



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS VARIASI D-LOOP DNA MITOKONDRIA PADA
POPULASI GAJAH SUMATERA (*Elephas maximus sumatranus*)
DI TAMAN NASIONAL WAY KAMBAS**

SKRIPSI

MIEN SAVIRA

0806327414

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS VARIASI D-LOOP DNA MITOKONDRIA PADA
POPULASI GAJAH SUMATERA (*Elephas maximus sumatranus*)
DI TAMAN NASIONAL WAY KAMBAS**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

MIEN SAVIRA

0806327414

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang
dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : Mien Savira

NPM : 0806327414

Tanda Tangan : 

Tanggal : 22 Juni 2012

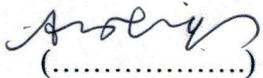
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Mien Savira
NPM : 0806327414
Program studi : S1 Biologi
Judul skripsi : Analisis Variasi D-loop DNA Mitokondria pada
Populasi Gajah Sumatera (*Elephas maximus
sumatranus*) di Taman Nasional Way Kambas

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. dr. Herawati Sudoyo, Ph.D 
(.....)

Pembimbing II : Dr. Noviar Andayani, M.Sc 
(.....)

Penguji I : Dr. Abinawanto 
(.....)

Penguji II : Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc 
(.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 22 Juni 2012

KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains, Departemen Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Saya menyadari, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Prof. dr. Herawati Sudoyo, Ph.D serta Dr. Noviar Andayani, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Dr. Abinawanto serta Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran, baik secara teknis maupun nonteknis yang sangat berguna dalam rangka penyusunan skripsi ini.
- (3) Pihak dari Laboratorium Mitokondria dan Laboratorium Forensik Lembaga Biologi Molekul Eijkman, yakni dr. Loa Helena Suryadi, MD, MS, Bu Safarina G. Malik, para *research assistants*, khususnya Ka Wulan, Ka Willy, Ka Cita, Jessica, ka Sukma, Bu Tari, dan Ka Pai yang telah memberikan banyak bantuan dalam perolehan data skripsi, serta Ka Bianka yang telah membantu urusan administratif yang terkait dengan penyusunan skripsi ini.
- (4) Rekan-rekan dari Wildlife Conservation Society - Indonesia Program (WCS-IP), khususnya Ka Donny Gunaryadi dan para personil lapangan yang telah membantu pengadaan sampel penelitian dan data yang sangat berguna bagi penyusunan skripsi ini.
- (5) Dr. rer. Nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. dan Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Ketua dan Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI.
- (6) Dra. Setiorini, M.Kes dan Dr. Drs. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. selaku koordinator seminar, serta Dr. Titi Soedjiarti, SU selaku koordinator

pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI yang turut membantu proses seminar penelitian dan sidang skripsi.

- (7) Dr. Dadang Kusmana, M.Sc. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan banyak dukungan semenjak awal perkuliahan saya di Departemen Biologi FMIPA UI hingga saat ini.
- (8) Seluruh dosen pengajar Departemen Biologi FMIPA UI yang telah berbagi ilmu yang sangat berguna selama saya berkuliah di Departemen Biologi FMIPA UI.
- (9) Kedua orang tua saya, yakni Drs. L. Abdul Radjab dan Elvina Rasjid, adik saya L.M. Ali Alqomar, serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan perhatian, kasih sayang, doa, dan dukungan yang senantiasa menjadi motivasi bagi saya untuk dapat meraih gelar sarjana.
- (10) Para sahabat (Andi Ghebi Wim, Ayu Mayasari, Elsa Widyaningsih, Rithami Arita, Putri Krida Gita Prayogha, Maya Ulfah, Seyla Fenina, Hanum Puspa Diani, Nur El Fadhila, Annisa, Rininta Dwi Anggriary, Dessy Komalasari, Bahagia Ayu Lestari, Labibah Qotrunada, Sintia Purnadanti, dan Alvin Natalius), rekan-rekan Laboratorium Genetika UI, dan Angkatan 2008 (Biosentris), yang keberadaannya selalu menjadi semangat dan kebahagiaan bagi saya.
- (11) Ka Shobi, Bertha, Sinta, Muthia, Fauzi, Anas, Mba Asri, Mba Fenti, Mba Evi serta semua pihak yang telah berbagi ilmu serta memberikan banyak bantuan selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Depok, Juni 2012

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mien Savira
NPM : 0806327414
Program Studi : S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Analisis Variasi D-Loop DNA Mitokondria pada Populasi Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Taman Nasional Way Kambas.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak bebas Royalti noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, megalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan dua (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya salaam tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : Juni 2012

Yang menyatakan


Mien Savira

ABSTRAK

Nama : Mien Savira
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Analisis Variasi D-loop DNA Mitokondria pada Populasi Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Taman Nasional Way Kambas.

Saat ini gajah sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) tercatat sebagai hewan dengan status konservasi “*critically endangered*”, terkait dengan penurunan populasi yang drastis selama 25 tahun terakhir serta permasalahan habitat dan konflik gajah-manusia yang terjadi secara terus-menerus. Kondisi demikian mengindikasikan bahwa gajah sumatera semakin rentan terhadap resiko kepunahan sehingga manajemen konservasi yang tepat perlu dirumuskan. Penelitian ini dilakukan untuk berkontribusi dalam penentuan manajemen konservasi komprehensif, melalui analisis terhadap variasi daerah D-loop (*displacement loop*) DNA mitokondria menggunakan sampel noninvasif berupa feses yang diperoleh populasi di Taman Nasional Way Kambas sebagai salah satu populasi gajah sumatera yang tersisa di alam. Tingkat variasi genetik yang rendah terdeteksi pada populasi tersebut melalui penemuan satu jenis haplotipe [$h, \pi = 0$] dari 31 sampel yang dianalisis. Hasil tersebut mengindikasikan kemungkinan pengaruh *founder effect*, *lineage sorting*, dan *selective sweep* terjadi pada populasi gajah sumatera di Taman Nasional Way Kambas. Meskipun demikian, penggunaan marka molekul mikrosatelit serta penambahan jumlah sampel perlu dilakukan untuk memperoleh hasil analisis yang lebih representatif terhadap populasi gajah sumatera di Taman Nasional Way Kambas.

Kata kunci : *D-loop*, gajah sumatera, haplotipe, Taman Nasional Way Kambas.
xiii + 76 halaman : 13 gambar
Daftar referensi : 100 (1979—2011)

ABSTRACT

Name : Mien Savira
Study Program : Biologi S1 Regular
Title : Analysis of Mitochondrial DNA D-loop Variation of The Sumatran Elephant (*Elephas maximus sumatranus*) Population in Way Kambas National Park.

The sumatran elephant (*Elephas maximus sumatranus*) has been classified as “critically endangered”, related to drastic population decline during the last 25 years, ongoing habitat problems and human-elephant conflicts. This situation indicates that the sumatran elephant is facing a greater risk of extinction, hence appropriate conservation management should be determined. To contribute to a comprehensive conservation management for this subspecies, this research was conducted to analyze the variation of mitochondrial DNA D-loop using noninvasive fecal samples obtained from Way Kambas National Park, as one of the sumatran elephant remaining population in the wild. Low level of genetic variation was detected in this population through the observation of single haplotype [$h, \pi = 0$] from 31 samples used in the analysis. This result indicates the possible influence of founder effect, lineage sorting and selective sweep to the population. Nevertheless, this result should be accompanied with genetic information from biparental molecular marker (e.g. microsatellites) and larger sample size to discover the more representative description about the population.

Keywords : *D-loop*, haplotype, sumatran elephant, Way Kambas National Park.
xiii + 76 pages : 13 pictures
Bibliography : 100 (1979—2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Gajah sumatera (<i>Elephas maximus sumatranus</i>).....	5
2.1.1 Karakteristik.....	5
2.1.2 Habitat dan distribusi populasi.....	5
2.1.3 Struktur sosial.....	6
2.1.4 Status konservasi.....	7
2.2. Taman Nasional Way Kambas	8
2.2.1 Populasi gajah sumatera.....	8
2.2.2 Ancaman terhadap populasi gajah sumatera di Taman Nasional Way Kambas (TNWK).....	9
2.3. Analisis genetika populasi.....	10
2.3.1 Metode pengambilan sampel noninvasif.....	10
2.3.2 DNA Mitokondria sebagai marka molekul.....	12
2.3.2.1 Karakteristik DNA mitokondria.....	12
2.3.2.2 Daerah D-loop DNA mitokondria	14
2.3.2.3 Daerah D-loop dan haplotipe gajah asia.....	15
2.3.2.4 Parameter statistik DNA mitokondria sebagai marka molekul.....	16
2.3.2.4.1 Keragaman nukleotida dan haplotipe.....	16
2.3.2.4.2 Rekonstruksi pohon filogenetik.....	16
2.4. Teknik Biologi Molekul	17
2.4.1 Pengukuran kuantitas DNA menggunakan spektrofotometri.....	17
2.4.2 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	17
2.4.3 Pemisahan fragmen DNA menggunakan elektroforesis	19
2.4.4 Pengurutan nukleotida berdasarkan analisis sekuensing.....	20
3. METODE PENELITIAN	23
3.1 Lokasi, waktu penelitian	23

3.1.1	Pengambilan sampel.....	23
3.1.2	Analisis variasi D-loop DNA mitokondria.....	23
3.2.	Alat, bahan, dan cara kerja.....	23
3.2.1	Pengambilan sampel.....	23
3.2.1.1	Alat.....	23
3.2.1.2	Bahan.....	24
3.2.1.3	Cara kerja.....	24
3.2.2.	Analisis variasi D-loop DNA mitokondria.....	24
3.2.2.1	Alat.....	24
3.2.2.2	Bahan.....	25
3.2.2.3	Cara kerja.....	26
3.2.2.3.1	Ekstraksi DNA	26
3.2.2.3.2	Kuantifikasi DNA.....	27
3.2.2.3.3	Desain primer dan amplifikasi DNA dengan metode PCR.....	28
3.2.2.3.4	Purifikasi produk PCR.....	29
3.2.2.3.5	<i>Cycle sequencing</i>	30
3.2.2.3.6	Presipitasi DNA.....	30
3.2.2.3.7	Pengurutan nukleotida melalui analisis sekuensing.....	31
3.2.2.3.8	Pengolahan data.....	31
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1.	Hasil.....	33
4.1.1.	Ekstraksi dan kuantifikasi DNA.....	33
4.1.2.	Desain primer dan amplifikasi DNA dengan metode PCR.....	34
4.1.3.	Pembacaan urutan nukleotida gajah sumatera melalui analisis sekuensing.....	37
4.1.4.	Pohon filogenetik.....	40
4.2.	Pembahasan.....	41
4.2.1	Ekstraksi DNA dan kuantifikasi DNA.....	41
4.2.2	Desain primer dan amplifikasi DNA dengan metode PCR.....	42
4.2.3	Pembacaan urutan nukleotida melalui analisis sekuensing.....	43
4.2.4	Variasi <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs).....	44
4.2.5	Tingkat variasi genetik dan distribusi varian genetik di dalam populasi.....	45
4.2.6	Hubungan filogenetik gajah sumatera di Taman Nasional Way Kambas.....	47
4.2.7	Manajemen konservasi populasi gajah sumatera di Taman Nasional Way Kambas.....	47
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1	Kesimpulan.....	50
5.2	Saran.....	51
	DAFTAR REFERENSI	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1	Gajah sumatera.....	5
Gambar 2.2.1	Estimasi distribusi gajah sumatera di TNWK.....	8
Gambar 2.3.1	Sampel noninvasif berupa feses.....	12
Gambar 2.3.2.1	Representasi mtDNA Mammoth.....	13
Gambar 2.3.2.2	Skema daerah D-loop mtDNA mamalia.....	15
Gambar 4.1.1	Peta lokasi pengambilan sampel di TNWK.....	34
Gambar 4.1.2(1)	Skema daerah amplifikasi menggunakan sekuens gajah asia yang diperoleh dari GenBank (<i>Accession number</i> : NC_005129).....	32
Gambar 4.1.2(2)	Strategi amplifikasi DNA (PCR) dan <i>cycle sequencing</i> ...	35
Gambar 4.1.2(3)	Visualisasi hasil amplifikasi DNA dengan metode PCR pada gel agarosa 2%.....	36
Gambar 4.1.3(1)	Skema daerah hasil sekuensing yang diperoleh pada penelitian ini.....	38
Gambar 4.1.3(2)	Posisi nukleotida pada mtDNA hasil sekuensing yang menunjukkan 5 SNPs.....	39
Gambar 4.1.3(3)	Peta distribusi haplotipe populasi gajah sumatera di TNWK.....	39
Gambar 4.1.4	Pohon filogenetik <i>Maximum Likelihood</i> haplotipe gajah sumatera yang ditemukan di TNWK dan gajah asia lainnya, disertai gajah afrika sebagai <i>outgroup</i>	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Tabel data pengambilan sampel di Taman Nasional Way Kambas.....	60
Lampiran 2	Tabel hasil ekstraksi feses gajah sumatera (<i>Elephas maximus sumatranus</i>) di Taman Nasional Way Kambas.....	63
Lampiran 3	Tabel konsentrasi produk PCR hasil purifikasi.....	64
Lampiran 4	Tabel posisi SNPs hasil <i>multiple alignment</i> pada 31 sampel <i>fecal</i> DNA gajah sumatera.....	65
Lampiran 5	Sekuens daerah 675 bp yang meliputi sitokrom <i>b</i> , tRNA threonin, tRNA prolin, dan D-loop menggunakan primer MDL5 (<i>forward</i>).....	66
Lampiran 6	Sekuens daerah 675 bp yang meliputi sitokrom <i>b</i> , tRNA threonin, tRNA prolin, dan D-loop menggunakan primer MDL3 (<i>reverse</i>).....	67
Lampiran 7	Hasil <i>multiple alignment</i> 31 sekuens sampel terhadap sekuens gajah asia (<i>Elephas maximus</i>), gajah afrika (<i>Loxodonta africana</i>), dan haplotipe BT sumatera.....	68
Lampiran 8	Daftar larutan dan <i>buffer</i> yang digunakan dalam penelitian	76

BAB 1 PENDAHULUAN

Gajah sumatera atau *Elephas maximus sumatranus* merupakan salah satu subspecies gajah asia yang memiliki habitat asli di pulau Sumatera (Santiapillai & Ramono 1993: 12; Comstock *dkk.* 2002: 2489; Vandebona *dkk.* 2004: 83; Soehartono *dkk.* 2007: 3). Hewan tersebut memiliki populasi yang tersebar di tujuh provinsi, yaitu di Nangroe Aceh Darusalam, Sumatera Utara, Riau, Jambi, Bengkulu, Sumatera Selatan, dan Lampung (Soehartono *dkk.* 2007: 4 & 6). Saat ini populasi-populasi tersebut tengah dihadapkan dengan resiko kepunahan yang semakin kritis sehingga IUCN menempatkan gajah sumatera ke dalam status konservasi *critically endangered* (IUCN 2012: 1).

Selama 25 tahun terakhir, populasi gajah sumatera di alam telah mengalami penyusutan secara drastis, baik dari segi ukuran populasi maupun distribusinya. Sebanyak 84% dari total jumlah individu yang berada pada populasi di Riau (\pm 1342 individu) telah berkurang menjadi angka 210 pada tahun 2007. Selain itu, studi oleh Hedges *dkk.* terhadap populasi gajah sumatera di Lampung menunjukkan bahwa 9 dari 12 populasi di provinsi tersebut telah mengalami kepunahan. Permasalahan habitat dianggap berkontribusi besar dalam menyebabkan kondisi tersebut. Berdasarkan analisis oleh IUCN (2012: 1), lebih dari 69% habitat potensial gajah sumatera telah hilang selama tiga generasi terakhir (terhitung sejak 1930-an). Padahal, hewan tersebut sangat bergantung pada habitat yang luas sehingga degradasi habitat akan mengurangi ruang gerak gajah dalam memenuhi kebutuhan hidupnya. Akibatnya, kawanan gajah marak ditemukan di luar habitatnya dan seringkali bersinggungan dengan kawasan kependudukan, yang pada akhirnya memicu konflik gajah-manusia (Soehartono *dkk.* 2007: 11).

Permasalahan habitat dan resiko konflik gajah-manusia menjadikan gajah sumatera terjebak dalam populasi-populasi yang berukuran kecil di alam. Hal tersebut memunculkan kekhawatiran terhadap penurunan variasi genetik di dalam populasi sebab populasi yang berukuran kecil cenderung memiliki variasi genetik yang rendah akibat peningkatan resiko *genetic drift* dan *inbreeding* (Lacy 2000:

39; Archie *dkk* 2011: 47). Penurunan variasi genetik dapat membawa dampak negatif bagi viabilitas populasi sebab dapat mengurangi kemampuan individual dalam menghadapi tekanan seleksi alamiah terutama akibat perubahan lingkungan. Kondisi tersebut menjadikan populasi yang bersangkutan lebih rentan terhadap resiko kepunahan di generasi yang akan datang (Frankham *dkk.* 2002: 225; Ahlering *dkk.* 2010: 414).

Taman Nasional Way Kambas (TNWK) merupakan salah satu kawasan di provinsi Lampung yang menampung populasi gajah sumatera. Serupa dengan populasi di kawasan lainnya, populasi di Taman Nasional tersebut juga dihadapkan pada berbagai ancaman, seperti kehilangan habitat, perburuan liar, dan konflik antara gajah-manusia (Soehartono *dkk.* 2007: 7). Walaupun demikian, populasi tersebut dianggap memiliki keistimewaan yang membedakannya dari populasi-populasi di kawasan lainnya. Populasi gajah sumatera di TNWK berada di dalam kawasan konservasi yang kecil (1235 km²), terisolasi (Nyhus *dkk.* 2000: 263), serta cukup *viable* (Sukumar & Santiapillai 1993: 63) dengan ukuran populasi yang cukup besar, yaitu sekitar 180—250 individu berdasarkan penghitungan pada tahun 1994 dan 2002 (Hedges *dkk.* 2005: 41). Meskipun merupakan kawasan konservasi dengan batasan yang jelas, populasi di TNWK memiliki tingkat konflik gajah-manusia tertinggi (Soehartono *dkk.* 2007: 10—11). Kondisi demikian membuat populasi gajah sumatera di TNWK tercatat sebagai salah satu prioritas utama bagi manajemen konservasi populasi gajah sumatera (IUCN 2012: 1).

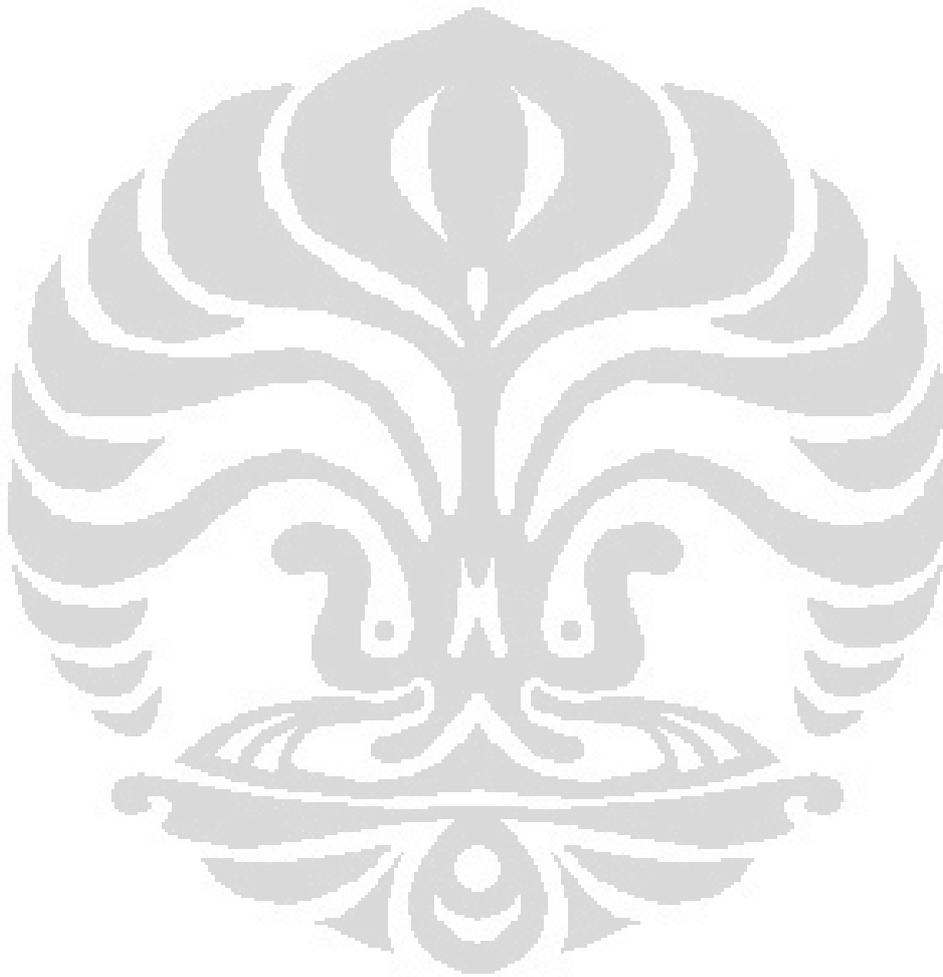
Manajemen konservasi pada umumnya bertujuan untuk melindungi populasi yang mampu bertahan hidup (*viable*) dan fungsional secara ekologi, dan salah satu faktor terpenting yang digunakan untuk memperkirakan kemampuan hidup jangka panjang dari suatu populasi yaitu variasi genetik (Ahlering *dkk.* 2010: 414). Oleh karena itu, analisis terhadap variasi genetik populasi gajah sumatera di TNWK sangat dibutuhkan. Selain itu, distribusi variasi genetik juga perlu diketahui sebab data tersebut dapat menunjukkan pola distribusi spasial gajah sumatera di dalam populasi. Pengetahuan mengenai pola distribusi spasial dapat digunakan khususnya untuk manajemen konservasi terhadap konflik gajah-manusia (Jamieson *dkk.* 2008: 130)

Perolehan data mengenai tingkat variasi genetik dan distribusinya di dalam populasi dapat dilakukan menggunakan marka DNA mitokondria atau mtDNA pada daerah D-loop (*displacement loop*). Daerah D-loop pada mtDNA dikenal merupakan daerah hipervariabel dengan laju mutasi tinggi ($0,075\text{—}0.165 \times 10^{-6}$ substitusi/situs/tahun) sehingga sangat sesuai untuk digunakan dalam analisis genetika populasi antartaksa yang berkerabat dekat. Selain itu, DNA mitokondria memiliki pola pewarisan maternal sehingga struktur genetik di dalam populasi matrilineal gajah sumatera dapat terlihat lebih jelas melalui distribusi haplotipe (Nyakaana & Arctander 1999: 1107). MtDNA juga diketahui memiliki banyak salinan di dalam satu sel tunggal sehingga lebih mudah untuk diisolasi bahkan dari sampel noninvasif seperti feses (Morin *dkk.* 2001: 1841; Pakendorf & Stoneking 2005: 167; Vidya *dkk.* 2005: 71; Gardipee 2007: 4).

Beberapa studi telah dilakukan untuk menganalisis tingkat variasi genetik populasi gajah di alam, tetapi hasil yang ditunjukkan masih berbeda. Studi terhadap kantong populasi gajah asia di Kanara Utara, India (sekitar 200—500 individu) menunjukkan tingkat variasi genetik yang rendah dengan temuan satu haplotipe mtDNA ($h = 0,0$) (Vidya *dkk.* 2005: 74). Hasil tersebut sangat berlawanan dengan studi populasi gajah asia yang berukuran lebih kecil (sekitar 60—80 individu; 740 km^2) di Cat Tien, Vietnam, yang menunjukkan variasi genetik yang lebih tinggi dengan total temuan sebanyak tiga haplotipe mtDNA ($0,699 \pm 0,049$) (Vidya *dkk.* 2007: 1471). Studi terhadap populasi gajah asia di Nakai Plateau, Laos (sekitar 132 individu; 1340 km^2) juga menunjukkan hasil serupa, yaitu enam haplotipe mtDNA ($0,741 \pm 0,020$) (Nyakaana & Arctander 1999; 1108; Ahlering *dkk.* 2010: 417). Perbedaan hasil yang ditunjukkan tersebut menandakan bahwa tingkat variasi genetik pada populasi gajah cukup sulit untuk diprediksi karena variasi genetik pada populasi gajah juga berkorelasi dengan struktur sosial matrilineal yang dimiliki oleh hewan tersebut. Gajah cenderung hidup secara berkelompok bersama kerabat dekatnya sehingga distribusi varian genetik di dalam populasi umumnya bersifat tidak acak dan seragam pada masing-masing kelompok (Archie *dkk.* 2006: 519).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat variasi genetik mtDNA serta pola distribusinya pada populasi gajah sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di TNWK, dengan membandingkan varian haplotipe yang pernah

ditemukan sebelumnya. Sampel yang digunakan pada penelitian ini berupa feses yang diperoleh secara noninvasif, yaitu, yaitu pada Mei 2010 hingga Desember 2010. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk menentukan manajemen konservasi yang efektif dan efisien bagi populasi gajah Sumatera yang terancam punah, khususnya pada populasinya di TNWK.



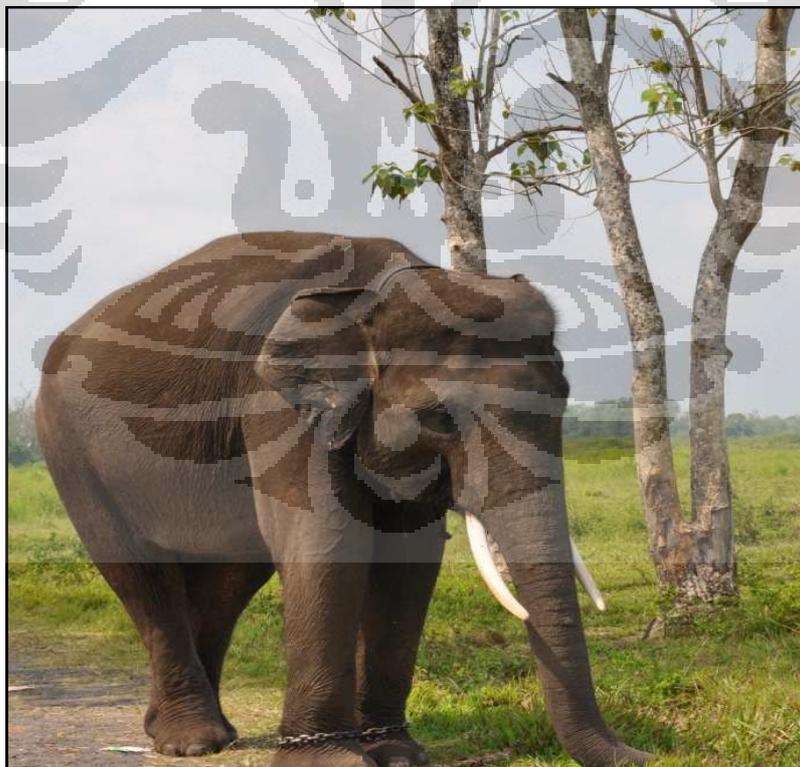
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. GAJAH SUMATERA (*Elephas maximus sumatranus*)

2.1.1. Karakteristik

Gajah sumatera atau *Elephas maximus sumatranus* (Gambar 2.1.1) merupakan salah satu subspecies gajah asia yang memiliki habitat asli di pulau Sumatera. Gajah sumatera tergolong subspecies gajah asia yang memiliki ukuran tubuh relatif kecil. Selain itu, gajah sumatera juga memiliki jumlah tulang rusuk sebanyak 20 pasang (berbeda dengan subspecies lainnya yang umumnya hanya memiliki 19 pasang tulang rusuk), telinga yang berukuran lebih besar, dan gading yang relatif lebih panjang (Fleischer *dkk.* 2001: 1883; Sitompul 2011: 2).



Gambar 2.1.1. Gajah sumatera
[Sumber: Dokumentasi pribadi]

2.1.2. Habitat dan distribusi populasi

Populasi gajah sumatera umumnya mendiami habitat berupa hutan dataran rendah dengan ketinggian di bawah 300 m (IUCN 2012: 1). Meskipun demikian, gajah juga terdapat di kawasan hutan pegunungan dengan kemiringan yang curam. Berdasarkan penelitian Rood *dkk.*(2010: 981), gajah juga ditemukan pada ketinggian 1600—220 di atas permukaan laut. Hal tersebut mengindikasikan bahwa gajah juga mampu untuk berpindah melalui kawasan yang bergunung-gunung, meskipun frekuensi individu yang ditemukan pada daerah tersebut lebih sedikit akibat kondisi tanah tidak rata yang dapat menghambat pergerakan gajah. Selain itu, kawasan hutan yang bergunung-gunung seringkali dijadikan tempat bagi gajah untuk menghindari dari kebisingan. Kinnaird *dkk.* (2003) (*lihat* Rood 2010: 976) menyatakan bahwa gajah menghindari kawasan tepi hutan sejauh 3 km ke bagian dalam (*edge effect*) yang kemungkinan dilakukan untuk menghindari resiko perburuan atau persinggungan dengan manusia.

Populasi-populasi gajah sumatera tersebar di tujuh provinsi yaitu Nangroe Aceh Darusalam, Sumatera Utara, Riau, Jambi, Bengkulu, Sumatera Selatan, dan Lampung (Soehartono *dkk.* 2007: 4). Berdasarkan survei sekitar hingga tahun 1985, populasi gajah sumatera berjumlah 44 populasi, dengan dua belas diantaranya berada di provinsi Lampung (Santiapillai & Ramono 1993: 14). Namun demikian, populasi di provinsi Lampung saat ini hanya bersisa tiga populasi, dengan satu populasi diantaranya dianggap kurang *viable* (Perrera 2009: 43; WCS 2010: 1).

2.1.3. Struktur sosial

Gajah sumatera merupakan kelompok hewan yang hidup dengan pola matrilineal, yaitu hidup berkelompok dan dipimpin oleh betina dewasa dengan ikatan sosial yang kuat (Vidya & Sukumar 2005b: 205). Kelompok tersebut biasa disebut juga dengan istilah kelompok famili, yaitu asosiasi induk-keturunan. Kelompok famili tersebut dapat bergabung membentuk 1) *kinship group*, yaitu asosiasi kelompok-kelompok famili yang saling berkerabat dekat 2) klan, yaitu gabungan dari kelompok-kelompok famili membentuk kesatuan yang lebih besar

3) subpopulasi, yaitu fragmen-fragmen berukuran kecil dari suatu populasi; 4) populasi. Berdasarkan studi oleh Santiapillai dan Suprahman (1995: 16—17) pada populasi gajah sumatera di TNWK, kelompok famili dihuni oleh 4—8 individu, sedangkan dalam tingkatan klan dapat dihuni sekitar 45 individu. Studi terhadap gajah padang rumput afrika menunjukkan bahwa kelompok hewan tersebut memiliki hubungan yang erat dan menghabiskan kebersamaan sekitar 70—90 % setiap harinya (Vidya & Sukumar 2005b: 205). Keberadaan kelompok sosial tersebut dianggap merupakan strategi untuk meningkatkan kelangsungan hidup keturunannya melalui perlindungan terhadap predator dan *allomothering* (pengasuh non-maternal) (Lee 1987: 278; Santiapillai & Suprahman 1995: 16; McCullough 1996: 1—2; Vidya & Sukumar 2005b: 205).

Hal yang berbeda ditunjukkan oleh individu gajah sumatera jantan yang umumnya hidup secara soliter, tetapi dapat pula bergabung dengan kelompok betina atau membentuk asosiasi yang longgar dengan sesama jantan (Vidya & Sukumar 2005b: 205). Populasi di TNWK menunjukkan 34 % gajah sumatera hidup secara soliter dan semuanya merupakan individu jantan. Beberapa kelompok jantan yang beranggotakan sekitar 2—9 individu juga ditemukan, tetapi kelompok yang dibentuk cenderung tidak stabil (Santiapillai & Suprahman 1995: 16).

2.1.4. Status konservasi

Gajah sumatera termasuk dalam daftar hewan yang berstatus *critically endangered* versi IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*), terkait dengan peningkatan resiko kepunahannya di alam di alam (IUCN 2012: 1). Gajah sumatera juga termasuk dalam *appendix I* CITES (*Convention on International Trade of Endangered Species*) sebagai hewan dilindungi dari berbagai bentuk perdagangan ilegal. Pemerintah Indonesia juga telah memberikan perlindungan bagi hewan tersebut melalui Undang-Undang Perlindungan Satwa Liar Tahun 1931 (Soehartono *dkk.* 2007: 3; Arivazhagan & Ramakrishnan 2012: 15).

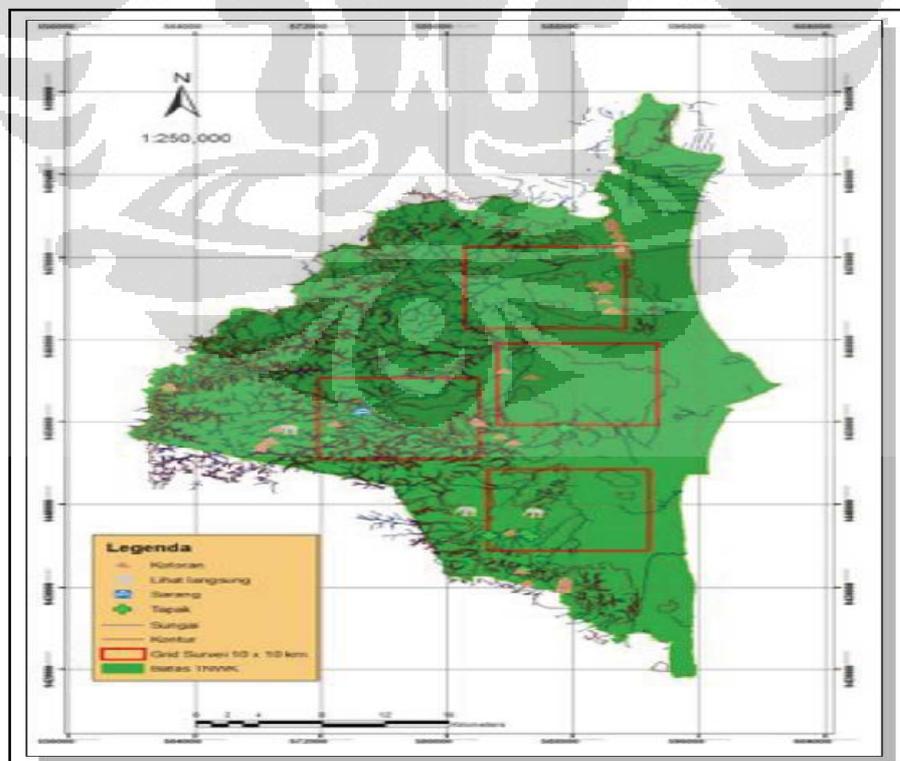
Gajah sumatera dikategorikan sebagai *Evolutionary Significant Unit* atau ESU sehingga memiliki prioritas yang tinggi dalam konservasi gajah asia.

Dengan status ESU dalam kaitan dengan pengelolaan di penangkaran seperti kebun binatang dan taman safari, kedua subspecies ini harus ditempatkan dan dikelola secara terpisah sehingga terhindar dari perkawinan campur. Perkawinan campur antara keduanya sangat bertentangan dengan konsep pengelolaan gajah *ex-situ* (Fernando *dkk.* 2003b: 110; Soehartono *dkk.* 2007: 3).

2.2. TAMAN NASIONAL WAY KAMBAS (TNWK)

2.2.1. Populasi gajah sumatera

Taman Nasional Way Kambas (TNWK) merupakan kawasan perlindungan dengan luas sekitar 1235 km² (Gambar 2.2.1). Kawasan tersebut memiliki luas tutupan hutan sebesar 688 km² dan merupakan habitat bagi banyak satwa-satwa endemik Indonesia, termasuk gajah sumatera. TNWK ditempatkan sebagai prioritas kedua untuk konservasi gajah sumatera yang menampung populasi sebesar 180—200 individu (Hedges *dkk.* 2005: 37 & 42).



Gambar 2.2.1. Estimasi distribusi gajah sumatera di TNWK
[Sumber: WCS 2011: 16]

2.2.2. Ancaman terhadap populasi gajah sumatera di Taman Nasional Way Kambas (TNWK)

Populasi gajah sumatera di alam saat ini sedang dihadapkan pada berbagai tekanan lingkungan, termasuk populasi di TNWK. Degradasi, konversi lahan hutan menjadi lahan pertanian, budidaya tanaman monokultur, atau kawasan pembangunan mengakibatkan penyempitan ruang gerak gajah sumatera yang membutuhkan wilayah jelajah yang luas. Hal tersebut mengakibatkan populasi gajah sumatera di alam terancam mengalami kehilangan habitat (Nyhus *dkk.* 2000: 263; Rood *dkk.* 2008: 18; Kumar *dkk.* 2010: 144; Rood *dkk.* 2010: 976).

Kerusakan habitat turut berpengaruh pada kemunculan konflik gajah-manusia yang marak terjadi di kawasan TNWK. Konflik yang umum terjadi melibatkan penyerangan terhadap hasil panen warga (*crop-raiding*). Akibatnya, gajah yang terlibat konflik seringkali ditangkap untuk dipindahkan ke penangkaran atau bahkan dibunuh di tempat kejadian (Nyhus *dkk.* 2000: 263; Ishwaran 2001: 27; Perrera 2009: 43).

Ancaman lain yang tidak kalah serius adalah perburuan liar terhadap gading gajah. Konflik gajah dan manusia, tingkat kemiskinan penduduk di sekitar habitat gajah dan permintaan pasar ilegal gading gajah secara komersial menjadi pendorong utama dalam terjadinya perburuan liar tersebut. Namun demikian, hingga saat ini belum ada data akurat yang menjelaskan tingkat ancaman perburuan bagi gajah sumatera sebab pengawasan dan analisis modeling akan dampak perburuan terhadap populasi gajah sangat jarang dilakukan (Soehartono *dkk.* 2007: 10).

Berbagai permasalahan yang mengancam populasi gajah sumatera di alam memunculkan kekhawatiran terhadap penurunan variasi genetik hewan tersebut. Variasi genetik merupakan komponen yang sangat penting untuk dipelihara, khususnya pada populasi hewan yang terancam punah seperti gajah sumatera. Hal tersebut disebabkan variasi genetik berkontribusi besar terhadap proses adaptasi individu terhadap perubahan lingkungan. Apabila penurunan variasi genetik terjadi pada populasi gajah sumatera di alam, viabilitas dari populasi juga akan menurun dan tidak menutup kemungkinan populasi hewan tersebut akan semakin mendekati kepunahan (Frankham *dkk.* 2002: 225; Ahlering *dkk.* 2010: 414).

2.3. ANALISIS GENETIKA POPULASI

2.3.1. Metode pengambilan sampel noninvasif

Salah satu pendekatan yang dapat digunakan untuk analisis molekul populasi gajah sumatera yaitu melalui pengambilan sampel secara noninvasif. Berbeda dengan pengambilan sampel secara invasif, pengambilan sampel secara noninvasif tidak memerlukan penangkapan ataupun bersinggungan langsung dengan hewan uji sehingga bisa menghilangkan resiko stres fisiologis atau efek samping berbahaya akibat penggunaan obat bius bagi hewan yang bersangkutan (Gardipee 2007: 4). Metode tersebut sangat sesuai digunakan mengingat kelompok hewan tersebut cukup sulit ditemui secara langsung di habitatnya yang umumnya berupa hutan berstruktur rapat (Eggert *dkk.* 2003: 1389). Sampel yang diperoleh secara noninvasif dapat digunakan sebagai sumber DNA, misalnya feses, urin, rambut, bulu, kulit, dan tengkorak (Taberlet *dkk.* 1999: 323).

Feses (Gambar 2.3.1) merupakan salah satu sampel yang populer digunakan sebagai sumber DNA dalam analisis molekul karena satu gram feses dapat mengandung sejumlah besar *fecal* DNA yang berasal dari sel-sel epitel usus yang terlepas selama proses pencernaan berlangsung (Wasser 1997: 1091; Piggot *dkk.* 2003: 342). Selain itu, gajah memiliki frekuensi defekasi yang cukup tinggi, yaitu sekitar delapan belas kali per hari (24 jam) sehingga peluang memperoleh sampel berupa feses sangat besar (Fernando *dkk.* 2003: 115; Gardipee 2007: 5 & 6; Hedges *dkk.* 2005: 45—44; Chaves *dkk.* 2006: 2). Penggunaan *fecal* DNA telah berhasil diterapkan pada beberapa jenis ungulata (bison (*Bison bison*), *alpine ibex* (*Capra ibex*), *corsican mouflon* (*Ovis musimo*), *bighorn sheep* (*Ovis canadensis*), beruang, serigala, serta gajah afrika dan asia (Gardipee 2007: 5 & 6).

Salah satu faktor yang dapat memengaruhi kualitas dan kuantitas *fecal* DNA, yaitu usia feses yang akan digunakan sebagai sampel. Usia feses sangat penting karena turut menentukan durasi feses terpapar pada kondisi lingkungan antara lain suhu, kelembaban, dan paparan terhadap sinar matahari. Kondisi lingkungan tersebut dapat menentukan aktivitas bakteri degradasi yang dapat yang dapat memengaruhi kualitas dan kuantitas amplifikasi DNA. Pada dasarnya cukup sulit untuk batasan umum terhadap usia feses yang akan digunakan sebagai

sampel. Fernando *dkk.* menyarankan penggunaan sampel yang berusia kurang dari 24 jam serta berada di lingkungan yang cukup kering walaupun Eggert *dkk.* menggunakan sampel yang berusia kurang dari dua minggu. Usia feses yang lebih dari dua minggu kemungkinan akan memiliki lendir yang lebih sedikit. (Eggert *dkk.* 2003: 1391; Fernando *dkk.* 2003: 113 & 121).

Faktor lain yang turut memengaruhi kualitas dan kuantitas *fecal* DNA yaitu metode pengawetan sampel dan suhu lingkungan. Metode pengawetan sampel yang disarankan oleh Fernando *dkk.* (2003: 121) yaitu menggunakan etanol 95% atau *buffer* penyimpanan yang mengandung DMSO/EDTA/Tris/larutan garam karena mampu mengawetkan sampel selama lebih dari tiga tahun. Penggunaan *buffer* penyimpanan harus dilakukan secara teliti dengan memperhatikan rasionya terhadap jumlah sampel sehingga tidak disarankan untuk digunakan oleh personil lapangan yang tidak terlatih. Suhu juga dapat memberikan pengaruh, sebagai contoh suhu tinggi ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) dapat meningkatkan aktivitas endonuklease dan enzim-enzim hidrolitik lainnya sehingga dapat menurunkan kualitas dan kuantitas DNA yang diperoleh (Nsubuga *dkk.* 2004: 2092).

Analisis *fecal* DNA pada dasarnya tidak terbatas pada kelompok taksa tertentu. Namun demikian, kondisi pencernaan yang berbeda-beda pada masing-masing kelompok taksa dapat memengaruhi kualitas dan kuantitas *fecal* DNA. Sebagai contoh, analisis *fecal* DNA pada hewan karnivora memiliki resiko pencampuran antara DNA mangsa yang dimakan dengan DNA hewan karnivora yang diteliti sehingga kesalahan genotiping kemungkinan lebih sering terjadi. Pada hewan herbivora, konsumsi yang didominasi oleh serat akan meningkatkan abrasi membran intestinal, yang secara tidak langsung akan menambah peluang perolehan sumber dari *fecal* DNA (Murphy *dkk.* 2003: 2261; Hajkova *dkk.* 2006: 561). Pemilihan primer dan optimasi PCR yang tepat juga perlu dilakukan untuk meningkatkan kesuksesan genotiping *fecal* DNA (Fernando *dkk.* 2003: 121).



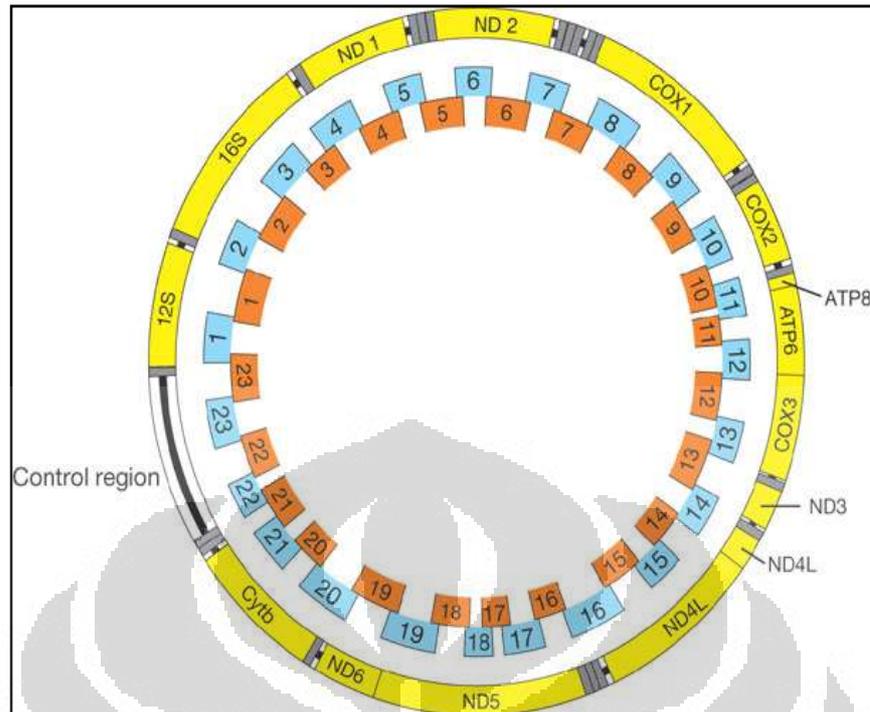
Gambar 2.3.1. Sampel noninvasif berupa feses
[Sumber: Dokumentasi pribadi]

2.3.2. DNA mitokondria sebagai marka molekul

2.3.2.1. Karakteristik DNA mitokondria

DNA mitokondria atau mtDNA merupakan DNA ekstras nuklear yang berada di organel penghasil energi, yaitu di bagian matriks mitokondria. MtDNA berbentuk untai ganda sirkuler yang pada mamalia memiliki kisaran ukuran 15.000—17.000 pb. MtDNA (Gambar 2.3.2.1) terbagi atas dua untai, yaitu untai berat atau *heavy strand* (H) dan untai ringan atau *light strand* (L) (Li & Graur 1991: 80; Wolfe 1993: 888—889).

MtDNA sebagian besar merupakan daerah penyandi protein dan sebagian kecil bukan daerah penyandi. Daerah penyandi tersebar hampir di sepanjang mtDNA, serta bertanggung jawab terhadap penyandian 13 subunit protein sistem fosforilasi oksidatif, 2 rRNA, dan 22 tRNA. Gen-gen tersebut umumnya lebih banyak tersebar di untai berat. Daerah bukan penyandi terletak pada daerah intergenik COI/tRNA^{Tyr}, daerah intergenik COII/tRNA^{Lys}, dan daerah kontrol atau disebut juga daerah D-loop pada vertebrata (Anderson *dkk.* 1981: 458; Chomyn *dkk.* 1986: 615; Wallace 1995: 1176; Taberlet 1996: 125; Sumida *dkk.* 2000: 79; Rogaev *dkk.* 2006: 0405).



Gambar 2.3.2.1. Representasi mtDNA mammoth
[Sumber: Krause *dkk.* 2006: 0403]

MtDNA memiliki beberapa karakteristik yang unik dibanding DNA inti. Berada pada organel yang berada di sitoplasma serta memiliki banyak salinan di dalam satu sel tunggal membuat mtDNA lebih mudah diperoleh untuk analisis molekul sehingga umumnya masih dapat diisolasi walaupun jumlah sampel yang diperoleh sedikit. Hal tersebut menjadikan mtDNA marak digunakan sebagai target investigasi genetik terhadap sampel noninvasif (Castro *dkk.* 1998: 328; Finnila 1999: 17; Morin *dkk.* 2001: 1841; Hoong & Lex 2005: 79; Pakendorf & Stoneking 2005: 166).

MtDNA diwariskan secara maternal, kecuali pada beberapa spesies seperti remis, lalat buah, tikus, dan burung hibrida (hasil hibridisasi dari dua spesies burung yang berbeda). Pola pewarisan maternal disebabkan mitokondria sel sperma tidak ikut menembus sel telur pada saat fertilisasi (Ankel-simons & Cummins 1996: 13859–13863). Dengan kata lain, mtDNA yang diwariskan bukan merupakan hasil rekombinasi. Pewarisan uniparental yang demikian akan memudahkan pengungkapan silsilah kekerabatan di masa lalu berdasarkan garis keturunan maternal, tanpa harus dibaurkan dengan pengaruh yang muncul akibat rekombinasi dan pewarisan biparental (Finnila 1999: 18; Pakendorf & Stoneking 2005: 167; Galtier *dkk.* 2009: 4541).

MtDNA memiliki laju mutasi yang lebih tinggi (10^{-8} substitusi/tahun) dibanding DNA inti (10^{-9} substitusi/tahun), khususnya pada daerah D-loop (Sumida *dkk.* 2000: 79; Pakendorf & Stoneking 2005: 168). Mutasi yang terjadi umumnya berupa mutasi titik, namun dapat pula berupa delesi atau insersi. Laju mutasi yang tinggi disebabkan mtDNA rentan terhadap peristiwa mutagenik serta produksi *Radical Oxydative Species* (ROS) dari proses fosforilasi oksidatif di organel tersebut (Rose *dkk.* 2007: 2). Selain itu, mtDNA tidak memiliki protein histon serta enzim perbaikan untuk kesalahan replikasi atau kerusakan DNA sehingga mutasi cenderung diteruskan dari waktu ke waktu. Laju mutasi yang tinggi mengakibatkan mtDNA mampu mengakumulasi polimorfisme 10—17 kali lebih cepat dari DNA inti sehingga dapat menunjukkan variasi yang tinggi pada berbagai level, baik antarindividu maupun populasi (Taberlet 1996: 125—126; Castro *dkk.* 1998: 328; Finnila 1999: 18; Ruokonen 2001: 16).

2.3.2.2. Daerah D-loop DNA mitokondria

MtDNA memiliki daerah yang disebut *displacement loop* atau D-loop (Gambar 2.3.2.2). Daerah D-loop mengandung pangkal replikasi untai berat (O_H), promoter transkripsi untai berat (P_H), dan promoter transkripsi untai ringan (P_L). Hal tersebut menunjukkan bahwa daerah D-loop berperan penting dalam hal replikasi dan transkripsi (Taberlet *dkk.* 1996: 126—127; Ruokonen 2001 16—18).

Daerah D-loop mengandung sekuens DNA yang paling bervariasi dari keseluruhan genom mtDNA hewan. Hipervariabilitas tersebut disebabkan oleh laju mutasi yang tinggi, yaitu sekitar $0,075—0.165 \times 10^{-6}$ substitusi/situs/tahun (Sumida *dkk.* 2000: 79). Laju mutasi yang tinggi juga mengakibatkan daerah D-loop memiliki ukuran yang bervariasi. Daerah D-loop pada gajah asia berukuran sekitar 1429 pb (NCBI 2007: 1), sedangkan pada mamalia lainnya umumnya berukuran sekitar 880—1400 pb (ruokonen 2001: 16—18).

2.3.2.4. Parameter statistik DNA mitokondria sebagai marka molekul

2.3.2.4.1. Keragaman nukleotida dan haplotipe

Parameter statistik yang umum digunakan untuk mengukur variasi D-loop mtDNA yaitu keragaman haplotipe. Pola yang ditunjukkan haplotipe mengandung informasi penting antara lain mengenai sejarah evolusi organisme serta varian genetik yang berperan dalam membentuk sifat pada organisme. Pengukuran keragaman haplotipe dapat dilakukan melalui rumus:

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

dengan x_i merupakan frekuensi haplotipe sekuens ke- i dan n merupakan ukuran sampel (Nei & Tajima 1981: 150).

Parameter statistik lain yang dapat digunakan yaitu pengukuran variasi gen pada mtDNA akan menggunakan perbedaan nukleotida per situs antara dua sekuens DNA yang dipilih secara acak atau disebut juga keragaman nukleotida, dengan rumus:

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

dengan x_i dan x_j merupakan frekuensi haplotipe ke- i dan ke- j di dalam populasi, serta Π_{ij} merupakan jumlah perbedaan nukleotida persitus nukleotida antara sekuens ke- i dan ke- j (Nei & Li 1979: 5273; Sekino *dkk.* 2002: 45; Mertens *dkk.* 2008: 19).

2.3.2.4.2. Rekonstruksi pohon filogenetik

Metode yang umum digunakan dalam rekonstruksi filogenetik yaitu metode *bootstrap*. Sejumlah replikasi set data yang dihasilkan oleh metode *bootstrap* memungkinkan penaksiran dilakukan terhadap topologi pohon filogeni. Berdasarkan hal tersebut, persentase hasil replikasi metode *bootstrap* atau *bootstrap value*, dapat dijadikan tolak ukur penentuan tingkat kepercayaan pohon filogeni. Semakin besar *bootstrap value*, semakin tinggi pula tingkat kepercayaan topologi pada hasil rekonstruksi tersebut (Nei & Li 1979: 5273).

2.4. TEKNIK BIOLOGI MOLEKUL

2.4.1. Pengukuran kuantitas DNA menggunakan spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan metode untuk mengetahui kemurnian suatu zat berdasarkan pengukuran nilai absorbansi dan nilai transmitansi. Transmitansi merupakan jumlah cahaya yang dilewatkan oleh zat, sedangkan absorbansi merupakan jumlah cahaya yang diserap oleh zat. Besaran nilai absorbansi dan transmitansi akan berkorelasi positif dengan tingkat kepekatan suatu zat (Vodopich & Moore 2005: 67—68).

Kuantifikasi dilakukan menggunakan panjang gelombang 260 nm atau A_{260} . Pembacaan pada A_{260} akan menunjukkan konsentrasi asam nukleat pada sampel. Nilai 1 pada A_{260} setara dengan konsentrasi DNA untai ganda sebesar $\sim 50 \mu\text{g/ml}$, $\sim 40 \mu\text{g/ml}$ untuk DNA untai tunggal dan RNA, dan $\sim 33 \mu\text{g/ml}$ untuk oligonukleotida untai tunggal. Tingkat kemurnian dari hasil tersebut dapat diketahui dengan membandingkan nilai absorbansi pada A_{260} terhadap absorbansi pada panjang gelombang 280 nm atau A_{280} . Rasio $A_{260} : A_{280}$ memiliki rentang nilai pada 1,8 hingga 2,0. Nilai absorbansi yang kurang dari rentang nilai tersebut menunjukkan kemungkinan kontaminasi terhadap protein atau fenol (Djonady 2005: 2).

Spektrofotometri dilakukan menggunakan alat spektrofotometer. Spektrofotometer digunakan untuk memisahkan cahaya polikromatik menjadi cahaya monokromatik dengan tingkatan spektrum yang berbeda. Cahaya yang diperlukan untuk pengukuran adalah cahaya monokromatik karena dapat menghasilkan nilai serapan yang linier dengan nilai konsentrasi suatu zat (Djonady 2005: 2).

2.4.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode untuk membuat salinan atau segmen spesifik dari suatu DNA. Metode tersebut dikembangkan oleh Kary B. Mullis beserta rekan-rekannya pada tahun 1980-an yang bertujuan untuk mengembangkan metode yang lebih efektif dan efisien dalam amplifikasi

DNA (Campbell *dkk.* 2002: 395). PCR memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan teknik amplifikasi materi genetik lainnya, antara lain dapat menghasilkan amplicon yang spesifik dan akurat terhadap DNA target, mudah dilakukan secara otomatis dengan menggunakan alat yang sederhana dan dapat memperbanyak sampel dalam waktu yang relatif singkat. PCR juga memiliki kekurangan yaitu relatif mahal, rentan terhadap kontaminasi, membutuhkan ketelitian yang tinggi, dan tidak dapat mengekspresikan mutasi (Russell 1994: 306—312; Paolella 2000: 182; Campbell *dkk.* 2002: 395).

Metode PCR dilakukan dengan melibatkan beberapa komponen utama, yaitu enzim DNA polimerase, primer, DNA cetakan (*template*), dan deoksiribonukleosida trifosfat (dNTP). Primer merupakan oligonukleotida yang urutan basanya dirancang agar berkomplementer pada daerah spesifik pada DNA cetakan (*template*). Primer dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu primer *forward* dan primer *reverse* yang masing-masing bekerja pada arah yang berlawanan. Primer berfungsi sebagai penduplikasi awal pada proses ekstensi oleh enzim DNA polimerase, sebab enzim tersebut tidak dapat memulai replikasi sendiri. DNA polimerase melakukan ekstensi dengan cara menambahkan basa komplemen berupa dNTP-dNTP pada primer sehingga dihasilkan untai DNA baru. Komponen lain, yaitu PCR *buffer* untuk menjaga kestabilan ionik pH, MgCl₂ sebagai kofaktor, dan ddH₂O (Li & Graur 1991: 128—129; Wolfe 1993: 139; Russell 1994: 304--306).

Proses PCR secara umum terbagi menjadi tiga tahap, yaitu denaturasi, pelekatan (*annealing*), dan ekstensi. Denaturasi merupakan proses pembukaan ikatan rantai ganda DNA sehingga menjadi ikatan tunggal DNA dan reaksi enzimatik berhenti. Denaturasi dilakukan pada suhu 94—95°C. Pelekatan (*annealing*) merupakan proses pelekatan primer pada DNA cetakan. Proses tersebut memerlukan suhu yang berkisar pada *melting temperature* (T_m). Penentuan *melting temperature* (T_m) dilakukan berdasarkan perhitungan komposisi basa pada primer dengan rumus sebagai berikut.

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

Suhu *annealing* yang ideal yaitu 52°—65°C. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan primer oligonukleotida melekat tidak sempurna, sedangkan suhu pelekatan yang terlalu rendah dapat menyebabkan pelekatan

primer yang tidak spesifik. Hal tersebut dapat mengakibatkan amplifikasi dari segmen DNA yang tidak diinginkan (Rychlik and Rhoads 1989: 1; Brock 1994: 265). Ekstensi merupakan proses pemanjangan *oligonucleotide* primer. Proses tersebut dikatalisasi enzim DNA polimerase yang bersifat termostabil pada suhu sekitar 72—78°C (Brock 1994: 265).

Thermal cycler merupakan salah satu komponen penting dalam PCR.

Thermal cycler adalah sebuah mesin yang dapat diprogram untuk menaikkan dan menurunkan suhu sesuai dengan urutan dan waktu yang diinginkan atau mesin yang menjalankan perubahan temperatur melalui siklus yang telah diprogram sebelumnya secara otomatis. *Thermal cycler* dapat menjalankan siklus PCR yang telah diprogram sebelumnya dengan variasi suhu yang berbeda (Weaver 1999: 77).

2.4.3. Pemisahan fragmen DNA menggunakan elektroforesis

Elektroforesis merupakan teknik untuk memisahkan makromolekul seperti asam nukleat atau protein berdasarkan ukuran, muatan listrik, dan sifat-sifat fisik lainnya. Prinsip kerja dari elektroforesis adalah pergerakan molekul bermuatan dalam medan listrik (Brown 1994: 19). Gugus-gugus fosfat yang dimiliki DNA akan membuat molekulnya menjadi bermuatan negatif sehingga pada pH netral, molekul DNA tersebut akan bermigrasi ke arah elektroda positif di bawah pengaruh medan listrik (Dowling *dkk.* 1996: 254). Elektroforesis memisahkan suatu campuran molekul DNA menjadi pita-pita yang masing-masing terdiri atas molekul DNA dengan panjang yang sama (Campbell *dkk.* 2002: 396—397).

Beberapa faktor yang mempengaruhi kecepatan molekul bergerak melewati gel, yaitu: ukuran molekul, bentuk molekul, densitas muatan, komposisi gel, dan kuat medan listrik. Berdasarkan ukuran molekul, molekul-molekul yang berukuran kecil lebih cepat bergerak melewati gel dibandingkan dengan molekul-molekul yang memiliki ukuran lebih besar. Bentuk molekul seperti DNA memiliki kecepatan gerak yang berbeda-beda. Molekul yang memiliki densitas muatan tinggi akan bergerak lebih cepat daripada molekul yang berdensitas rendah. Komposisi gel berbanding terbalik dengan ukuran pori-porinya sehingga pada gel dengan konsentrasi tinggi, DNA berukuran besar akan sulit untuk

bergerak sebab pori-pori gel tersebut berukuran kecil. Kuat medan listrik yang lebih tinggi akan mempercepat pergerakan molekul permuatan daripada kuat medan listrik yang lebih rendah (Old & Primrose 1985: 9; Wolfe 1993: 127).

Elektroforesis memerlukan komponen utama berupa gel, antara lain gel pati, gel agarosa, gel poliakrilamida, dan gel selulosa asetat yang memiliki fungsi masing-masing. Beberapa gel tersebut memiliki kapasitas pemisahan molekul yang berbeda-beda. Gel pati dan gel selulosa asetat berfungsi untuk memisahkan protein, gel agarosa yang berfungsi untuk memisahkan DNA yang berukuran besar, gel poliakrilamida yang berfungsi untuk memisahkan DNA atau protein yang berukuran kecil (Russell 1994:499).

Identifikasi ukuran fragmen hasil elektroforesis dapat dilakukan menggunakan marka DNA, yang merupakan segmen DNA yang spesifik dan telah diketahui ukurannya. Marka DNA berfungsi sebagai penanda posisi pasangan basa dari molekul DNA yang bermigrasi. Marka-marka DNA tersebut merupakan marker yang telah dibuat oleh pabrik sehingga tanda pasangannya jelas (Birren & Lai 1993: 82; Martin 1996: 77). Visualisasinya kemudian dapat dilakukan dengan cara menambahkan etidium bromida ke dalam gel sehingga DNA berpendar di bawah sinar ultraviolet, atau dengan menambahkan pewarna atau label radioaktif ke dalam primer yang digunakan di dalam PCR (Martin 1996: 14).

2.4.4. Pengurutan nukleotida berdasarkan analisis sekuensing

Sekuensing merupakan proses penentuan urutan nukleotida dari suatu fragmen DNA tertentu. Metode sekuensing yang telah dikembangkan terdiri atas tiga metode, yaitu metode Maxam-Gilbert, metode Sanger, dan *automated DNA sequencing* (Griffin & Griffin 1993: 1—4; Campbell *dkk.* 2002: 401).

Metode Maxam-Gilbert merupakan metode sekuensing yang dikembangkan oleh Allan Maxam dan Walter Gilbert. Metode tersebut memiliki prinsip dasar pemotongan ujung molekul DNA berlabel dengan menggunakan agen kimiawi yang spesifik. Agen spesifik untuk basa-basa purin yaitu dimetilsulfat (DMS), sedangkan untuk basa-basa pirimidin yaitu hidrazin. Keberadaan agen-agen kimiawi spesifik tersebut mengakibatkan pembentukan empat jenis kombinasi

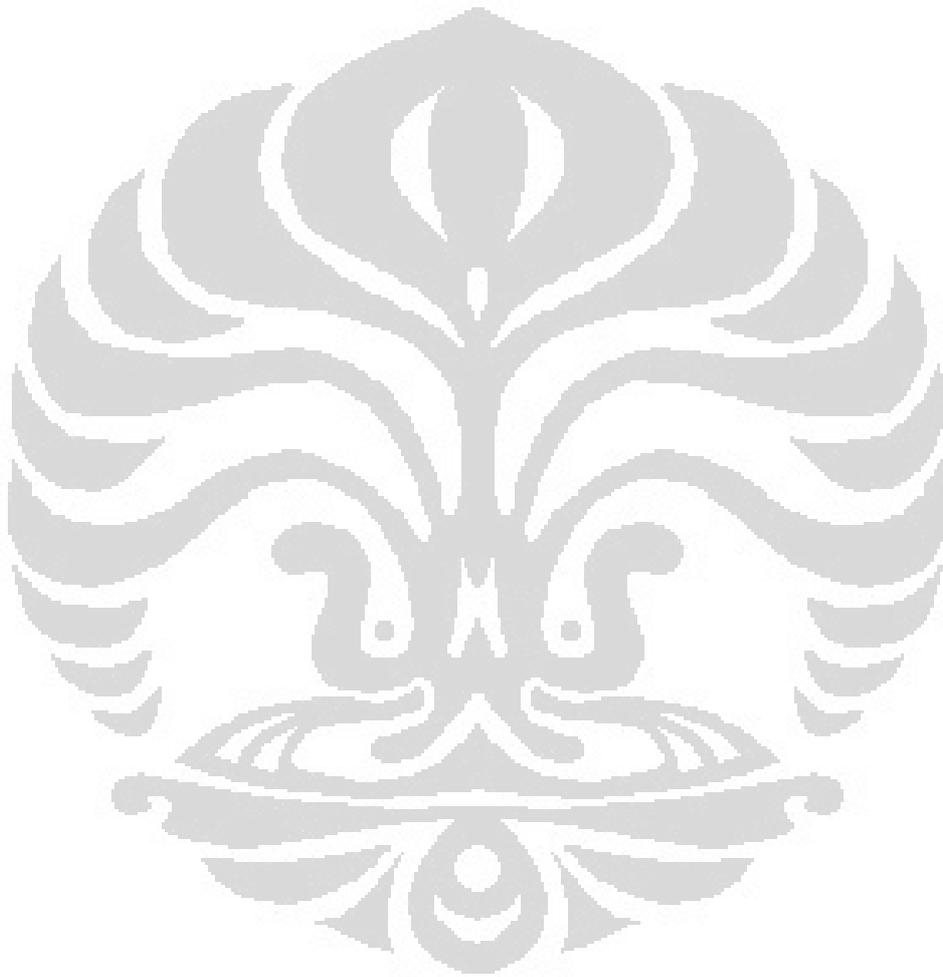
yang mengandung basa tertentu, yaitu A, G+A, C, dan C+T. Kombinasi tersebut digunakan untuk mengetahui jenis basa yang terdapat pada satu fragmen DNA. Pembacaan fragmen hasil dari metode Maxam-Gilbert dilakukan menggunakan elektroforesis, kemudian dideteksi melalui autoradiografi (Albert *dkk.* 1994: 297).

Metode Sanger merupakan metode sekuensing yang ditemukan oleh Frederick Sanger pada tahun 1977. Prinsip kerja metode Sanger yaitu terminasi sintesis DNA oleh dideoksinukleotida yang ditempatkan pada empat tabung yang berbeda. Terminasi sintesis DNA akan menghasilkan *chain terminating dideoxynucleotide* sehingga terbentuk fragmen-fragmen dengan ukuran yang beragam. Pembacaan fragmen-fragmen tersebut kemudian dilakukan melalui elektroforesis dengan mengidentifikasi jenis dideoksinukleosida yang digunakan untuk terminasi (Cooper 1997: 110—111; Fairbanks & Andersen 1999: 287).

Metode *automated DNA sequencing* merupakan metode sekuensing yang merupakan pengembangan dari metode sanger. Persamaan metode *automated DNA sequencing* dengan metode sanger yaitu menggunakan prinsip terminasi replikasi, tetapi komponen reaksi yang digunakan ditempatkan dalam satu tabung yang sama (Wolfe 1993: 142). Metode tersebut dapat diotomatisasi menggunakan mesin yang disebut *DNA sequencer*. Setiap jenis dideoksiribonukleotida yang terbaca akan teridentifikasi berdasarkan pewarna fluoresens yang muncul setelah dipaparkan pada sinar laser. Masing-masing pewarna fluoresens mewakili basa-basa tertentu dan data terdeteksi menggunakan detektor (Griffin & Griffin 1993: 6; Weaver 1999: 107). Metode *automated DNA sequencing* memiliki beberapa kelebihan tersendiri antara lain berpotensi untuk mengurutkan sekuens nukleotida dan untai DNA berukuran besar, memungkinkan proses sekuensing terjadi secara otomatis dengan bantuan komputer, serta berpeluang memperoleh hasil berupa urutan DNA dalam waktu yang relatif lebih singkat (Weaver 1999: 104 & 107).

Sekuensing dengan metode *automated DNA sequencing* dilakukan dalam proses yang disebut *cycle sequencing* terhadap hasil amplifikasi PCR. Proses *cycle sequencing* menggunakan prinsip yang serupa dengan proses PCR, yaitu ekstensi fragmen DNA dengan pengaturan suhu menggunakan *thermal cycler*. Proses *cycle sequencing* juga terbagi atas tahap denaturasi, pelekatan primer, dan ekstensi secara berulang. Namun demikian, berbeda dengan proses PCR, *cycle sequencing* hanya menggunakan satu jenis primer dan mengikutsertakan

dideoksinukleotida (ddNTP), selain deoksinukleotida (dNTP) sebagai basa komplementer (Weaver 1999: 104 & 107).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. LOKASI, WAKTU PENELITIAN

3.1.1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan di beberapa lokasi di TNWK sejak 24 Mei 2010 hingga 24 Desember 2010. Total sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 80 sampel. Pemilihan sampel dilakukan secara acak berdasarkan lokasi *hot spot* (lokasi yang diprediksi merupakan wilayah jelajah gajah berdasarkan temuan feses) dari hasil survei sebelumnya yang telah terlaksana pada tahun 2002.

3.1.2. Analisis variasi D-loop DNA mitokondria

Preparasi sampel dilakukan di Departemen Biologi Universitas Indonesia pada 14—16 Februari 2012. Analisis variasi D-loop dilakukan di Laboratorium Mitokondria Lembaga Biologi Molekul Eijkman, Jl. Diponegoro, Jakarta 10430 selama empat bulan, dimulai dari bulan Februari 2012 hingga Mei 2012.

3.2. ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA

3.2.1. Pengambilan sampel

3.2.1.1. Alat

Alat untuk merekam lokasi pengambilan sampel menggunakan GPS (*Global Positioning System*), meteran ukur, kamera digital, peta, alat tulis, tabung plastik 50 ml (Biologix, Kansas, Amerika Serikat), sendok plastik, dan papan jalan.

3.2.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada pengambilan sampel yaitu, sampel feses, *buffer* penyimpanan DMSO/EDTA/Tris/larutan garam, label kertas, lembar data, dan sarung tangan.

3.2.1.3. Cara kerja

Sampel feses yang ditemukan pada saat perjalanan diamati dan dilihat keberadaan lendir pada permukaannya. Tanda-tanda lain yang perlu diamati yaitu warna kotoran (cokelat terang hingga pekat) serta keberadaan tanda-tanda bekas keberadaan gajah sumatera, seperti jejak, bekas pakan, dan kerusakan vegetasi. Setelah itu, feses kemudian dikikis pada bagian permukaannya yang berlendir lalu dimasukkan ke dalam tabung Biologix 50 ml yang telah berisi 20 ml *buffer* penyimpanan DMSO/EDTA/Tris/larutan garam dengan rasio 1:4. Tabung yang telah berisi sampel ditutup kemudian diberi kode sampel dan lokasi keberadaannya berdasarkan GPS (WCS 2011: 6—8).

3.2.2. Analisis variasi D-loop DNA mitokondria

3.2.2.1. Alat

Alat-alat umum yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikropipet Biohit[®] 0,5—10 µl, Biohit[®] 2—10 µl, Biohit[®] 10—100 µl, Biohit[®] 100-1000 µl (Biohit, Helsinki, Finland), tabung mikrofus 1,5 ml dan 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg, Germany), tabung PCR 0,2 ml, Thermolyne[®] Maxi Mix II Type 37600 Mixer (Thermo Scientific, Massachusetts, Amerika Serikat), Heraeus[®] Benchtop Microcentrifuge Type Biofuge Pico, Heraeus[®] Benchtop Microcentrifuge Type Biofuge Primo, dan Heraeus[®] Megafuge II Centrifuge (Heraeus, Hanau, Germany), Tomy[®] Mini Personal Centrifuge Type MicroOne (Japan), ujung pipet Biologix ukuran 10 µl (putih), 200 µl (kuning), dan 1000 µl (biru) (Biologix, Kansas, Amerika Serikat), serta ujung pipet ART[®] Tip (*aerosol barrier*) ukuran

0,1—10 μ l, 10—100 μ l, dan 100—1000 μ l (Molecular BioProduct, San Diego, Amerika Serikat).

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan QIAamp *spin column* (Qiagen, California, Amerika Serikat). Kuantifikasi DNA ekstraksi dan produk purifikasi PCR dilakukan menggunakan Nanodrop[®] Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Amerika Serikat). Metode PCR dilakukan menggunakan GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, California, Amerika Serikat). Elektroforesis dilakukan menggunakan Mini Sub Cell GT[®] Electrophoresis Chamber (BioRad, California, Amerika Serikat) dan voltmeter. Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan QiaQuick Spin Column (Qiagen, California, United Amerika Serikat) dan tabung koleksi 2 ml (Qiagen, California, Amerika Serikat). *Cycle sequencing* dilakukan menggunakan GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, California, Amerika Serikat). Alat yang digunakan dalam presipitasi DNA yaitu DNA SpeedVac[®] DNA110 (Savant, Massachusetts, Amerika Serikat). Alat yang digunakan dalam sekuensing yaitu pelat optik dan mesin AB 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, Amerika Serikat).

3.2.2.2. Bahan

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen, California, Amerika Serikat) yang terdiri dari *buffer* ASL, *buffer* AL, *buffer* AW1 (konsentrat), *buffer* AW2 (konsentrat), *buffer* AE, dan proteinase K, serta etanol absolut dan sampel feses gajah sumatera. Untuk kuantifikasi DNA, bahan yang digunakan yaitu akuabides dan DNA hasil ekstraksi dari feses. Metode PCR dilakukan menggunakan campuran yang terdiri dari AmpliTaq Gold[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, Amerika Serikat), 20 pmol primer MDL5 *forward*, 20 pmol primer MDL3 *reverse*, DNA cetakan dan akuabides. Produk PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 2% SeaKem LE (Lonza, Rockland, Amerika Serikat), 1x TBE yang berisi Tris (Invitrogen, New York, Amerika Serikat), asam borat (Merck, New Jersey, Amerika Serikat), dan EDTA (Analar Normapur, Dublin, Irlandia), 1% EtBr, akuades, *loading buffer*, dan marka DNA Phi-X (OZ Bioscience, Marseille, France) yang didigesti

menggunakan enzim *HaeIII* (OZ Bioscience, Marseille, France). Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan QiaQuick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, California, Amerika Serikat) yang berisi *buffer* PB, *buffer* PE (konsentrat), *buffer* EB, dan indikator pH 1, serta sodium asetat 3 M pH 5,0. *Cycle sequencing* dilakukan menggunakan BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California, Amerika Serikat), 2 pmol primer MDL5 atau 2 pmol primer MDL3, dan akuabides. Presipitasi DNA dilakukan menggunakan 125 mM EDTA pH 8,0, sodium asetat 3 M pH 5,2, etanol absolut, dan etanol 70%. Sekuensing dilakukan menggunakan Hi-Di[™] formamida (Invitrogen, New York, Amerika Serikat).

3.2.2.3. Cara kerja

3.2.2.3.1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan protokol QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen 2001: 22—24) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 1,8 ml sampel feses dimasukkan ke dalam tabung mikrofus 2 ml. Tabung tersebut disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm selama 15 menit, lalu supernatan yang diperoleh dibuang. Sebanyak 1,5 ml sampel feses ditambahkan pada pelet. Tabung yang berisi pelet disentrifugasi, lalu supernatan yang diperoleh dibuang. Sebanyak 1,6 ml *buffer* ASL ditambahkan pada tabung yang berisi pelet, lalu divorteks hingga homogen. Tabung tersebut diinkubasi pada kisaran suhu 20—25°C. Tabung tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan pada tabung mikrofus 2 ml yang baru. Sebanyak 1 tablet InhibitEX dimasukkan ke dalam tabung tersebut, divorteks hingga homogen, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm selama 6 menit. Supernatan (dengan segera) dipindahkan ke dalam tabung mikrofus 1,5 ml, lalu disentrifugasi kembali pada kecepatan 14000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml yang telah berisi 25 µl proteinase K. Sebanyak 600 µl *buffer* AL dimasukkan ke dalam tabung tersebut, lalu diinkubasi pada suhu 70°C selama 30 menit untuk memperoleh lisat. Lisat yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung mikrofus 2 ml. Sebanyak 550—600 µl

etanol absolut ditambahkan pada lisat. Tabung yang berisi campuran tersebut di-*invert* lalu disentrifugasi hingga mencapai kecepatan 8000 rpm. QIAamp Spin Column yang telah dipasangkan dengan tabung koleksi disiapkan. Filtrasi lisat dilakukan dengan cara memasukkan 650 µl lisat ke dalam QIAamp Spin Column, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm selama 1 menit. Tabung koleksi yang berisi filtrat dibuang, lalu QIAamp Spin Column dipasangkan dengan tabung koleksi yang baru. Filtrasi lisat dilakukan sebanyak tiga kali atau hingga seluruh lisat telah habis. Sebanyak 500 µl *buffer* AW1 dimasukkan ke dalam QIAamp Spin Column yang telah dipasangkan dengan tabung koleksi yang baru, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm selama 1 menit. Tabung koleksi yang berisi filtrat dibuang, lalu QIAamp Spin Colum dipasangkan dengan tabung koleksi yang baru. Sebanyak 500 µl *buffer* AW2 kemudian dimasukkan ke dalam QIAamp Spin Column, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm selama 3 menit. Tabung koleksi yang berisi filtrat dibuang lalu QIAamp Spin Column dipasangkan dengan tabung koleksi yang baru dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 14000 rpm selama 2 menit. QIAamp Spin Column kemudian dipasangkan dengan tabung mikrofus 1,5 ml. Sebanyak 30 µl *buffer* AE ditambahkan melalui membran QIAamp Spin Column, lalu diinkubasi pada kisaran suhu 20—25°C selama 10 menit. Setelah itu, QIAamp Spin Column beserta tabung mikrofus 1,5 ml tersebut disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 1 menit. Filtrat yang diperoleh berisi DNA dari sampel feses yang digunakan, namun penampakan DNA hanya terlihat transparan. Penyimpanan DNA dilakukan pada suhu -20°C.

3.2.2.3.2. Kuantifikasi DNA

Kuantifikasi DNA dilakukan menggunakan NanoDrop[®] Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific 2008: 3-1—3-3). Pertama-tama, alat tersebut dinyalakan dan program ND-1000 v3.5.2 dibuka. Setelah itu, standar blanko dibuat dengan meneteskan 1 µl akuabides diteteskan pada *pedestal* lalu diukur dengan menekan tombol "OK" pada tampilan di layar. Setelah hasil pengukuran muncul, tombol "Blank" ditekan hingga hasil pengukuran "0,0 ng/ml" muncul pada konsentrasi DNA. Permukaan *pedestal* kemudian dibersihkan menggunakan

tisu untuk selanjutnya dilakukan pengukuran pada sampel. Sebanyak 1 µl sampel diteteskan pada *pedestal* lalu tombol "Measure" ditekan. Setelah pengukuran selesai dilakukan, permukaan *pedestal* dibersihkan menggunakan tisu. Jika sampel yang akan diukur lebih dari satu, prosedur tersebut dapat diulang. Hasil pengukuran dicatat dan/atau disimpan di dalam *folder* khusus di komputer. Setelah itu, program ND-1000 ditutup dengan menekan tombol "Exit", lalu komputer dimatikan.

3.2.2.3.3. Desain primer dan amplifikasi DNA dengan metode PCR

Penelitian ini menggunakan primer MDL5 dan MDL3 yang telah dipublikasi oleh Fernando *dkk.* (2000: 36). Primer tersebut kemudian disejajarkan dengan sekuense genom lengkap gajah asia yang diperoleh dari GenBank, dengan menggunakan program BioEdit. Setelah itu, karakteristik primer diuji menggunakan PerlPrimer versi 1.1.21

DNA yang diekstraksi diamplifikasi menggunakan metode PCR Sambrook & Russel (2001b: 8.4—8.9) yang telah dimodifikasi. Fragmen yang diamplifikasi berukuran sebesar 675 pb, yang akan meliputi daerah D-loop mtDNA. Pasangan primer yang digunakan yaitu MDL5 *forward* [5'-TTACATGAATTGGCAGCCAACCAG-3'] dan MDL3 *reverse* [5'-CCCACAATTAATGGGCCCGGAGCG-3'].

Campuran PCR dimasukkan ke dalam tabung PCR steril dengan volume total 25 µl yang terdiri dari 12,5 µl AmpliTaq Gold Master Mix, 0,5 µl enhancer, 0,05 µl, 0,05 µl primer *forward*, 0,05 µl primer *reverse*, 10 µl akuabides dan 1 µl. Proses amplifikasi diawali dengan tahap predenaturasi pada suhu 95°C selama 10 menit untuk menguraikan DNA dan mengaktifkan enzim Taq polimerase "Hot Start". Tahap selanjutnya dilakukan amplifikasi sebanyak 30 siklus dengan tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, pelekatan primer pada suhu 62°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Ekstensi akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit. Pada setiap reaksi selalu disertakan blanko.

Produk PCR dipisahkan menggunakan gel agarosa 2% SeaKem LE yang telah dicampurkan dengan etidium bromida. Gel kemudian dielektroforesis

dengan tegangan sebesar 80 volt selama 60 menit. Marka DNA yang digunakan yaitu Phi-X 174 yang didigesti menggunakan enzim *Hae*III. Elektroforesis dilakukan menggunakan Mini Sub Cell GT[®] Electrophoresis Chamber. Gel kemudian divisualisasi menggunakan GelDoc[®] 1000 menggunakan program Quantity One 4.6.1.

3.2.2.3.4. Purifikasi produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan protokol QiaQuick[®] PCR Purification Kit (Qiagen 2008: 19—20). Produk PCR dicampurkan dengan *buffer* PB (yang telah ditambahkan dengan indikator pH 1), dengan perbandingan 1 : 5 volume. Warna ideal yang akan muncul pada campuran yaitu kuning, yang menandakan pH $\leq 7,5$. Jika warna yang muncul adalah jingga tua atau violet, campuran tersebut harus diberi penambahan 10 μ l sodium asetat 3M, pH 5,0 lalu dikocok sehingga yang terlihat adalah warna kuning. Sampel kemudian dipindahkan ke dalam QiaQuick Spin Column yang sebelumnya telah dipasangkan dengan tabung koleksi 2 ml. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 12000 rpm selama 30—60 detik. Filtrat yang terdapat pada tabung koleksi 2 ml dibuang, lalu tabung tersebut dipasangkan kembali dengan QiaQuick Spin Column. Pencucian kemudian dilakukan dengan menambahkan *buffer* PE ke dalam QiaQuick spin column lalu disentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama 30—60 detik. Filtrat yang terdapat pada tabung koleksi 2 ml dibuang, lalu tabung tersebut dipasangkan kembali dengan QiaQuick spin Column. Sentrifugasi dilakukan kembali pada kecepatan 13000 rpm selama satu menit untuk menghilangkan residu etanol dari *buffer* PE. Setelah sentrifugasi, QiaQuick Spin Column dipindahkan ke dalam tabung mikrofus 1,5 ml. Untuk mengelusi DNA, sebanyak 30 μ l *buffer* EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) atau air (pH 7,0—8,5) melalui bagian tengah membran QiaQuick Spin Column kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Tabung mikrofus 1,5 ml yang berisi filtrat berupa produk PCR disimpan pada suhu -20°C.

Produk purifikasi kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarosa 2% SeaKem[®] LE pada tegangan 80 volt selama 60 menit. Elektroforesis dilakukan menggunakan Mini Sub Cell GT[®] Electrophoresis Chamber. Marka DNA yang

digunakan yaitu Phi-X 174 yang didigesti menggunakan enzim *HaeIII*. Gel kemudian divisualisasi menggunakan GelDoc[®] dengan program Quantity One

4.6.1. Produk purifikasi dikuantifikasi menggunakan NanoDrop[®]

Spectrophotometer ND-1000 dengan program ND-1000 v3.5.2.

3.2.2.3.5. Cycle sequencing

Cycle sequencing dilakukan menggunakan protokol BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 2002: 2-6—3-5) yang telah dimodifikasi. Volume reaksi dibuat sebanyak 15 µl dengan komponen berupa BigDye, primer, DNA cetakan, dan akuabides hingga mencapai volume 15 µl. Pertama-tama, tabung 0,2 ml disiapkan. Sebanyak 6 µl BigDye, 1,5 µl 2 pmol primer MDL5 atau primer MDL3, dan akuabides dicampurkan di dalam tabung 0,2 ml. Setelah itu, sebanyak ± 30 ng DNA cetakan ditambahkan ke dalam tabung 0,2 ml yang berisi campuran, lalu di vorteks dan disentrifugasi hingga mencapai 8000 rpm. Tabung tersebut kemudian dimasukkan ke dalam alat *thermocycler* GeneAmp PCR System 9700. Proses *cycle sequencing* diawali dengan predenaturasi pada suhu 96°C selama 3 menit, lalu dilanjutkan dengan 25 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 96°C selama 10 detik, pelekatan primer pada suhu 50°C selama 5 detik, dan ekstensi pada suhu 60°C selama 4 menit. Produk *cycle sequencing* ditutup menggunakan lembaran aluminium lalu disimpan pada suhu 4°C untuk penyimpanan sementara, atau pada suhu -20°C untuk penyimpanan jangka panjang.

3.2.2.3.6. Presipitasi DNA

Presipitasi DNA dilakukan menggunakan protokol yang tertera pada BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit yang telah dimodifikasi (Applied Biosystems 2002: 4-7—4-8). Tahapan presipitasi DNA diawali dengan mencampurkan 1,5 µl EDTA 125 mM pH 8,0, 1,5 µl sodium asetat 3M pH 5,2, dan 37,5 µl etanol absolut di dalam tabung mikrofus 1,5 ml yang akan digunakan, lalu campuran tersebut divorteks. Produk *cycle sequencing* ditambahkan ke dalam campuran, lalu divorteks selama 20—30 detik. Campuran tersebut diinkubasi

pada suhu 4°C selama 10 menit. Setelah itu, campuran disentrifugasi pada dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang dengan hati-hati karena pelet DNA hanya terlihat transparan. Sebanyak 250 µl etanol 70% ditambahkan pada pelet, lalu divorteks selama 20—30 detik, kemudian disentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan hati-hati karena DNA hanya terlihat transparan. Pelet yang tersisa disentrifugasi menggunakan DNA SpeedVac[®] DNA110 pada kecepatan medium (\pm 1300 rpm) selama 10 menit. Tabung 1,5 ml yang berisi pelet berupa DNA tersebut ditutup menggunakan lembaran alumunium lalu disimpan pada suhu pada suhu 4°C untuk penyimpanan sementara, atau pada suhu -20°C untuk penyimpanan jangka panjang .

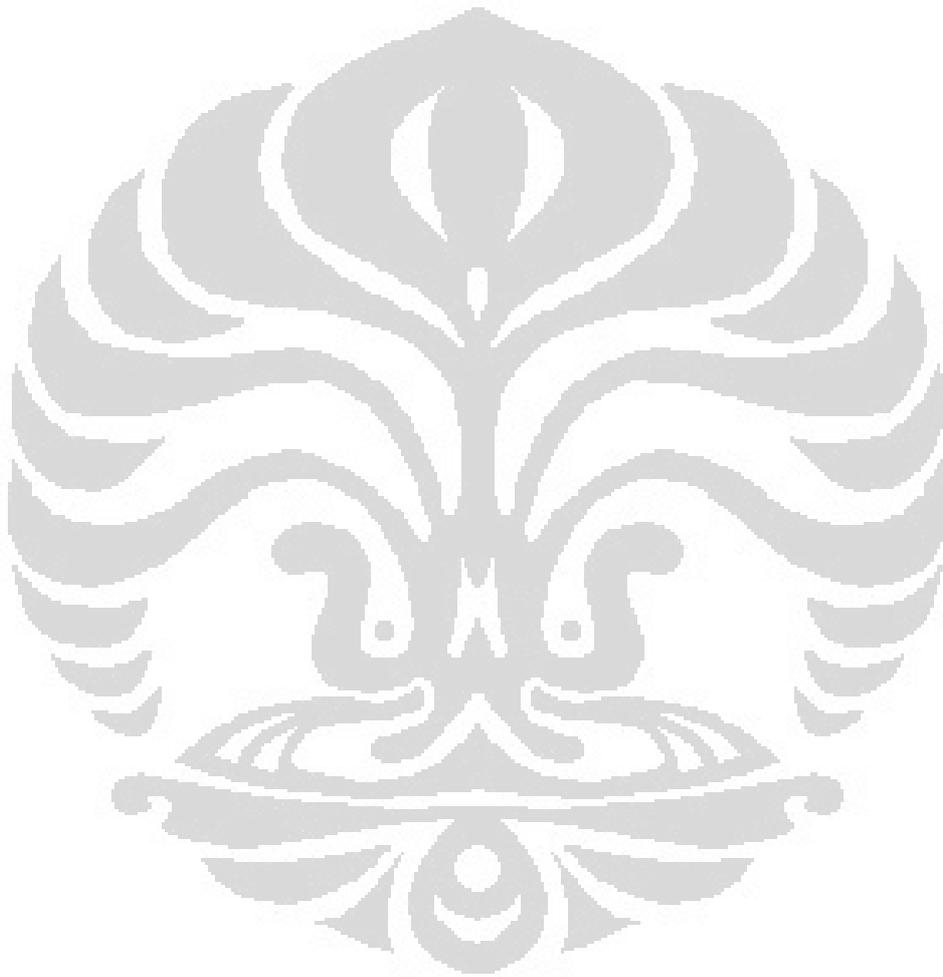
3.2.2.3.7. Pengurutan nukleotida melalui analisis sekuensing

Sekuensing dilakukan menggunakan protokol Applied Biosystems DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis (Applied Biosystems 2009: 122) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 11 µl Hi-DiTM Formamida ditambahkan pada tabung 1,5 ml yang berisi sampel hasil presipitasi. Tabung tersebut divorteks selama 3 menit, lalu di-*spin down*. Sampel pada tabung dimasukkan pada sumur pelat optik. Pelat diinkubasi pada suhu 95°C selama 3 menit, lalu dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 4°C selama 3 menit. Pelat kemudian dimasukkan ke dalam mesin AB 3130xl Genetic Analyzer lalu dianalisis menggunakan program Sequencing Analysis v.5.2.

3.2.2.3.8. Pengolahan data

Sequence alignment dan perbaikan dilakukan menggunakan program BioEdit v.7.0.9.0. Pengukuran keragaman haplotipe, keragaman nukleotida, dan rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan program MEGA 5 (Tamura *dkk.* 2011: 2731). Sekuens yang diperoleh dari sampel feses dibandingkan dengan sekuens genom mtDNA dari gajah asia (*Elephas maximus* NC_005129) untuk mengidentifikasi posisi SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Pohon filogenetik dibuat dengan membandingkan sekuens yang diperoleh pada

penelitian ini terhadap haplotipe gajah asia lainnya, serta terhadap *outgroup* yaitu gajah afrika (*Loxodonta Africana* NC_000934).

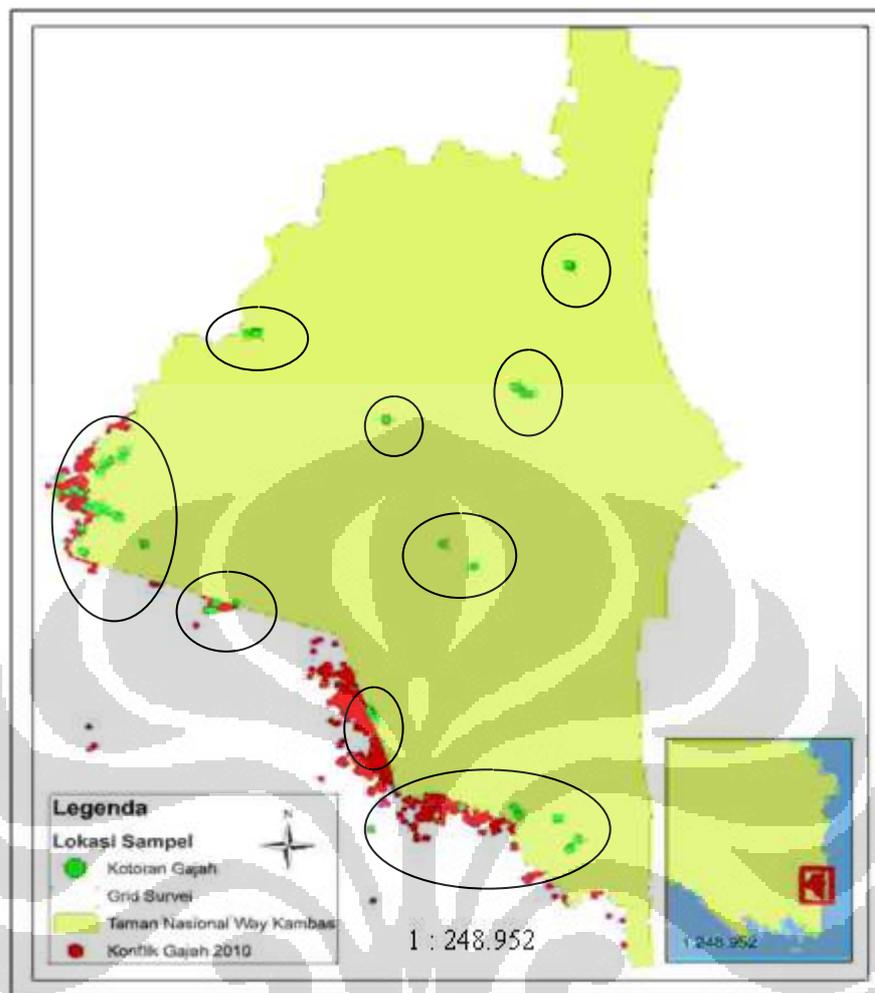


BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. HASIL

4.1.1. Ekstraksi dan kuantifikasi DNA

Sebanyak 80 sampel feses berhasil diekstraksi di dalam penelitian ini. Feses yang digunakan dikoleksi dalam keadaan segar serta memiliki kisaran waktu preservasi 1—1,5 tahun (lampiran 1). Sampel terdistribusi secara merata pada 9 titik di kawasan TNWK, termasuk pada lokasi yang berdekatan dengan kawasan kependudukan sehingga diharapkan telah mewakili populasi gajah sumatera di dalamnya (Gambar 4.1.1). Ekstraksi DNA dari feses dilakukan menggunakan protokol QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit yang telah dimodifikasi, yang kemudian dikuantifikasi menggunakan NanoDrop[®] Spectrophotometer ND-1000 (Tabel 2). Rerata kuantitas DNA yang diperoleh yaitu $124,13 \text{ ng} \pm 87,61$, dengan nilai tertinggi yaitu 420,0 ng dan nilai terendah yaitu 11,5 ng. Nilai absorbansi pada $A_{260/280}$ memiliki rerata $1,68 \pm 0,29$, dengan nilai tertinggi yaitu 1,93 dan nilai terendah yaitu 0,94. Sebanyak 43 sampel feses menunjukkan nilai absorbansi diatas 1,8, sedangkan 37 sampel lainnya menunjukkan nilai absorbansi di bawah 1,8 yang mengindikasikan keberadaan kontaminan berupa protein. Penelitian ini juga menyediakan sampel kontrol positif berupa DNA dari darah gajah sumatera.



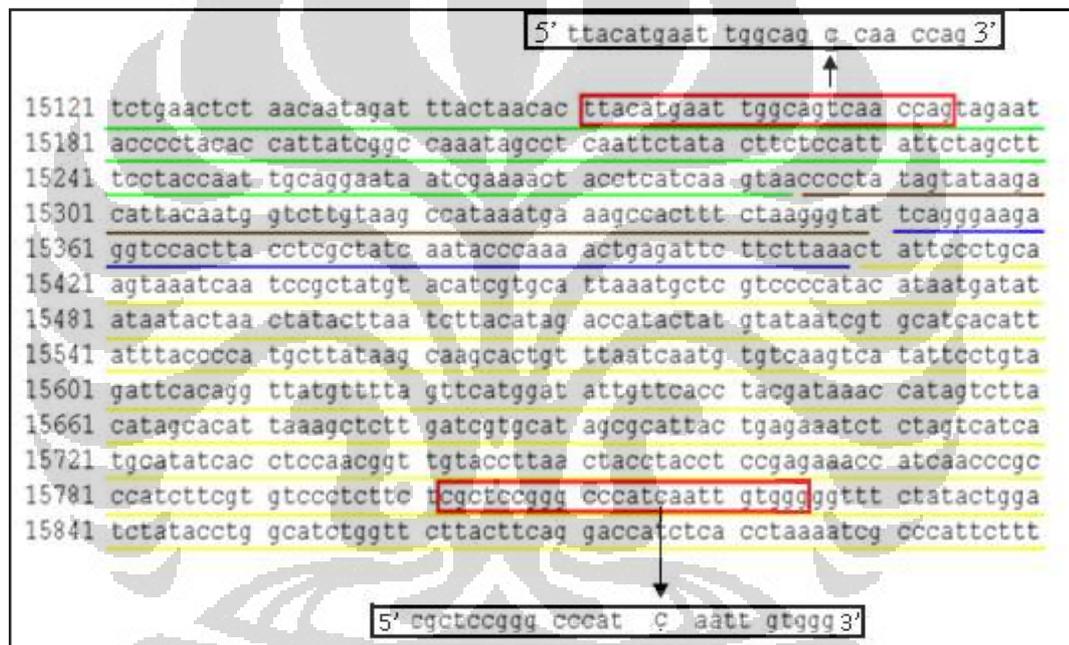
Gambar 4.1.1. Peta lokasi pengambilan sampel di TNWK [Gambar memperlihatkan 9 titik pengambilan sampel yang terdistribusi merata di seluruh kawasan TNWK (lingkaran hitam). Kumpulan titik merah menandakan sampel berada di lokasi yang berdekatan dengan kawasan kependudukan].

4.1.2. Desain primer dan amplifikasi DNA dengan metode PCR

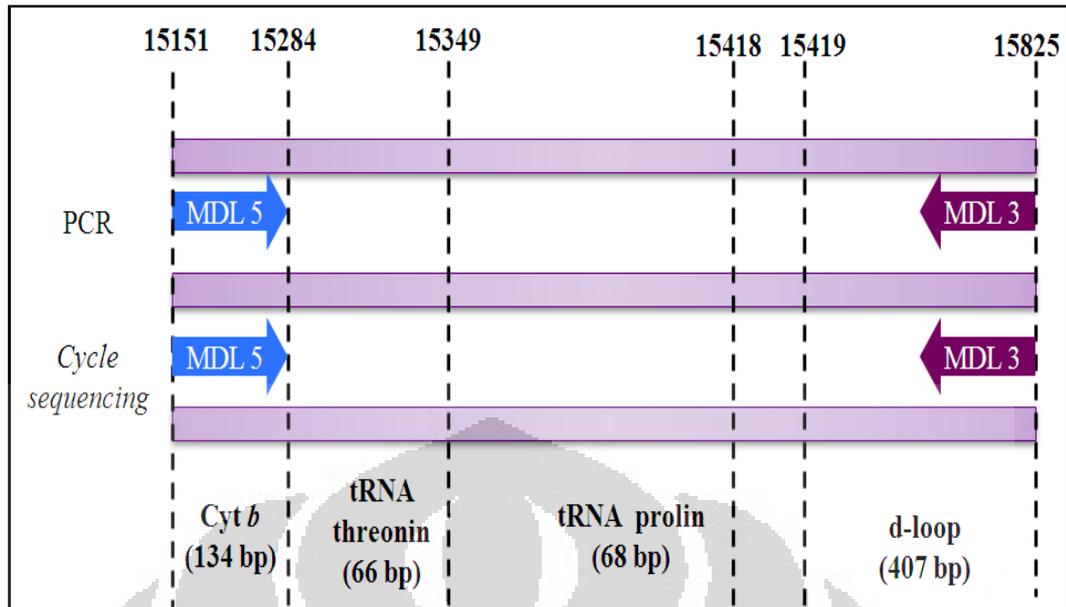
Hasil penyejajaran primer MDL5 (*forward*) dan MDL3 (*reverse*) terhadap sekuens genom lengkap gajah asia yang diperoleh dari GenBank (*Accession number*: NC_005129) menunjukkan posisi *annealing* pada nukleotida nomor 15151—15174 (MDL5) dan 15802—15858 (MDL3) (gambar 4.1.2(1)). Kedua primer mengandung *mismatch* akibat substitusi T17C pada primer MDL5, serta substitusi C16T pada primer MDL3. Hasil pengujian primer menggunakan PerlPrimer menunjukkan *melting temperature* sebesar 64,48°C (MDL5) dan

70,51°C (MDL3), konten GC sebesar 45% (MDL5) dan 62% (MDL3), serta menunjukkan bahwa kedua primer tidak saling berkomplemen.

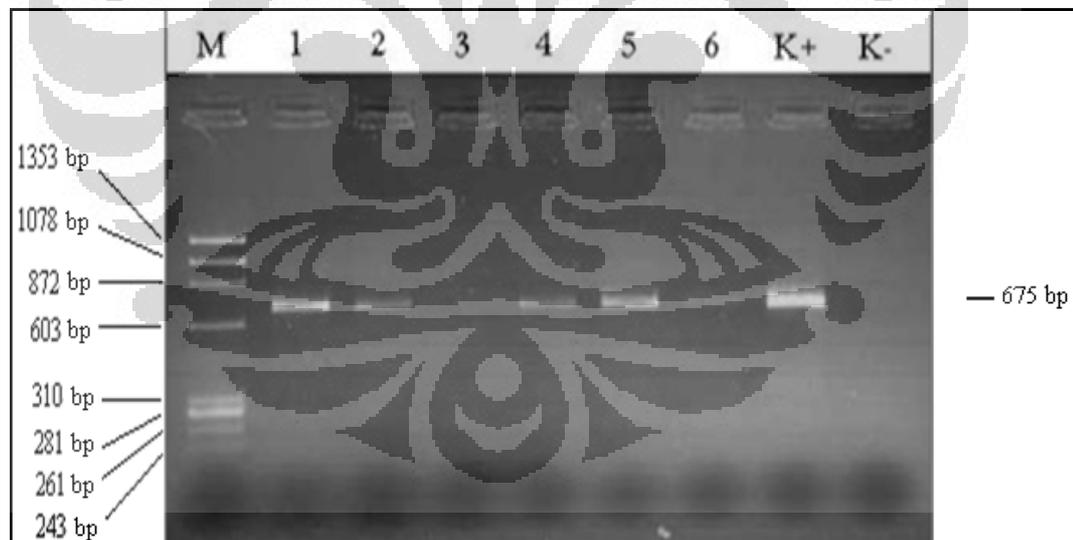
Amplifikasi fragmen DNA mitokondria berhasil dilakukan pada 31 sampel sampel feses gajah sumatera, dengan menggunakan pasangan primer MDL5 (*forward*) dan MDL3 (*reverse*) (gambar 4.1.2(2)). Sampel darah gajah sumatera yang diambil secara invasif digunakan sebagai kontrol positif pada proses amplifikasi. Pita yang teramplifikasi pada sampel feses dan kontrol positif menunjukkan ukuran yang sama, yaitu pada 675 bp yang terletak di antara posisi 603—872 bp. (gambar 4.1.2(3)).



Gambar 4.1.2(1). Skema daerah amplifikasi menggunakan sekuens gajah asia yang diperoleh dari GenBank (*Accession number*: NC_005129). [Kotak merah = Lokasi pelekatan primer; garis hijau = daerah pengkode sitokrom *b*; garis coklat = daerah pengkode tRNA threonin; garis biru = daerah pengkode tRNA prolin; garis kuning = daerah *Displacement loop* (D-loop); kotak hitam = primer yang digunakan pada penelitian ini].



Gambar 4.1.2(2). Strategi amplifikasi DNA (PCR) dan *cycle sequencing* [Gambar menunjukkan lokasi amplifikasi PCR dan *cycle sequencing* kedua primer meliputi 134 bp daerah sitokrom *b*, 66 bp tRNA threonin, 68 bp tRNA prolin, serta daerah 407 bp D-loop yang merupakan target utama dari penelitian ini].

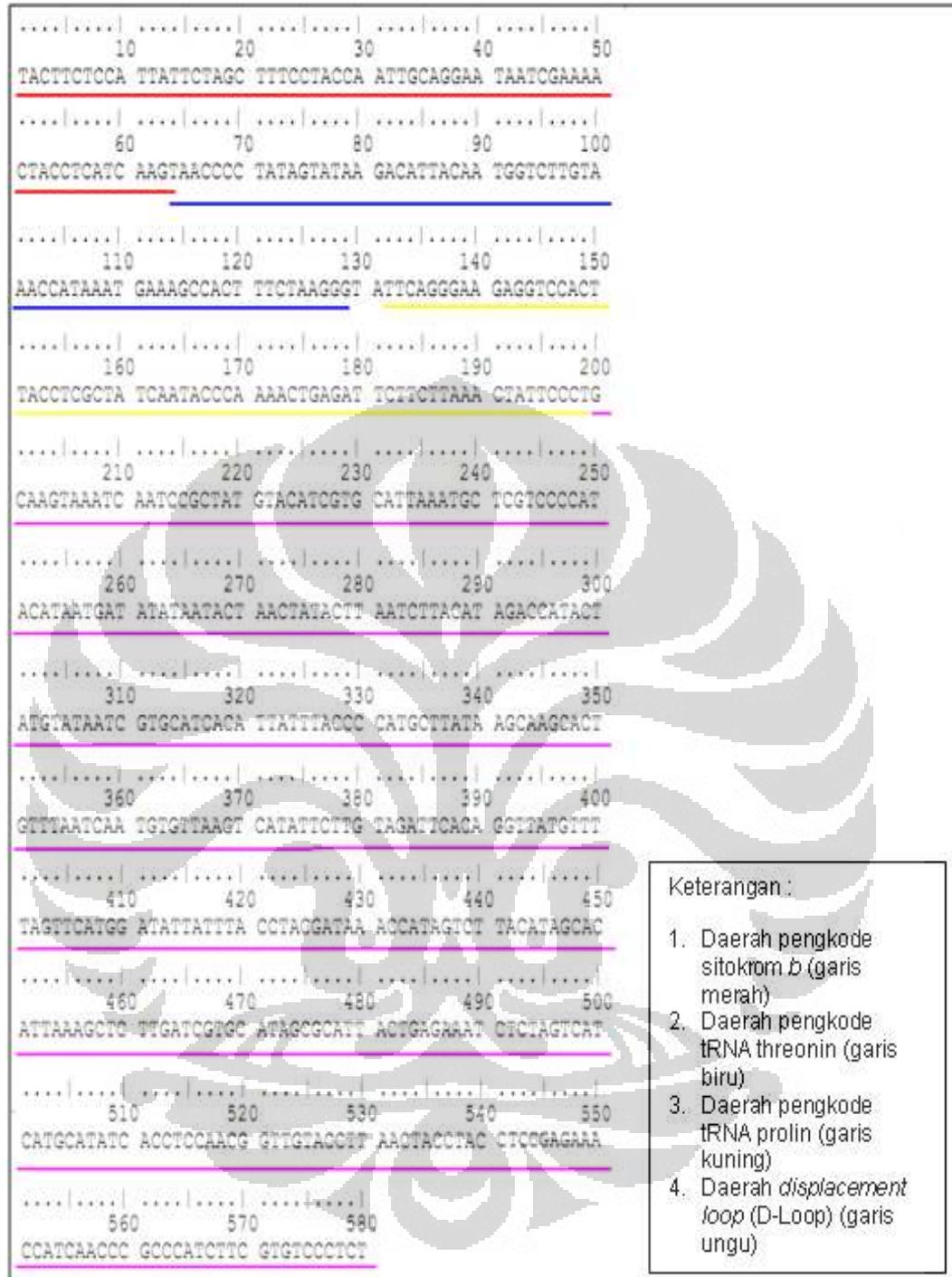


Gambar 4.1.2(3). Visualisasi hasil amplifikasi DNA dengan metode PCR pada gel agarosa 2%.

[Gambar memperlihatkan pita DNA tunggal pada posisi 675-bp. Lajur M = Marka DNA phi-X174/*Hae*III; lajur 1, 2, 4, 5, dan 6 = hasil PCR positif; lajur 3 = hasil PCR negatif; lajur K+ = kontrol positif; lajur K- = kontrol negatif].

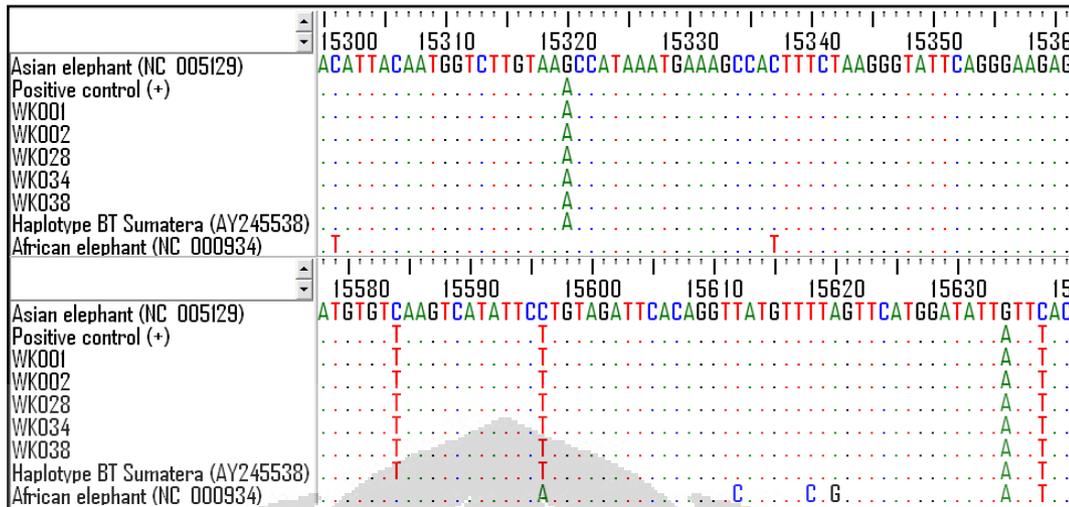
4.1.3. Pembacaan urutan nukleotida melalui analisis sekuensing

Sebanyak 31 sampel yang telah diamplifikasi kemudian disekuensing menggunakan primer MDL5 dan MDL3. Panjang fragmen yang terbaca dengan jelas dan digunakan untuk analisis yaitu 580 bp, yang terdiri dari 64 bp pada sitokrom *b*, 66 bp pada tRNA threonin, 68 pada tRNA prolin, dan 382 bp pada daerah D-loop (Gambar 4.1.3(1)). Sekuens yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan sekuens genom mtDNA dari gajah asia (*Accession number* (GenBank) : NC_005129), kontrol positif, serta sekuens genom mtDNA gajah afrika (*Accession number* (GenBank) : NC_000934). Sebanyak 5 SNPs berhasil diidentifikasi pada posisi basa ke- 15320, 15584, 15596, 15634, dan 15637 dari sekuens genom mtDNA tersebut (Gambar 4.1.3(2)). Posisi SNP pertama terletak pada daerah tRNA threonin, sedangkan 4 SNPs lainnya berada pada daerah D-loop. Kelima SNPs tersebut merupakan hasil substitusi transisi, dengan rasio transisi G→A : C→T yaitu 2 : 3. Semua sekuens yang diperoleh dari sampel feses menunjukkan kesamaan haplotipe dan terdistribusi secara merata pada populasi di TNWK (gambar 4.1.3(3)). Jenis haplotipe tersebut identik dengan haplotipe BT (*Accession number*: AY245825) yang dilaporkan pada penelitian Vidya *dkk.* (2009: 894).

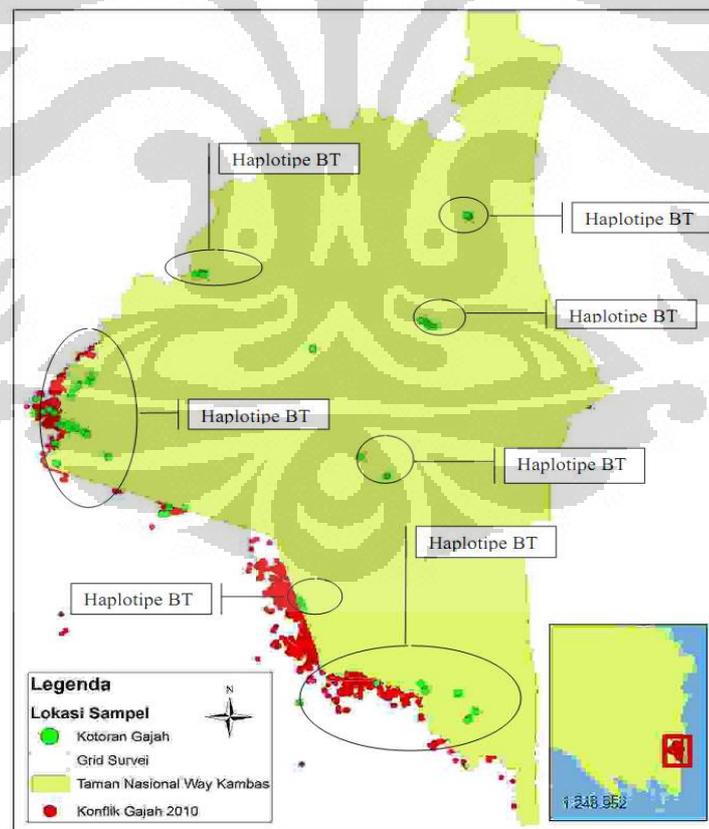


Gambar 4.1.3(1). Skema daerah hasil sekuensing yang diperoleh pada penelitian ini.

[Gambar menjelaskan posisi daerah pengkode sitokrom *b*, tRNA threonin, tRNA prolin, serta D-loop pada sekuens 580 bp yang diperoleh pada penelitian ini. Masing-masing posisi ditentukan berdasarkan hasil *multiple alignment* terhadap sekuens genom gajah asia yang diperoleh dari GenBank (*Accession number*: NC_005129)].



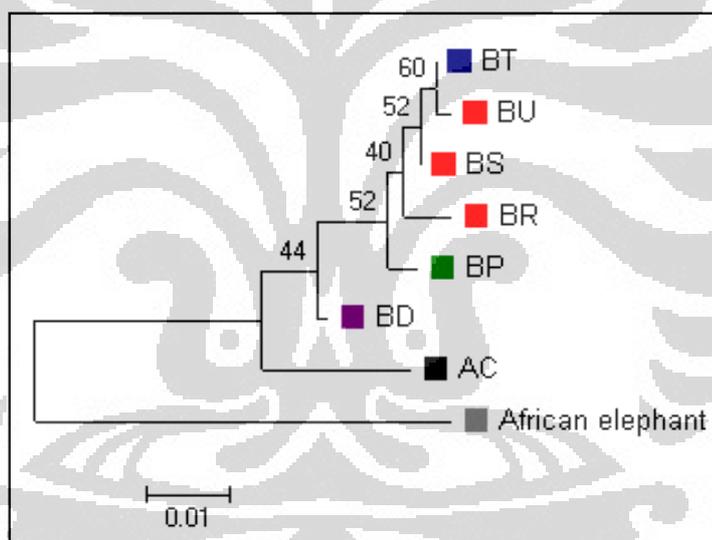
Gambar 4.1.3(2). Posisi nukleotida pada mtDNA hasil sekuensing yang menunjukkan 5 SNPs.
 [Gambar (A) menunjukkan substitusi G15320A pada daerah tRNA threonin, sedangkan gambar (B) menunjukkan substitusi C15584T, C15596T, G15634A, dan C15637T pada daerah D-loop].



Gambar 4.1.3(3). Peta distribusi haplotipe populasi gajah sumatera di TNWK [Gambar menunjukkan haplotipe BT merupakan haplotipe tunggal yang terdistribusi pada semua lokasi pengambilan sampel di populasi TNWK].

4.1.4. Pohon filogenetik

Pohon filogenetik dibuat menggunakan metode *Maximum-Likelihood* dengan penghitungan *bootstrap* sebanyak 1000 kali replikasi menggunakan program MEGA 5 (gambar 4.1.4). Haplotipe tersebut dibandingkan dengan haplotipe yang pernah dilaporkan pada penelitian sebelumnya (Vidya *dkk.* 2009: 893), yaitu BR, BS, dan BU (Sumatera), BP (Sumatera & Sri Lanka), AC (Bhutan & India), serta gajah afrika (*Loxodonta africana*). Haplotipe BT yang ditemukan pada populasi gajah sumatera di TNWK menunjukkan hubungan monofiletik dengan haplotipe lainnya yang pernah dilaporkan pada populasi gajah sumatera, kecuali haplotipe BP. Haplotipe BP tidak hanya ditemukan pada populasi gajah sumatera, tetapi juga pada daerah Sri Lanka (Vidya *dkk.* 2009: 858).



Gambar 4.1.4. Pohon filogenetik *Maximum Likelihood* haplotipe gajah sumatera yang ditemukan di TNWK dan gajah asia lainnya, disertai gajah afrika sebagai *outgroup*.

[Kotak biru = haplotipe gajah di TNWK; kotak merah = haplotipe gajah sumatera yang dilaporkan pada penelitian Vidya *dkk.* (2009: 893); kotak hijau = haplotipe yang dimiliki oleh gajah sumatera serta gajah asia di Sri Lanka; kotak ungu = haplotipe gajah borneo; kotak hitam = haplotipe gajah asia di India; gajah afrika (*outgroup*)].

4.2. PEMBAHASAN

4.2.1. Ekstraksi DNA dan kuantifikasi DNA

Ekstraksi DNA berhasil dilakukan menggunakan protokol QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit. Berdasarkan studi oleh Johnson *dkk.* (2005: 6) dengan sampel berupa feses manusia, ekstraksi DNA menggunakan QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit lebih unggul dibanding ekstraksi DNA dengan metode ekstraksi organik. Pada tahap lisis sel, protokol QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit menganjurkan supernatan diinkubasi di dalam *buffer* ASL pada suhu ruang dan waktu yang singkat. Dengan demikian, meskipun terjadi pencampuran antara sel mikroorganisme dan sel-sel epitel dari feses, DNA keduanya tidak akan tercampur sebab sel bakteri dan parasit lainnya akan lisis secara efektif pada suhu 70—95°C. Selain itu, penggunaan tablet InhibitEX dapat dengan efektif mengikat substansi perusak DNA dan inhibitor PCR antara lain bilirubin, garam empedu dan polisakarida tumbuhan. Berbeda dengan QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit, ekstraksi organik umumnya menggunakan bahan-bahan kimia seperti fenol pada ekstraksi fenol-kloroform yang dapat secara langsung menghambat kerja enzim taq polimerase (Wiedbrauk *dkk.* 1995: 2646).

Sebanyak 80 sampel feses masih dapat diekstraksi DNA-nya meskipun usia penyimpanannya telah lebih dari 1 tahun. Studi oleh Frantzen *dkk.* (1998: 1426) menunjukkan bahwa penyimpanan DNA di dalam *buffer* DMSO/EDTA/Tris/larutan garam lebih efektif dibandingkan dengan metode penyimpanan di dalam etanol 70%, *direct freezing* pada suhu -20°C, dan desikasi. DMSO merupakan krioprotektan yang digunakan untuk melindungi sel selama proses pembekuan, sedangkan kombinasi Tris dan EDTA berfungsi untuk mengikat kation divalen yang merupakan kofaktor nuklease sehingga resiko degradasi DNA oleh enzim tersebut dapat dihambat selama penyimpanan (Smith & Morin 2005: 1).

Kuantitas DNA yang diperoleh umumnya sangat tinggi, yaitu di atas 100 ng. Hasil tersebut sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa feses dapat mengandung sejumlah besar sel epitel usus yang terlepas pada saat proses pencernaan (Wasser 1997: 1091; Piggot *dkk.* 2003: 342). Beberapa sampel

menunjukkan kuantitas DNA yang lebih rendah (<100 ng). Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain kondisi lingkungan pada saat koleksi. Berdasarkan studi oleh Wehausen *dkk.* (2004: 508) serta Nsubuga *dkk.* (2004: 2092), sampel yang diambil pada saat kondisi lingkungan lembab atau terlalu lama terpapar pada kondisi yang lembab, cenderung memiliki kuantitas DNA yang rendah, terkait dengan aktivitas degradasi endonuklease yang relatif lebih tinggi pada kondisi tersebut.

Berdasarkan data yang diperoleh terhadap tingkat kemurnian, sebanyak 20 sampel menunjukkan tingkat kemurnian dengan kisaran nilai 1,8—1,91, sedangkan 10 sampel lainnya menunjukkan tingkat kemurnian dengan nilai di bawah 1,8. Tingkat kemurnian pada $A_{260/280}$ dengan kisaran nilai 1,8—2,0 menunjukkan kualitas DNA yang baik, nilai di bawah 1,8 menunjukkan kontaminasi terhadap protein, sedangkan nilai di atas 2,0 menunjukkan kontaminasi terhadap kloroform atau fenol (Sambrook *dkk.* 2001c). Hal tersebut menunjukkan bahwa beberapa sampel mengandung kontaminan berupa protein atau reagen yang digunakan pada saat reaksi (Thermo Scientific 2010: 2). Meskipun demikian, keberadaan kontaminan tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap amplifikasi sebab semua sampel berhasil diamplifikasi, baik yang menunjukkan tingkat kemurnian tinggi maupun yang menunjukkan tingkat kemurnian rendah. Studi oleh Frantzen *dkk.* (1998: 1426) menyimpulkan bahwa sampel feses yang disimpan dalam *buffer* penyimpanan berupa DMSO/EDTA/Tris/larutan garam mampu menunjukkan kesuksesan amplifikasi yang lebih tinggi dibanding dengan sampel yang disimpan menggunakan etanol atau dengan metode preservasi lainnya.

4.2.2. Desain primer dan amplifikasi DNA dengan metode PCR

Hasil uji karakterisasi menggunakan program PerlPrimer menunjukkan bahwa primer MDL5 dan MDL3 memiliki ukuran 24 bp. Ukuran tersebut masuk ke dalam standar primer ideal, yaitu 18—30 bp (Taylor 1991: 3). Kedua primer tersebut juga mengandung konten GC yang sesuai dengan standar ideal, yaitu 45% dan 62% . Konten GC yang tinggi dapat mendukung spesifisitas primer

terhadap sekuens target. Selain itu, primer dengan konten GC yang tinggi dapat bertahan pada suhu *annealing* yang tinggi (Snustad & Simmons 2003: 448).

Primer MDL5 dan MDL3 memiliki kisaran *melting temperature* yang cukup jauh, yaitu 6,03°C. Nilai tersebut berada di luar standar selisih *melting temperature* yang berkisar 5°C. Meskipun demikian, suhu *annealing* yang digunakan dalam penelitian ini (62°C) cukup efektif digunakan dalam amplifikasi menggunakan kedua primer tersebut. Hilis *dkk.* (1996: 215) menyatakan bahwa suhu *annealing* yang berbeda 1—2°C dari suhu karakterisasi termasuk ke dalam kisaran yang masih dapat ditoleransi .

Keberadaan *mismatch* ditunjukkan oleh primer MDL5 dan MDL3. Meskipun demikian, hasil amplifikasi yang baik masih dapat diperoleh. Hal tersebut kemungkinan disebabkan *mismatch* berada di luar lima basa terakhir dari ujung 3'. Keberadaan *mismatch* pada lima basa terakhir dari sekuens primer dapat mengurangi efisiensi amplifikasi karena daerah 3' akan berinteraksi lebih dekat dengan situs aktivasi DNA polimerase (Stadhouders *dkk.* 2010: 109—110).

Proses amplifikasi melalui metode PCR dilakukan menggunakan campuran PCR AmpliTaq Gold® PCR Master Mix. Penggunaan campuran pabrikan disebabkan kondisi PCR yang ideal tidak dapat dicapai menggunakan campuran PCR dengan enzim polimerase dan komponen standar. AmpliTaq Gold® PCR Master Mix menggunakan komponen khusus berupa enzim taq polimerase "Hot Start". Berbeda dengan enzim polimerase standar, enzim tersebut membutuhkan aktivasi terlebih dahulu pada suhu denaturasi sehingga dapat mengurangi resiko kemunculan produk PCR nonspesifik yang dapat terjadi pada saat preparasi PCR di dalam suhu ruang atau pada saat siklus PCR melewati suhu *annealing* yang tidak optimal. Selain itu, AmpliTaq Gold® PCR Master Mix memiliki sensitivitas yang tinggi sehingga sangat sesuai digunakan untuk sampel feses seringkali memiliki kualitas dan kuantitas DNA yang rendah (Perkin Elmer 1993: 2—3).

4.2.3. Pembacaan urutan nukleotida melalui analisis sekuensing

Hasil sekuensing menunjukkan hasil yang cukup baik meskipun hasil pembacaan yang kurang jelas masih ditemukan khususnya pada 20—40 basa

pertama. Hasil yang demikian umum terjadi pada hasil sekuensing yang seringkali disebabkan oleh separasi fragmen yang belum optimal pada awal proses sekuensing di dalam mesin AB 3130xl Genetic Analyzer. Penggunaan primer PCR untuk primer *cycle sequencing* juga dapat mengakibatkan hasil baca yang demikian. Hal tersebut disebabkan produk nonspesifik yang berada pada produk PCR akan terakumulasi pada saat *cycle sequencing* akibat penggunaan primer yang sama. Oleh karena itu, permasalahan tersebut seringkali diatasi dengan menggunakan primer internal untuk meningkatkan spesifisitas karena primer internal tidak akan melekat pada produk PCR nonspesifik (Eton Bioscience 2003: 13—14). Namun demikian, sekuensing dua arah (*forward* dan *reverse*) yang dilakukan dapat menunjukkan hasil baca yang cukup jelas sehingga penelitian ini tetap dilanjutkan dengan menggunakan primer yang sama dengan primer PCR.

4.2.4. Variasi *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs)

Penelitian ini berhasil memperoleh sekuens sepanjang 580 bp, yang terdiri dari 64 bp pada sitokrom *b*, 66 bp pada tRNA threonin, 68 pada tRNA prolin, dan 382 bp pada daerah D-loop (Gambar 4.2.4). Sekuens tersebut serupa dengan 560 bp dari sekuens 600 bp yang digunakan pada penelitian Vidya *dkk.* (2009: *supplementary information* 5). Hasil sekuensing menunjukkan keberadaan lima SNPs, keempat SNPs terakhir berada pada daerah D-loop mtDNA, sedangkan SNP pertama berada pada daerah tRNA threonin. Hasil tersebut menunjukkan bahwa 80% variasi SNPs terdistribusi pada daerah D-loop. Daerah D-loop merupakan daerah paling bervariasi dari keseluruhan genom mtDNA mamalia. Daerah tersebut lebih mudah mengakumulasi mutasi akibat pemaparan terhadap produk sampingan respirasi (radikal bebas) yang tidak diimbangi dengan keberadaan sistem perbaikan (Stewart & Baker 1994: 9; Fernando *dkk.* 2000: 363). Akibatnya, daerah D-loop lebih mudah mengakumulasi substitusi nukleotida. Berbeda dengan D-loop, daerah tRNA threonin cenderung bersifat konservatif akibat perannya dalam fungsi fisiologis sehingga variasi yang ditunjukkan akibat mutasi pada daerah tersebut sangat sedikit (Parsons 2006: 36). Fernando *dkk.* (2000: 366) dan Vidya *dkk.* (2009: *supplementary data* 5) melaporkan keberadaan 22 SNPs pada daerah D-loop dan hanya 2 SNPs pada

daerah tRNA threonin. Selain itu, semua substitusi merupakan hasil transisi. Transisi memiliki probabilitas kejadian yang lebih tinggi dari transversi. Hal tersebut kemungkinan disebabkan transisi tetapi memasang purin dan pirimidin sehingga tidak dibutuhkan perubahan konformasi (Wakeley 1996: 159).

4.2.5. Tingkat variasi genetik dan distribusi varian genetik di dalam populasi

Hasil sekuensing pada 31 sampel feses gajah sumatera di TNWK hanya menghasilkan satu haplotipe BT [$h, \pi = 0$], meskipun sampel dikoleksi dari berbagai lokasi yang berbeda di TNWK. Hasil serupa juga dilaporkan pada populasi gajah asia di Nilgiri, India, yang diperkirakan terdiri dari ± 9000 individu. Studi yang dilakukan oleh Vidya *dkk.* (2005: 74) tersebut hanya menghasilkan satu haplotipe BN [$h, \pi = 0$]. Ukuran populasi tampaknya tidak selalu mengindikasikan tingkat variasi genetik yang tinggi. Analisis variasi genetik pada populasi gajah asia di Nakai Plateau, Laos, yang diperkirakan berukuran sekitar 132 individu, sebaliknya menghasilkan 6 jenis haplotipe [$h = 0,699 \pm 0,049; \pi = 0.011 \pm 0.006$].

Populasi gajah sumatera di TNWK tergolong berukuran kecil dengan sekitar 180—250 individu saja dan terisolasi secara geografis dengan populasi gajah lainnya di Sumatera. Populasi yang demikian cenderung lebih rentan terhadap berbagai faktor yang dapat meningkatkan resiko kepunahan, seperti penurunan variasi genetik, akumulasi mutasi letal, *genetic drift*, serta tekanan silang dalam atau *inbreeding depression* (Lacy 2000: 39; Archie *dkk.* 2001: 47; Frankham *dkk.* 2002: 225; Campbell *dkk.* 2003: 26; Ahlering *dkk.* 2010: 414). Meskipun ukuran populasi tidak selalu berkorelasi positif dengan tingkat variasi genetik, rendahnya variasi genetik pada populasi gajah di TNWK menunjukkan bahwa proses genetik yang berlaku pada populasi kecil dan terisolasi telah terjadi (Nyakaana & Arctander 1999: 1105).

Founder effect merupakan salah satu fenomena yang dapat menjelaskan tingkat variasi genetik yang rendah pada populasi gajah di TNWK. Pada peristiwa tersebut, ukuran populasi efektif akan berkurang sehingga kontribusi anggota populasi terhadap *gene pool* generasi mendatang juga akan menurun. Beberapa varian genetik populasi kemungkinan tidak akan terwakili pada generasi

berikutnya melalui proses *lineage sorting*. Melalui proses tersebut, varian genetik atau haplotipe dapat tereliminasi secara acak dan menghasilkan garis keturunan tunggal di dalam populasi. Pengaruh *lineage sorting* akan lebih mudah terjadi pada mtDNA. Hal tersebut disebabkan ukuran populasi efektif dari mtDNA hanya $\frac{1}{4}$ kali dari ukuran populasi efektif DNA inti sehingga suatu efek stokastik yang mengarah pada penyimpangan frekuensi genetik dapat dengan relatif “cepat” menghilangkan varian genetik mtDNA di dalam populasi (Chiang *dkk.* 2004: 2007; Heckman *dkk.* 2007: 364).

Struktur sosial juga dapat memengaruhi variasi haplotipe di dalam populasi melalui mekanisme *selective sweep*. Mekanisme tersebut dapat terjadi ketika beberapa kelompok famili di dalam populasi bergabung membentuk suatu organisasi sosial yang lebih besar yang disebut klan. Dominansi hirarki di dalam klan tersebut dapat mengakibatkan haplotipe tertentu menjadi dominan dan mereduksi frekuensi haplotipe lainnya. Jika kondisi tersebut dipertahankan dalam jangka waktu yang lama, diferensiasi populasi akan punah dan yang teramati adalah homogenisasi genetik di dalam populasi (Vidya *dkk.* 2005: 78).

Founder effect, *lineage sorting*, serta *selective sweep* kemungkinan berkontribusi dalam penurunan ekstrim variasi haplotipe pada populasi gajah sumatera di TNWK. Namun demikian, penggunaan jumlah sampel yang masih sedikit (31 sampel) dapat menjadi faktor penemuan variasi genetik yang tunggal sebab beberapa varian genetik lainnya kemungkinan belum terlihat. Selain itu, tidak tertutup kemungkinan bahwa sampel feses yang digunakan berasal dari satu individu saja atau dari beberapa individu yang tergabung pada kelompok famili yang sama. Hal tersebut cukup memungkinkan sebab gajah merupakan hewan penjelajah, dengan luas wilayah mencapai 600 km^2 sehingga feses dari individu atau kelompok famili yang sama dapat ditemukan pada lokasi yang berjauhan (Soehartono *dkk.* 2007: 6). Haplotipe BT yang ditemukan pada penelitian ini merupakan haplotipe yang terdistribusi secara luas pada populasi gajah sumatera, termasuk pada populasi di TNWK. Hal tersebut didasari oleh penelitian Zein (komunikasi pribadi, 29 & 31 Mei 2012) yang melaporkan keberadaan haplotipe BT pada lima lokasi pengambilan sampel, yaitu di Bentayan, Sugihan, Bukit Salero Lahat, Seblat, dan di TNWK. Hal tersebut juga terlihat pada penelitian Vidya *dkk.* (2009: 894) terhadap populasi gajah sumatera yang juga

memperlihatkan dominansi haplotipe BT melalui penemuan 44% haplotipe tersebut dari 34 sampel yang digunakan di dalam analisis. Dengan demikian, tidak mengherankan jika haplotipe tersebut juga mendominasi pada lokasi pengambilan sampel di TNWK. Akan tetapi, penambahan jumlah sampel perlu dilakukan untuk memastikan hal tersebut dan memperoleh deskripsi menyeluruh tentang struktur genetik populasi gajah sumatera di TNWK.

4.2.6. Hubungan filogenetik haplotipe gajah di Taman Nasional Way Kambas

Hasil analisis menunjukkan bahwa haplotipe BT yang ditemukan pada TNWK menunjukkan hubungan monofiletik dengan haplotipe BR, BS, BT, dan BU, yang semuanya merupakan haplotipe gajah sumatera dan termasuk ke dalam klad B. Keempat haplotipe tersebut tergolong ke dalam haplotipe kawasan Sunda, bersamaan dengan haplotipe Borneo (BD). Penelitian Vidya *dkk.* 2009 juga pernah melaporkan keberadaan haplotipe BP pada populasi gajah sumatera. Haplotipe BP pada kenyataannya tidak hanya terdapat pada populasi gajah sumatera saja, tetapi juga pada populasi gajah di Sri Lanka. Penemuan haplotipe tersebut di kawasan Sunda dan Sri Lanka kemungkinan disebabkan oleh migrasi yang terjadi sekitar 0,9 milyar tahun yang lalu berawal dari Sri Lanka menuju kawasan Sunda (Fernando *dkk.* 2003b: 111; Vidya *dkk.* 2009: 898—899).

4.2.7. Manajemen Konservasi Populasi Gajah Sumatera di Taman Nasional Way Kambas

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa populasi gajah sumatera di TNWK memiliki tingkat variasi genetik yang rendah [$h, \pi = 0$]. Meskipun hasil penelitian ini dianggap kurang representatif, temuan tersebut tetap menjadi informasi penting yang dapat digunakan sebagai masukan dalam merancang manajemen konservasi bagi populasi gajah sumatera, khususnya di TNWK.

Pembangunan koridor merupakan upaya yang dapat direkomendasikan untuk manajemen konservasi gajah sumatera di TNWK, mengingat populasi tergolong berukuran kecil dan terisolasi. Namun demikian, pembangunan koridor masih cukup sulit untuk direalisasikan bagi populasi yang terpisah cukup jauh

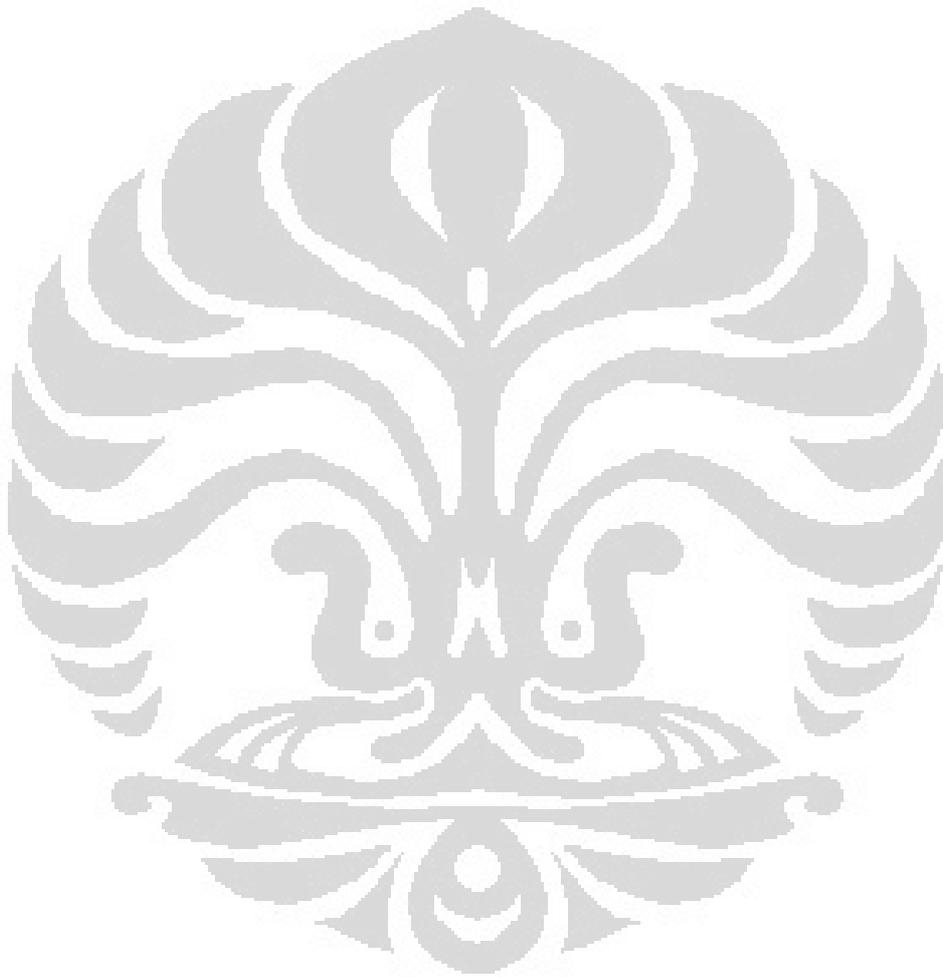
secara geografis, terutama jika melintasi kawasan dengan aktivitas penduduk yang tinggi dan permanen (Primack *dkk.* 1998: 123). Sebagai alternatif, upaya translokasi individu gajah dari lokasi lain ke dalam TNWK dapat menjadi strategi yang dapat dipertimbangkan. Implementasi translokasi individu harus diawali dengan penentuan *source population* atau populasi sumber yang layak untuk “menyumbangkan” varian genetiknya kepada populasi tujuan translokasi. Populasi sumber harus merupakan populasi yang memiliki variasi genetik yang relatif lebih tinggi. Hal tersebut bertujuan untuk menghindari penggunaan individu-individu dengan variasi genetik yang rendah yang justru dapat mendorong penurunan variasi genetik di dalam populasi tujuan translokasi (Frankham *dkk.* 2002: 408—409).

Gajah sumatera dikategorikan sebagai *Evolutionary Significant Unit* atau ESU sehingga memiliki prioritas yang tinggi dalam konservasi gajah asia. Dengan status ESU dalam kaitan dengan pengelolaan di penangkaran seperti kebun binatang dan taman safari, satwa tersebut harus ditempatkan dan dikelola secara terpisah sehingga terhindar dari hibridisasi dengan spesies gajah asia lainnya. Hibridisasi sangat bertentangan dengan pengelolaan gajah *ex-situ* (Fernando *dkk.* 2003b: 110; Soehartono *dkk.* 2007: 3). Berdasarkan *Haldane's rule*, hibridisasi dapat mengarah pada penurunan viabilitas dan fertilitas bagi individu heterogamet sehingga dapat mengarah pada kesintasan populasi akibat *outbreeding depression* (Fickel *dkk.* 2007: 298).

Pengetahuan mengenai ukuran populasi efektif pada populasi gajah sumatera di TNWK perlu untuk diketahui dalam rangka memperkirakan viabilitasnya. Beberapa pendapat ahli biologi menyebutkan bahwa ukuran populasi efektif berkisar 1/5 dari ukuran populasi total, meskipun pendapat tersebut tidak sepenuhnya berlaku mengingat ukuran populasi efektif dapat lebih tinggi dari ukuran populasi total, bergantung dari sejarah populasi yang bersangkutan (Harmon & Braude 2010: 127).

Penentuan manajemen konservasi yang tepat masih belum dapat dirumuskan terkait dengan data penelitian yang kemungkinan belum cukup representatif terhadap kondisi populasi gajah sumatera di TNWK. Oleh karena itu, penelitian ini perlu diteruskan dengan penambahan jumlah sampel dengan disertai analisis yang lebih mendalam. Selain itu, analisis genetik terhadap

populasi tersebut diharapkan dapat didampingi oleh data menggunakan marka molekul biparental (contoh: mikrosatelit) sehingga informasi yang diperoleh tidak hanya berupa variasi genetik, tetapi juga pada determinasi individu-individu di dalam populasi (Wasser 1997: 1091; Taberlet *dkk.* 1999: 233; Piggot *dkk.* 2000: 67).



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Tingkat variasi genetik daerah D-loop DNA mitokondria tergolong rendah [h , $\pi = 0$] pada populasi gajah sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di TNWK.
2. *Founder effect*, *lineage sorting*, dan *selective sweep* bertanggung jawab terhadap variasi genetik yang rendah.

B. SARAN

1. Jumlah sampel yang disertakan dalam analisis perlu ditingkatkan sehingga gambaran yang representatif mengenai populasi gajah sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di TNWK dapat diperoleh.
2. Analisis menggunakan marka molekul biparental (contoh: mikrosatelit) perlu disertakan untuk dapat memperoleh informasi yang lebih komprehensif, tidak hanya mengenai variasi genetik tetapi juga individu-individu di dalam populasi.

DAFTAR ACUAN

- Ahlering, M.A., S. Hedges, A. Johnson, M. Tyson, S.G. Schuttler & L.S. Eggert. 2010. Genetic diversity, social structure, and conservation value of the elephants of the Nakai Plateau, Lao PDR, based on non-invasive sampling. *Conserv Genet* : 413—422.
- Albert, B., B.J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J.D. Watson. 1994. *Molecular Biology of The Cells*. 3rd ed. Garland Publishing, Inc., New York: xii + 1294 hlm.
- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrel, M.M.L. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden & I.G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457—465.
- Ankel-Simmon, F. & J.M. Cummins. 1996. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 13859–13863.
- Applied Biosystems. 2002. *BigDye[®] Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit*. California, United States of America. vi + 4-14 hlm.
- Archie, E.A., C.J. Moss & S.C. Albert. 2006. The ties that bind: Genetic relatedness predicts the fission and fusion of social groups in wild African elephants. *Proc R Soc B* **273**: 513–522.
- Archie, E.A., C.J. Moss & Alberts, S.C. 2011. Friends and relations: kinship and the nature of female elephant social relationships. *Dalam: Amboseli Elephants: A long-term perspective on a long-lived mammal* (Eds. C.J. Moss, H. Croze). Chicago: University of Chicago Press. 238—245.
- Arivazhagan, C. & B. Ramakhrisnan. 2010. Conservation perspective of Asian Elephants (*Elephas maximus*) in Tamil Nadu, Southern India. *Indian J Biotech* 1: 15—22.
- Birren, B. & E. Lai. 1993. *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical guide*. Academic-Press, Inc., San Diego: xvii + 253 hlm.
- Brock, T.D. 1994. *Biology of microorganisms*. 7th ed. Prentice Hall, Inc, New Jersey: xvii + 909 hlm.

- Brown, T.A. 1993. *Genetics: a molecular approach*. 2nd ed. Chapman Hall, New York : xii + 467 hlm.
- Campbell, N.A., J.B Reece & L.G Mitchell. 2002. Biologi. Terj dari *Biology*, oleh Lestari, R.,E.I.M.Adil & N.Anita. 5th ed. Erlangga, Jakarta: xxi + 438 hlm.
- Castro, J.A., A. Picornell & M. Ramon. 1998. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *Internatl Microbiol* **1**:327–332.
- Chaves, P.B. M.F. Paes, S.L. Mendes, K.B. Strier, I.D. Louro & Valéria Fagundes. 2006. Noninvasive genetic sampling of endangered mურიკი (Primates, Atelidae): Efficiency of fecal DNA extraction. *Genet Mol Biol* **29**(4): 1—5.
- Chiang, T.Y., K.H. Hung, T.W. Hsu & W.L. Wu. 2004. Lineage sorting and phylogeography in *Lithocarpus formosanus* and *L. dodonaeifolius* (Fagaceae) from Taiwan. *Ann Missouri Bot Gard* **91**: 207—222.
- Chomyn, A., M.W.J. Cleeter, C.I. Raga, M. Riley, R.F. Doolittle & G. Attardi. 1986. URF6: Last unidentified reading frame of human mtDNA codes for an NADH dehydrogenase sub-unit. *Science* **234**: 614—618.
- Clayton, D.A. 1996. Mitochondrial DNA Replication. *CHSL Press* : 1015—1027.
- Comstock, K.E., N. Georgiadis, J. Pecon-Slattey, A.L. Roca, E.A. Ostrander, S.J. O'Brien & S.K. Wasser. 2002. Pattern of molecular genetic variation among African elephant populations. *Mol Ecol* **11**: 2489—2498.
- Cooper, G.M. 1997. *The Cell: A molecular approach*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland: xxiv + 673 hlm.
- Djonady. 2005. Spektrofotometer absorpsi UV/VIS. 5 hlm.
<http://sentrabd.com/spectrophotometer.htm>. 1 Mei 2009, pk. 11.10 WIB.
- Dowling, T.E., C. Moritz, J.D. Palmer & L.H. Rieseberg. 1996. Nucleic acids II: Analysis of fragments and restriction sites. *Dalam*: Hillis, D.M., C. Moritz & B.K. Marple (eds.). 1996. *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland:249—320.
- Eggert, L.S. J.A. Eggert & D.S. Woodruff. 2003. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Mol Ecol* **12**: 1389—1402.
- Eton Bioscience. 2003. Troubleshooting. 1 hlm.
<http://www.etonbio.com/troubleshooting.php>. 2 April, pk. 13.05 WIB.

- Fairbanks, D.J. & W.R. Andersen. 1999. *Genetics: The continuity of life*. Brooks/Cole Publishing Company, New York: xix + 820 hlm. (13)
- Fernando, P., M.E. Pfrender, S.E. Encalada & R. Lande. 2000. Mitochondrial DNA variation, phylogeography, and population structure of the Asian elephant. *Heredity* **84**: 362—372.
- Fernando, P., T. N. C. Vidya, C. Rajapakse, A. Dangolla & D. J. Melnick. 2003. Reliable Noninvasive Genotyping: Fantasy or Reality?. *J Hered* **94**(2):115—123.
- Fernando, P., T. N. C. Vidya, J. Payne, M. Stuewe, G. Davison, R.J. Alfred, P. Andau, E. Bosi, A. Kilbourn & D.J. Melnick. 2003b. DNA Analysis Indicates That Asian Elephants Are Native to Borneo and Are Therefore a High Priority for Conservation. *PloS Biol* **1**(1): 110—115.
- Fickel, J., D. Lieckfeldt, P. Ratanakorn & C. Pitra. 2007. Distribution of haplotypes and microsatellite alleles among Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand. *Eur J Wildl Res* **53**: 298—303.
- Finnila, S. 1999. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA: Detection of mutations in patients with occipital stroke. Dissertation – Department of Neurology University of Oulu, Oulu, Finland. 57 hlm.
- Fleischer, R.C., E.A. Perry, K. Muralidharan, E.E. Stevens, & C.M. Wemmer. 2001. Phylogeography of The Asian Elephant (*Elephas maximus*) Based on Mitochondrial DNA. *Evolution* **55**(9): 1882—1892.
- Frankham, R. J.D. Ballou & D.A. Briscoe. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge: xx + 617 hlm.
- Frantzen, M.A.J., J.B. Silk, J.W.H. Ferguson, R.K. Wayne & M.H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation method for faecal DNA. *Molec Ecol* **7**: 1423—1428.
- Galtier, N., B. Nabholz, S. Glemin & G.D.D. Hurst. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol Ecol* **18**: 4541–4550.
- Gardipee, F.M. 2003. Development of fecal DNA sampling methods to assess genetic population structure of greater Yellowstone bison. Theses – Wildlife biology The University of Montana, Montana: viii + 54 hlm.
- Griffin, H.G. & A.M. Griffin. 1993. *DNA Sequencing Protocols*. Human Press, Inc., Totowa, New Jersey: xii + 392 hlm.

- Hájková, P., B. Zemanová, J. Bryja, B. Hájek, K. Roche, E. Tkadlec & J. Zima. 2006. Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces. *Mol Ecol Notes* **6**: 559—562.
- Heckman, K.L., C.L. Mariani, R. Rasoloarison & A.D. Yoder. 2007. Multiple nuclear loci reveal patterns of incomplete lineage sorting and complex species history within western mouse Lemurs (*Microcebus*). *Mol Phylogenet Evol* **43**: 353—367.
- Hedges, S., M.J. Tyson, A.F. Sitompul, M.F. Kinnaird, D. Gunaryadi & Aslan. 2005. Distribution, status, and conservation needs of Asian elephants (*Elephas maximus*) in Lampung Province, Sumatra, Indonesia. *Biol Conserv* **124**: 35—48.
- Hoong, L.L. & K.C. Lek. 2005. Genetic polymorphisms in mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III of the Malaysian population. *Asia Pacific J Mol Biol Biotechnol* **13**(2): 79—85.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). 2012. The IUCN Red List of threatened species: summary. 1 hlm. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/7140/0>. 5 Februari 2012, pk. 12.29 WIB.
- Jamieson, I.G., C.E. Grueber, J.M. Waters, & D.M. Gleeson. 2008. Managing genetic diversity in threatened population. *New Zeal J Ecol* **32**(1): 130-137.
- Krause, J., P. H. Dear, J. Pollack, M. Slatkin, H. Spriggs, I. Barnes, A.M. Lister, I. Ebersberger, S. Paabo & M. Hofreiter. 2005. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* **439**: 724-727.
- Kumar, M.A., D. Mudappa, T.R.S. Raman. 2010. Asian elephant (*Elephas maximus*) habitat use and ranging in fragmented rainforest and plantations in the Anamalai Hills, India. *Tropic Conserv Sci* **3** (2):143-158.
- Lee, P.C. 1987. Allomothering among African elephant. *Anim Behav* **35**: 278—291.
- Li, W. & D. Graur. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland: xv + 284 hlm.
- Martin, R. 1996. *Gel electrophoresis: Nucleic acids*. BIOS Scientific Publishers, Ltd., Oxford: xiv + 175 hlm.

- McCoullough, D.R. 1996. Introduction. *Dalam: McCoullough, D.R. (ed.) 1996. Metapopulations and Wildlife Conservation*. Island Press, Washington, D.C.: 1—10.
- Mertens, G., S. Rand, E. Jehaes, G. Leijnen, W. Jacobs & E. Van Marck. 2008. Forensic evaluation and population data of 11 Y-STRs in Moroccan immigrants in Belgium. *Open Forensic Sci J* **1**: 19-25.
- Morin, P.A., K.E. Chambers, C.Boesch & L.Vigilante. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Mol Ecol* **10**: 1835—1844.
- Murphy, M.A., L.P. Waits & K.C. Kendall. 2003. Influence of diets on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Mol Ecol* **12**: 2261—2265.
- NCBI (National Center of Biotechnology Information). 2007. *Elephas maximus* Mitochondrial DNA Complete Genome. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=nc_005129_2007. 19 Februari 2011, pk. 18.39 WIB.
- Nei, M. & F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**: 145-163.
- Nei, M. & W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci* **76**(10): 5269-5273.
- Nsubuga, M.A., M.M. Robbins, A.D. Roeder, P.A. Morin, C. Boesch & L. Vigilant. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Mol Ecol* **13**: 2089–2094.
- Nyakaana, S. & P. Arctander. 1999. Population genetic structure of the African elephant in Uganda based on variation at mitochondrial and nuclear loci: evidence for male-biased gene flow. *Mol Ecol* **8**: 1105–1115.
- Nyhus, P.J., R. Tilson & Sumianto. 2000. Crop-raiding elephants and conservation implications at Way Kambas National Park, Sumatra, Indonesia. *Oryx* **34**(4): 262—274.
- Old, R. W. & B. Primrose. 1989. *Pengantar Rekayasa Genetika*. Printek Bil bau: 438 hlm.

- Pakendorf, B. & M. Stokening. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**:165–83.
- Paolella, P. 2000. *Introduction to molecular biology*. WCB McGraw Hill Companies, Inc., Massachussets: xiii + 241 hlm.
- Perkin Elmer. 1993. Amplification of low copy number sequences. The Perkin-Elmer Corporation, United States of America: 1—4 hlm.
- Perrera, B.M.A.O. 2009. The human-elephant conflict: A review of current status and mitigation methods. *Gajah* **30**: 41—52.
- Piggot, M.P. & A.C. Taylor. 2003. Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species. *Aust J Zool* **51**: 341—355.
- Qiagen. 2001. QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit Handbook. California, United States of America. 1—40 hlm.
- Rogaev, E.I., Y.K. Moliaka, B.A. Malyarchuk, F.A. Kondrashov, M.V. Derenko, I. Chumakov & A.P. Grigorenko. 2006. Complete mitochondrial genome and phylogeny of pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*. *PloS Biol* **4**(3): 0403—0410.
- Rood, E.J.J. 2008. Elephant crop raiding in a disturbed environment: The effect of landscape clearing on elephant distribution and crop raiding patterns in the north of Aceh, Indonesia. *Gajah* **29**: 17-23.
- Rood, E., A.A. Ganie, & V. Nijman. 2010. Using presence-only modelling to predict Asian elephant habitat use in a tropical forest landscape: implications for conservation. *Divers Distrib* **16**: 975—984.
- Rose, G., G. Passarino, V. Scornaienchi, G. Romeo, S. Dato, D. Bellizzi, V. Mari, E. Feraco, R. Maletta, A. Bruni, C. Franceschi & Giovanna De Benedictis. 2007. The mitochondrial DNA control region shows genetically correlated levels of heteroplasmy in leukocytes of centenarians and their offspring. *BMC Genom* **8**: 1—10.
- Ruokonen, M. 2001. Phylogeography and conservation genetics of the lesser white-fronted goose (*anser erythropus*). Dissertation – Department of Biology University of Oulu, Oulu, Finland. 53 hlm.
- Russell, P.J. 1994. *Fundamentals of genetics*. Harper Collins College Publishers, New York: xvi + 528 hlm.

- Rychlik & Rhoads. 1989. *Calculation of melting temperature*. 15 Juli 2003: 1 hlm. <http://www.psb.ugent.be>. 23 April 2007, pk. 15.50.
- Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001b. *Molecular Cloning: a Laboratory manual*. Volume 2. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 8.1—14.53 + 144 hlm.
- Santiapillai, C. & W.S. Ramono. 1993. Reconciling elephant conservation with economic development in Sumatra. *Gajah* **10**: 11—18.
- Santiapillai, C. & H. Suprahman. 1995. The Sumatran elephant (*Elephas maximus sumatranus*): Its population structure and impact on woody vegetation in the Way Kambas National Park, Sumatra, Indonesia. *Gajah* **14**: 10—27.
- Sekino, M., Taniguchi, N. & H. Motoyuki. 2002. Genetic diversity within and between hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* assessed by means of microsatellite and mitochondrial DNA sequencing analysis. *Aquaculture* **213**: 101-122.
- Sitompul, F.A. 2011. Ecology and conservation of sumatran elephants in Sumatra, Indonesia. Disertasi Ph.D. University of Massachusetts, Massachusetts, USA. xviii + 105 hlm.
- Smith, S. & P.A. Morin. 2005. Optimal storage conditions for highly dilute DNA samples: A role for trehalose as a preserving agent. *J Forensic Sci* **50**(5): 1—8.
- Snustad, D.P. & M.J. Simmons. 2003. *Principles of Genetics*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken: xix + 840 hlm.
- Soehartono, T., H.D. Susilo, A.F. Sitompul, D. Gunaryadi, E.M. Purastuti, W. Azmi, N. Fadhli & C. Stremme. 2007. Strategi dan rencana aksi konservasi gajah Sumatera dan gajah Kalimantan. Departmen Kehutanan, Jakarta, Indonesia. ii + 31 hlm.
- Stadhouders, R., S.D. Pas, J. Anber, J. Voermans, T.H.M. Mes & M. Schutten. 2010. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn* **12**(1): 109—117.
- Stewart, D.T. & A.J. Baker. 1994. Patterns of sequence variation in the mitochondrial DNA D-loop region of Shrews. *Mol Biol Evol* **11**(1): 9—21.

- Sumida, M., H. Kaneda, Y. Kato, Y. Kanamori, H. Yonekawa & M. Nishioka. 2000. Sequence variation and structural conservation of d-loop region and flanking genes of mitochondrial DNA from Japanese pond frogs. *Genes Genet Syst* **75**: 79—92.
- Taberlet, P. 1996. The use of mitochondrial control region sequencing in conservation genetics. *Dalam*: Smith, T.B. & R.K. Wayne (eds). 1996. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, New York: 125—142.
- Taberlet, P., L.P. Waits & G. Luikart. 1999. Noninvasive genetic sampling: Look before you leap. *Tree* **14**: 323—327.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* **28**(10): 2731—2739.
- Taylor, G.R. 1991. Polymerase chain reaction: Basic principles and automation. *Dalam*: McPherson, M.J.P. Qiuerke & G.R. Taylor. 1991. *PCR: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York: 1—14.
- Thermo Fisher Scientific. 2008. *NanoDrop 1000 Spectrophotometer v3.7 User's Manual*. Wilmington, United States of America. 1-1—19-3 hlm.
- Vandebona, H., M.B. Gunasekera, W.D. Ratnasooriya, N.C.W. Goonesekere, D.S. Kodikara & J. Alahakoon. 2004. DNA fingerprints of the Asian elephants in Sri Lanka, *Elephas maximus maximus*, using multilocus probe 33.15 (Jeffreys). *J Natl Sci Found Sri* **32**(3&4): 83—86.
- Vidya, T.N.C., P. Fernando., D.J. Melnick, & R. Sukumar. 2005. Population differentiation within and among Asian elephant (*Elephas maximus*) populations in southern India. *Heredity* **94**: 71—80.
- Vidya, T.N.C. & R. Sukumar. 2005b. Social organization of the Asian elephant (*Elephas maximus*) in southern India inferred from microsatellite DNA. *J Ethol* **23**:205—210.
- Vidya, T.N.C., S. Varma, N.X. Dang, T. Van Thanh, & R. Sukumar. 2007. Minimum population size, genetic diversity, and social structure of the Asian elephant in Cat Tien National Park and its adjoining areas, Vietnam, based on molecular genetic analyses. *Conserv Genet* **8**:1471—1478.

- Vidya, T.N.C., R. Sukumar & D. J Melnick. 2009. Range-wide mtDNA phylogeography yields insights into the origins of Asian elephants. *Proc R Soc B* **276**: 893—902.
- Wakeley, J. 1996. The excess of transition among nucleotide substitutions: new methods of estimating transition bias underscore its significance. *Tree* **11**(4): 158—162.
- Vodopich, D.S. & R. Moore. 2005. *Biology: Laboratory manual*. 7th ed. Mc.Graw-Hill company, Boston: ix + 555 hlm.
- Wallace, D.C. 1995. 1994 William Allan Address: Mitochondrial DNA variation in human evolution, degeneration disease, and aging. *Am J Hum Genet* **57**(2): 201—223.
- Wasser, S.K., C.S. Houston, G.M. Koehler, G.G. Cadd & S.R. Fain. 1997. Techniques for application of fecal DNA methods to field studies of Ursids. *Mol Ecol* **6**: 1091—1097.
- WCS (*Wildlife Conservation Society*). 2011. Survei kotoran (DNA) gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Taman Nasional Way Kambas. Balai Taman Nasional Way Kambas Wildlife Conservation Society – Indonesia Program. 25 hlm.
- Weaver, R.F. & P.W. Hedrick. 1999. *Genetics*. 3rd ed. W.M.C. Brown Publishers, Dubuque: xvii + 638 hlm.
- Wehausen, J.D., J.J. Ramey II & C.W. Epps. 2004. Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: The importance of DNA extraction method. *J Hered* **95**(6): 503—509.
- Wiedbrauk, D.L., J.C. Werner & A.M. Drevon. 1995. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluid. *J Clin Biol* **33**(10): 2643—2646.
- Wolfe, S.L. 1993. *Molecular & Cellular Biology*. Wardsworth Inc, California: vi + 1146 hlm.

Lampiran 1

Tabel data pengambilan sampel di Taman Nasional Way Kambas

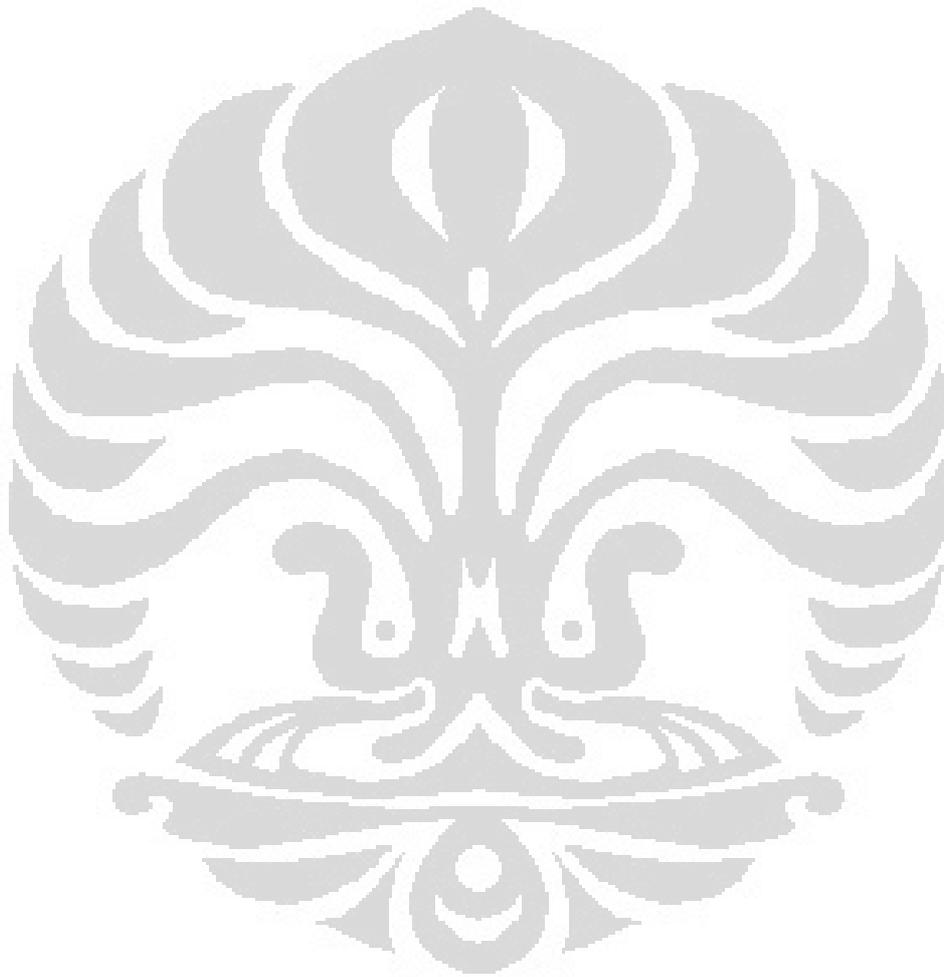
No.	Sampel	Tanggal koleksi	Longitude	Latitude	Kondisi feses pada saat koleksi
1	WK001	27/09/2010	564496	9448829	Segar
2	WK002	27/09/2010	564529	9448842	Segar
3	WK025	11/11/2010	562755	9450866	Segar
4	WK028	11/11/2010	562995	9450702	Segar
5	WK032	11/11/2010	562219	9451163	Segar
6	WK034	11/11/2010	561858	9451346	Segar
7	WK038	11/11/2010	561679	9451535	Segar
8	WK041	12/11/2010	561648	9451105	Segar
9	WK044	13/11/2010	560785	9448241	Segar
10	WK045	13/11/2010	560788	9448240	Segar
11	WK046	13/11/2010	560773	9448258	Segar
12	WK049	13/11/2010	560699	9448315	Segar
13	WK052	12/12/2010	562278	9454600	Segar
14	WK060	12/12/2010	561985	9454430	Segar
15	WK063	12/12/2010	562405	9454803	Segar
16	WK069	12/12/2010	563059	9454966	Segar
17	WK070	13/12/2010	563295	9455358	Segar
18	WK074	13/12/2010	561781	9453970	Segar
19	WK075	24/12/2010	579356	9457651	Segar
20	WK076	24/12/2010	579355	9457653	Segar
21	WK078	24/12/2010	579358	9457622	Segar
22	WK082	24/12/2010	579340	9457592	Segar
23	WK085	24/12/2010	579385	9457634	Segar
24	WK087	24/12/2010	579355	9457557	Segar
25	WK088	28/12/2010	588205	9459390	Segar
26	WK092	28/12/2010	587939	9459416	Segar
27	WK093	28/12/2010	587834	9459464	Segar
28	WK095	28/12/2010	587794	9459552	Segar
29	WK098	28/12/2010	587579	9459775	Segar
30	WK100	28/12/2010	587446	9459924	Segar
31	WK111	28/12/2010	587256	9459923	Segar
32	WK117	13/11/2010	582891	9448850	Segar
33	WK118	13/11/2010	582889	9448848	Segar
34	WK119	13/11/2010	584746	9447281	Segar
35	WK146	29/10/2010	591207	9428015	Segar
36	WK149	29/10/2010	591188	9427961	Segar
37	WK158	30/10/2010	590710	9427439	Segar

Lampiran 1 (*lanjutan*)

38	WK159	30/10/2010	590637	9427305	Segar
39	WK165	11/11/2010	587478	9429886	Segar
40	WK168	11/11/2010	587504	9429785	Segar
41	WK169	11/11/2010	578418	9428712	Segar
42	WK174	11/11/2010	587240	9430262	Segar
43	WK181	12/11/2010	587530	9429675	Segar
44	WK182	13/11/2010	589902	9429490	Segar
45	WK183	13/11/2010	589972	9429520	Segar
46	WK188	29/10/2010	590706	9468441	Segar
47	WK189	29/10/2010	590690	9468459	Segar
48	WK198	29/10/2010	590680	9468514	Segar
49	WK200	29/10/2010	590609	9468540	Segar
50	WK201	29/10/2010	590600	9468519	Segar
51	WK206	29/10/2010	590571	9468520	Segar
52	WK207	13/12/2010	570814	9463745	Segar
53	WK211	13/12/2010	571276	9463828	Segar
54	WK217	13/12/2010	571394	9463836	Segar
55	WK218	13/12/2010	571394	9463836	Segar
56	WK220	13/12/2010	571367	9463794	Segar
57	WK231	13/12/2010	571435	9463698.48	Segar
58	WK233	5/11/2010	559269	9453598	Segar
59	WK234	5/11/2010	560568	9452455	Segar
60	WK235	5/11/2010	559118	9452357	Segar
61	WK236	5/11/2010	559768	9452506	Segar
62	WK237	6/12/2010	560896	9451563	Segar
63	WK240	6/12/2010	561091	9451658	Segar
64	WK242	6/12/2010	561081	9451434	Segar
65	WK246	8/12/2010	560208	9452704	Segar
66	WK248	8/11/2010	583978	9430266	Segar
67	WK252	8/11/2010	560182	9452713	Segar
68	WK257	5/12/2010	560625	9449940	Segar
69	WK260	5/12/2010	560621	9449951	Segar
70	WK261	5/12/2010	560621	9449943	Segar
71	WK262	9/12/2012	578376	9437153	Segar
72	WK266	9/12/2012	578467	9436908	Segar
73	WK273	9/12/2012	578546	9436748	Segar
74	WK281	9/12/2012	578619	9436478	Segar
75	WK292	22/12/2012	568380	9444161	Segar
76	WK294	22/12/2012	568407	9444134	Segar
77	WK295	22/12/2012	568770	9444174	Segar

Lampiran 1 (*lanjutan*)

78	WK298	22/12/2012	568922	9444745	Segar
79	WK299	22/12/2012	570066	9444696	Segar
80	WK300	22/12/2012	570066	9444695	Segar



Lampiran 2

Tabel Hasil Ekstraksi Sampel Feses gajah sumatera di Taman Nasional Way

Kambas

Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	A ₂₆₀ / A ₂₈₀
WK001	165,37	1,78	WK095	149,6	1,82	WK218	117,4	1,84
WK002	204,34	1,84	WK098	123,8	1,84	WK220	163,7	1,88
WK025	242,6	1,87	WK100	347,4	1,84	WK231	105,8	1,81
WK028	259,1	1,88	WK111	203,6	1,84	WK233	36,9	1,82
WK032	257,2	1,89	WK117	15,5	1,89	WK234	75,6	1,87
WK034	72,0	1,93	WK118	97,6	1,79	WK235	71,1	1,79
WK038	142,5	1,87	WK119	105,3	1,91	WK236	98,4	1,82
WK041	279,0	1,88	WK146	230,5	1,87	WK237	83,2	1,86
WK044	97,9	1,89	WK149	104,6	1,76	WK240	72,9	1,85
WK045	170,6	1,88	WK158	121,7	1,45	WK242	65,7	1,75
WK046	134,4	1,81	WK159	24,2	1,73	WK246	49,2	1,79
WK049	60,2	1,74	WK165	51,5	1,81	WK248	263,9	1,77
WK052	34,3	1,03	WK168	54,9	1,79	WK252	138,0	1,85
WK060	13,1	1,08	WK169	160,9	1,75	WK257	180,8	1,87
WK063	59,6	1,06	WK174	45,8	1,74	WK260	226,5	1,86
WK069	35,6	1,00	WK181	42,2	1,61	WK261	147,7	1,87
WK070	19,8	1,14	WK182	100,3	1,69	WK262	15,9	1,43
WK074	30,3	1,01	WK183	101,5	1,58	WK266	125,5	1,80
WK075	11,5	0,94	WK188	193,7	1,84	WK273	68,6	1,73
WK076	14,1	0,98	WK189	118,9	1,87	WK281	82,7	1,83
WK078	9,4	0,98	WK198	91,4	1,79	WK292	138,3	1,63
WK082	34,9	0,98	WK200	420,0	1,81	WK294	60,5	1,44
WK085	47,9	1,10	WK201	211,9	1,84	WK295	137,0	1,60
WK087	19,97	1,14	WK206	376,2	1,88	WK298	192,0	1,62
WK088	157,1	1,89	WK207	195,1	1,86	WK299	209,6	1,62
WK092	177,5	1,82	WK211	137,6	1,84	WK300	100	1,80
WK093	122,0	1,91	WK217	105,2	1,90			

Lampiran 3

Tabel konsentrasi produk PCR hasil purifikasi

No.	Sampel	Konsentrasi DNA (ng)	A260/A280
1	WK001	14,1	1,55
2	WK002	19,7	1,58
3	WK028	26,3	1,73
4	WK034	10,3	1,65
5	WK038	12,2	1,72
6	WK044	13,3	1,89
7	WK045	16,8	1,73
8	WK046	15,5	1,76
9	WK049	23,6	1,62
10	WK088	18,6	1,72
11	WK092	28,6	1,73
12	WK093	18,6	1,60
13	WK098	31,4	1,64
14	WK100	27,9	2,03
15	WK111	27,8	1,89
16	WK118	15,2	1,65
17	WK119	17,5	2,08
18	WK168	24,7	1,61
19	WK169	24,7	1,97
20	WK182	9,7	1,79
21	WK183	17,5	1,54
22	WK198	22,0	1,67
23	WK201	17,5	1,67
24	WK217	26,6	1,65
25	WK218	15,2	1,80
26	WK220	23,4	1,75
27	WK231	19,4	1,70
28	WK235	12,5	1,93
29	WK252	11,1	1,55
30	WK266	12,0	1,78
31	WK281	10,9	2,06

Lampiran 4

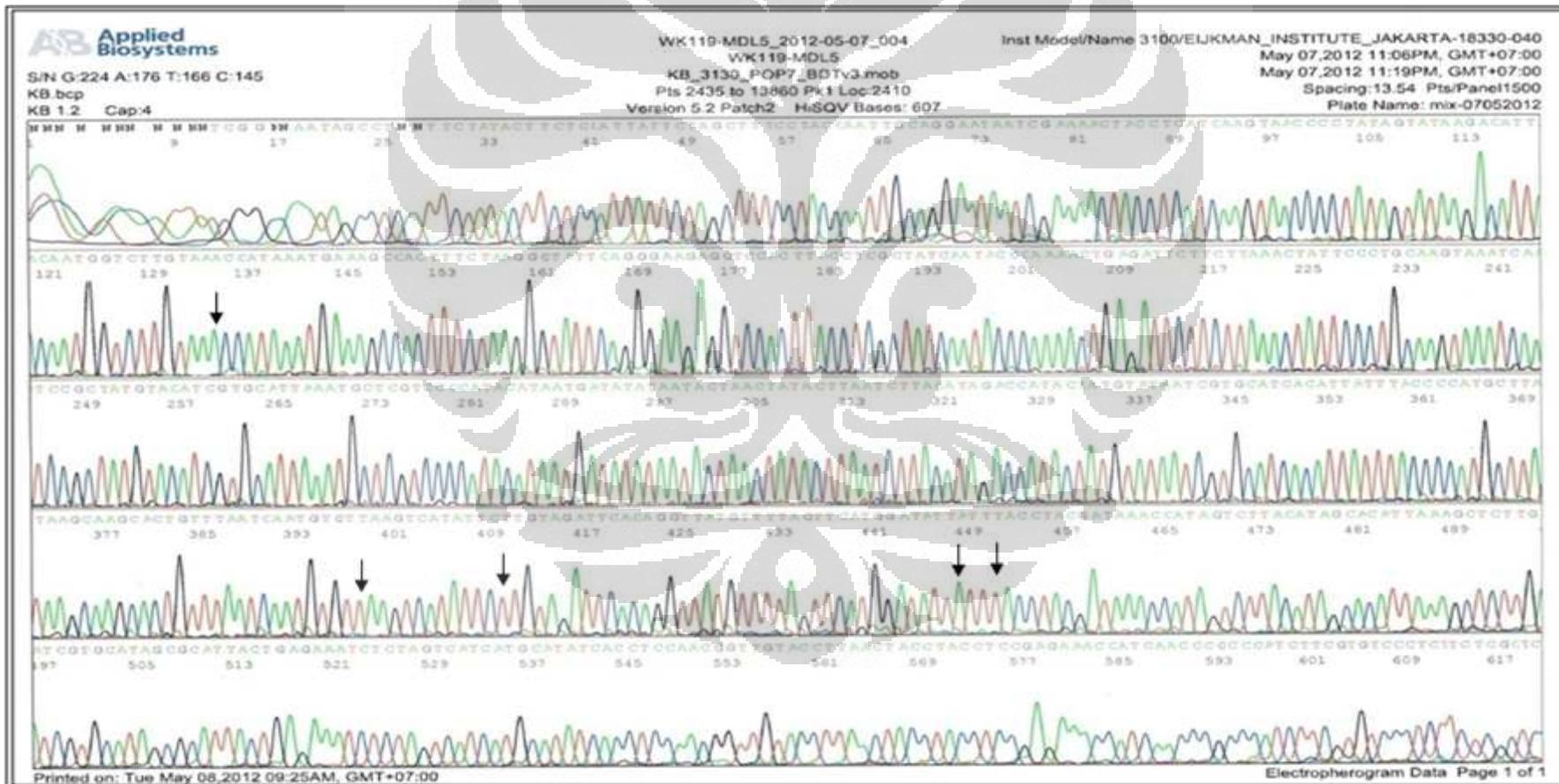
Tabel posisi SNPs hasil *multiple alignment* pada 31 sampel *fecal* DNA gajah sumatera di Taman Nasional Way Kambas

Nomor basa	tRNA threonin	D-loop			
	15320	15584	15596	15634	15637
Gajah asia	G	C	C	G	C
WK001	A	T	T	A	T
WK002	A	T	T	A	T
WK028	A	T	T	A	T
WK034	A	T	T	A	T
WK038	A	T	T	A	T
WK044	A	T	T	A	T
WK045	A	T	T	A	T
WK046	A	T	T	A	T
WK049	A	T	T	A	T
WK088	A	T	T	A	T
WK092	A	T	T	A	T
WK093	A	T	T	A	T
WK098	A	T	T	A	T
WK100	A	T	T	A	T
WK111	A	T	T	A	T
WK118	A	T	T	A	T
WK119	A	T	T	A	T
WK168	A	T	T	A	T
WK169	A	T	T	A	T
WK182	A	T	T	A	T
WK183	A	T	T	A	T
WK198	A	T	T	A	T
WK201	A	T	T	A	T
WK217	A	T	T	A	T
WK218	A	T	T	A	T
WK220	A	T	T	A	T
WK231	A	T	T	A	T
WK235	A	T	T	A	T
WK252	A	T	T	A	T
WK266	A	T	T	A	T
WK281	A	T	T	A	T

Lampiran 5

Skema daerah 675 bp yang meliputi sitokrom *b*, tRNA threonin, tRNA prolin, dan D-loop menggunakan primer MDL5 (*forward*)

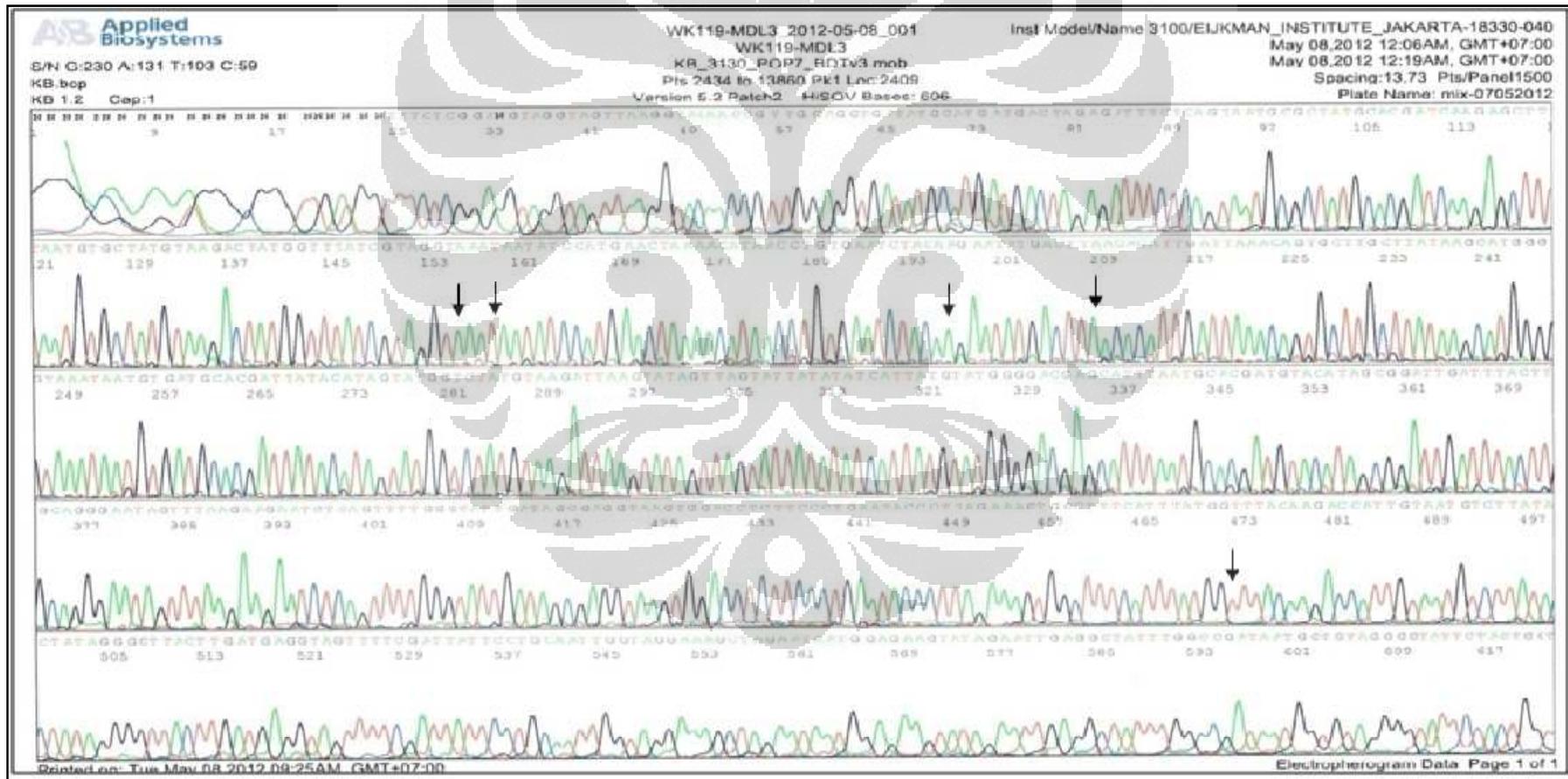
[Tanda panah menunjukkan lokasi SNPs]



Lampiran 6

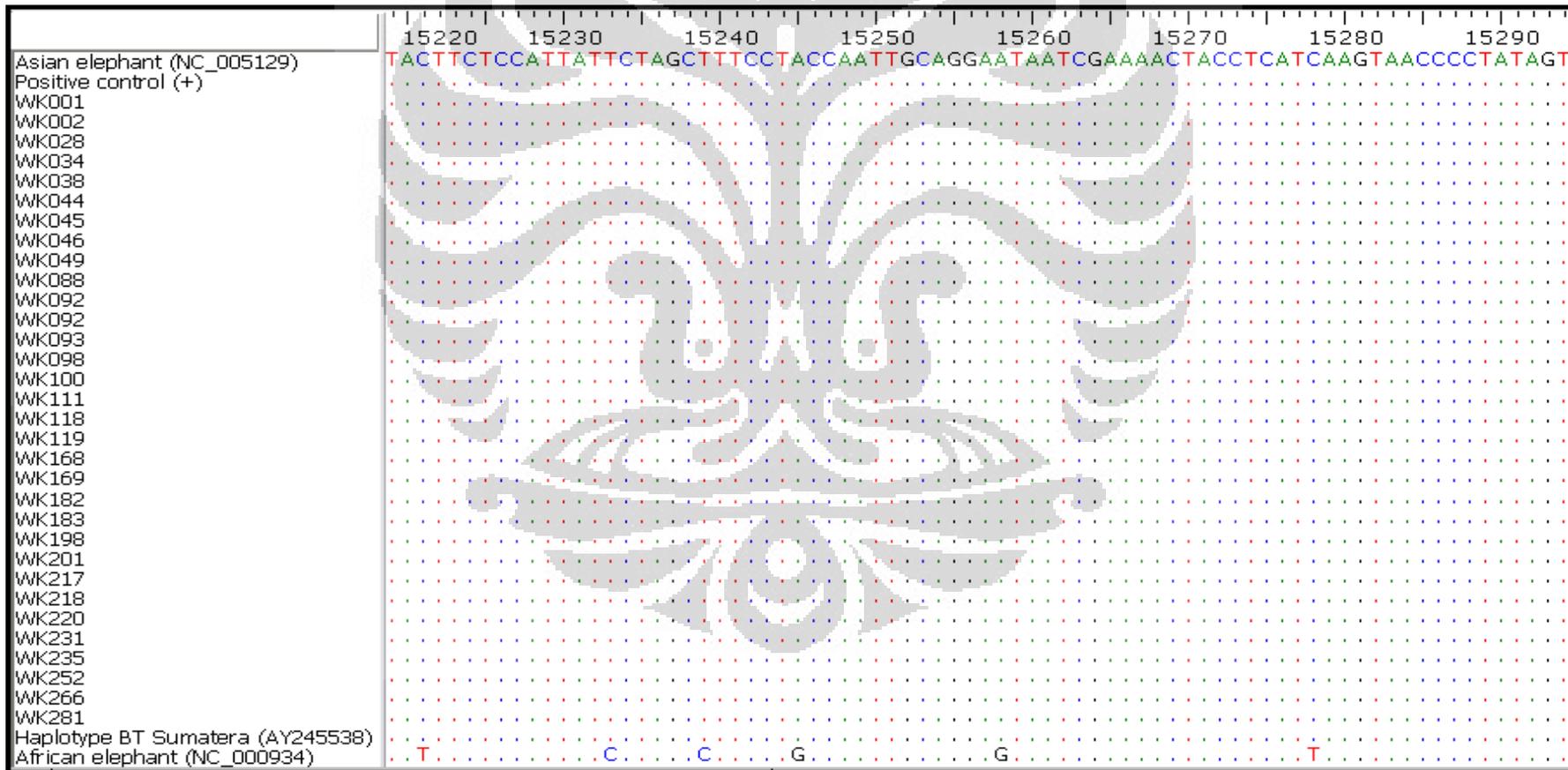
Skema daerah 675 bp yang meliputi sitokrom *b*, tRNA threonin, tRNA prolin, dan D-loop menggunakan primer MDL3 (*reverse*)

[Tanda panah menunjukkan lokasi SNPs]

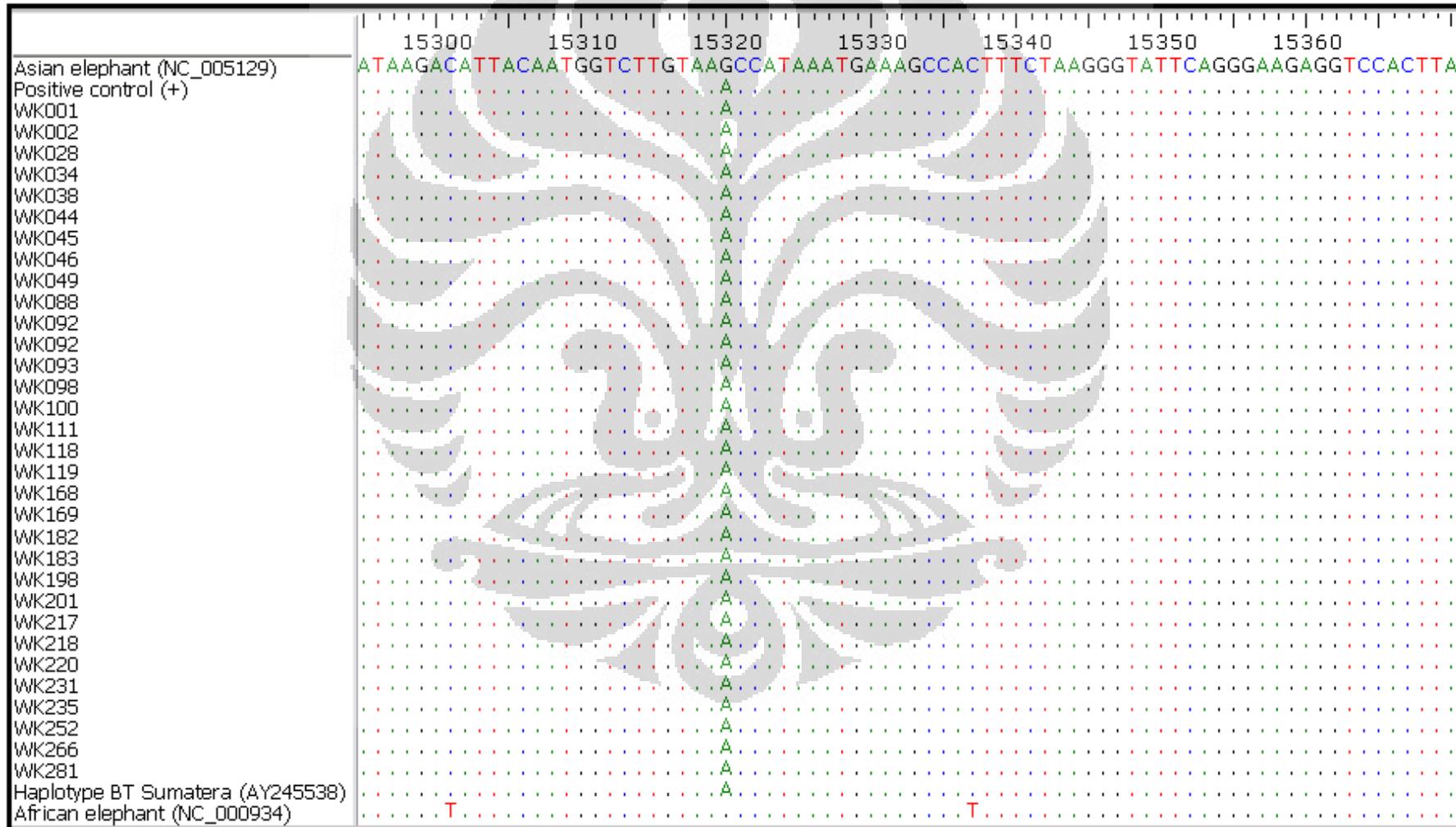


Lampiran 7

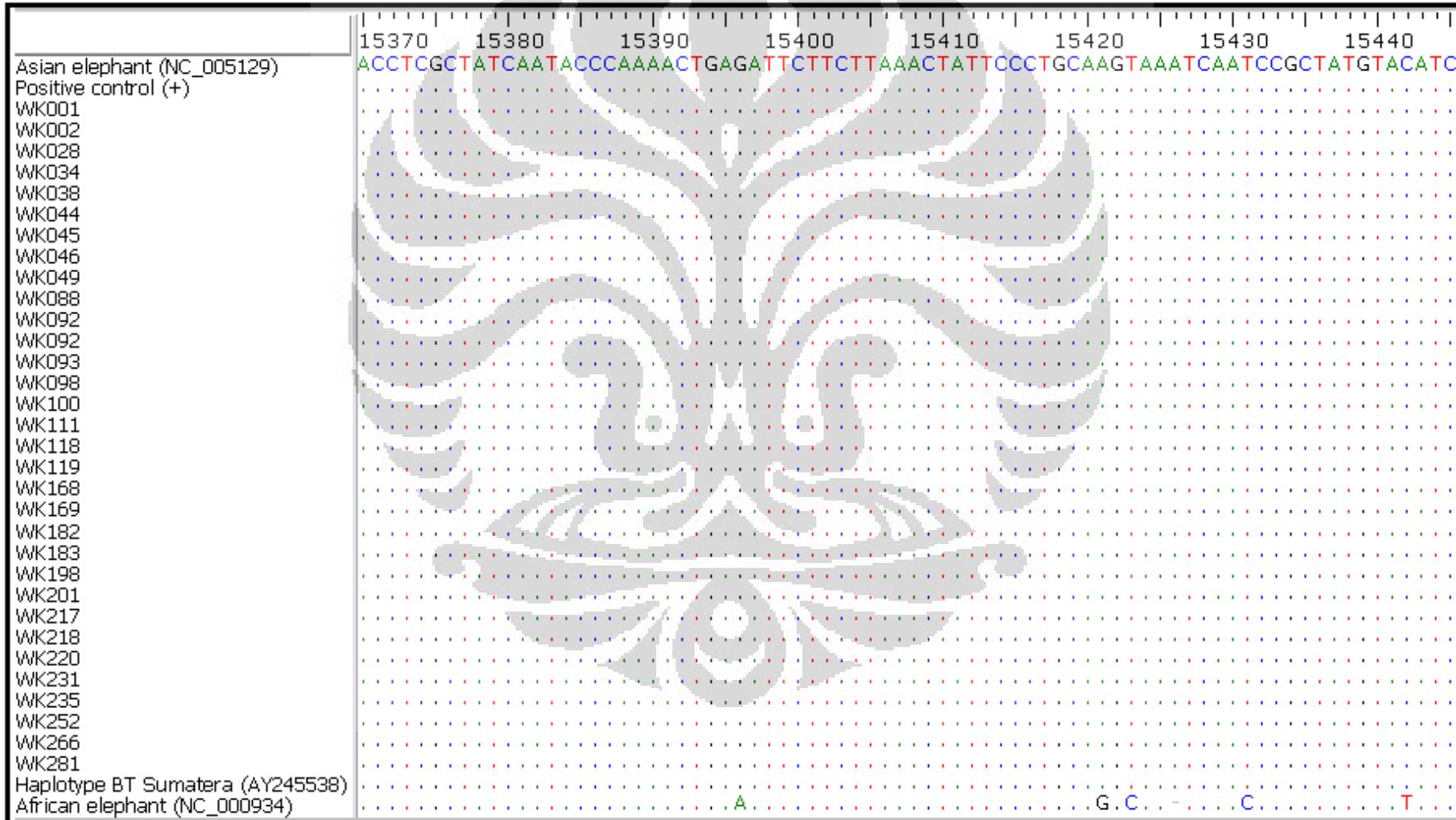
Hasil *multiple alignment* 31 sampel terhadap sekuens gajah asia (*Elephas maximus*), kontrol positif, haplotipe BT sumatera, dan gajah afrika (*Loxodonta Africana*)



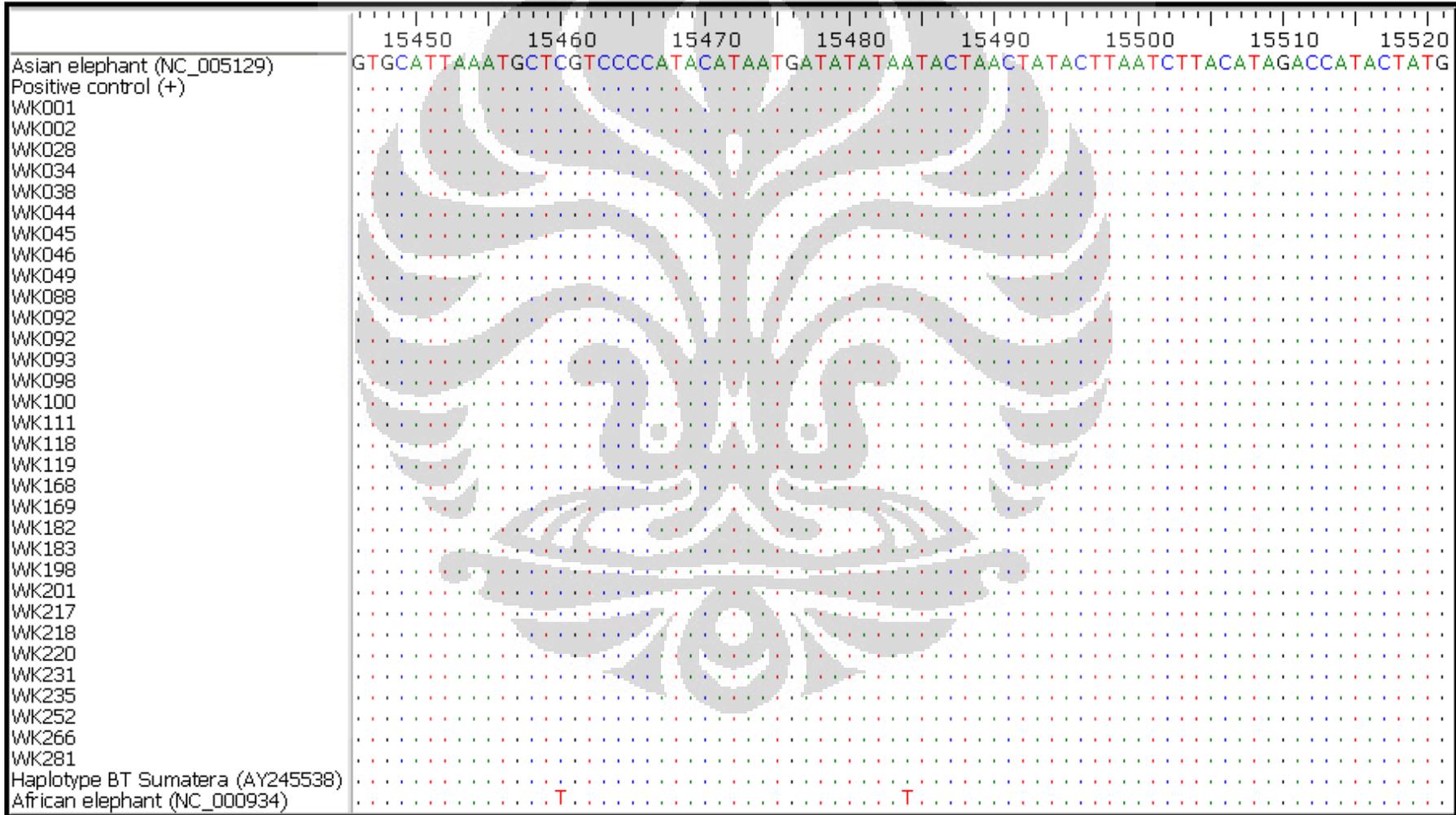
Lampiran 7 (lanjutan)



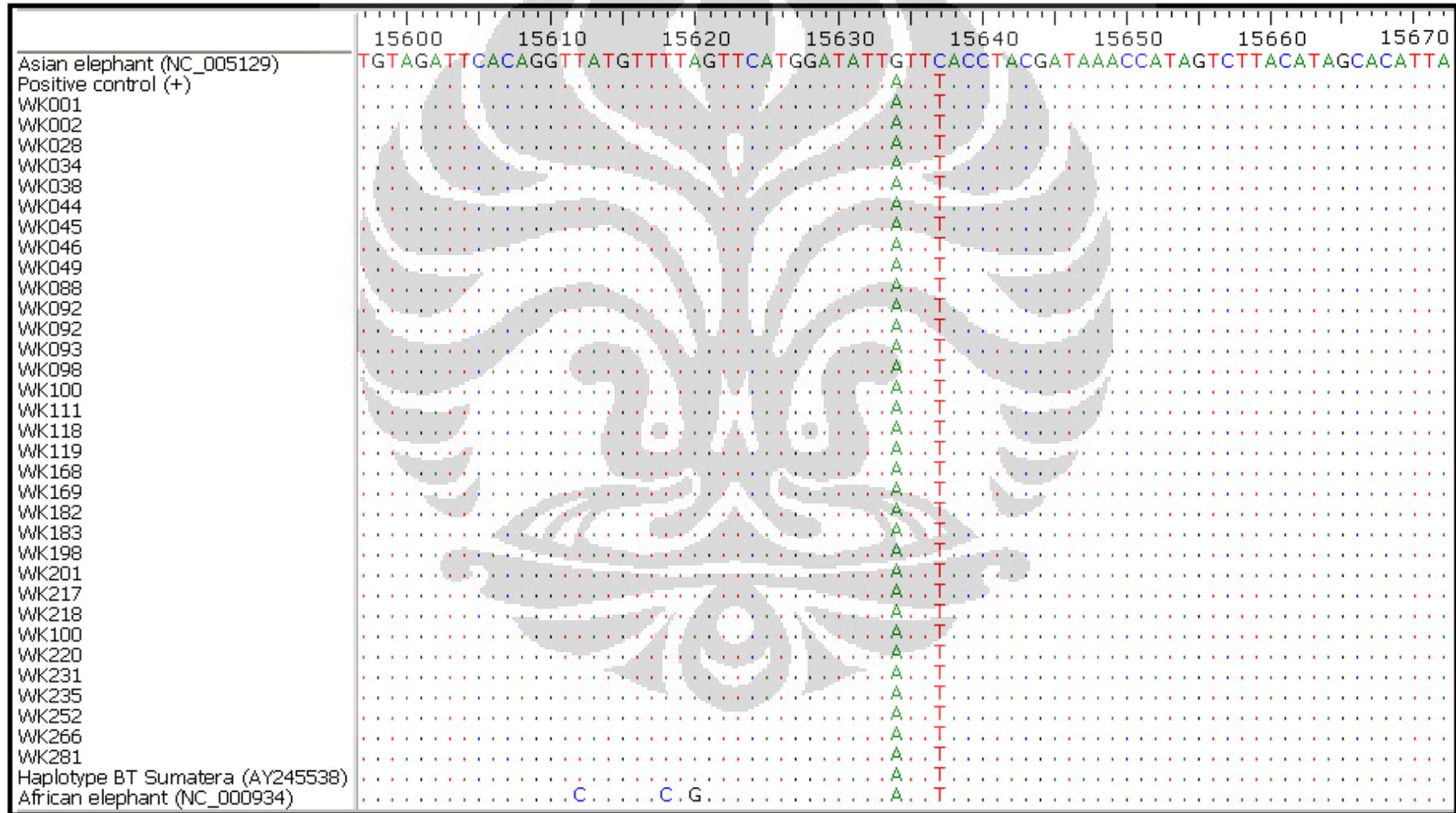
Lampiran 7 (lanjutan)



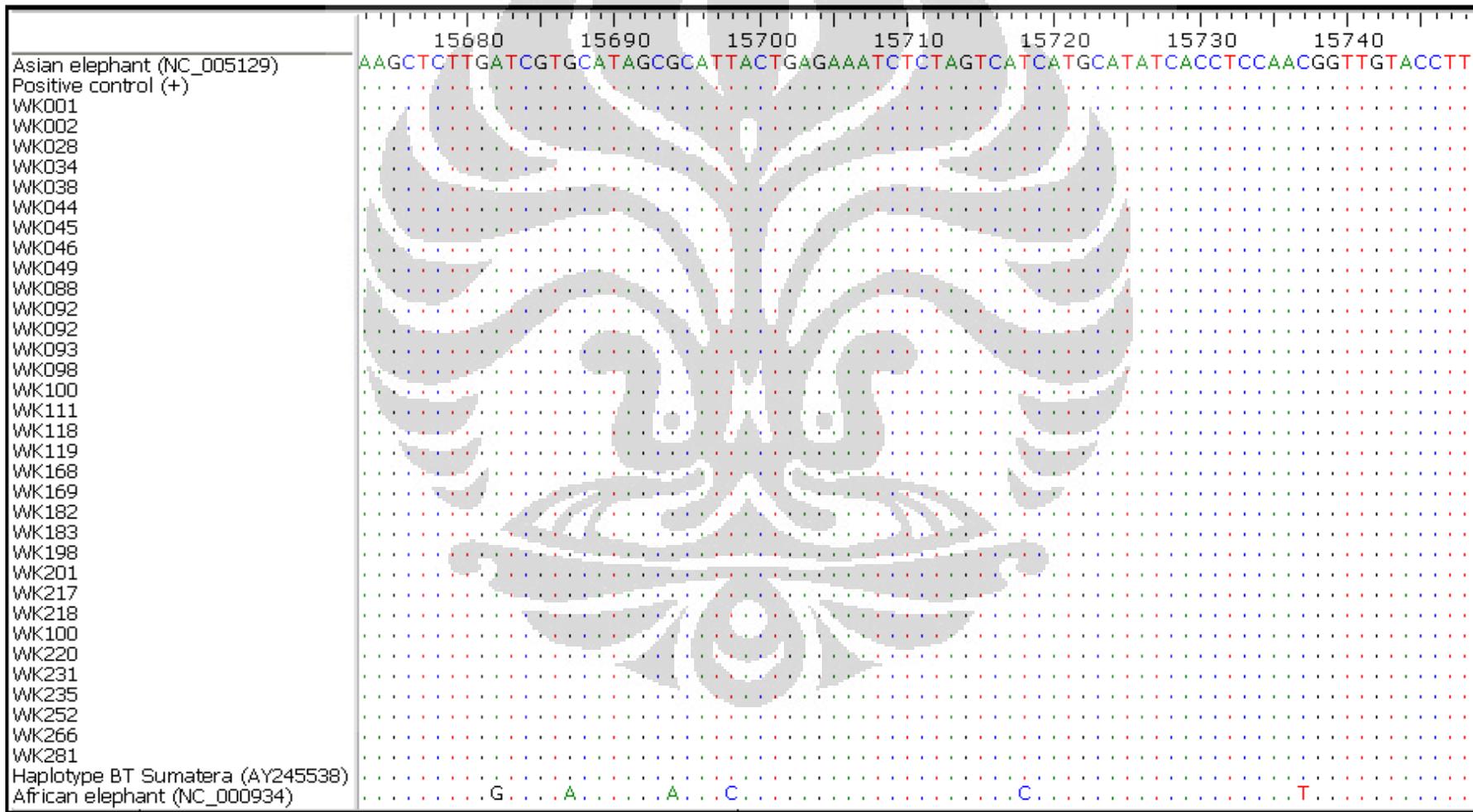
Lampiran 7 (lanjutan)



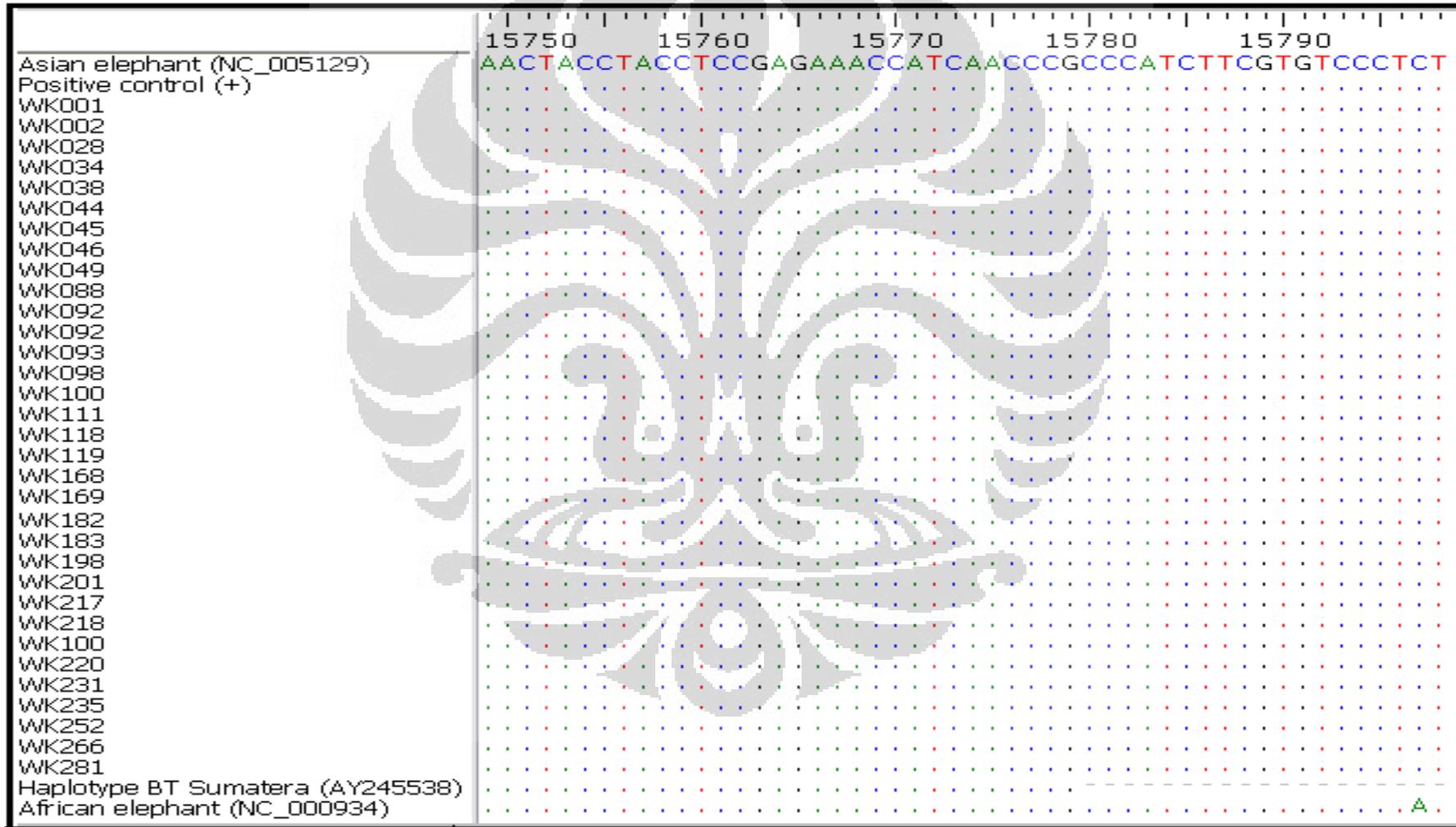
Lampiran 7 (lanjutan)



Lampiran 7 (lanjutan)



Lampiran 7 (lanjutan)



Lampiran 8

Daftar larutan dan *buffer* yang digunakan dalam penelitian***Loading buffer***

Bromofenol biru	0,075 g
Sukrosa	12 g
Akuabides	hingga mencapai volume 15 ml

10X TBE (Volume total 1000 ml)

Tris	108 g
Asam borat	55,0 g
EDTA anhidrat	8,3 g
<i>Nanopure water</i>	hingga mencapai volume 1000 ml

Gel agarosa 2% (Ukuran 100 ml)

Gel agarosa	2 g
TBE 1X	100 ml
EtBr 1%	10 μ l

Marka DNA phi-X174/*Hae*III

DNA phi-X174	10 μ l
<i>Buffer</i> NEB 2	15 μ l
Enzim <i>Hae</i> III	3 μ l
Akuabides	122 μ l