

**UJI KOMPARASI HASIL EKSTRAKSI DNA MENGGUNAKAN TEKNIK
SEDERHANA DAN TEKNIK MOLEKULER GAPDH PADA GAJAH
SUMATERA BETINA DI PUSAT LATIHAN GAJAH TAMAN NASIONAL
WAY KAMBAS**

(Skripsi)

Oleh

Tika Novianasari



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRAK

UJI KOMPARASI HASIL EKSTRAKSI DNA MENGGUNAKAN TEKNIK SEDERHANA DAN TEKNIK MOLEKULER GAPDH PADA GAJAH SUMATERA BETINA DI PUSAT LATIHAN GAJAH TAMAN NASIONAL WAY KAMBAS

Oleh

TIKA NOVIANASARI

Uji komparasi DNA menggunakan teknik sederhana dan molekuler merupakan langkah awal dalam uji genetik dalam mendukung penelusuran keragaman genetik gajah sumatera untuk mengantisipasi *inbreeding* di Pusat Latihan Gajah, Taman Nasional Way Kambas. Penelitian ini bekerja sama dengan Taman Nasional Way Kambas dan Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung. Tujuan penelitian untuk mendapatkan data hasil komparasi ekstrak DNA gajah sumatera betina di PLG TNWK menggunakan teknik sederhana dan molekuler *Glyceraldehyde-3-Fosfat Dehydrogenase* (GAPDH). Hasil uji kualitas dengan teknik sederhana menunjukkan 56,6% pendaran pita DNA, sedangkan dengan teknik molekuler menunjukkan 100% pendaran pita DNA dari 23 sampel individu gajah sumatera betina yang digunakan. Hal tersebut membuktikan bahwa

penggunaan primer GAPDH lebih sensitif dalam uji kualitatif hasil ekstraksi DNA, karena mampu memperbanyak jumlah DNA hasil ekstraksi.

Kata kunci : Gajah sumatera, DNA, *Glyceraldehyde-3-Fosfat Dehydrogenase*,
Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas.

**UJI KOMPARASI HASIL EKSTRAKSI DNA MENGGUNAKAN TEKNIK
SEDERHANA DAN TEKNIK MOLEKULER GAPDH PADA GAJAH
SUMATERA BETINA DI PUSAT LATIHAN GAJAH TAMAN NASIONAL
WAY KAMBAS**

Oleh

Tika Novianasari

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

Judul Skripsi : Uji Komparasi Hasil Ekstraksi DNA Menggunakan Teknik Sederhana dan Teknik Molekuler GAPDH pada Gajah Sumatera Betina di Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas.

Nama Mahasiswa : Tika Novianasari

Nomor Pokok Mahasiswa: 1417021118

Program Studi : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Priyambodo, M.Sc.
NIP. 198611142015041003

drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc.
NIP. 197408072003121001

2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung

Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.
NIP. 196603051991032001

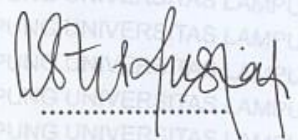
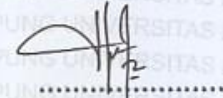
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Priyambodo, M.Sc.

Sekretaris : drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc.

**Penguji
Bukan Pembimbing : Dra. Ely Lestari Rustiati, M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.
NIP. 19710212199521001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 6 April 2018

RIWAYAT HIDUP



Tika Novianasari dilahirkan di Metro pada 1 November 1996, anak bungsu dari tiga saudara dengan dua kakak perempuan yaitu Tutik Supriyani, Nuri Andriani dari pasangan Bapak Alm. M. Danuri dan Ibu Supingah.

Jenjang pendidikan yang pernah ditempuh penulis yaitu TK. Pertiwi Metro Barat diselesaikan tahun 2002, SD Negeri 8 Metro Barat diselesaikan tahun 2008, SMP Negeri 3 Metro diselesaikan tahun 2011, SMA Negeri 2 Metro diselesaikan tahun 2014.

Tahun 2014, penulis diterima di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam melalui jalur SNMPTN (Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri). Pada tahun 2017 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata di Dusun Suka Negara Kecamatan Bangun Rejo Lampung Tengah dan melaksanakan Kerja Praktik di Laboratorium Parasitologi Balai Veteriner Lampung.

Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Biologi Umum, Biokonservasi, Perilaku Hewan, Ekologi dan Mamalogi. Penulis terdaftar menjadi anggota HIMBIO pada tahun 2014/2015 dan terdaftar menjadi anggota Biro Kesekretariatan dan Logistik. Penulis juga aktif di lembaga kemahasiswaan sebagai anggota Koperasi Mahasiswa UNILA pada tahun 2014-2015. Anggota Rohis FMIPA UNILA pada tahun 2015-2016. Anggota Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA UNILA pada tahun 2015/2016 sebagai anggota Departemen PSLH. Penulis juga berpartisipasi pada kegiatan Karya Wisata Ilmiah (KWI) sebagai tim kesehatan pada tahun 2016. Selain aktif dalam lembaga kemahasiswaan penulis menjadi panitia Rapat Tahunan XXXVIII Badan Kerjasama Perguruan Tinggi Negeri Wilayah Indonesia Bagian Barat Tahun 2017.

MOTTO

**Cukuplah Allah bagiku, tidak ada Tuhan selain Dia
(Q.S. At-Taubah:129)**

**"Hidup adalah kegelapan jika tanpa hasrat dan keinginan.
Dan semua hasrat keinginan adalah buta jika tidak
disertai pengetahuan. Dan pengetahuan adalah hampa
jika tidak diikuti pelajaran.
Dan setiap pelajaran akan sia-sia jika tidak disertai
cinta" (Kahlil Gibran)**

**Maka nikmat Tuhanmu yang manakah yang kamu
dustakan?
(QS: Ar-Rahman:13)**

PERSEMBAHAN

Bismillahirrohmanirohim

Dengan mengharap rahmat dan keberkahan Allah SWT, kupersembahkan Karya ini Sebagai cinta kasih, tanda bakti, dan terima kasihku yang terdalam kepada:

Ibuku dan Alm. Bapak terkasih,

Yang telah mendidik dan membesarkanku dengan cinta, kasih sayang, serta do'a dan dukungan terhadap segala langkahku, menuju kesuksesan.

Kakak dan segenap keluarga besarku

Atas kebersamaan, keceriaan, kasih sayang, dan do'a serta segala bentuk dukungan

Rasa Hormatku kepada:

Bapak Priyambodo, M.Sc
Bapak drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc
Ibu Dra. Elly Lestari Rustiati, M.Sc.

atas ilmu, inspirasi, motivasi serta pengorbanan waktu dan kesabaran dalam membimbing dan menjadikanku insan yang lebih baik

Para sahabat seperjuangan

Atas kebersamaan, dukungan, nasihat kepadaku

Serta

Almamaterku tercinta

SANWACANA

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT, karena atas izin dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi sebagai syarat meraih gelar Sarjana Sains.

Skripsi dengan judul **“Uji Komparasi Hasil Ekstraksi DNA menggunakan Teknik Sederhana dan Teknik Molekuler GAPDH pada Gajah Sumatera Betina di Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas”** yang dilaksanakan bulan Desember 2017 - Januari 2018, bekerja sama dengan Taman Nasional Way Kambas dan Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung.

Penulis menyadari banyak pihak yang turut membantu dalam pelaksanaan penelitian sampai dengan penyusunan skripsi. Dengan terselesaikannya penulisan skripsi ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada :

1. Priyambodo, M.Sc., selaku dosen pembimbing I yang telah banyak membimbing selama proses penelitian, memberikan ilmu tanpa batas hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini. Terima kasih telah menjadi lebih dari sekedar pembimbing skripsi, melainkan juga sebagai orang tua, guru, dan teman;

2. drh. Eko Agus Srihanto, M.Sc. selaku dosen pembimbing II yang telah banyak mambantu, membimbing dengan cermat, mengarahkan, memberikan solusi selama proses penelitian sampai penyusunan skripsi ini;
3. Dra. Elly L. Rustiati, M.Sc. selaku dosen penguji dengan penuh sabar telah memberikan banyak pengetahuan, mengarahkan dan memberikan solusi. Terima kasih telah menjadi lebih dari sekedar dosen penguji skripsi, melainkan orang tua yang berada di kampus tercinta;
4. Prof. Warsito selaku Dekan FMPA Unila;
5. Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc. selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Unila;
6. Rochmah Agustrina, Ph.D selaku dosen Pembimbing Akademik;
7. Bapak Syamsul Ma'arif, selaku Kepala Balai Veteriner Lampung;
8. drh. Liza Angeliya, M.Sc., selaku koordinator Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung;
9. Bapak Firwantoni, A.Md., Ibu Rosmaya Wulan Suciningtias, Ibu Yuni Tina Sari atas bantuan arahannya selama penelitian di Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung;
10. Ibu dan keluargaku yang selalu memberikan doa dan kasih sayang hingga terselesaikannya penyusunan skripsi ini;
11. Seluruh sahabatku Endang, Widia, Tumirah, Miranda, Mentari Panca, Dian Anggraini, Dian Neli, Siti Umairoh, Juwita Anjelina, Fanisha, Latifah terimakasih atas kebersamaan, bantuan, dukungan dan menemaniku saat senang maupun duka hingga terselesaikannya skripsi ini;
12. Sahabat SMA-ku yang selalu memotivasi agar bisa menjadi orang yang lebih baik dan bermanfaat untuk orang;

13. Teman-teman KKN Dwi, Irvan, Indah, Burhan, Nia, Sofian yang telah belajar bersama dan menggali pengalaman baru di Kecamatan Bangun Rejo dan terimakasih senantiasa mendukung dan memberikan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini;
14. Dan seluruh sahabat penulis FMIPA Biologi yang tidak dapat disebutkan satu persatu, atas segala bentuk dukungan, bantuan, dan semangat yang telah diberikan, penulis mengucapkan banyak terima kasih.

Akhir kata, penulis menyadari skripsi ini jauh dari kesempurnaan dan masih banyak kekurangan dalam penyusunannya, akan tetapi penulis berharap karya ini dapat memberi manfaat bagi banyak pihak.

Bandar Lampung, 20 April 2018

Penulis,

Tika Novianasari

...

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	ii
HALAMAN PENGESAHAN	v
RIWAYAT HIDUP	vii
MOTTO	ix
HALAMAN PERSEMBAHAN	x
SANWACANA	xi
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
E. Kerangka Pikir	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
A. Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas	7
B. Gajah.....	9
1. Morfologi Gajah	10
2. Status Ekologi dan Klasifikasi Gajah Sumatera	10

3. Habitat dan Tingkah Laku.....	12
C. Keragaman Genetik.....	13
D. <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i> (DNA).....	14
E. Tahap Pengambilan Sampel Darah Gajah Sumatera.....	15
F. Ekstraksi DNA Gajah Sumatera.....	16
G. Penanda Molekuler GAPDH.....	17
H. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	18
I. Elektroforesis.....	21
III. METODE KERJA.....	23
A. Waktu dan Tempat.....	23
B. Alat dan Bahan.....	23
1. Alat.....	23
2. Bahan.....	24
C. Prosedur Penelitian.....	25
1. Tahap Pendahuluan.....	25
2. Tahap Pengambilan Sampel Darah Gajah Sumatera.....	27
3. Ekstraksi DNA.....	27
4. Uji Kualitas DNA Hasil Ekstraksi dengan Teknik Sederhana...30	
5. Uji Kualitas DNA Hasil Ekstraksi dengan Teknik Molekuler GAPDH-PCR.....	31
6. Elektroforesis.....	34
D. Analisis Data.....	34
E. Diagram Alir Penelitian.....	35
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
A. Ekstraksi DNA.....	37
B. Uji Kualitas DNA Hasil Ekstraksi dengan Teknik Sederhana.....	39
C. Uji Kualitas DNA Hasil Ekstraksi dengan Teknik Molekuler GAPDH-PCR.....	44
D. Uji Diagnostik.....	47
E. Manfaat Hasil Uji Diagnostik pada Gajah Sumatera di PLG TNWK.....	51
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN.....	59

A. Hasil Uji Kualitatif Ekstrak DNA menggunakan Teknik Sederhana dan Teknik Molekuler	59
B. Hasil Perhitungan	60
C. Surat Izin Penelitian di Balai Veteriner Lampung	67

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Daftar nama gajah sumatera di PLG TNWK.....	26
Tabel 2. Daftar sequens GAPDH <i>gene</i>	31
Tabel 3. Daftar hasil uji kualitas DNA hasil ekstraksi menggunakan teknik sederhana.....	40
Tabel 4. Daftar hasil uji kualitas DNA hasil ekstraksi menggunakan teknik Molekuler GAPDH-PCR	45
Tabel 5. Data hasil uji kualitas DNA hasil ekstraksi menggunakan teknik sederhana (Uji I) dan teknik molekuler (Uji II)	48

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Peta persebaran potensi Taman Nasional Way Kambas	7
Gambar 2. Gajah sumatera (<i>E. maximus sumatranus</i>).....	9
Gambar 3. Siklus amplifikasi.....	18
Gambar 4. Tahapan reaksi amplifikasi.....	32
Gambar 5. Diagram alir uji komparasi DNA dengan teknik sederhana dan teknik molekuler GAPDH pada gajah sumatera betina di Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas	36
Gambar 6. DNA gajah sumatera hasil ekstraksi	38
Gambar 7. Hasil uji kualitas DNA gajah sumatera betina hasil ekstraksi menggunakan teknik sederhana	41
Gambar 8. DNA hasil amplifikasi	44
Gambar 9. Hasil uji kualitas DNA gajah sumatera betina hasil ekstraksi menggunakan teknik molekuler	46

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Taman Nasional Way Kambas (TNWK) terletak di Kecamatan Labuhan Ratu Kabupaten Lampung Timur. Berdasarkan SK Menteri Kehutanan No.670/Kpts-II/1999 luas TNWK 125.621,3 ha (Kementerian Kehutanan, 2006). Kawasan TNWK telah ditetapkan untuk melindungi dan melestarikan keanekaragaman hayati dan mempunyai peran penting dalam upaya keanekaragaman hayati dan ekosistemnya (Balai Taman Nasional Way Kambas, 2010). Ekosistem TNWK terdiri dari hutan hujan tropis sekunder dataran rendah, hutan rawa air tawar, padang alang-alang, semak belukar dan hutan bakau (Kementerian Kehutanan, 2006). Kawasan TNWK merupakan habitat dari lima mamalia kunci, yaitu harimau sumatera (*Panthera tigris sumatrae*), badak sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*), tapir (*Tapirus indicus*), beruang madu (*Helarctos malayanus*) dan gajah sumatera (*Elephas maximus sumatranus*). Upaya konservasi dari masing-masing mamalia kunci tersebut dikembangkan dengan strategi khusus, termasuk gajah sumatera. Upaya dalam mendukung konservasi gajah sumatera binaan dipusatkan di Pusat Latihan Gajah, TNWK.

Pusat Latihan Gajah (PLG) di TNWK merupakan salah satu upaya pemerintah dalam menanggulangi konflik antara gajah sumatera dan manusia serta membantu dalam upaya konservasi gajah sumatera yang jumlahnya setiap tahun mengalami penurunan (Alikodra, 1990). Di PLG, gajah sumatera selain bermanfaat sebagai edukasi konservasi dan penelitian, gajah sumatera yang dilatih diharapkan dapat berperan menanggulangi konflik gajah sumatera dan manusia dalam penghalauan gajah sumatera.

Gajah sumatera sejak tahun 2001 berstatus kritis (*critically endangered*) dalam daftar *Red List Data Book* yang dikeluarkan oleh IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) (IUCN, 2012). Dalam 25 tahun terakhir gajah sumatera telah kehilangan habitatnya hingga 70%, hal tersebut menyebabkan populasi gajah sumatera menyusut hingga lebih dari separuh populasinya.

Kelestarian gajah sumatera diancam oleh pembalakan liar, fragmentasi habitat, perburuan, dan konflik antara gajah sumatera dengan manusia (*World Wildlife Fund*, 2005). Hilangnya habitat akibat aktivitas penebangan hutan yang tidak berkelanjutan berakibat pada keluarnya gajah liar dan masuk kawasan penduduk. Gajah sumatera yang mengalami konflik ditangkarkan dan dibina di PLG. Kawasan PLG memiliki luas sekitar 400 ha sebagai upaya konservasi gajah sumatera di TNWK (Mukhtar, 2004). Terdapat 66 ekor gajah sumatera di PLG TNWK dengan perbandingan jantan 36 ekor gajah sumatera dan betina 30 ekor gajah sumatera (Rustiati

dkk., 2017). Ukuran populasi yang kecil menyebabkan terjadinya perkawinan dengan sekerabat dekat yang dapat meningkatkan terjadinya perkawinan silang dalam (*inbreeding*). *Inbreeding* mengakibatkan terjadinya penurunan variasi genetik yang menimbulkan resiko penurunan viabilitas dan resiko kepunahan akan meningkat.

Dalam mendukung upaya konservasi gajah sumatera informasi keragaman genetik sangat diperlukan. Tekanan *inbreeding* dari rendahnya keragaman genetik pada suatu populasi, berdampak pada kemampuan bertahan hidup dan sangat mungkin akan terjadi kepunahan (Frankham, Ballou dan Briscoe, 2002). Pendekatan analisis genetika molekuler dalam bidang konservasi dengan uji molekuler dapat dilakukan uji sekuensing untuk menentukan keragaman genetik pada gajah sumatera. Uji sekuensing dilakukan dengan hasil ekstraksi DNA dengan kualitas baik. Teknik pengujian kualitas DNA dapat dilakukan dengan berbagai macam cara antara lain dengan spektrofotometer dan gel elektroforesis untuk mendeteksi gen *Glyceraldehyde-3-Fosfat Dehydrogenase* (GAPDH). Teknik molekuler seperti GAPDH digunakan untuk melihat hasil ekstraksi DNA dengan kualitas baik dan berperan dalam menentukan keragaman genetik pada gajah sumatera di PLG TNWK.

Hasil uji kualitas DNA menggunakan teknik sederhana dan teknik molekuler dikomparasi dan diperhitungkan berdasarkan *Veterinary epidemiologic research* .

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana hasil komparasi ekstrak DNA gajah sumatera betina di PLG TNWK menggunakan teknik sederhana dan molekuler ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan hasil komparasi ekstrak DNA gajah sumatera betina di PLG TNWK menggunakan teknik sederhana dan molekuler.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai sumber informasi mengenai hasil komparasi DNA gajah betina di PLG TNWK yang akan digunakan sebagai langkah awal dalam mendukung penelusuran keragaman genetik gajah sumatera di PLG TNWK sehingga upaya pencegahan *inbreeding* dapat dilakukan.

E. Kerangka Pikir

Salah satu area konservasi gajah sumatera yang ditangkarkan dan dibina terdapat di PLG TNWK. Upaya konservasi gajah sumatera terus dilakukan

salah satunya di kawasan yang menjadi habitat alami gajah sumatera berada di PLG yang terdapat di Taman Nasional Way Kambas.

Gajah sumatera merupakan mamalia besar yang statusnya kritis (*critically endangered*). Populasi gajah sumatera mengalami penurunan setiap tahun yang diakibatkan oleh pembalakan liar, fragmentasi habitat, perburuan, dan konflik gajah sumatera. Gajah sumatera yang mengalami konflik dengan manusia ditangkarkan dan dibina di PLG. Luas PLG sekitar 400 ha dengan jumlah populasi sebanyak 66 ekor gajah sumatera dapat meningkatkan terjadinya *inbreeding* yang berakibat keragaman genetik menurun.

Keragaman genetik gajah sumatera di setiap spesies dalam populasi akan memberikan pengaruh yang besar terhadap kemampuan dalam beradaptasi di lingkungannya. Dengan penurunan keragaman genetik maka kemungkinan terjadi kepunahan semakin besar. Gajah sumatera merupakan spesies yang perlu dijaga kelestariannya karena jumlah populasi setiap tahun yang terus menurun.

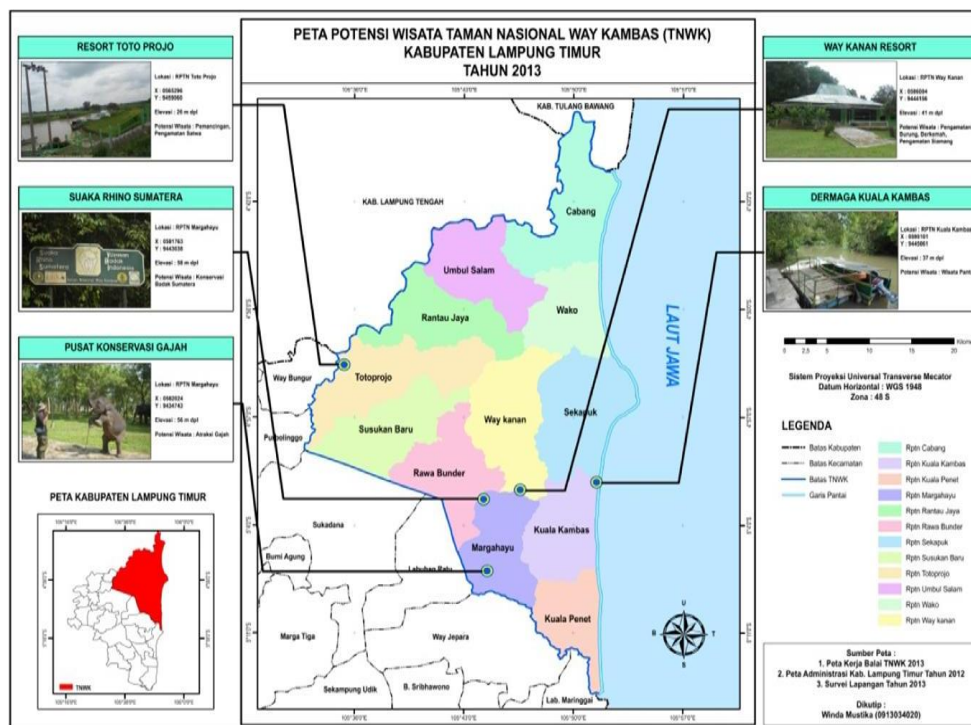
Langkah awal dalam uji genetik dilakukan dengan ekstraksi DNA. Hasil ekstraksi DNA dapat dilihat menggunakan teknik sederhana dan teknik molekuler *Glyceraldehyde-3-Fosfat Dehydrogenase* (GAPDH). Uji komparasi DNA hasil ekstraksi menggunakan GAPDH biasanya menunjukkan kualitas DNA yang lebih baik dan lebih akurat dibandingkan dengan teknik sederhana yang kemudian hasil ekstraksi tersebut digunakan

sebagai langkah awal dalam mendukung penelusuran kekerabatan genetik gajah sumatera di PLG TNWK.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas

Secara geografis Taman Nasional Way Kambas (TNWK) terletak antara $40^{\circ}37' - 50^{\circ}16'$ Lintang Selatan dan antara $105^{\circ}33' - 105^{\circ}54'$ Bujur Timur, berada di bagian tenggara Pulau Sumatera di wilayah Provinsi Lampung (Hudiyono, 2008).



Gambar 1. Peta Persebaran Potensi Taman Nasional Way Kambas (Mustika dkk., 2014).

Kawasan TNWK terletak di Kecamatan Labuhan Ratu Kabupaten Lampung Timur. Kawasan ini berbatasan dengan 37 desa dari 10 kecamatan yang terletak bersebelahan langsung dengan kawasan konservasi di Kabupaten Lampung Timur (Balai Taman Nasional Way Kambas, 2006). Wilayah TNWK ditetapkan pada tanggal 26 Agustus 1999 dengan luas mencapai 125.621,3 ha melalui Surat Keputusan Menteri Kehutanan No. 670/Kpts-II/1999 (Kementerian Kehutanan, 2011).

Kawasan TNWK memiliki *Camp Resort* yang terletak di Jagawana Way Kanan dan Pusat Latihan Gajah. *Camp Resort Jagawana Way Kanan* terletak 13 kilometer dari pintu masuk utama yang memiliki area pusat konservasi badak sumatera atau yang disebut *Suaka Rhino Sumatera (SRS)* juga merupakan proyek penelitian dalam mengembangkan populasi badak sumatera. Pusat Latihan Gajah (PLG) terletak 9 kilometer dari pintu gerbang utama yang merupakan area konservasi gajah sumatera.

Pusat Latihan Gajah (PLG) merupakan upaya konservasi yang terdapat di TNWK berperan membantu dalam menanggulangi persoalan konflik antara gajah dengan manusia. PLG mulai beroperasi sejak 27 Agustus 1985. PLG memiliki luas sekitar 400 ha yang digunakan sebagai upaya konservasi gajah sumatera di TNWK (Mukhtar, 2004). Konservasi gajah sumatera di PLG TNWK terus ditingkatkan dan upaya dalam menjaga kesehatan gajah sumatera terus dilakukan. Rumah Sakit Gajah (RSG) Prof. Dr. Ir. H. Rubini Atmawidjaja didirikan tahun 2015. RSG ini merupakan rumah sakit gajah

pertama di Indonesia. PLG TNWK diharapkan menjadi pusat latihan gajah yang mampu menjadi pusat konservasi gajah dengan kualitas *breeding*-nya (Febriyanto, 2011).

B. Gajah

Di dunia terdapat dua jenis gajah yaitu gajah asia (*Elephas maximus*) dan gajah afrika (*Loxodonta africana*). Gajah asia terbagi menjadi empat anak jenis yaitu gajah india (*Elephas maximus indicus*), gajah srilangka (*Elephas maximus maximus*), gajah kalimantan (*Elephas maximus borneensis*), dan gajah sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) (Sukumar, 2003). Gajah afrika terbagi menjadi dua anak jenis yaitu gajah savana (*Loxodonta africana africana*) dan gajah hutan (*Loxodonta africana cyclotis*) (Eggert *et al.*, 2003) .



Gambar 2. Gajah sumatera (*E. maximus sumatranus*) (Dokumentasi pribadi, 2017).

1. Morfologi Gajah

Gajah asia dan afrika umumnya memiliki perbedaan morfologi.

Gajah asia memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan dengan gajah afrika. Gajah asia memiliki telinga lebih kecil berbentuk segitiga.

Gajah afrika memiliki telinga berbentuk konkrak terbalik. Punggung

gajah asia berbentuk cembung. Punggung gajah afrika berbentuk

cekung. Gajah asia memiliki dua bonggol di kepalanya. Gajah afrika

memiliki satu bonggol di kepalanya. Ujung belalai gajah asia

memiliki satu bibir. Ujung belalai gajah sumatera memiliki dua bibir.

Gajah asia hanya gajah jantan yang memiliki gading yang terlihat

sedangkan gajah betina tidak terlihat. Gajah afrika jantan dan betina

memiliki gading yang terlihat. Gajah asia memiliki berat badan

mencapai 5000 kg dengan tinggi sekitar 3 m. Gajah afrika memiliki

berat mencapai 7000 kg dengan tinggi 4 m (Lekagul dan McNeely,

1977).

2. Status Ekologi dan Klasifikasi Gajah Sumatera

Gajah sumatera sejak tahun 2001 berstatus kritis (*critically*

endangered) dalam daftar *Red List Data Book* yang dikeluarkan oleh

IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural*

Resources) (IUCN, 2012). Gajah sumatera merupakan satwa langka

berdasarkan Undang-Undang No. 5 tahun 1990 tentang konservasi

sumber daya alam hayati dan ekosistemnya. Kerusakan habitat,

perburuan gading, konflik antara gajah dan manusia merupakan ancaman terhadap populasi gajah sumatera yang terus menurun setiap tahunnya (Kementerian Kehutanan, 2007).

Dalam 25 tahun terakhir gajah sumatera telah kehilangan habitatnya hingga 70% hal tersebut menyebabkan populasi gajah sumatera menyusut hingga lebih dari separuh populasinya. Peneliti gajah sumatera dari WCS menyebutkan jumlah gajah sumatera TNWK pada tahun 2010 sebanyak 247 ekor gajah sumatera dengan rentang estimasi 220 – 278 individu (Wulan *dalam* Rahmad Rahmadi, 2015) dan 66 ekor gajah sumatera yang ditangkarkan di PLG TNWK (Rustiati dkk., 2017).

Taksonomi gajah sumatera diklasifikasi sebagai berikut:

Kerajaan : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Bangsa : Proboscidea

Suku : Elephantidae

Marga : *Elephas*

Jenis : *Elephas maximus*

Anak Jenis : *Elephas maximus sumatranus*

(Lekagul dan McNeely, 1977).

3. Habitat dan Tingkah Laku

Gajah sumatera memilih habitat dengan memperhitungkan berbagai kondisi faktor seperti kelandaian (0-20⁰) memiliki jarak yang dekat dengan sumber air, ketersediaan pakan yang berlimpah, penutupan tajuk, dan tipe hutan sekunder biasanya disukai oleh gajah (Abdullah dkk., 2005). Beberapa tipe hutan yang menjadi habitat gajah sumatera yaitu hutan gambut, hutan rawa dan pada umumnya gajah sumatera lebih menyukai hutan hujan daratan rendah. Sebaran gajah sumatera di Indonesia meliputi Provinsi Aceh, Sumatera Utara, Riau, Jambi, Sumatera Selatan, Bengkulu dan Lampung (Altevogt dan Kurt, *dalam* Tarmizi, 2008).

Gajah sumatera merupakan spesies yang hidup secara berkelompok dan dipimpin oleh betina dewasa dengan ikatan sosial yang kuat (Sukumar, 1989). Induk betina yang paling besar akan dijadikan pemimpin setiap kelompok dan gajah betina muda menjadi anggota kelompok dan bertindak sebagai bibi pengasuh pada kelompok, gajah yang sudah tua akan hidup menyendiri karena sudah tidak bisa mengikuti kelompoknya, gajah jantan muda yang sudah beranjak dewasa dipaksa meninggalkan kelompok dan mencari kelompok jantan lain (Shoshani dan Eisenberg, 1982). Kelompok gajah bergerak dari satu area ke area yang lain dan memiliki daerah jelajah sesuai ketersediaan makanan dan tempat berlindung dan berkembang biak. Gajah jantan hidup secara sendiri (*soliter*) atau bergabung

dengan jantan lainnya membentuk kelompok jantan (Kementerian Kehutanan, 2007).

Usia reproduksi gajah betina antara 10-12 tahun dan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, ketersediaan sumber daya pakan dan faktor ekologi (kepadatan populasi) (McKay *et al.*, 1973). Masa kehamilannya antara 18-23 bulan dengan rata-rata sekitar 21 bulan dan jarak kehamilan betina sekitar 4 tahun (Sukumar, 2003).

C. Keragaman Genetik

Keragaman genetik merupakan variasi genetik yang terdapat pada setiap spesies mencakup aspek biokimia, struktur, dan sifat organisme yang diturunkan dari induknya. Keragaman genetik suatu populasi sangat menentukan daya tahan makhluk hidup dalam suatu populasi pada kondisi lingkungan yang ekstrim (Haig, 1998). Keragaman genetik di dalam suatu spesies mencakup beberapa faktor seperti jumlah individu, semakin banyak individu dalam suatu populasi maka semakin beragam genetik pada setiap spesiesnya, kisaran penyebaran geografi setiap spesies berpengaruh karena semakin luas penyebaran pada suatu spesies maka memiliki ketahanan tubuh yang berbeda, tingkat ekstraksi DNA dari populasi menghasilkan baik atau tidaknya hasil isolat DNA yang akan digunakan sebagai langkah awal dalam upaya membantu melestarikan gajah sumatera dan sistem perkawinannya

dapat diperhatikan sehingga mendapatkan hasil keturunan yang tahan terhadap perubahan lingkungan (Lowe *et al.*, 2004).

Tanpa ada tindakan yang tepat dan direncanakan secara matang untuk jangka panjang kemungkinan terjadinya penurunan populasi gajah sumatera di PLG terus meningkat, dikarenakan semakin sempit luas area yang dijadikan habitat menyebabkan putusnya aliran gen (*gene flow*) yang seharusnya dapat meningkatkan variabilitas genetik dan meningkatnya hanyutan gen (*genetik drift*) yang dapat menurunkan variabilitas genetik yang menjadi faktor *inbreeding* dalam suatu populasi, sehingga terjadi penurunan kualitas genetik. *Gene flow* merupakan proses perpindahan atau migrasi gen atau alel dari suatu populasi ke populasi lain sedangkan *genetik drift* merupakan hilang atau lepasnya frekuensi alel secara kebetulan yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor, misalnya migrasi yang dilakukan oleh sejumlah organisme dan menetap di suatu tempat, hal tersebut dapat menyebabkan terbentuknya koloni baru yang memiliki frekuensi alel berbeda karena berasal dari induk yang menetap di suatu area yang sama.

D. *Deoxyribo Nucleic Acid (DNA)*

Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) merupakan asam nukleat yang tersimpan di dalam inti dan mitokondria pada hewan dan manusia, dan klorofil pada tumbuhan dan mempunyai sifat dapat diturunkan (Faatih, 2009). DNA merupakan molekul penyusun kromosom yang tersusun dari basa nitrogen,

gula pentosa, dan gugus fosfat. DNA *polymerase* adalah enzim utama yang mengkatalisis polimerisasi nukleotida menjadi untaian DNA serta molekul yang bertanggung jawab dalam perbanyakan dan penyebaran *blueprint* dalam kehidupan. *Blue print* merupakan kerangka kerja yang menjadi landasan dalam pembuatan kebijakan. Prinsip dari DNA *polymerase* untuk sintesis untaian DNA baru dari arah 5'–3' menjadi untaian ganda (Mannheim, 2006). Ilmu genetika molekuler sangat mempunyai pengaruh yang sangat besar, seperti perkembangan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mampu mengamplifikasi untaian DNA hingga mencapai konsentrasi tertentu, yang sangat berguna dalam merancang program konservasi pada spesies tertentu.

E. Tahap Pengambilan Sampel Darah Gajah Sumatera

Pengambilan sampel darah pada gajah Sumatera memiliki tiga tahap yaitu tahap persiapan, tahap pengendalian dan tahap inti (pengambilan sampel darah gajah Sumatera) (Asiyah, 2017). Pada tahap pertama diperlukan mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan dalam pengambilan sampel darah gajah Sumatera seperti tabung hisap yaitu tabung dengan koagulan yang memiliki tutup berwarna merah dengan ukuran 3 ml yang digunakan untuk pemeriksaan kimia darah dan serum darah. Tabung dengan antikoagulan yang memiliki tutup berwarna ungu yang berisi EDTA digunakan untuk apusan hematologi. Tahap kedua yaitu tahap pengendalian dapat berupa pemberian pisang, mendatangkan gajah lain, maupun

diperlukan tempat khusus yang dilengkapi dengan tali dan tiang untuk mengikat gajah sumatera. Tahap ketiga yaitu tahap pengambilan sampel darah yang dilakukan ditelinga gajah sumatera yaitu pada bagian vena aurikularis, menggunakan jarum hipodermik 18 G atau jarum bersayap. Penggunaan jarum hipodemik disesuaikan dengan jenis hewan yang digunakan, jarum hipodemik 18 G digunakan untuk menyuntik atau mengambil cairan dari dalam tubuh, sedangkan jarum bersayap digunakan untuk mengambil darah secara vakum atau digunakan untuk memberi obat cair atau infus (Asiyah, 2017).

F. Ekstraksi DNA Gajah Sumatera

Ekstraksi DNA dilakukan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak dan karbohidrat. Hasil ekstraksi DNA yang baik tanpa adanya kontaminan seperti protein dan RNA dapat diperoleh jika proses koleksi sampel dilakukan dengan baik dan sesuai prosedur. Prinsip utama dalam ekstraksi DNA ada tiga tahapan yaitu penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Corkill *et al.*, 2008). Sampel yang digunakan untuk ekstraksi DNA menggunakan sampel darah. Tahap penghancuran (lisis) pada ekstraksi DNA gajah sumatera menggunakan *buffer* AL (protokol ekstraksi *DNeasyR Blood & Tissue Kit* dari QIAGEN) yang berperan dalam pemecahan sel secara kimiawi dan untuk mencegah DNA rusak. Ekstraksi dilakukan untuk mendapatkan ekstrak DNA. Beberapa hal yang dapat

terjadi selama proses ekstraksi seperti DNA patah-patah selama proses ekstraksi, DNA terdegradasi oleh enzim nuklease, dan terjadi kontaminan. Pemisahan DNA dari komponen lain seperti kontaminan dapat dilakukan dengan melakukan sentrifugasi. Pada tahap presipitasi atau pemurnian ditambahkan etanol yang digunakan untuk membersihkan DNA dari residu pada tahap pemecahan sel (Fatchiyah dkk., 2011).

G. Penanda Molekuler GAPDH

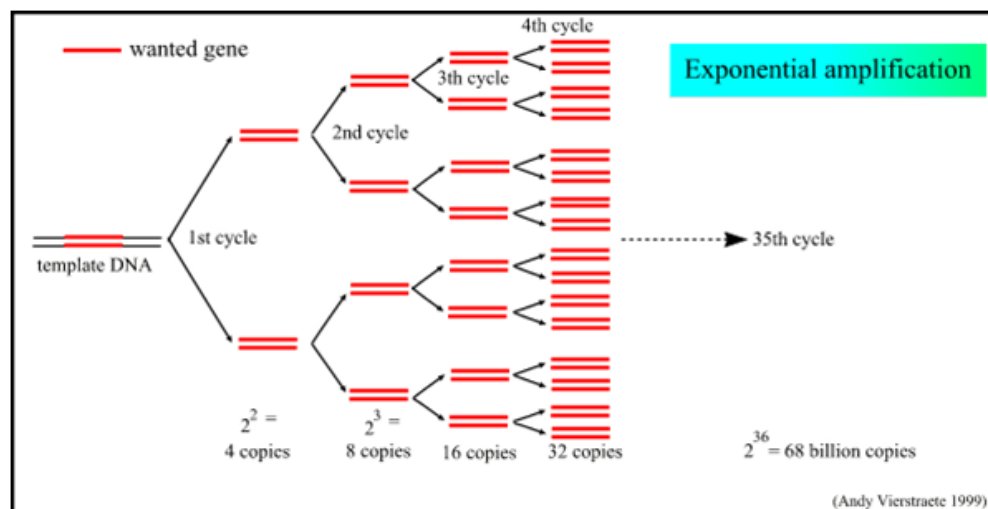
Glyceraldehyde-3-Fosfat Dehydrogenase (GAPDH) merupakan salah satu enzim yang berperan dalam mengkatalisis reaksi jalur glikolisis. Glikolisis adalah proses metabolisme universal yang terjadi pada makhluk hidup. Pada tahap glikolisis terjadi pemecahan 1 molekul glukosa menjadi 2 molekul asam piruvat yang terjadi di sitoplasma. Primer GAPDH merupakan gen yang mengkode enzim GAPDH. Enzim GAPDH mengkatalisis *Glyceraldehyde-3-Fosfat* menjadi 1,3 biphosphoglycerate (Thanonkeo *et al.*, 2010).

Molekul GAPDH dikenal dengan homotetramer yaitu tetramer yang tersusun atas empat rantai polipeptida pada elektroforesis menggunakan gel GAPDH terdeteksi sebagai *band* tunggal dengan massa molekul sekitar 36 Kda dengan berat molekul keseluruhan 144 Kda. GAPDH dimurnikan dari jaringan jantung manusia atau kelinci dapat digunakan sebagai standar atau

kalibrator *immunoassays* sebagai imunnogen untuk memproduksi antibodi dan studi biokimia GAPDH.

H. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dirintis pada tahun 1983 dan Kary Mullis mendapatkan hadiah nobel pada tahun 1993 dalam bidang kimia berbasis DNA untuk penemuan metode PCR.



Gambar 3. Siklus amplifikasi gen pada PCR (Andy vierstracte, 1999).

Teknik ini digunakan untuk menyalin urutan DNA sebanyak beberapa lusin kali dari jumlah semula. Teknik PCR merupakan metode analisis DNA yang paling luas, tahun 1985 PCR baru pertama kali dipresentasikan yang dimungkinkan dapat meniru hingga jutaan kali urutan DNA dalam tabung, segmen DNA merupakan bahan genetik yang rumit. Tahun 1988 Perkin-Elmer memperkenalkan perangkat yang secara otomatis dan berulang-ulang

dapat menaikkan dan menurunkan suhu sampel selama proses PCR (Mannheim, 2006).

Reaksi amplifikasi melalui metode PCR dapat mengubah molekul kecil khususnya asam nukleat menjadi jumlah yang lebih banyak dalam mikrogram. Setiap urutan dalam metode PCR melibatkan tiga tahapan seperti denaturasi, *annealing* dan ekstensi. Tiga tahapan ini pada metode PCR akan diulangi dalam waktu tertentu. Pengulangan dalam proses PCR berfungsi untuk memperbanyak dengan pengaturan suhu yang berbeda. Jumlah DNA target dapat menyalin dua kali setiap siklus, sehingga dalam 20 siklus PCR dapat menyalin jutaan DNA target (Mannheim, 2006).

Tahap pertama dalam amplifikasi DNA yaitu denaturasi digunakan suhu tinggi ($> 90^{\circ}\text{C}$) merupakan proses awal untuk merusak untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal. Tingkat denaturasi DNA tergantung pada tingginya suhu. Perubahan tingkat denaturasi DNA dapat diikuti dengan memperlakukan DNA pada suhu yang bertingkat. Perbandingan kandungan antara basa nukleotida GC terhadap AT sangat penting, karena tingginya kandungan GC akan memperlambat proses denaturasi molekul DNA. Sebaliknya, kandungan AT yang tinggi akan menyebabkan pita DNA mudah putus. Ikatan hidrogen menempel antara basa pada satu untai dan mitranya pada untai lainya. Sedangkan nukleotida terhubung dengan nukleotida lainya melalui gugus fosfat dengan membentuk ikatan kovalen yang sangat kuat (Mannheim, 2006).

Tahap kedua dalam amplifikasi DNA yaitu *annealing* digunakan sebagai pengenalan suatu primer terhadap DNA target dalam urutan yang memiliki kurang lebih 100-35.000 pasang basa yang unik pada suatu organisme. Optimasi suhu *annealing* dimulai dengan menghitung *melting temperature* (T_m) menggunakan rumus $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$, yaitu dengan menghitung kandungan ATGC pada primer untuk menentukan suhu yang akan digunakan pada tahap *annealing*. Suhu pada tahap *annealing* biasanya 5°C dibawah T_m primer yang sebenarnya, T_m ini dipengaruhi oleh komponen buffer, konsentrasi primer dan cetakan DNA. *Melting temperature* atau suhu leleh merupakan temperatur yang diperlukan oleh primer untuk mengalami disosiasi/ lepas ikatan. T_m atau suhu leleh yang digunakan harus sama untuk memastikan kinerja yang konsisten pada pasangan primer. Amplifikasi akan efisien apabila suhu *annealing* antara 40°C dan 65°C tergantung dari panjang dan urutan primer. Primer akan menempel pada urutan nukleotida yang sesuai dengan urutan primer itu sendiri dan menempel pada posisi ujung 5' dari untai DNA target yang telah terurai sebelumnya (Mannheim, 2006).

Tahap ketiga dalam amplifikasi DNA yaitu ekstensi. Tahap ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA. Suhu ekstensi berkisar 72°C . Primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target yang akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA target yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan (Mannheim, 2006).

Asam nukleat banyak digunakan dalam menentukan diagnosa medis, teknik PCR terus diperbarui dan diperluas untuk meningkatkan manfaat yang akan diperoleh, dengan mengoptimalkan PCR berfungsi untuk mendeteksi dan analisis hasil dalam sekali putaran tunggal (*single run*), pengenalan tag molekuler atau urutan nukleotida (biotin dan digoxigenin) menggunakan PCR selama amplifikasi memungkinkan hasil yang didapatkan dapat digunakan dalam diagnosis medik, studi tentang variabilitas genetik (digunakan sebagai dasar untuk menentukan penyakit genetik), pembuatan DNA baru dengan mutagenesis secara *in vitro*, dan dapat digunakan dalam pencarian hubungan evolusi melalui pemeriksaan DNA purba dari fosil (Mannheim, 2006).

I. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu cara analisis kimiawi berdasarkan pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik. Arus listrik yang dialirkan pada suatu medium penyangga yang telah berisi protein plasma maka komponen-komponen protein tersebut akan bermigrasi dari kutub negatif ke kutub positif (Ricardson *et al.*, 1986).

Elektroforesis gel dibagi menjadi dua model yaitu elektroforesis vertikal dan elektroforesis horizontal. Elektroforesis horizontal lebih sering digunakan karena mempunyai beberapa kelebihan seperti peralatan yang digunakan

relatif sederhana, relatif murah dan pemisahan untuk enzim tertentu menghasilkan pemisahan yang baik (Sargent *et al.*, 1975).

Terdapat beberapa tahapan dalam penggunaan elektroforesis yaitu ekstraksi sampel yang digunakan, hasil ekstraksi seperti DNA, RNA, maupun protein merupakan bahan yang akan digunakan pada proses selanjutnya. Pembuatan media penunjang yang biasa digunakan pada elektroforesis adalah gel agarosa, gel pati, gel poliakrilamida dan kertas selulosa poliasetat. Gel agarosa biasa digunakan untuk DNA dan RNA pada elektroforesis, sedangkan gel poliakrilamida digunakan untuk protein. Penempatan sampel harus sesuai dengan peta yang telah dibuat untuk mempermudah dalam menganalisis hasil visualisasinya. Proses elektroforesis menggunakan kekuatan (Volt) dan waktu sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan. Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan alat bantu seperti *digi dog* dan kemudian hasil visualisasi dianalisis. Hasil visualisasi dari gel elektroforesis berupa noda atau pita (bandmorp) (Nei, 1977, Brown dan Weir, 1983).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada Bulan Januari 2018 - Februari 2018 bekerja sama dengan Taman Nasional Way Kambas dalam pengambilan sampel darah dan Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung, di bawah penelitian **Dra. Elly L. Rustiati, M.Sc.** dengan judul “**Konstruksi Peta Filogenetis Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) Di Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas Berdasarkan Analisis Sitologis dan Molekuler**”.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Adapun peralatan yang digunakan dalam ekstraksi DNA yaitu tabung mikro 1,5 µl, tabung *spin column* koleksi terdapat kolom yang mengandung *silica gel* untuk mengikat DNA, vortex untuk homogenisasi, *waterbath* untuk inkubasi sampel selama proses ekstraksi berlangsung. Alat untuk proses elektroforesis yaitu satu set alat

elektroforesis horizontal untuk melakukan uji kualitatif DNA (*parafilm*, cetakan gel, sisir, *power supply*), *micropipet* dan tip untuk mengambil sampel DNA, *Digital Documents (Digi Doc)* untuk visualisasi hasil elektroforesis, dan kamera OPO A37 sebagai alat dokumentasi. Amplifikasi DNA dilakukan dengan alat berupa vortex untuk homogenisasi larutan, *Laminar Air Flow (LAF)* untuk preparasi bahan-bahan agar tidak terkontaminasi dengan udara luar, sentrifugasi untuk memisahkan partikulat padat dalam cairan, *Veriti Thermal Cycler* untuk proses amplifikasi dengan suhu, waktu dengan jumlah siklus tertentu dan *Veterinary Epidemiologi Research* digunakan sebagai buku panduan dalam menganalisis data.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam ekstraksi DNA adalah 23 sampel darah gajah sumatera yang diperoleh dari Taman Nasional Way Kambas yang telah diberi perlakuan *Etilan Diamin Tetraasetat (EDTA)* untuk mencegah terjadinya penggumpalan (Asiyah, 2016), satu set *DNesy Blood and Tissue Kit* dari QIAGEN untuk ekstraksi DNA. Bahan untuk proses elektroforesis adalah DNA hasil ekstraksi, gel agarosa sebagai fase diam, larutan penyangga *Tris-Acetate-EDTA (TAE)* sebagai fase gerak dan pelarut agarosa, *loading dye* sebagai pemberat DNA di dalam sumuran gel, *SYBR Safe* digunakan sebagai pewarna untuk melihat DNA hasil ekstraksi setelah dilakukan elektroforesis, *parafilm* sebagai tempat mencampurkan DNA dengan larutan *loading dye*, *marker 100 bp* sebagai

penanda, dan bahan untuk amplifikasi meliputi *mix master* yang terdiri dari Platinum[®]Blue PCR SuperMix Qty:100 rxn (4×1.125 mL) yang mengandung (antibody Platinum[®]anti-Taq DNA Polymerase, Mg^{++} , dNTPs, *glycerol*), Taq DNA Polimerase (enzim DNA polymerase yang diekstraksi dari bakteri termofilik), Mg^{++} untuk pengikatan, dNTPs digunakan sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA, *glycerol* untuk pemberat sehingga DNA tidak akan keluar dari sumuran gel, *nuclease-free water* digunakan sebagai pelarut primer dan primer GAPDH digunakan untuk mengenali urutan yang akan diamplifikasi.

C. Prosedur Penelitian

1. Tahap Pendahuluan

Teknik pengambilan sampel darah dilakukan oleh Siti Asiyah, Dedi Chandra, Diah E. Angraini, Elly L. Rustiati, dan Priyambodo tahun 2016. Sampel darah gajah sumatera betina yang digunakan dalam penelitian berjumlah 23 sampel dari total populasi gajah sumatera yang terdapat di PLG TNWK sebanyak 66 individu. Sampel gajah sumatera diambil dari Rumah Sakit Gajah (RSG) Prof. Dr. Ir. H. Rubini Atmawidjaja di PLG, *Elephant Respon Unit* (ERU) I, ERU II, ERU III TNWK (Rustiati dkk., 2017).

Pertimbangan dalam pengambilan sampel berdasarkan umur pada gajah sumatera betina pada tahun 2017. Gajah dengan kisaran umur 0–10 tahun berjumlah empat individu gajah sumatera, 10-20 tahun berjumlah empat individu gajah sumatera, 20-30 tahun berjumlah sembilan individu gajah sumatera, dan 30-40 tahun berjumlah enam individu gajah sumatera.

Tabel 1. Daftar nama gajah sumatera betina di PLG TNWK

No	Nama Gajah	Nomor Sampel	Umur Gajah
1.	Yeti	24	4 tahun
2.	Yulia	7'	4 tahun
3.	Amalia	14'	4 tahun
4.	Queen	1'	6 tahun
5.	Pepi	1	12 tahun
6.	Wulan	4	13 tahun
7.	Mega	8	18 tahun
8.	Karmila	13'	19 tahun
9.	Poniyem	4a	22 tahun
10.	Riska	30	22 tahun
11.	Rahmi	3a	23 tahun
12.	Dita	3	24 tahun
13.	Wulan	4	13 tahun
14.	Alma	34	26 tahun
15.	Pleno	9'	27 tahun
16.	Heli	36	27 tahun
17.	Arni	28	28 tahun
18.	Bunga	27	34 tahun
19.	Dona	29	37 tahun
20.	Gunturia	5	37 tahun

Tabel 1 (lanjutan)

21.	Suli	3'	28 tahun
22.	Kartijah	15	39 tahun
23.	Lingling	11'	39 tahun

2. Tahap Pengambilan Sampel Darah Gajah Sumatera

Pengambilan sampel darah pada gajah sumatera memiliki tiga tahapan yaitu tahap persiapan, tahap pengendalian dan tahap inti (pengambilan sampel darah gajah sumatera) (Asiyah, 2017).

3. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA genom mengacu pada protokol ekstraksi *DNeasy^R Blood & Tissue Kit* dari QIAGEN. Proses ekstraksi DNA diperlukan tiga tahapan untuk mendapatkan ekstrak DNA yang baik yaitu melalui tahap lisis, tahap pencucian, dan tahap elusi. Pada tahap lisis sampel darah 50–100 µl dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang berisi proteinase K 20 µl. Proteinase K merupakan enzim yang berperan dalam memecah senyawa protein dalam membran sel darah (Khosravinia dkk., 2007). *Buffer AL* 200 µl ditambah dan dilakukan homogenisasi menggunakan vortex sehingga pemecahan sel terjadi sempurna. *Buffer AL* memiliki fungsi sebagai pemecah sel secara kimiawi. *Buffer AL* mengandung detergen yang mampu melarutkan senyawa lipid yang merupakan komponen penyusun membran sel. *Sodium Dodecyl*

Sulphate (SDS) merupakan detergen yang sering digunakan untuk melarutkan senyawa lipid. Kemudian suspensi diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 56⁰C selama 10 menit. Inkubasi membantu dalam mempercepat pemisahan sel tanpa merusak ikatan pada molekul DNA (Asiyah, 2017).

Pada tahap pencucian digunakan etanol 100% sebanyak 200 µl ditambahkan dalam tabung mikro dan dihomogenisasi. Etanol berfungsi membersihkan residu garam dan berperan dalam presipitasi DNA membentuk endapan serat. Campuran tersebut kemudian dimasukkan kedalam tabung *spin column* yang dilengkapi dengan tabung koleksi 2 ml dan disentrifugasi 8.000 rpm selama 1 menit. Fungsi dari sentrifugasi yaitu untuk memisahkan campuran berdasarkan perbedaan berat molekul. Isolat DNA akan terikat pada silika gel dalam tabung *spin column* dan senyawa yang tidak dibutuhkan akan mengalir kedalam tabung koleksi. Di dalam tabung *spin column* molekul DNA akan berikatan dengan *silica gel* yang dipengaruhi oleh adanya garam-garam dari *buffer* yang digunakan. Konsentrasi garam yang tinggi mengakibatkan DNA terdehidrasi yang mengakibatkan adanya interaksi hidrogen antara DNA dengan permukaan *silica*, sehingga menyebabkan adsorpsi oleh *silica gel*. Campuran pada tabung *spin column* dipindahkan ke dalam tabung koleksi baru kemudian ditambahkan 500 µl *buffer* AW1 dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Pencucian menggunakan *buffer* AW1 merupakan pencucian

tahap pertama yang berfungsi untuk membersihkan DNA dari residu-residu yang masih tersisa dari tahap presipitasi. Perlakuan di atas diulang kembali dengan mengganti tabung koleksi lama diganti dengan tabung koleksi baru kemudian buffer AW2 sebanyak 500 μ l di masukan kedalam tabung *spin column* dan disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Pencucian kedua ini berfungsi untuk memastikan DNA terbebas dari residu-residu yang masih tertinggal. Senyawa etanol umumnya digunakan dalam tahap pencucian. Senyawa etanol akan mempertahankan DNA dalam kondisi terhidrasi dan terikat pada *silica gel* serta membersihkannya dari residu garam (Asiyah, 2017).

Pada tahap elusi tabung koleksi diganti menggunakan tabung mikro 1,5 ml. *Buffer AE* 200 μ l ditambahkan ke dalam tabung mikro kemudian di inkubasi selama 1 menit dalam suhu ruang kemudian dilakukan sentrifugasi. *Buffer AE* berfungsi untuk meluruhkan molekul DNA yang mengalami presipitasi pada *silica gel* ke dalam tabung mikro. *Buffer AE* memiliki kandungan air atau larutan rendah ion sehingga tahap elusi dapat terjadi. DNA dapat meluruh melewati *silica gel* dan masuk ke dalam tabung mikro. Inkubasi selama 1 menit berfungsi untuk menghilangkan etanol yang tersisa dari tahap pencucian dan mengoptimalkan penyerapan *buffer AE*. Etanol merupakan pelarut memiliki titik didih rendah sehingga mudah menguap pada suhu ruang. Setelah dilakukan sentrifugasi ekstrak DNA terkoleksi dalam tabung mikro. Molekul DNA kemudian disimpan dalam lemari pendingin

dengan suhu -20°C untuk menjaga DNA agar terhindar dari kerusakan, sehingga bisa digunakan untuk tahap selanjutnya (Asiyah, 2017).

4. Uji Kualitas DNA Hasil Ekstraksi dengan Teknik Sederhana

Pengujian kualitas DNA hasil ekstraksi dengan teknik sederhana menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Bubuk agarosa sebanyak 1,5 gr ditambahkan dengan 150 ml buffer *Tris-Acetate-EDTA* (TAE) yang digunakan sebagai larutan penyangga, kemudian dipanaskan dalam *microwave* selama 3 menit setelah itu gel agarosa yang telah dipanaskan ditambahkan dengan *SYBR safe* 1,5 μl sampai homogen. *SYBR safe* ini digunakan sebagai pewarna untuk melihat DNA hasil ekstraksi setelah dilakukan elektroforesis. Gel agarosa kemudian dimasukkan kedalam *chamber* yang telah dipasang sisir dan diamkan sampai gel agarosa padat, sisir ini berguna sebagai pembentuk sumuran sebagai tempat untuk meletakkan DNA. Setelah agarosa padat lepaskan sisir yang masih tertancap pada gel agarosa. Masukkan gel agarosa yang telah padat ke dalam *chamber* yang telah berisi buffer TAE hingga gel agarosa terendam. Molekul DNA sebanyak 6 μl ditambahkan *loading dye* 2 μl yang berfungsi sebagai pemberat DNA di dalam sumuran gel dihomogenkan di atas kertas parafilm menggunakan *micropipette*. Kemudian masukan DNA yang telah homogen dengan *loading dye* ke dalam sumuran yang telah dibuat. Elektroda kemudian dihubungkan dengan *power supply* selama 10 menit dengan tegangan 100 volt.

Setelah selesai *running* matikan alat elektroforesis. Gel agarosa dipindahkan ke *digi doc* untuk divisualisasi. Molekul DNA yang memiliki kualitas baik akan menunjukkan pedaran pita yang dapat dilihat dari *digi doc* menggunakan sinar UV.

5. Uji Kualitas DNA Hasil Ekstraksi dengan Teknik Molekuler GAPDH-PCR

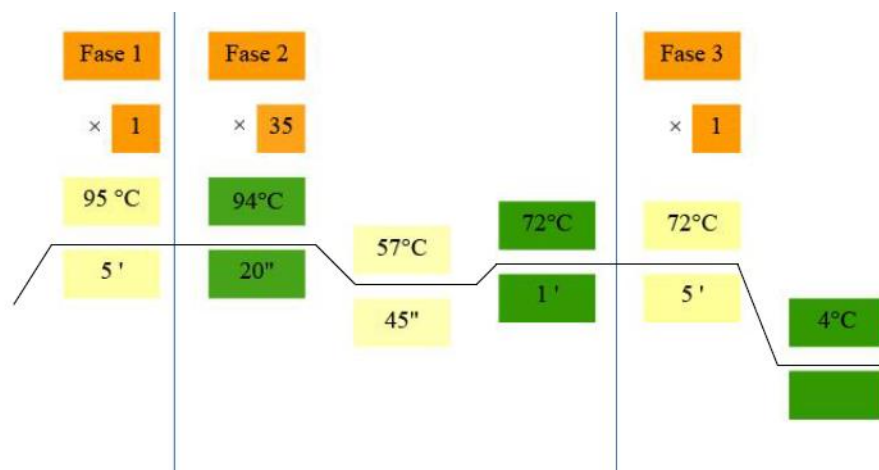
Uji kualitas DNA dengan teknik molekuler dilakukan dengan primer *Glyceraldehyde-3-Fosfat Dehydrogenase* (GAPDH) yang terdiri dari sepasang primer yaitu *forward primer* dan *reverse primer*.

Tabel 2. Daftar Sequens GAPDH *gene*

Primer	Sequens
Forward	5'ATCACTGCCACCCAGAAGACT3'
Reverse	5'CATGCCAGTGAGCTT CCCGTT3'

Uji kualitas DNA menggunakan GAPDH PCR dimulai dengan melakukan *mix master* yaitu dengan menghomogenkan Platinum[®]Blue PCR SuperMix 21 µl ditambahkan Primer GAPDH (*Reverse primer* dan *Forward primer*) 2 µl. Platinum[®]Blue PCR SuperMix mengandung antibodi Platinum[®]anti-Taq DNA Polymerase yang berfungsi sebagai enzim untuk memperbanyak DNA (enzim DNA polymerase diekstraksi dari bakteri termofilik), Mg⁺⁺ berfungsi sebagai kofaktor dari enzim Taq polymerase karena tanpa ion Mg⁺⁺ enzim DNA polymerase tidak dapat

bekerja, dNTPs digunakan sebagai *building block* yaitu membangun *block* ATGC yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA, dNTPs terdiri dari empat basa penyusun DNA yaitu dATP, dCTP, dGTP dan dTTP. Primer GAPDH terdiri *Forward Primer* untuk mengenali urutan yang akan diamplifikasi dari arah depan dan *Reverse Primer* untuk mengenali urutan yang akan diamplifikasi dari arah belakang. DNA template ditambahkan sebanyak 3 μ l dan di sentrifugasi selama 1 menit. Kemudian hasil *mix master* dimasukkan kedalam alat *Thermo Cycler* untuk dilakukan proses PCR yang terdiri dari lima tahap yaitu predenaturasi, denaturasi, *annealing*, ekstensi, dan post-ekstensi (Gambar 4.).



Gambar 4. Tahapan reaksi amplifikasi

Tahap predenaturasi digunakan suhu 95⁰C dengan waktu 5 menit. Tahap predenaturasi digunakan untuk memastikan rantai ganda DNA genom dapat terpisah menjadi untai tunggal. Tahap kedua yaitu tahap denaturasi digunakan suhu 94⁰C dengan waktu 20 detik. Tahap denaturasi merupakan proses awal untuk memisahkan untai ganda DNA

menjadi dua untai tunggal. Pada tahap ketiga yaitu tahap *annealing* digunakan suhu 57°C dengan waktu 45 detik. Tahap ini digunakan sebagai pengenalan suatu primer terhadap DNA target yang memiliki pasangan basa yang unik pada suatu organisme. Penentuan suhu *annealing* didapatkan dari perhitungan *Temperature melting* (T_m) yaitu dengan rumus :

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

Ket: $T_m = \text{Temperature melting}$

A = Jumlah basa adenin dalam primer GAPDH

T = Jumlah basa timin dalam primer GAPDH

G = Jumlah basa guanin dalam primer GAPDH

C = Jumlah basa sitosin dalam primer GAPDH

Rumus tersebut digunakan untuk menghitung banyaknya kandungan ATGC pada primer yang digunakan. T_m merupakan suhu di mana separuh dari struktur DNA ulir ganda hilang. Adapun faktor yang mempengaruhi T_m tersebut yaitu pH, panjang rantai DNA dan komposisi basa (semakin banyak komposisi G-C maka T_m akan semakin tinggi). Tahap keempat yaitu tahap ekstensi digunakan suhu 72°C dengan waktu 1 menit. Tahap ekstensi merupakan tahap pemanjangan untai baru DNA. Tahap kelima yaitu tahap post-ekstensi menggunakan suhu 72°C selama 5 menit dan suhu 4°C untuk menyempurnakan tahap terakhir. Tahap satu dengan tahap lima berulang $1\times$, sedangkan tahap dua, tiga dan empat berulang sebanyak $35\times$.

6. Elektroforesis

Hasil PCR kemudian dilihat dan dipisahkan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5 % dalam *buffer* TAE. Bubuk agarosa 1,5 mg ditambahkan dengan 100 ml *buffer* TAE dididihkan selama 3 menit dalam *microwave*, pewarna *SYBR safe* ditambahkan sebanyak 1,5 µl dan dilakukan homogenisasi. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir pembuat sumuran pada gel. Setelah mengeras, sisir dicabut dari gel agarosa dan gel agarosa dimasukkan ke dalam *chamber* lalu ditambahkan *buffer* TAE hingga terendam. Hasil ampikon DNA yang sudah diberi perlakuan dimasukkan pada sumuran yang telah terbentuk. Bagian sumur pertama tambahkan marker 100 bp untuk mengukur panjang ampikon DNA. Elektroda kemudian dihubungkan dengan *power supply* agar DNA melakukan pergerakan selama 30 menit dengan tegangan 100 Volt. Setelah selesai, gel dipindahkan dari alat elektroforesis ke *digi doc*, hasil visualisasi kemudian digunakan untuk membandingkan antara hasil uji kualitas dengan teknik sederhana dan teknik molekuler.

D. Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh berupa pendaran pita DNA yang bersifat dominan dari hasil uji teknik sederhana maupun teknik molekuler. Pendaran pita DNA dengan teknik sederhana dan teknik molekuler divisualisasi menggunakan *digi doc* setelah dilakukan elektroforesis.

Analisis data dilakukan secara deskriptif berdasarkan pendaran pita DNA yang muncul dan berdasarkan hasil perhitungan sensitivitas (*Se*), spesifitas (*Sp*) dan *kappa test* (*K*) dari hasil dua teknik yang dilakukan.

$$\text{Sensitivitas (Se)} = \frac{a}{a+c} \times 100\%$$

$$\text{Spesifitas (Sp)} = \frac{d}{b+d} \times 100\%$$

$$\text{Kappa (K)} = \frac{x}{y}$$

Keterangan : a. Jumlah dari hasil dua uji ++
 b. Jumlah dari hasil dua uji +-
 c. Jumlah dari hasil dua uji -+
 d. Jumlah dari hasil dua uji --
 x. Hasil perhitungan dari proporsi kesesuaian-peluang
 y. Hasil perhitungan dari 1-peluang

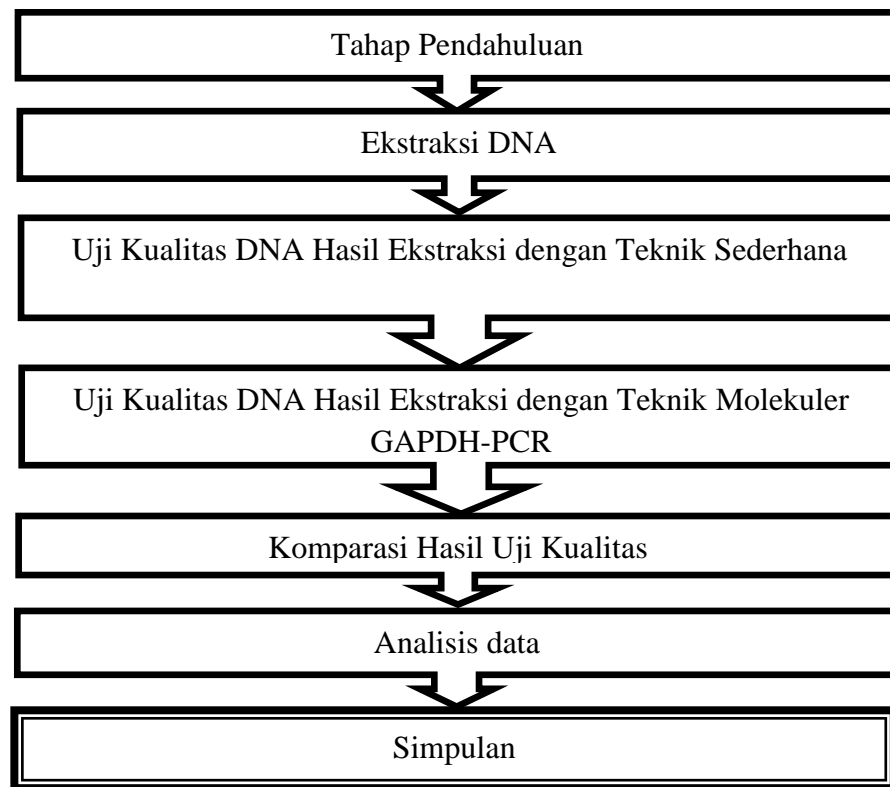
Ketetapan *kappa test*

Keterangan : > 0.8 : Kesesuaian hampir sempurna
 0.6 – 0.8 : Kesesuaian baik
 0.4 – 0.6 : Kesesuaian cukup
 0.2 – 0.4 : Kesesuaian rendah
 < 0.2 : Kesesuaian sangat rendah

(Dohoo *et al.*, 2003. *Veterinary epidemiologic research*.pp.92)

E. Diagram Alir Penelitian

Tahapan yang akan dilakukan dalam penelitian ini digambarkan dalam diagram alir (Gambar 5.) sebagai berikut:



Gambar 5. Diagram alir uji komparasi DNA dengan teknik sederhana dan teknik molekuler GAPDH pada gajah sumatera betina di Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan adalah hasil uji kualitas DNA menunjukkan ada perbedaan hasil antara teknik sederhana dan teknik molekuler. Hasil uji kualitas DNA menggunakan teknik sederhana menunjukkan pendaran pita DNA sebanyak 56,6% dari 23 individu gajah sumatera, sedangkan hasil menggunakan teknik molekuler menunjukkan hasil positif 100% dari 23 individu gajah sumatera betina sehingga hasil ekstraksi dapat digunakan untuk proses selanjutnya.

B. Saran

Saran yang bisa diberikan berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Diperlukan ketelitian yang maksimal dalam proses amplifikasi DNA terutama pada tahap *mix master* karena jumlah bahan yang digunakan terlalu sedikit menyebabkan bahan menempel pada tip dan tidak masuk kedalam tabung mikro.

2. Kondisi lingkungan hendak dijaga agar tetap steril untuk mencegah terjadinya kontaminan yang dapat terlihat saat visualisasi menggunakan *digi doc* dengan sinar UV.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, D.N. Choesin., dan A.Sjarmidi. 2005. Estimasi Daya Dukung Pakan Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus* Temmick) di Kawasan Hutan Tessonilo. Bandung. Prov Riau. *Jurnal Ekologi dan Biodiversitas ITB*. 4 (2) : 37- 41.
- Alikodra, H.S.. 1990. *Pengelolaan Satwaliar*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Pusat Anatar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Altevogt, R. F dan Kurt, dalam Tarmizi. 2008. *Pemilihan Habitat Gajah Sumatera (Elephas maximus sumatranus) di Cagar Alam Jantho Kabupaten Aceh Besar*. Universitas Syiah Kuala. Banda Aceh.
- Asiyah, S., D. Candra., D.E. Anggraini., E.L. Rustiati., dan Priyambodo. 2016. Blood Sampling Technique on Captive Elephant in Way Kambas National Park. *Oral Pesentation of International Wildlife Symposium*. Universitas Lampung. Lampung.
- Asiyah, S.. 2017. Uji Kualitatif DNA Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas. (Skripsi). Bandar Lampung. Universitas Lampung.
- Balai Taman Nasional Way Kambas. 2006. *Zonasi Taman Nasional Way Kambas*. Buku Taman Nasional Way Kambas. Lampung Timur.
- Brown, A.H.D and B.S. Weir .1983. Measuring Variability in Plant Population. *In*. S.D. Tanksley and T. J. Orton (eds.). *Isozymes in plant Genetics and Breeding. Part A. Elsevier Science Publisers*. Amsterdam. 219.

- Corkill, G., and R. Rapley. 2008. *The Manipulation of Nucleic Acids: Basic Tools and Techniques. In Molecular Biomechanics Handbook Second Edition. Ed. Walker, J.M., Rapley, R. Humana Press, NJ. USA.*
- Dohoo, I., W. Martin., and H. Stryhn. 2003. *Veterinary Epidemiology Research. AVC Inc . Canada.. 5. 95-100.*
- Eggert, L.S., J.A. Eggert., and D.S. Woodruff. 2003. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park. Ghana. *Molecular Ecology. 12. 1389-1402.*
- Faatih, M.. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi. 10.*
- Fatchiyah, E.L. Arumingtyas., S. Widyarti., dan S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis. Erlangga. Jakarta.*
- Febriyanto. 2011. Analisis Gap Harapan Dan Kinerja Berdasarkan Persepsi Pengunjung Taman Nasional Way Kambas Di Lampung Timur. *Jurnal Manajemen dan Bisnis. 2 (1). 53-68.*
- Frankham, R.J.D. Ballou and D.A Briscoe. 2002. *Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. Cambridge.*
- Haig, S.M.. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology. 79. 413-425.*
- Hudiyono, M. Z. 2008. *Sekilas Informasi Taman Nasional Way Kambas. Balai Taman Nasional Way Kambas, Lampung Timur.*
- IUCN. 2012. IUCN Red List Of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Diunduh 6 Agustus 2017 pukul 20.00 WIB.
- Kementerian Kehutanan. 2006. *Peraturan Menteri Kehutanan Nomor: P. 52/ Menhut –II/ 2006. Tentang Peragaan Jenis Tumbuhan dan Satwa Liar Dilindungi. <http://www.dephut.go.id/index.php?q=id/node/1903>. Diunduh 7 Mei 2017 pukul 20.00 WIB.*

- Kementerian Kehutanan. 2007. *Strategi dan Rencana Aksi Konservasi Gajah Sumatera dan Gajah Kalimantan 2007-2017*. Direktorat Jenderal Perlindungan Hutan dan Konservasi Alam. Departemen Kehutanan. Jakarta.
- Kementerian Kehutanan. 2011. Balai Konservasi Sumber Daya Alam Sumatera Selatan: *Laporan Tahunan 2011*. Brigade Pengendalian Kebakaran Hutan Manggala Agni Sumatera Selatan.
- Khosravinia, H.N.N. Murthy., D.T. Parasad., and N. Piraniy. 2007. Optimazing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6(4). pp. 481-486.
- Lekagul, B. and J.A. McNeely,. 1977. *Mammals of Thailand*. Sahakarnbhat Co. Bangkok.
- Lowe, A.J., S.A. Harris., and P. Ashton . 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application*. Blackwell. Oxford, UK. 326.
- Mannheim. 2006. *PCR Aplications Manual 3rd edition*. Roche Appled Science 68298 Mannheim. Germany. 9-15.
- McKay, G.M. 1973. Behavior and ecology of the Asiatic elephant in southeastern Ceylon. *Smithsonian Contributions to Zoology*.
- Mukhtar. 2004. *Taman Nasional Way Kambas Daya Tarik Kepariwisataan Lampung*. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/pariwisata-muchtar.pdf>. Diunduh 23 November 2017 pukul 20.00 WIB.
- Mustika W., Yarmaidi., dan Lusi I.N. 2014. Potensi Wisata Taman Nasional Way Kambas Kecamatan Labuhan Ratu Kabupaten Lampung Timur. *Jurnal Penelitian Geografi*. 2 (3).4.
- Nei, M.. 1977. F-Statistic and Analysis of Gen Diversity in Subdivided Populations. *Ann. Hum. Genet.* 41.
- Pearce, E.C.. 2006. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

- Priyambodo, E.L. Rustiati., D. Candra., dan S. Asiyah. 2017. Pembuatan Bank DNA Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatrensis*) di Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas. *Oral Presentation on Semirata BKS PTN Barat tahun 2017*.
- Rahmad, R. 2015. Jumlah Gajah Sumatera di Way Kambas dapat diperkirakan melalui kotorannya. WCS. <http://indonesia.wcs.org/Wildlife/sumatran-Elephant.aspx>. diunduh pada 1 Desember 2017 pukul 09.33 WIB
- Richardson, B. J., P. R. Baverstock and M. Adams. 1986. *Allozyme Electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*. Academic Press, Inc. San Diego. pp. 410.
- Rustiati, E.L., Priyambodo., S. Asiyah., F.N. Islami., E.D. Krismurniati., E.D. Anggraini., dan D. Candra. 2017. Pemahaman perilaku dalam pemeriksaan dan pengambilan sampel darah gajah sumatera di penangkaran, Pusat Latihan Gajah, Taman Nasional Way Kambas. *Oral Presentation on Semirata BKS PTN Barat Bidang MIPA tahun 2017*.
- Sargent, J.R. and S.G.George. 1975. *Methods in Zone Electrophoresis* BDH Chemical LTD.Poole England. pp. 219.
- Shoshani, J. and J. F Eisenberg., 1982. *Elephas Maximus*. The American Society of Mammalogists. pp. 1-8.
- Sukumar, R.. 1989. *The Asian Elephant: Ecology and Management*. Cambridge University Press. Cambridge. UK.
- Sukumar, R..2003. *The Living Elephants*. Oxford University Press. Oxford.
- Syafaruddin dan T.J. Susanto. 2011. Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien pada Kemiri Sunan (*Reualis trisperma* (Blanco) Airy Shaw. *Jurnal LITRI* .Vol. 17(1).
- Thanonkeo, P., R.Monkeang, W.Saksirirat and S. Thanonkeo.2010. Cloning and molecular characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from thermotolerant mushroom, *Lentinus polychrous*. *African Journal of Biotechnology*.

Vierstraete, A. 1999. *Principle of the PCR*. <http://user.ugent.be/avierstr/INDEX.HTML>

World Wildlife Fund [WWF]. 2005. Central African Elephant Conservation Strategy. WWF International Avenue du MontBlanc 1196 Gland Switzerland. www.panda.org. Diunduh pada 13 Agustus 2017 pukul 09.20 WIB.