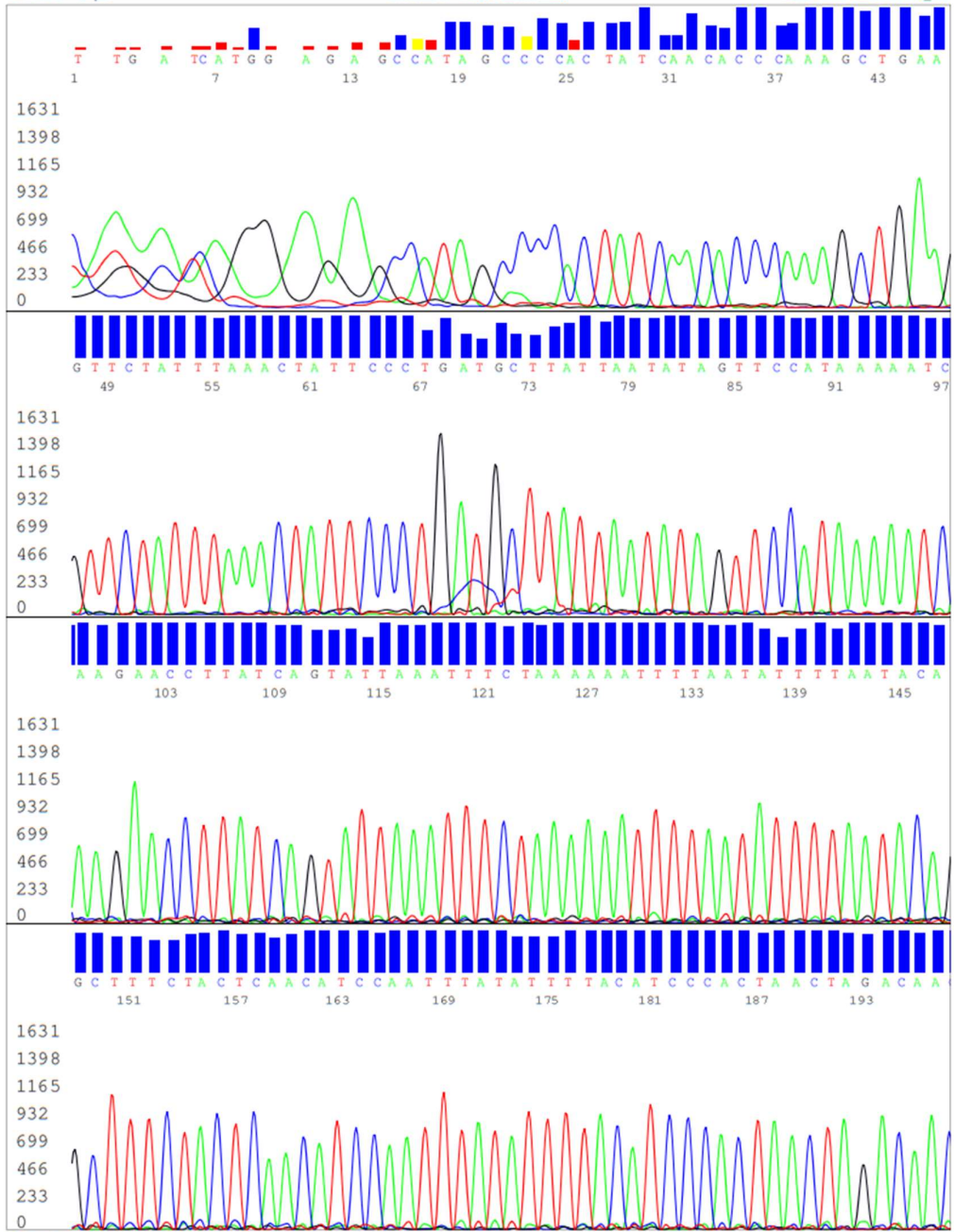
Lampiran 2 (lanjutan)



S/N G298 A:356 T:369 C:278  
KB.bcp  
KB 1.4.1.8 Cap:6

6. M5 F\_F07\_06  
M5 F  
KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob  
Pts 1214 to 12684 Pk1 Loc:1191  
Version 6.0 HISQV Bases: 1023

Inst Model/Name 3500/3500 Instrument  
May 24, 2022 04:05PM, ICT  
May 24, 2022 04:29PM, ICT  
Spacing: 11.72 Pts/Panel600  
Plate Name: 22050100789\_790



Printed on: Wed May 25, 2022 01:52PM, ICT

Electropherogram Data Page 1 of 6

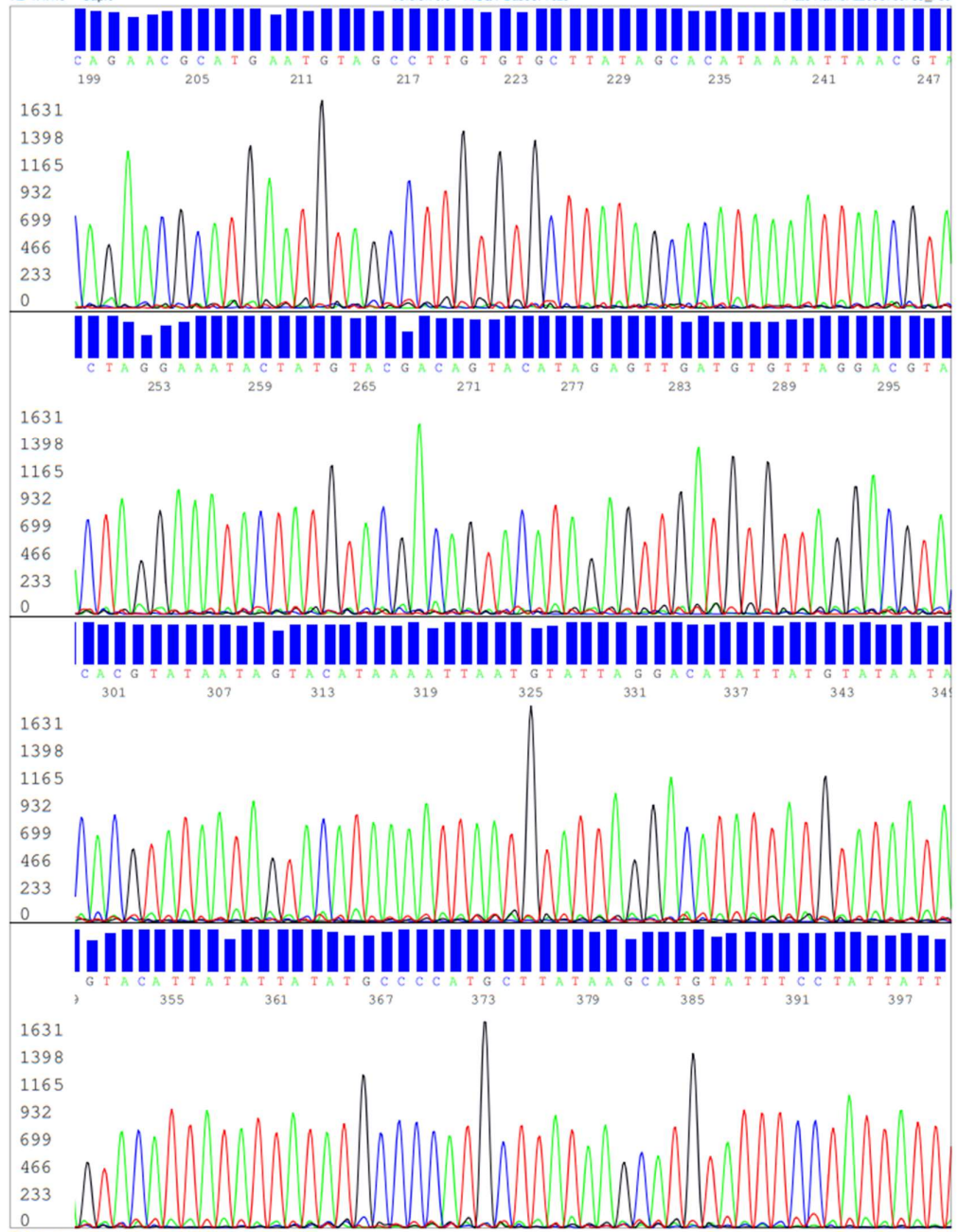
Lampiran 2 (lanjutan)



S/N G:298 A:356 T:369 C:278  
 KB.bcp  
 KB 1.4.1.8  
 Cap:6

6. M5\_F07\_06  
 M5 F  
 KB\_3500\_POP7\_BDTV3.mob  
 Pts 1214 to 12684 Pk1 Loc:1191  
 Version 6.0 HiSQV Bases: 1023

Inst Model/Name 3500/3500 Instrument  
 May 24,2022 04:05PM, ICT  
 May 24,2022 04:29PM, ICT  
 Spacing:11.72 Pts/Pane1600  
 Plate Name: 22050100789\_790



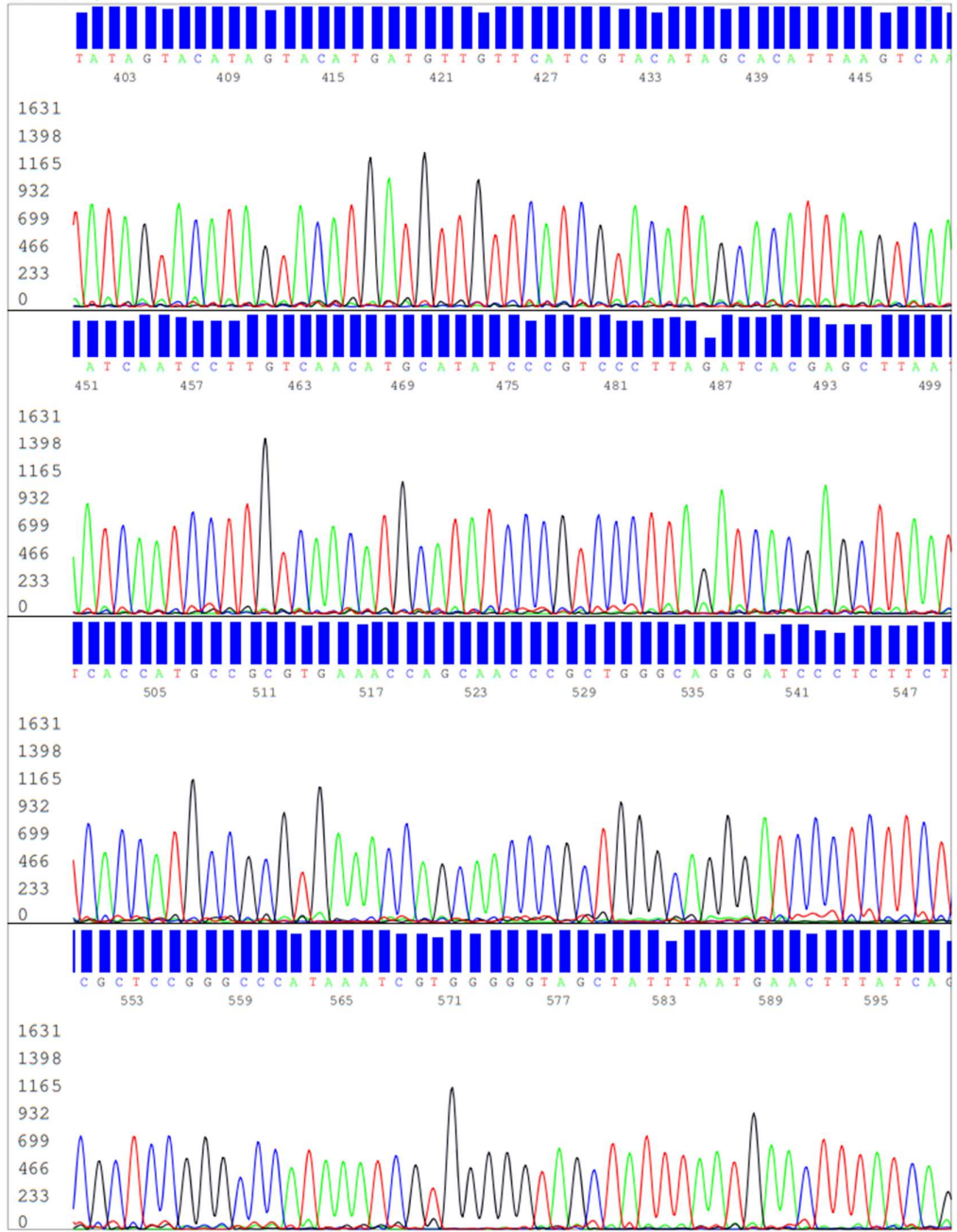
Printed on: Wed May 25,2022 01:52PM, ICT

Electropherogram Data Page 2 of 6

Lampiran 2 (lanjutan)



SN G 298 A:356 T:369 C:278  
 KB.bcp  
 KB 1.4.1.8 Cap:6  
 6. M5 F\_F07\_06  
 M5 F  
 KB\_3500\_POP7\_BDTV3.mob  
 Pts 1214 to 12684 Pk1 Loc:1191  
 Version 6.0 HiSQV Bases: 1023  
 Inst Model/Name 3500/3500 Instrument  
 May 24,2022 04:05PM, ICT  
 May 24,2022 04:29PM, ICT  
 Spacing:11.72 Pts/Panel600  
 Plate Name: 22050100789\_790



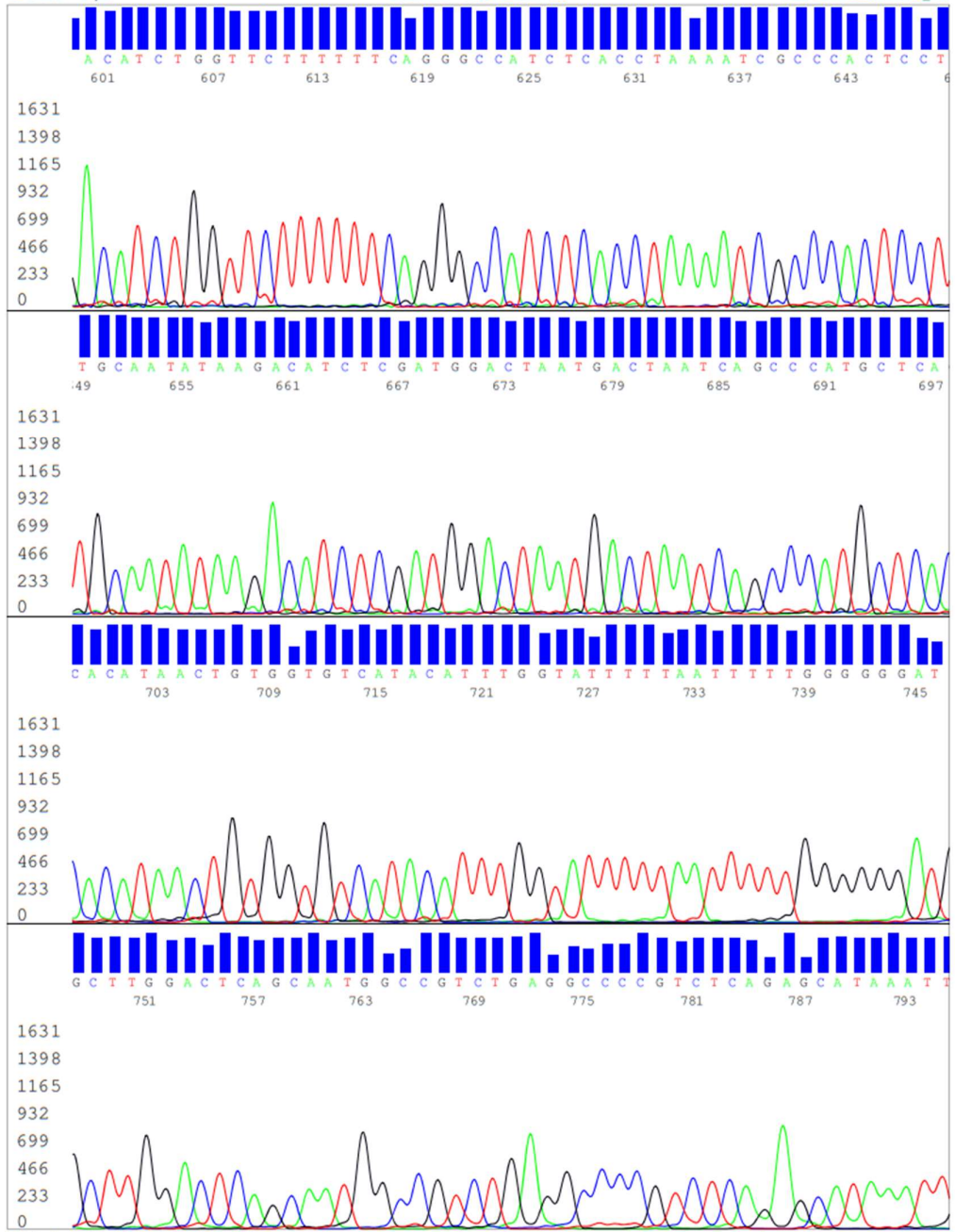
Printed on: Wed May 25,2022 01:52PM, ICT

Electropherogram Data Page 3 of 6

Lampiran 2 (lanjutan)



S/N G 298 A:356 T:369 C:278  
 KB.bcp  
 KB 1.4.1.8 Cap:6  
 6. M5 F\_F07\_06  
 M5 F  
 KB\_3500\_POP7\_BDTV3.mob  
 Pts 1214 to 12684 Pk1 Loc:1191  
 Version 6.0 HISQV Bases: 1023  
 Inst ModelName 3500/3500 Instrument  
 May 24,2022 04:05PM, ICT  
 May 24,2022 04:29PM, ICT  
 Spacing:11.72 Pts/Panel600  
 Plate Name: 22050100789\_790



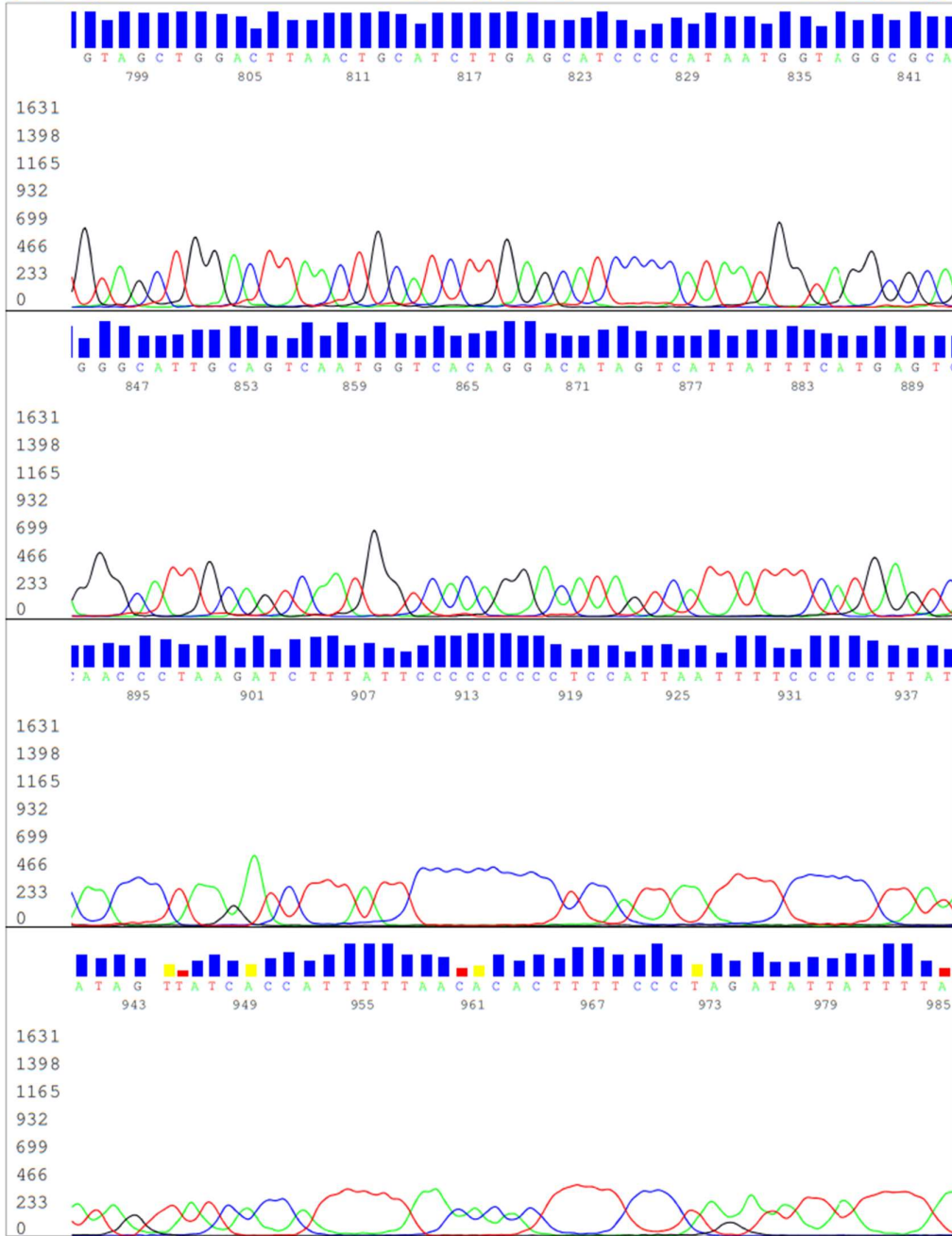
Printed on: Wed May 25,2022 01:52PM, ICT

Electropherogram Data Page 4 of 6

Lampiran 2 (lanjutan)



S/N G298 A:356 T:369 C:278  
 KB.bcp  
 KB 1.4.1.8 Cap:6  
 6. M5 F\_F07\_06  
 M5 F  
 KB\_3500\_POP7\_BDTV3.mob  
 Pts 1214 to 12684 Pk1 Loc:1191  
 Version 6.0 HiSQV Bases: 1023  
 Inst Model/Name 3500/3500 Instrument  
 May 24, 2022 04:05PM, ICT  
 May 24, 2022 04:29PM, ICT  
 Spacing:11.72 Pts/Panel600  
 Plate Name: 22050100789\_790



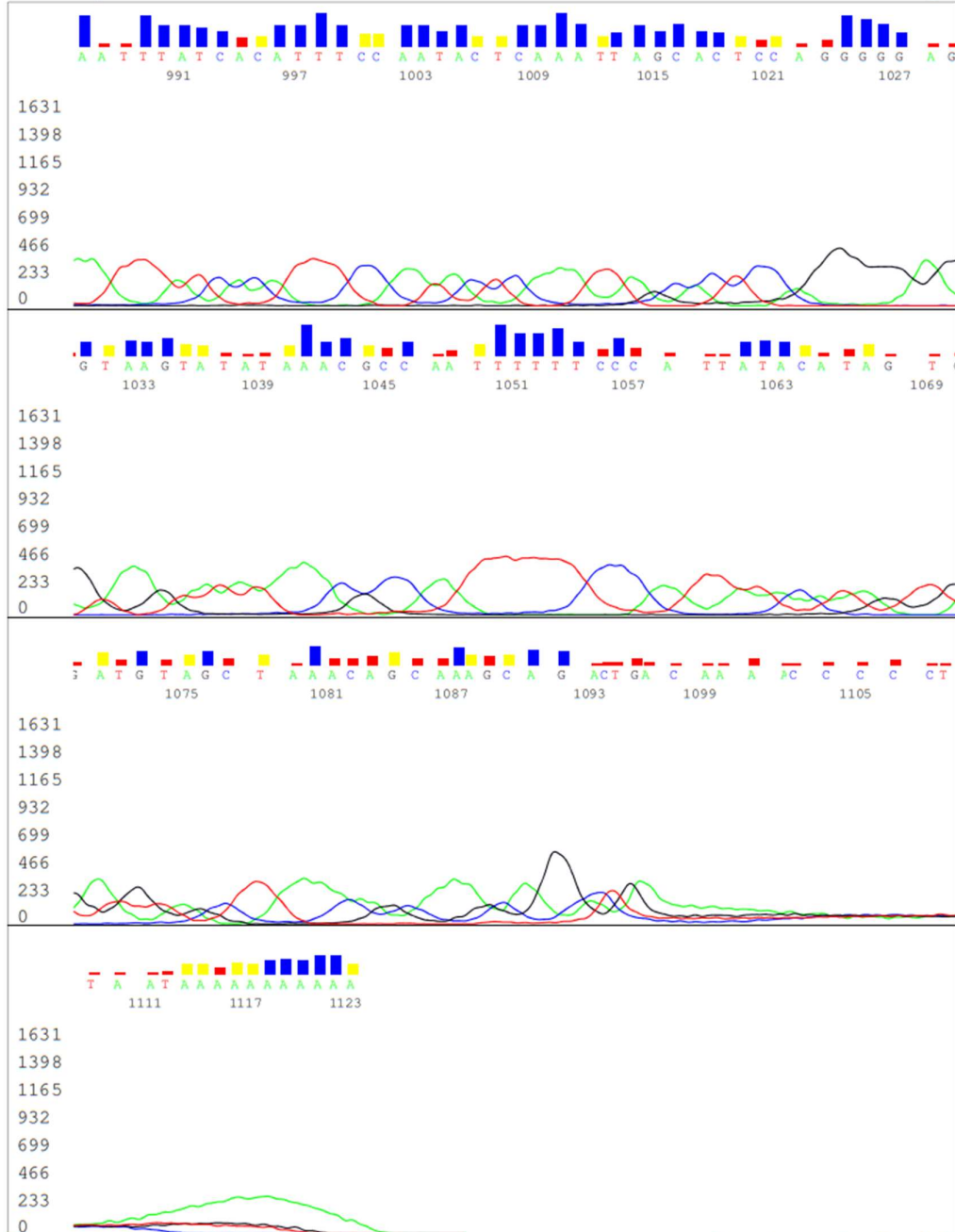
Lampiran 2 (lanjutan)



S/N G 298 A:356 T:369 C:278  
 KB.bcp  
 KB 1.4.1.8 Cap:6

6. M5 F\_F07\_06  
 M5 F  
 KB\_3500\_POP7\_BDTV3.mob  
 Pts 1214 to 12684 Pk1 Loc:1191  
 Version 6.0 HISQV Bases: 1023

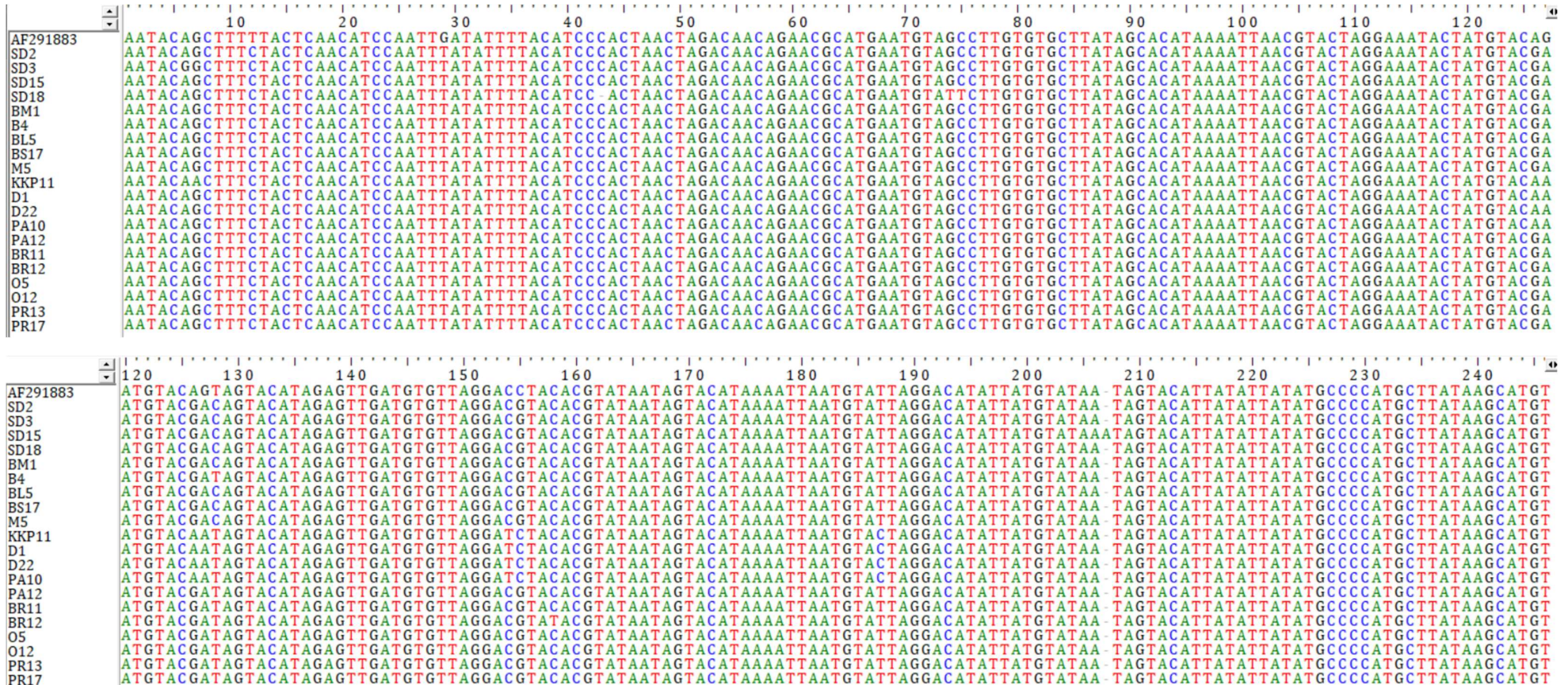
Inst Model/Name 3500/3500 Instrument  
 May 24,2022 04:05PM, ICT  
 May 24,2022 04:29PM, ICT  
 Spacing:11.72 Pts/Panel600  
 Plate Name: 22050100789\_790



Printed on: Wed May 25,2022 01:52PM, ICT

Electropherogram Data Page 6 of 6

Lampiran 3. Hasil *multiple alligment* atau pensejajaran 20 sampel terhadap sekuens rusa timor (*Rusa timorensis*) dari NCBI (AF291883)









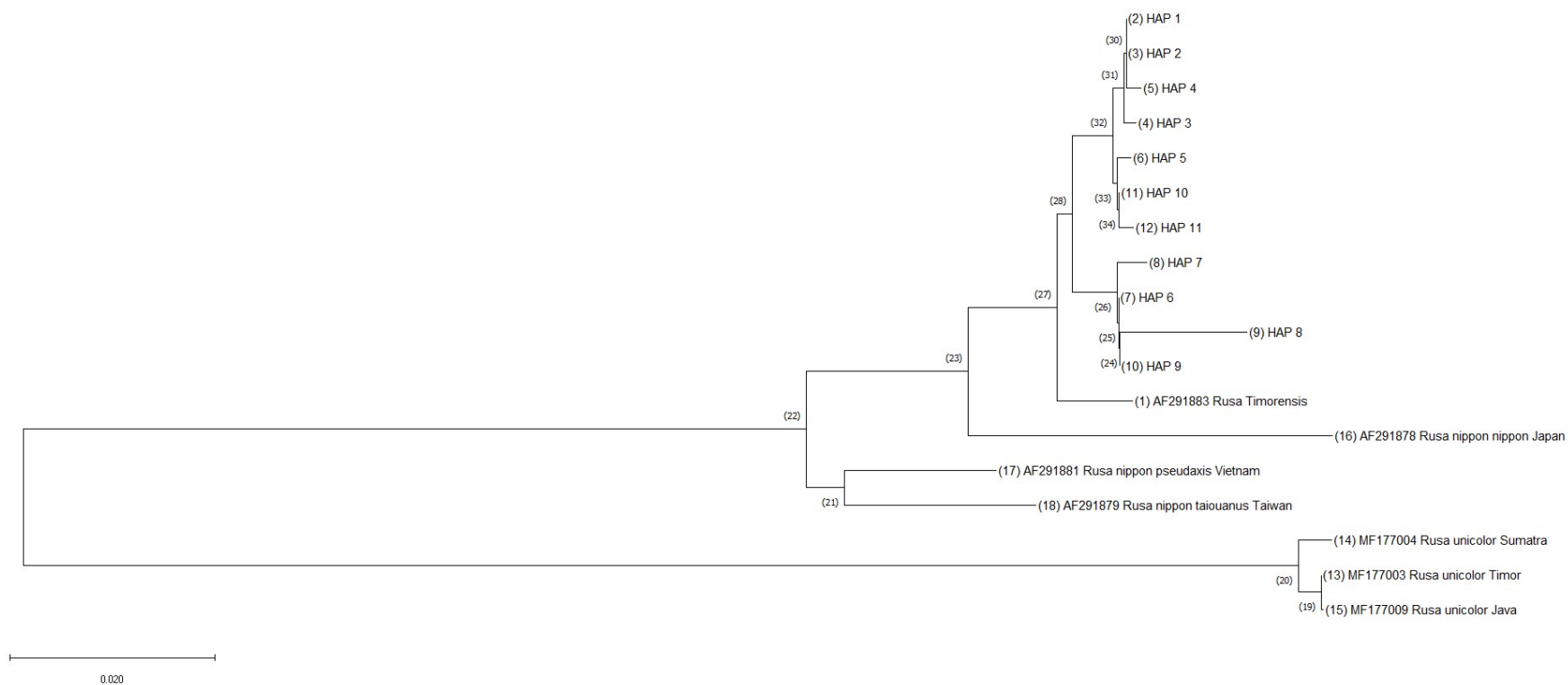
Lampiran 3 (lanjutan)

	720	730	740	750	760	770
AF291883	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	ATTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
SD2	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
SD3	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
SD15	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
SD18	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
BM1	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
B4	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
BL5	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
BS17	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
M5	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
KKP11	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
D1	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
D22	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGATTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
PA10	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
PA12	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
BR11	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
BR12	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
O5	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
O12	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
PR13	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT
PR17	CAGTCAATGGT	CACAGGACAT	AGTCATTATTT	CATGAGTCA	CAACCCTA	AAGATCTTTATT

Lampiran 4. Tabel letak SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisme*) per sampel dengan data dari NCBI (AF291883)

No.	Sampel	Nomor situs basa nukleotida																													
		1	2	7	7	2	2	2	5	5	5	8	5	4	7	6	4	4	5	6	7	9	0	1	2	3	4	5	6		
		6	7	2	9	4	5	6	7	8	4	5	8	7	1	3	4	8	2	5	5	5	8	5	0	0	4	4	9	6	3
1	AF291883 (NCBI)	A	G	T	G	G	C	A	G	T	C	C	C	T	T	C	C	T	C	A	T	C	T	A	C	T	A	T	G	C	C
2	SD2	.	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
3	SD3	G	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
4	SD15	.	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
5	SD18	.	.	C	T	T	T	G	A	C	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	
6	BM1	.	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	C	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
7	B4	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	T	.
8	BL5	.	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	C	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
9	BS17	.	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	C	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
10	M5	.	.	C	T	.	.	G	A	C	.	G	.	.	C	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
11	KKP11	.	A	C	T	.	.	.	A	.	T	.	.	C	.	T	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
12	D1	.	.	C	T	.	.	.	A	.	T	.	.	C	.	T	T	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.
13	D22	.	.	C	T	.	.	.	A	.	T	.	.	C	.	T	T	.	.	G	G	T	G	.	G	G	C	G	T	.	T
14	PA10	.	.	C	T	.	.	.	A	.	T	.	.	C	.	T	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
15	PA12	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
16	BR11	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
17	BR12	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	T	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
18	O5	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
19	O12	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
20	PR13	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.
21	PR17	.	.	C	T	.	.	G	A	.	.	G	.	.	.	T	T	.	T	G	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.

Lampiran 5. Pohon Filogeografi antar haplotip *Rusa timorensis* dan data dari NCBI (AF291883) serta dibandingkan dengan *out grup* *Rusa nippon* dan *Rusa unicorn*



Keterangan : TN Alas Purwo (HAP 1; HAP 2; HAP 3), TN Baluran (HAP 4; HAP 5; HAP 6; HAP 7; HAP 8), TN Bali Barat (HAP 9; HAP 10; HAP 11)

Lampiran 6. Foto Kegiatan Penelitian



Persiapan alat untuk  
disterilisasi



Seleksi Sampel



Mengeluarkan  
Sampel dari Tube



Menghancurkan Sampel  
Feses



Menimbang Sampel  
Feses



Memasukkan sampel  
ke Tube Ekstraksi



Proses Ekstraksi DNA



Proses Ekstraksi DNA



Proses Ekstraksi DNA

Lampiran 6 (lanjutan)



Vortex



Inkubasi



Sentrifuse



Kuantifikasi DNA



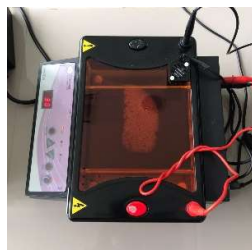
Persiapan PCR



PCR



Pembuatan Gel Agarose  
Untuk Elektroforesis



Elektroforesis



Visualisasi  
Elektroforesis