

**DESAIN PRIMER UNTUK AMPLIFIKASI SECARA *IN SILICO*
GEN 16S rRNA PADA KELINCI BELANG (*Nesolagus netscheri*)
ASAL SUMATERA SELATAN**

TUGAS AKHIR

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains di
Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Sriwijaya

Oleh:

AULIA PUTRI SYAFAAT

08041182025015



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

2024

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Judul Seminar Hasil : Desain Primer Untuk Amplifikasi DNA Secara *in Silico*
pada Gen 16S rRNA Spesies Kelinci Belang (*Nesolagus
netscheri*) Asal Sumatera Selatan

Nama Mahasiswa : Aulia Putri Syafaat
NIM : 08041182025015
Jurusan : Biologi

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Sidang Ujian Skripsi Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya pada 16
Mei 2024 dan telah diperbaiki, diperiksa, serta disetujui sesuai masukan panitia
Sidang Ujian Skripsi.

Indralaya, 20 Mei 2024

Pembimbing :

1. Prof. Dr. Arum Setiawan, S.Si, M.Si
NIP. 197211221998031001
2. Prof. Dr. rer.nat. Indra Yustian, M.Si
NIP. 197307261997021001

(.....)
(.....)
(.....)
(.....)

Penguji :

1. Dr. Laila Hanum, M.Si
NIP. 197308311998022001
2. Dra. Muharni, M.Si
NIP. 196306031992032001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Sriwijaya



HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

Judul Seminar Hasil : Desain Primer untuk Amplifikasi DNA secara *in Silico*
pada Gen 16S rRNA Spesies Kelinci Belang (*Nesolagus
netscheri*) Asal Sumatera Selatan

Nama Mahasiswa : Aulia Putri Syafaat

NIM : 08041182025015

Jurusan : Biologi

Telah disetujui untuk disidangkan pada 16 Mei 2024.

Indralaya, 20 Mei 2024

Pembimbing :

1. Prof. Dr. Arum Setiawan, S.Si, M.Si
NIP. 197211221998031001



(.....)

2. Prof. Dr. rer.nat. Indra Yustian, M.Si
NIP. 197307261997021001



(.....)

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Judul Skripsi : Desain Primer untuk Amplifikasi DNA Secara *In Silico* Pada Gen 16S rRNA Spesies Kelinci Belang (*Nesolagus netscheri*) Asal Sumatera Selatan

Nama Mahasiswa : Aulia Putri Syafaat

NIM : 08041182025015

Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi

Menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan karya ilmiah ini belum pernah diajukan sebagai pemenuhan persyaratan untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata satu (S1) dari Universitas Sriwijaya maupun perguruan tinggi lain.

Semua informasi yang dimuat dalam skripsi ini yang berasal dari penulis lain baik yang dipublikasikan atau tidak telah diberikan penghargaan dengan mengutip nama sumber penulis secara benar. Semua isi dari skripsi ini sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya sebagai penulis.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.



Indralaya, Mei 2024

Penulis,

Aulia Putri Syafaat
08041182025015

HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai civitas akademik Universitas Sriwijaya, yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa	: Aulia Putri Syafaat
NIM	08041182025015
Fakultas/Jurusan	: MIPA/ Biologi
Jenis Karya	: Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Sriwijaya “ Hak bebas royalti non-eksklusif (*non-exclusively royalty free right*)” atas karya ilmiah saya yang berjudul :

“Desain Primer untuk Amplifikasi DNA Secara *In Silico* Pada Gen 16S rRNA
Spesies Kelinci Belang (*Nesolagus netscheri*) Asal Sumatera Selatan”

Hak bebas royalti non-eksklusif ini Universitas Sriwijaya berhak menyimpan, mengalih media/memformatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir atau skripsi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis. Pencipta dan sebagai penulis. Pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya,

Indralaya, Mei 2024
Yang menyatakan,

Aulia Putri Syafaat
08041182025015

**DESAIN PRIMER UNTUK AMPLIFIKASI SECARA *IN SILICO* GEN 16S
rRNA PADA KELINCI BELANG (*Nesolagus netscheri*) ASAL
SUMATERA SELATAN**

**Aulia Putri Syafaat
08041182025015**

RINGKASAN

Kelinci Belang Sumatera (*Nesolagus netscheri*) termasuk mamalia langka yang dilindungi berdasarkan peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Nomor P.106 Tahun 2018 dan tergolong dalam spesies kurang data oleh IUCN. Analisis genetik molekuler Kelinci belang Sumatera pada gen 16S rRNA belum pernah dilakukan dan informasi genetik spesies tersebut masih sangat terbatas. Penerapan analisis molekuler bisa menjadi alat yang ampuh untuk identifikasi spesies hewan mengenai hubungan genetik dari Kelinci Belang Sumatera. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain kandidat primer dari gen 16S rRNA yang dapat mengidentifikasi spesies *Nesolagus netscheri* secara spesifik dan efisien. Data sekuen beberapa spesies famili Leporidae diambil dari *GeneBank*, kemudian sekuen di-*alignment* dan dipilih kandidat primer berdasarkan daerah *conserved* yang terbentuk. Kandidat primer yang terpilih dipasangkan dan dianalisis spesifitas-nya serta diuji parameter primernya. Hasil desain primer 16S rRNA didapatkan 9 kandidat pasangan primer. Hasil uji spesifitas dengan mengacu pada standar parameter primer ideal didapatkan hasil kandidat primer terbaik yang direkomendasikan yaitu primer 16S-04, primer 16S-05 dan primer 16S-06 yang sudah memenuhi semua parameter primer ideal kecuali parameter struktur sekunder *self-dimer*. Struktur sekunder yang dihasilkan dapat dioptimalkan dengan melakukan optimasi pada saat dilakukannya uji validasi di laboratorium sehingga bisa didapatkan pasangan primer dengan hasil yang lebih maksimal untuk identifikasi spesies *Nesolagus netscheri* pada gen penanda 16S rRNA.

Kata kunci : Desain primer, Gen 16S rRNA, *Nesolagus netscheri*

PRIMER DESIGN FOR IN SILICO AMPLIFICATION OF 16S rRNA GENE IN STRIPED RABBIT (*Nesolagus netscheri*) FROM SOUTHSUMATERA

Aulia Putri Syafaat
08041182025015

Summary

The Sumatran striped rabbit (*Nesolagus netscheri*) is a rare mammal protected under the Minister of Environment and Forestry Regulation No. P.106/2018 and classified as a data-deficient species by the IUCN. Molecular genetic analysis of the Sumatran striped rabbit on the 16S rRNA gene has never been carried out and genetic information on the species is still very limited. The application of molecular analysis can be a powerful tool for animal species identification regarding the genetic relationship of the Sumatran striped rabbit. This study aims to design primer candidates from the 16S rRNA gene that can identify *Nesolagus netscheri* species specifically and efficiently. Sequence data of several species of the Leporidae family were taken from GeneBank, then the sequences were aligned and primer candidates were selected based on the conserved regions formed. The selected primer candidates were paired and analyzed for specificity and tested for primer parameters. The results of 16S rRNA primer design obtained 9 candidate primer pairs. The results of the specificity test with reference to the ideal primer parameter standards obtained the best primer candidates recommended are primer 16S-04, primer 16S-05 and primer 16S-06 which have met all the ideal primer parameters except the parameters of the secondary structure of the self-dimer. This secondary structure produced can be optimized by performing optimization during validation tests in the laboratory so that primer pairs can be obtained with maximum results for the identification of *Nesolagus netscheri* species in the 16S rRNA marker gene.

Keywords: Primer design, 16S rRNA gene, *Nesolagus netscheri*

HALAMAN PERSEMBAHAN

Kupersembahkan skripsi ini untuk:

- ♥ *Allah SWT*
- ♥ *Diriku sendiri*
- ♥ *Kedua orang tuaku yang selalu support dan menyayangiku selama 21 tahun ini*
- ♥ *Ketiga saudaraku yang selalu mendoakanku*
- ♥ *Sahabat – sahabat terbaikku*
- ♥ *Almamaterku*

MOTTO

“ dan aku belum pernah kecewa dalam berdoa kepada-Mu, Ya Allah ”

[Q.S. Maryam: 4]

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT. yang telah memberikan Rahmat serta Karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul **“Desain Primer untuk Amplifikasi PCR secara *In Silico* Gen 16S rRNA pada Kelinci Belang (*Nesolagus netscheri*) Asal Sumatera Selatan”**. Shalawat beserta salam semoga selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW serta pengikutnya hingga akhir zaman. Dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis dengan senang hati menyampaikan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Taufik Marwa, selaku Rektor Universitas Sriwijaya.
2. Bapak Prof. Hermansyah selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam beserta jajaran pengurus Dekanat lainnya.
3. Bapak Prof. Arum Setiawan, M.Si selaku Ketua Jurusan sekaligus Pembimbing I yang selalu memberikan arahan, saran, dan motivasi selama penulis membuat skripsi.
4. Bapak Dr. Sarno, M.Si selaku sekretaris jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya.
5. Bapak Prof. Dr. rer.nat. Indra Yustian, M.Si selaku Pembimbing II yang selalu memberikan arahan, saran dan motivasi serta semangat selama perkuliahan dan penyusunan skripsi.
6. Ibu Dr. Laila Hanum, M.Si dan Ibu Dra. Muharni, M.Si selaku dosen pembahas yang telah memberikan saran, kritik dan masukan kepada

penulis dalam penyusunan skripsi ini.

7. Seluruh Dosen beserta staf Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya yang telah memberikan bantuan selama proses penyusunan skripsi.
8. Kedua orang tuaku serta seluruh keluarga tercinta yang selalu memberikan semangat, dukungan, dan motivasi kepada penulis untuk terus berjuang menyelesaikan skripsi ini.
9. Semua sahabat-sahabatku yang selalu mendukungku dan menyemangatiku dan merangkulku selama kuliah. Nana, Deva dan teman-teman *healing*-ku Dil, Meep, Ky, Jrul, Ji, Din dan Sang yang sudah berbagi keseruan bersama terutama dimasa-masa semesterakhir penulis.
10. Manusia yang tidak bisa penulis sebutkan namanya dalam part kali ini, terimakasih banyak sudah mmeberi warna yang cukup membuat perjalanan tugas akhir penulis penuh dengan roller coaster dan jatuh bangunnya.

Dalam penulisan skripsi ini tentunya terdapat banyak kekurangan dari berbagai spek, mulai dari kualitas maupun kuantitas dari materi penelitian yang disajikan. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna sehingga penulis membutuhkan kritik dan saran yang bersifat membangun untuk kemajuan Pendidikan di masa yang akan datang.

Indralaya, Mei 2024

Aulia Putri Syafaat
NIM. 08041182025015

DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN	i
HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI	ii
RINGKASAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Kelinci Belang Sumatera (<i>Nesolagus netscheri</i>).....	6
2.1.1. Klasifikasi dan Karakteristik.....	6
2.1.2. Habitat dan Persebaran.....	9
2.1.3. Status Konservasi.....	11
2.2. DNA Mitokondria (mtDNA).....	12
2.3. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	16
2.4. Primer Amplifikasi DNA.....	17
2.4.1. Panjang Primer.....	18
2.4.2. Komposisi Primer.....	19
2.4.3. Primer Melting Temperature (T_m).....	20
2.4.4. Struktur Sekunder.....	21
2.5. Desain Primer.....	22
BAB III METODE PENELITIAN	24
3.1. Waktu dan Tempat.....	24
3.2. Alat dan Bahan.....	24
3.3. Cara Kerja.....	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1. Kandidat Primer Gen 16S rRNA <i>Nesolagus netscheri</i>	29
4.2. Analisis Spesifitas Kandidat Primer Gen 16S rRNA Spesies <i>Nesolagus netscheri</i>	31
4.3. Analisis Primer Gen 16S rRNA Hasil Desain Secara <i>In Silico</i>	38
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1. Kesimpulan.....	41
5.2. Saran.....	41

DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Kriteria parameter primer yang baik (ideal).....	28
Tabel 4.1. Urutan basa Primer <i>forward</i> dan <i>reverse</i> gen 16S rRNA untuk spesies <i>Nesolagus netscheri</i>	29
Tabel 4.2. Sembilan kandidat pasangan primer gen 16S rRNA.....	30
Tabel 4.3 Spesies yang terjaring oleh kandidat pasangan primer 16S rRNA	31
Tabel 4.4. Kriteria Parameter Pasangan Primer 16S rRNA	33
Tabel 4.5. Hasil Uji PCR <i>In Silico</i> dengan <i>Software FastPCR</i>	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Nesolagus netscheri</i> dari Sumatera Selatan	6
Gambar 2.2 Peta Distribusi <i>Nesolagus Netscheri</i>	9
Gambar 2.3 Peta Genom DNA mitokondria (mtDNA) <i>Lepus</i>	14

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data sekuen gen 16S rRNA yang digunakan	50
Lampiran 2. Kombinasi sekuen pasangan primer	51
Lampiran 3. Daerah <i>conserved</i> desain primer 16S rRNA.....	52
Lampiran 4. Pengecekan Primer Gen 16S rRNA.....	54
Lampiran 5. Uji Spesifitas Primer menggunakan <i>Oligoanalyzer</i>	56
Lampiran 6. Uji PCR <i>In Silico</i> Menggunakan <i>FastPCR</i>	58

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kelinci Belang Sumatera (*Nesolagus netscheri*) termasuk salah satu satwa mamalia langka endemik di Pulau Sumatera dan dilindungi sejak 1972 (Noeridjito dan Maryanto, 2001; Setiawan *et al.*, 2022). Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Nomor P.106 Tahun 2018 mencatat *Nesolagus netscheri* termasuk satwa dilindungi dan berdasarkan IUCN termasuk ke dalam spesies *datadeficient* atau kurang data. Hal tersebut terjadi karena informasi mengenai Kelinci Belang Sumatera masih sangat terbatas, hanya ada sedikit catatan ekologi mengenai keberadaan *Nesolagus netscheri* (McCharty *et al.*, 2019).

Habitat *Nesolagus netscheri* yaitu berada di Taman Nasional Gunung Leuser di Sumatera bagian utara hingga Taman Nasional Bukit Barisan di Sumatera bagian selatan (Setiawan *et al.*, 2023). Pulau Sumatera telah kehilangan 7,54 juta ha atau 70% hutan primer dari tahun 1990 hingga 2010 (Margono *et al.*, 2012). Hasil penelitian Suyadi (2011) mengungkapkan bahwa Taman Nasional Bukit Barisan mengalami deforestasi antara tahun 1972 hingga 2006 dengan laju rata-rata 20 Km² per tahun atau sekitar 0,64% pertahun. Deforestasi yang terjadi mengakibatkan habitat asli *Nesolagus netscheri* semakin berkurang sehingga menimbulkan ancaman penurunan jumlah spesies Kelinci Belang Sumatera.

Populasi kelinci belang yang berhasil didata masih sangat terbatas. Kelinci belang pertama kali didokumentasikan tahun 1997 oleh J. Holden di Taman

Nasional Kerinci Seblat dan setelahnya hanya sedikit dokumentasi tambahan atau pengamatan langsung (Flora Fauna Indonesia, 1998). Hal tersebut terjadi karena adanya alih fungsi lahan menjadi kebun kopi dan masih lemahnya penegakan hukum terhadap kasus penebangan kayu secara ilegal (Suyadi, 2011).

Data genetik mengenai kelinci belang masih sangat terbatas. Penelitian Nguyen (2021) tentang analisis genetik kelinci belang menggunakan metode DNA turunan invertebrata (iDNA) berhasil mendeteksi adanya kelinci belang di lima wilayah dari delapan wilayah penelitian melalui iDNA Lintah hematophagous terestrial. Penelitian tentang *Nesolagus Netscheri* sebelumnya sudah pernah berhasil diidentifikasi menggunakan gen 12S rRNA yang bersumber dari satu individu *Nesolagus netscheri* asal Pagar Alam dan berhasil mendeteksi 1 band amplikon 900 bp hingga 1000 bp (Saputra *et al.*, 2019).

Informasi tentang keberadaan dan jumlah populasi serta informasi mengenai spesies *Nesolagus netscheri* masih sangat sedikit dan jarang. Hal tersebut dikarenakan spesies *Nesolagus netscheri* sangat jarang ditemukan di alam, sehingga perlu adanya konservasi yang dilakukan, salah satunya yaitu melalui konservasi genetik dari *Nesolagus netscheri*. Teknik molekuler menjadi salah satu strategi yang dapat diterapkan dalam konservasi yang menyediakan informasi mengenai pewarisan gen dalam individu hingga bisa mengetahui perbedaan garis keturunan antar spesies (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Penggunaan gen 16S rRNA sebagai penanda dalam menentukan keterkaitan evolusioner pertama kali diusulkan oleh Carl Woese karena gen tersebut ada di semua organisme (Olsen dan Woese, 1993). Gen 16S rRNA memiliki ukuran

yang relatif besar dengan panjang sekitar 1550 bp dan memiliki daerah yang dilestarikan atau *conserved regions* dan juga daerah *hypervariable*, yaitu bagian dari 16S rRNA yang membedakan antar organisme. Penelitian mengenai spesies *Nesolagus netscheri* menggunakan metode PCR *in vitro* pada gen 16S rRNA sebelumnya sudah pernah dilakukan menggunakan primer yang bersumber dari Rodrigues *et al.* (2019) dengan hasil panjang basa yang belum memenuhi standar gen 16S rRNA yaitu hanya sekitar 171 panjang basa saja.

Kajian molekuler dan publikasi data sekuen dari spesies *Nesolagus netscheri* masih sangat terbatas. Oleh karena itu perlu dilakukan desain primer dengan tujuan mendapatkan primer yang spesifik untuk amplifikasi DNA spesies *Nesolagus netscheri* melalui pendekatan *in silico*. Keberhasilan amplifikasi DNA bergantung pada keakuratan primer yang digunakan dan primer yang digunakan harus bisa membatasi daerah yang akan diamplifikasi (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Efisiensi, dan sensitivitas amplifikasi DNA metode PCR dipengaruhi oleh penggunaan primer dan *annealing* yang digunakan (yang *et al.*, 2013).

Primer harus didesain spesifik untuk menjamin keberhasilan proses amplifikasi DNA pada proses PCR (Purwakasih dan Achyar, 2021). Sepasang primer harus mempunyai karakter yang baik agar dapat menempel pada gen target sehingga menghasilkan produk PCR yang spesifik. Urutan primer harus memenuhi beberapa kriteria dan dapat dirancang secara *in silico* serta mensimulasikannya menggunakan PCR *in silico*, yaitu merancang atau mendesain primer dengan bantuan suatu program dalam komputer dan studi literatur (Muhsinin *et al.*, 2018). Desain primer sebagai langkah penting dalam semua

metode amplifikasi DNA dan diperlukan untuk memastikan amplifikasi urutan target yang spesifik dan efisien (Kalendar, 2022).

1.2. Rumusan Masalah

Strategi yang tepat dalam upaya konservasi Kelinci Belang Sumatera menjadi agenda utama dalam upaya untuk mencegah terjadinya kepunahan pada Kelinci Belang Sumatera, salah satunya melalui kajian molekuler menggunakan PCR. Penelitian menggunakan PCR memerlukan penggunaan primer yang spesifik dan tepat. Analisis molekuler spesies *Nesolagus netscheri* belum tersedia urutan primer yang spesifik sehingga perlu dilakukan penelitian tentang desain primer gen 16S rRNA spesies *Nesolagus netscheri*. Analisis secara genetika diharapkan dapat memberikan informasi mengenai genetik *Nesolagus netscheri* sehingga dapat menjadi data tambahan untuk strategi konservasi kedepannya.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan kandidat primer untuk amplifikasi secara *in silico* serta mengetahui panjang sekuen amplifikasi secara *in silico* menggunakan kandidat primer yang telah didesain pada gen 16S rRNA spesies *Nesolagus netscheri* asal Sumatera Selatan

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai kandidat primer gen 16S rRNA dari Kelinci Belang asal Sumatera Selatan sehingga dapat dijadikan sumber referensi untuk penggunaan primer pada proses amplifikasi DNA spesies *Nesolagus netscheri* asal Sumatera Selatan.

BAB II

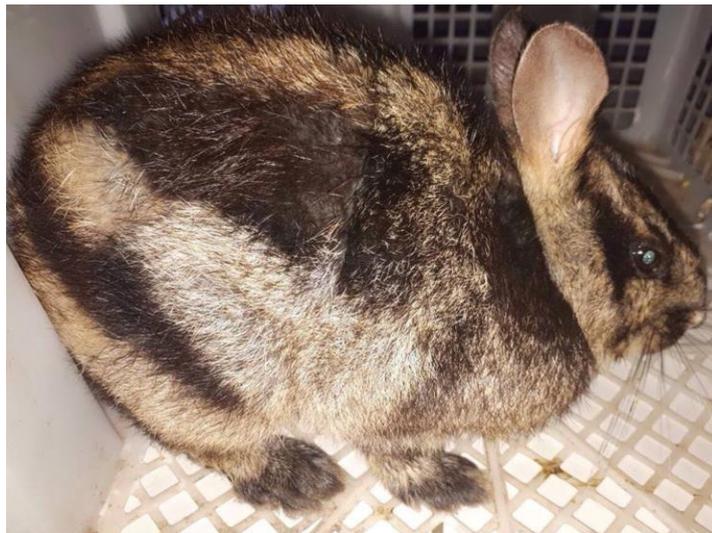
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kelinci Belang Sumatera (*Nesolagus netscheri*)

2.1.1. Klasifikasi dan Karakteristik

Klasifikasi dari kelinci belang yang ditemukan di Sumatera, Indonesia menurut Schlegel (1880) adalah sebagai berikut (McCarthy *et al.*, 2019).

Kingdom : Animalia
Divisi : Chordata
Kelas : Mamalia
Ordo : Lagomorpha
Famili : Leporidae
Genus : *Nesolagus*
Spesies : *Nesolagus netscheri*



Gambar 2.1 *Nesolagus netscheri* dari Sumatera Selatan (Setiawan *et al.*, 2019)

Nama spesies jenis *Nesolagus* awalnya diusulkan oleh Schlegel dan Jentink (1880) sebagai *Lepus netscheri* setelah mempelajari kelinci belang dari Sumatera. Akan tetapi, Forshyth (1899) mendirikan genus baru yaitu *Nesolagus* dan merevisi *Lepus netscheri* sebagai *Nesolagus netscheri* karena struktur tengkorak dan giginya yang berbeda dari Leporidae lainnya dimana anggota tubuhnya jauh lebih pendek daripada *Lepus*. *Nesolagus netscheri* dideskripsikan pertama kali tahun 1880 dari spesimen yang di kumpulkan oleh E. Netscher di Dataran Tinggi Padang di Sumatera Barat (Flux, 1990).

Kelinci Belang dengan genus *Nesolagus* terdiri dari tiga spesies yang berhasil ditemukan di dunia, antara lain *Nesolagus timminsi* yang ditemukan di Pegunungan Annam dan dikategorikan sebagai hewan terancam punah oleh IUCN pada tahun 2019 (Tilker *et al.*, 2019), *Nesolagus netscheri* yang ditemukan di Pegunungan Sumatera dan *Nesolagus sinensis* yang terkonfirmasi keberadaannya sudah punah (Jin *et al.*, 2010). *Nesolagus netscheri* adalah mamalia endemik Sumatera yang bersifat nokturnal. *Nesolagus netscheri* termasuk ke dalam keluarga Leporidae dimana famili Leporidae terdiri dari 11 genus dan salah satunya adalah *Nesolagus* (Wilson dan Reeder, 2005).

Kelinci Belang Sumatra memiliki tubuh yang relatif kecil, memiliki garis-garis kecoklatan dengan telinga berwarna hitam, bagian dalam kakinya berwarna keputihan, ekor berwarna merah, dan bawah perutnya berwarna putih dengan individu muda menunjukkan warna yang sedikit gelap (Schai-Braun dan K. Häcklander, 2016). Berdasarkan hasil penelitian Setiawan *et al.* (2019), warna kelinci muda belang Sumatera dari gunung Dempo sama dengan kelinci yang

telah dewasa, hanya saja warna kelinci belang muda terlihat jauh lebih gelap dibandingkan dengan individu dewasa.

Morfometri dari kelinci belang Sumatera yaitu panjang kepala dan tubuh 368-417 mm, ekor 17 mm, kaki belakang 67-87 mm, telinga 34-45 mm, panjang tengkorak 67-74 mm dan telinga yang sangat pendek dengan memiliki berat tubuh 1,5 kg. Umumnya *Nesolagus netscheri* memiliki ukuran yang sama dengan kelinci Eropa *Oryctolagus cuniculus*, akan tetapi dapat dibedakan dari ukuran kepala *Nesolagus netscheri* yang lebih besar serta moncong dan kakinya yang lebih pendek. Ekor pada *Nesolagus netscheri* juga sangat pendek sehingga biasanya tidak terlihat (Flux, 1990; Francis, 2001; Setiawan *et al.*, 2018).

Makanan yang disukai *Nesolagus netscheri* berdasarkan hasil pelaporan penduduk setempat pada penelitian Setiawan *et al.* (2018) yaitu berupa daun muda yang berdaging, terutama tanaman dengan batang ungu kemerahan. Jenis tanaman yang diindikasikan sebagai makanan kelinci belang yaitu *Cyrtandra* yang tersebar luas di hutan basah di Sumatera. Hasil penelitian Abramov *et al.* (2016) terhadap *Nesolagus timminsi* di taman Nasional Pu Mat, Vietnam memperlihatkan bahwa kelinci belang memakan beberapa pucuk tanaman bahkan daun-daun yang berguguran. Hasil penelitian (Flux, 1990) diduga *Nesolagus netscheri* memakan *Elatostema* sp, *Godonoboea platypus*, dan daun muda *Capsicum Annuum*.

Jumlah dari individu Kelinci Belang Sumatera yang sedikit dan jarang nya penampakan dari genus *Nesolagus* sehingga tidak banyak informasi tersedia mengenai perilakunya. Secara keseluruhan sangat sedikit informasi yang

diketahui tentang hewan dengan genus ini. Kelinci Belang Sumatera aktif di malam hari dan bersembunyi di liang yang tidak dibuatnya sendiri melainkan menempati liang bekas hewan lain dan tidak terlalu suka keluar mencari makan di tempat yang terlalu jauh dari rumahnya (McCarthy *et al.*, 2019).

2.1.2. Habitat dan Persebaran



Gambar 2.2. Peta Distribusi *Nesolagus Netscheri* (McCarthy *et al.*, 2019)

Nesolagus netscheri menempati hutan lebat dengan ketinggian 600-1.400 mdpl (Flux, 1990). Kelinci Belang Sumatera pernah ditemukan di hutan dataran rendah pada tahun 1997 dan satu individu kelinci belang berhasil terekam oleh kamera jebakan tahun 2011 di hutan dataran rendah pada ketinggian 544 mdpl di Ipuh Provinsi Bengkulu (McCarthy *et al.*, 2019). Habitat *Nesolagus netscheri*

berupa hutan dengan tanah vulkanik yang subur dan menempati bekas liang hewan lain sebagai tempat istirahatnya (Jin *et al.*, 2010). Karakteristik habitat *Nesolagus netscheri* yaitu hutan dengan struktur vegetasi yang rapat dan belum tercatat kelinci belang hidup di kawasan terbuka (McCarthy *et al.*, 2019).

Catatan mengenai Kelinci Belang Sumatera pertama kali dideskripsikan tahun 1972 oleh M. Borner di Taman Nasional Gunung Leuser. Taman Nasional Kerinci Seblat dan Taman Nasional Bukit Barisan Selatan diindikasikan menjadi habitat utama dari *Nesolagus netscheri*. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya frekuensi penemuan Kelinci Belang Sumatera yang lebih banyak terjadi (McCarthy *et al.*, 2019). Tahun 1978 dilaporkan adanya penemuan Kelinci Belang Sumatera di daerah dekat Gunung Kerinci oleh J. Seidensticker (Flux, 1990).

Bulan September tahun 2021 terdapat penemuan terbaru Kelinci Belang Sumatera yang telah dilaporkan di daerah Kabupaten Rejang Lebong Provinsi Bengkulu. BKSDA Bengkulu menerima dua ekor *Nesolagus netscheri* berjenis kelamin jantan dengan umur kurang lebih satu bulan dari masyarakat setempat. Kelinci belang tersebut kemudian dikembalikan ke alam liar setelah empat bulan di penangkaran BKSDA (Setiawan *et al.*, 2022). Kelinci Belang Sumatera pernah dilaporkan penemuannya di Suaka Margasatwa Gunung Raya yaitu Kelinci Belang Sumatera muda dan Kelinci Belang Sumatera dewasa dimana individu muda terlihat jauh lebih gelap daripada dewasa (Setiawan *et al.*, 2018).

Suaka Margasatwa Isau-Isau menjadi salah satu lokasi ditemukannya *Nesolagus netscheri*. Dokumentasi mengenai kelinci belang berhasil didapatkan yaitu sebanyak delapan rekaman dari hewan tersebut, tiga diantaranya yang

berhasil didokumentasikan dari *camera trap* dan tiga informasi dari hasil wawancara dengan masyarakat setempat dari tahun 1995 hingga 2022. Informasi yang berhasil dihimpun berupa karakteristik lokasi ditemuinya Kelinci Belang Sumatera atau oleh penduduk setempat dan jenis tumbuhan yang pernah dimakan oleh *Nesolagus netscheri* (Setiawan *et al.*, 2023).

2.1.3. Status Konservasi

Nesolagus netscheri termasuk dalam daftar satwa yang dilindungi sejak 1972 (Noeridjito dan Maryanto, 2001; Setiawan *et al.*, 2022) berdasarkan Peraturan Pemerintah No. 7 tahun 1999. Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Nomor P.106. Tahun 1994, *Nesolagus netscheri* ditetapkan statusnya sebagai *Endangered* oleh IUCN. Dua tahun kemudian status Kelinci Belang Sumatera berganti menjadi *Critically Endangered* dan pada tahun 2008 IUCN menetapkan status konservasi Kelinci Belang Sumatera menjadi *Vulnerable* (Vu; Rentan) (Meijaard dan Sugardjito, 2008).

Informasi tentang ekologi dari spesies *Nesolagus netscheri* yang masih sedikit sehingga IUCN menetapkan kembali status dari Kelinci Belang Sumatera sebagai *Data Deficient* atau kurang data. Informasi mengenai Kelinci Belang Sumatera yang masih sangat terbatas menyebabkan adanya keterbatasan dalam menentukan distribusi spesies, perkiraan kepadatan spesies dan juga populasi dari spesies langka *Nesolagus netscheri*. Penebangan hutan secara ilegal dan alih fungsi hutan menjadi perkebunan kopi yang dilakukan masyarakat menjadi ancaman utama bagi Kelinci Belang Sumatera yang sangat bergantung pada habitat dengan vegetasi hutan yang rapat (McCarthy *et al.*, 2019).

2.2. DNA Mitokondria (mtDNA)

Organisme yang hidup pasti mempunyai DNA sebagai sumber informasi di dalam jaringan tubuh. DNA merupakan singkatan dari Deoxyribo Nucleic Acid yang terdapat di dalam inti sel. DNA adalah molekul yang mengandung semua materi genetik yang diperlukan oleh semua organisme dalam siklus hidupnya. Struktur DNA yang unik menyerupai tangga berpilin yang memiliki dua rantai polinukleotida. DNA tersusun atas pasang basa adenin (A), timin (T), uanin (G), dan sitosin (C). Pasang basa adenin (A) berpasangan dengan timin (T) dengan dua ikatan hidrogen, sedangkan Sitosin (C) berpasangan dengan guanin (G) yang memiliki tiga ikatan hidrogen (Campbell, 2003).

DNA pada organel sel terbagi menjadi dua yaitu DNA inti dan DNA mitokondria. Mitokondria adalah organel seluler yang mampu menghasilkan energi dalam bentuk ATP melalui fosforilasi oksidatif (Ng dan Turnbull, 2015). Setiap sel mengandung ratusan hingga ribuan mitokondria yang terletak di sitoplasma. Mitokondria memiliki sejumlah kecil DNA sendiri yang dikenal sebagai DNA mitokondria atau mtDNA. mtDNA berbeda dengan DNA inti pada lokasi, urutan, kuantitas dalam sel, dan cara pewarisannya (Satiyarti *et al.*, 2017).

DNA mitokondria merupakan DNA ekstrakromosom yang berukuran panjang sekitar 16,5 kb hingga 20 kb dan tidak memiliki intron. DNA mitokondria memiliki rantai DNA ganda berupa rantai untai berat (H) yang kaya akan basa purin (G dan A) dan untai ringan (L) yang kaya akan basa pirimidin (C dan T) (Habbane *et al.*, 2021). Sel bisa memiliki 1.000 hingga 10.000 kopi mtDNA lebih banyak dibandingkan DNA inti. Laju mutasi yang lebih tinggi juga terjadi pada

DNA mitokondria yaitu 10-17 kali lebih cepat dibandingkan DNA inti yang disebabkan karena mtDNA tidak memiliki protein histon dan juga enzim untuk perbaikan kesalahan dalam proses replikasi, hal tersebut menyebabkan mtDNA lebih mudah terjadi mutasi (Yudianto, 2020).

DNA mitokondria terdiri dari daerah *coding region* sebesar 90% dan *non coding region* sebesar 10%. mtDNA mengandung 37 gen pengkode atau *coding region* yaitu 13 gen pengkode protein berupa 7 subunit untuk NADH *dehydrogenase*, 1 sub unit sitokrom b, 3 sub unit COI dan 2 subunit ATP sintase. Gen lainnya yaitu 22 gen digunakan untuk translasi DNA mitokondria yang terdiri dari 2 gen rRNA untuk sintesis protein (12 rRNA, dan 16 rRNA). Proporsi basa nukleotida antara DNA mitokondria dan DNA inti juga berbeda, mtDNA mengandung GC sebesar 21% sedangkan DNA inti mengandung basa nukleotida GC sebesar 40%. DNA mitokondria *Non control region* tidak menyandi gen tetapi sebagai daerah pengontrol yaitu disebut D-loop (Maksum, 2017).

Keunikan dari mtDNA yaitu terdapat informasi genetik yang diwariskan dari induk betina secara maternal tanpa adanya rekombinasi DNA dari induk jantan sehingga DNA mitokondria memiliki daerah *conserved* yang bisadigunakan dalam analisis studi evolusi, hubungan kekerabatan dan analisis genetik lainnya pada hewan karena merupakan refleksi dari filogenetika dari garis keturunan induk betina (Vidya *et al.*, 2009). Sifat mtDNA yang diwariskan hanya dari ibu digunakan untuk melacak sejarah evolusi dan asal usul suatu organisme sehingga bisa digunakan dalam mempelajari hubungan antar spesies serta merekonstruksi pohon filogenetika (Rahayu dan Jannah, 2019).

Daerah penanda 16S rRNA merupakan komponen dari subunit kecil ribosom yang dikodekan oleh genom mitokondria dengan panjang gen hampir 1570 bp (Chen *et al.*, 2011). S pada 16S RNA menyatakan *Svedberg* yaitu satuan ukuran ribosom (Clarridge, 2004). 16S rRNA sangat diperlukan untuk penerjemahan mRNA menjadi protein mitokondria dan sebagai penanda genetik untuk mengidentifikasi hewan invertebrata, mamalia, unggas menggunakan primer universal (Yang *et al.*, 2014). Penggunaan gen 16S rRNA sebagai penanda dalam menentukan keterkaitan evolusioner pertama kali diusulkan oleh Carl Woese karena gen tersebut ada di semua organisme (Olsen dan Woese, 1993).

Gen 16S rRNA memiliki ukuran yang relatif besar yaitu dengan panjang sekitar 1550 bp dan memiliki daerah yang dilestarikan atau *conserved regions* dan juga daerah *hypervariable*, yaitu bagian dari 16S rRNA yang membedakan antar organisme. Gen 16S rRNA bersifat polimorfisme interspesifik. Primer yang biasa digunakan sebagai pengkode daerah 16S rRNA yaitu primer universal. Daerah *conserved* akan dikenali oleh primer dan daerah *hypervariable* akan teramplifikasi oleh primer universal yang digunakan. Daerah lestari pada gen pengkode 16S rRNA sangat terkonservasi pada spesies hewan yang berbeda sehingga bisa menggunakan primer universal untuk amplifikasi PCR (Clarridge, 2004).

Urutan gen 16S rRNA utuh terdiri dari sembilan wilayah hipervariabel yang dipisahkan oleh wilayah yang sangat dilestarikan. Pada beberapa penelitian, rangkaian gen 16S rRNA yang digunakan hanya berupa rangkaian parsial dikarenakan adanya keterbatasan dalam teknologi apabila pembacaan secara utuh. Oleh karena itu, pemilihan primer yang digunakan menjadi sangat penting agar

pembacaan sekuen menjadi lebih akurat (Yang *et al.*, 2014).

2.3. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) atau reaksi polimerase berantai merupakan teknik dari amplifikasi DNA atau perbanyakan DNA secara *in vitro* yang dapat mengidentifikasi spesies secara molekuler pada level DNA dalam jumlah yang banyak (Fakih *et al.*, 2021). Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Satu molekul DNA dapat diperbanyak dua kali lipat dalam satu kali siklus suhu (Maksum *et al.*, 2017).

PCR memiliki proses siklus yang berulang meliputi proses denaturasi, *annealing* dan tahapan ekstensi oleh enzim polimerase. Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat untai DNA baru dari ujung -5' menuju ujung 3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan. Dasar siklus PCR ada 30-35 siklus meliputi *Pra-denaturation*, *Denaturation* (95⁰C), *Annealing* (55-60⁰C), *Extension* (72⁰C), dan *post-extension*. Tahap kedua sampai dengan keempat merupakan tahapan berulang, dimana pada setiap siklus akan terjadi duplikasi jumlah DNA. Waktu yang digunakan dalam proses PCR tergantung dari ukuran amplikon DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Prinsip kerja PCR didasarkan pada kemampuan enzim DNA polimerase dalam mensintesis untai DNA baru yang merupakan komplementer dari *DNA template* (Mullis *et al.*, 1994). Komponen utama reaksi PCR terdiri dari *template DNA*, primer yang didesain, enzim DNA polimerase dan nukleotida (dNTP)

(Handoyo dan Rudiretna, 2001). Konsep teknologi PCR mensyaratkan bahwa bagian tertentu sekuen DNA yang akan dilipatgandakan harus diketahui urutan nuklotidanya terlebih dahulu sebelum proses pelipatgandaan tersebut dapat dilakukan yaitu primer. Proses PCR membutuhkan dua jenis primer yaitu primer *forward* dan primer *reverse* yang akan mengamplifikasi DNA dengan arah yang berlawanan (Rahayu dan Jannah, 2019).

Proses PCR bisa dilakukan secara *wet lab* atau secara langsung di laboratorium dan *dry lab* yaitu memanfaatkan teknologi berbasis simulasi PCR secara *in silico*. *In silico* PCR bertujuan untuk mendapatkan hasil simulasi PCR secara teoritis menggunakan genom spesies tertentu sehingga bisa memungkinkan amplifikasi DNA secara spesifik dengan hasil yang baik (Alsamman *et al.*, 2019). Penelitian menggunakan PCR secara *in silico* dapat digunakan untuk memprediksi kemampuan pasangan primer secara teoritis dan bisa memperkuat fragmen gen yang ditargetkan menggunakan acuan sekuen yang ada di *database*. Kelebihandari PCR secara *in silico* juga dapat mengurangi trial dan eror pada saat melakukan penelitian secara *wet lab* nantinya (Ruslan *et al.*, 2011).

2.4. Primer Amplifikasi DNA

Primer merupakan potongan DNA pendek utas tunggal (oligonukleotida), dan sebagai bahan esensial yang diperlukan dalam PCR dan komplemen dengan urutan gen target. Primer berfungsi untuk menginisiasi dan untuk membatasi daerah yang akan diamplifikasi pada reaksi PCR. Primer berperan sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan dilipatgandakan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' agar DNA polimerase dapat memperpanjang

untaian DNA dengan menambahkan *building block* DNA (dNTP) (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Mendapatkan suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk digunakan pada proses amplifikasi DNA dapat dilakukan desain primer secara *in silico* (Suryadi *et al.*, 2014).

Primer memegang peranan penting dalam proses PCR. Primer akan menempel pada sekuen yang sesuai dengan basa komplementer dan DNA *taq polimerase* akan bekerja membentuk utas DNA baru (Rahman *et al.*, 2013). Primer yang bagus untuk proses PCR memiliki rangkaian basa nukleotida yang unik pada *template* tersebut, sehingga tidak terdapat pada *sequence* atau lokasi lain pada *template* (Sari, 2018). Perancangan primer dilakukan berdasarkan sekuens basa atau asam amino yang konservatif. Tingkat konservatif dapat diperoleh melalui penjajaran beberapa sekuens. Keberhasilan proses PCR sangat bergantung pada primer yang digunakan (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

2.4.1. Panjang Primer

Primer yang digunakan dalam satu kali PCR yaitu sebanyak dua jenis primer, yaitu primer *forward* dan primer *reverse*. Panjang primer ideal umumnya berkisar antara 18-30 basa sehingga primer bisa berhibridisasi dengan sekuen target pada suhu *annealing* dengan baik. Primer yang memiliki jumlah basa yang terlalu pendek dapat mengalami penempelan primer ditempat lain yang tidak diinginkan atau *mispriming* sehingga dapat mengurangi spesifitasnya dan berakibat pada efektifitas serta efisiensi pada proses PCR. Primer yang terlalu panjang bisa menyebabkan penurunan efisiensi penempelan primer dengan sekuen *template* (Paneto dan Careta, 2014).

Panjang primer lebih dari 30 basa menyebabkan penempelan primer menjadi tidak spesifik pada DNA target (Nastiti dan Kuncara, 2023). Primer yang digunakan semakin panjang maka amplikon yang dihasilkan akan semakin sedikit karena proses pemanjangan amplikonnya membutuhkan waktu yang lebih lama dan menyebabkan pada biaya produksi yang juga bisa lebih besar (Fakih *et al.*, 2021). Primer yang panjang dapat berakibat terhibridasi dengan primer lain sehingga tidak membentuk polimerisasi DNA (Sasmito *et al.*, 2014).

2.4.2. Komposisi Primer

Primer yang didesain harus menghindari urutan dinukleotida yang sama (*repeats*) karena dapat menurunkan spesifitas dan meningkatkan kemungkinan terjadinya *mispriming*. Pengulangan (*runs*) lebih dari empat basa dengan basa yang sama harus dihindari karena dapat menyebabkan terjadinya *mispriming*, sehingga proses penempelan primer menjadi sulit. Urutan pengulangan primer sebaiknya tidak lebih dari 2 basa dengan maksimum pengulangan yang masih dapat ditoleransi yaitu sebanyak 4 kali. Keberadaan *run* dan *repeat* pada urutan primer dapat menyebabkan *mispriming* pada proses PCR. Secara umum, *run* dan *repeat* yang ditoleransi maksimal berjumlah empat (Sasmita *et al.*, 2018).

Persentase kandungan guanin dan sitosin dalam primer sebanyak 40% sampai 60% karena jika terlalu rendah diperkirakan tidak akan bisa secara efektif menempel pada target yang diinginkan sehingga efisiensi proses PCR menjadi menurun, sedangkan kandungan GC yang tinggi akan meningkatkan suhu T_m serta suhu *annealing* PCR (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Basa G dan C lebih stabil dalam mengikat *template* karena mempunyai 3 ikatan hidrogen

dibandingkan basa A dan T yang memiliki 2 ikatan hidrogen. Persentase GC atau kandungan jumlah basa G dan C dapat mempengaruhi T_m yang dimiliki suatu primer (Sari, 2018).

Beberapa program desain primer mensyaratkan pasangan primer yang didesain mengandung basa G dan C pada 5 basa terakhir di ujung 3' untuk membantu primer berikatan secara spesifik dengan *template*. Akan tetapi, hanya maksimal 3 basa G atau C yang diperlukan untuk menghindari ujung 3' melipat membentuk struktur dimer yang bisa mengakibatkan ujung 3' primer tidak terikat pada *template* (abd-Elsalam, 2003).

2.4.3. Primer Melting Temperature (T_m)

Suhu *annealing* berkaitan dengan suhu *melting temperature* (T_m) pada primer yang digunakan untuk proses PCR. Suhu T_m diperlukan oleh primer untuk mengalami disosiasi atau lepas ikatan sehingga primer bisa mengenali DNA targetnya yang komplementer. *Melting temperature* mempengaruhi proses PCR dimana suhu leleh yang terlalu tinggi mengakibatkan rendahnya tingkat hibridisasi primer dengan *template* sehingga menurunkan efisiensi dari reaksi PCR. Selisih suhu leleh pada pasangan primer sebaiknya tidak lebih dari 5°C untuk proses amplifikasi yang baik (Sasmito *et al.*, 2014).

Secara teoritis T_m suatu primer dapat ditentukan dengan rumus $[2(A+T)+4(G+C)]$. Nilai T_m berkisar antara 50-62°C. T_m mengindikasikan stabilitas hibrida sehingga juga menentukan suhu penempelan dalam PCR. Suhu *annealing* pada primer dapat dihitung berdasarkan rumus 5°C dibawah suhu T_m sampai dengan 5°C di atas suhu T_m . Suhu *annealing* yang digunakan perlu diperhatikan

agar kemungkinan *misspriming* dapat dihindari dan keberhasilan suatu proses PCR ditentukan oleh eksperimen secara langsung (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Primer yang dibuat berupa primer dengan pembacaan dua arah DNA yaitu primer *forward* dan primer *reverse*. Desain primer dibuat dengan ketentuan persentase GC dari masing-masing primer harus berada pada kisaran 40% sampai 50%. Suhu *annealing* PCR akan dipengaruhi oleh kandungan basa guanin dan sitosin yang memiliki tiga ikatan hidrogen karena itu membutuhkan banyak energi dan panas untuk memutuskannya (Maitrtiani *et al.*, 2016).

2.4.4. Struktur Sekunder

Reaksi PCR sebaiknya terbebas dari struktur sekunder seperti *hairpin*, *self-dimer* dan *hetero-dimer*. *Hairpins* merupakan interaksi intramolekuler dalam primer yang menempel pada dirinya sendiri sehingga membentuk struktur sekunder (Chuang *et al.*, 2013). Struktur sekunder mengakibatkan primer tidak dapat menempel dengan template DNA. *Hairpins* dalam primer dapat mengganggu proses penempelan primer pada *template* (Borah, 2011). Primersebaiknya tidak memiliki basa timin pada ujung 3'-nya karena dapat menyebabkan *mismatch* yang dapat menyebabkan *hairpin* (Sasmito *et al.*, 2014).

Self Dimer terjadi apabila terbentuk ikatan pada dua primer yang sejenis (Saraswati *et al.*, 2019). Primer yang berikatan dengan primer pasangannya disebut sebagai *hetero-dimer*. Struktur dimer yang terbentuk pada produk PCR dapat terjadi karena primer memiliki banyak basa komplementer. Jika ikatan basa komplementer yang terbentuk lebih stabil dibandingkan dengan ikatan primer dan *template* maka primer tidak dapat berikatan dengan *template* sehingga produk

PCR yang dihasilkan akan berkurang secara signifikan (Sasmito *et al.*, 2014). Jika ikatan dimer ini terlalu kuat, akan mengganggu proses perpanjangan DNA dan akan menghasilkan konsentrasi DNA yang rendah (Saraswati *et al.*, 2019).

2.5. Desain Primer

Desain primer sebagai langkah awal yang sangat penting dalam proses amplifikasi dan analisis segmen DNA menggunakan PCR karena primer tersebut yang akan berhibridisasi pada DNA *template* dan mengamplifikasi DNA target. Sepasang primer oligonukleotida menempel pada DNA target tergantung pada suhu yang digunakan pada tahapan *annealing* (Medrano dan Oliveira, 2014). Urutan basa nukleotida primer yang didesain harus berkomplemen dengan urutan basa nukleotida *template*. Studi secara *in silico* merupakan gabungan dari beberapa ilmu seperti ilmu biologi dan komputasi yang dioperasikan menggunakan komputer serta perangkat lunak yang salah satunya dapat dimanfaatkan untuk merancang sebuah kandidat primer (Padhi *et al.*, 2020).

Studi perancangan primer merupakan kajian awal yang memudahkan pekerjaan molekuler terhadap suatu gen menggunakan PCR dan menghemat tenaga, uang, serta waktu daripada uji coba PCR berulang-ulang di laboratorium. Salah satu peran paling signifikan dari bioinformatika adalah untuk merancang dan menghasilkan sekuen primer sebagai bahan amplifikasi DNA (Septiari *et al.*, 2015). Desain primer adalah langkah penting dalam semua jenis metode amplifikasi DNA dan diperlukan untuk memastikan amplifikasi urutan target yang spesifik dan efisien agar menghasilkan produk PCR yang baik (Kalendar, 2022).

Desain primer bisa diperoleh dari hasil penelitian yang telah dipublikasi

seperti yang telah tersedia di *GeneBank* atau dengan menggunakan perangkat lunak yang bisa memberikan rekomendasi primer dalam waktu yang singkat. Perangkat lunak yang biasa digunakan seperti *Genamics expression, primer 3, Bioedit, NCBI* dan lainnya (Camilo, 2016). Metode dalam desain primer dibagi menjadi dua yaitu desain primer spesifik untuk mengamplifikasi gen target dan desain primer *degenerate* yang digunakan untuk mengamplifikasi gen dari suatu spesies baru atau desain primer yang diperoleh dari hasil penerjemahan asam amino menjadi basa nukleotida (Utomo *et al.*, 2019).

Publikasi penelitian sudah banyak yang membahas desain primer dalam bidang molekuler khususnya sekuensing DNA. Penggunaan DNA parsial dalam pengenalan dan identifikasi jenis secara molekuler dapat dianggap sah dan dalam analisis kekerabatan makhluk hidup (Suparman *et al.*, 2016). Desain primer sudah pernah dilakukan pada beberapa penelitian seperti Astari *et al.* (2021) yang melakukan perancangan primer untuk deteksi kandungan gen *cyt-b* pada babi. Hal yang sama juga dilakukan oleh Fakhri *et al.* (2021) yang mendesain primer secara *in silico* untuk mendeteksi gen 12S rRNA dari DNA mitokondria *Sus scrofa*.

Penelitian yang dilakukan Nguyen (2021) berhasil mengidentifikasi spesies *Nesolagus timminsi* melalui perancangan pasangan primer spesifik dengan memanfaatkan DNA turunan invertebrata (iDNA) dan memperoleh dua primer spesifik untuk gen 16S rRNA. Desain primer yang tepat adalah salah satu faktor yang paling penting dalam keberhasilan sekuensing DNA (Maitriani *et al.*, 2014).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan September sampai April 2024 bertempat di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian berupa laptop dengan koneksi internet stabil, *notepad*, *software* desain primer (UGENE 50.0 dari Unipro, *OligoAnalyzer* 3.1 dari Integrated DNA technologies, *Primer-Blast* dari NCBI dan *FastPCR* 6.9.11 dari PrimerDigital).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah data sekuen gen 16S rRNA famili Leporidae yang diambil dari *Genebank*.

3.3. Cara Kerja

Penelitian yang dilakukan menggunakan analisis bioinformatika dan uji coba PCR secara *in silico*. Pengambilan dan pengolahan data bersumber dari data yang tersedia di *GenBank* NCBI.

3.3.1. Pengambilan Data Sekuen Gen Mitokondria *Nesolagus netscheri*

Desain primer gen 16S rRNA dimulai dengan diunduh beberapa sekuen DNA gen 16S rRNA spesies yang berada dalam satu genus dan satu famili yang tersedia di GenBank yaitu *Nesolagus timminsi* (NC_063946.1), *Sylvilagus*

bachmani (DQ334837.1), *Sylvilagus floridanus* (DQ334836.1), *Lepus timidus* (DQ334832.1), *Lepus europaeus* (DQ334835.1), *Lepus californicus* (DQ334834.1), *Lepus americanus* (DQ334833.1), *Lepus arcticus* (DQ334831.1) dan *Lepus othus* (DQ334830.1). Pemilihan data sekuen didasarkan atas ketersediaan data yang ada di *genebank* dan mempertimbangkan jumlah panjang basa yang dimiliki oleh data sekuen. Pengunduhan gen mitokondria *Nesolagus netshceri* dilakukan dalam format Fasta (.txt) dengan mengakses *database* NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Sekuen yang sudah dicari selanjutnya disimpan dengan cara *dicopy* file fasta sekuen, kemudian aplikasi *Notepad* dibuka dan di-*paste*, data sekuen yang sudah di-*copy* akan muncul pada aplikasi *Notepad*. Di dalam *Notepad* tersebut tersimpan 9 sekuen yang sudah di-*copy*, kemudian file di-*save*. File yang dihasilkan berekstensi *.fasta.

3.3.2. Desain Primer

Primer yang sudah disimpan dalam format FASTA dibuka menggunakan *software Unipro UGENE*, kemudian sekuen di-*alignment* menggunakan program *Muscle* di *Unipro UGENE*. *Unipro UGENE* digunakan dalam bioinformatika untuk mengelola, menganalisis dan memvisualisasikan objek biologi seperti anotasi DNA/RNA dan protein, penyejajaran sekuen dan lain-lain (Okonechnikov *et al.*, 2012). Setelah file di-*alignment* kemudian dilakukan pemilihan kandidat primer berdasarkan daerah *conserved* sekuen secara manual. Primer *reverse* yang sudah dipilih secara manual dilakukan *reverse complement* sehingga didapatkan urutan basa primer *reverse*.

3.3.3. Pengecekan Kandidat Primer secara *In Silico*

Kandidat primer yang diperoleh selanjutnya dipasangkan antara primer *forward* dan *reverse* dan dilakukan pengecekan ulang untuk melihat apakah kandidat pasangan primer yang telah dirancang dapat menempel pada spesies target berdasarkan data yang ada di *Genebank* menggunakan *Primer-Blast*. Sekuens kandidat primer akan dibandingkan dengan *database* nukleotida yang terdapat di *GenBank* NCBI (Rodríguez *et al.*, 2015).

Situs *Primer-Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) dibuka, kemudian pada menu *primer parameters* diisi sekuens pasangan primer (*forward* dan *reverse*). Setelah itu, pada menu *primer pair specificity checking parameters* dipilih sumber *database non redundant* (nr), nama organisme (*Nesolagus netscheri*) dan yang lainnya dibiarkan secara *default*. Tombol “*Get Primer*” dipilih untuk menjalankan sistem *Primer-Blast*. Prinsip kerja *Primer-Blast* yaitu primer yang telah dibuat akan menempel pada potongan-potongan gen yang telah ada di *genebank*. Penggunaan *Primer-Blast* ini merupakan simulasi untuk melihat potongan primer yang telah didesain bisa atau tidak mengenai sasaran gen yang ditargetkan saat proses amplifikasi (Suparman *et al.*, 2016).

3.3.4. Analisis Spesifitas Primer

Spesifitas primer dianalisa menggunakan *software OligoAnalyzer* dari *Integrated DNA Technologies* (IDT) 3.1 dan diakses pada *website* (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) yang mengacu pada kriteria parameter ideal primer (tabel 3.1). Pengujian dilakukan dengan cara diketik urutan primer satu persatu di tempat pencarian kemudian diklik menu *analyze* untuk

memulai pengujian primer. *Software OligoAnalyzer* memiliki beberapa parameter struktur sekunder yang bisa diuji dengan cara dipilih opsi sesuai dengan jenis parameter yang akan dicari, kemudian diklik opsi *analyze*. *Software OligoAnalyzer* biasanya digunakan untuk menentukan parameter primer seperti panjang primer, persentase basa guanin dan sitosin, suhu leleh (T_m), berat molekul, *hairpin*, *self dimer* dan *heterodimer* (Pazdernik, 2012).

3.3.5. Pengujian Primer pada PCR *In Silico*

Desain primer selanjutnya dilakukan pengujian PCR secara *in silico* berbasis web menggunakan *software FastPCR*. Pengujian dilakukan dengan cara pada menu dipilih opsi PCR *in silico*. Pada opsi *sequence* diisi dengan data sekuen pembanding yang diambil dari *GeneBank*. Opsi *Pre-designed primer list* diisi dengan primer yang akan dilakukan pengujian. Kemudian diklik *run* pada menu untuk memproses PCR secara *in silico*. Hasil pengujian dapat dilihat pada opsi *in silico PCR result*, tertera informasi posisi nukleotida tempat primer menempel, panjang produk PCR, *mismatch*, suhu T_m dan beberapa informasi lainnya. Primer spesifik target akan ditampilkan jika berhasil secara *in silico* beserta dengan spesifitas dari primer (Kalendar, 2022). Primer dianalisis untuk mengetahui posisi akurat dari penempelan primer yang didesain dan panjang produk yang dihasilkan secara bioinformatika dengan mengacu pada data sekuen yang terdapat pada *GeneBank* (Bustin dan Huggett, 2017).

3.4. Analisis Data

Data sekuen hasil penelitian dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan mendeskripsikan rancangan primer *Nesolagus netscheri* yang baru, menilai serta

menseleksi primer berdasarkan parameter primer yang baik dengan mengacu pada referensi yang ada (Tabel 3.1) serta menilai kemampuan primer dalam megamplifikasi DNA secara *in silico* menggunakan *software FastPCR*.

Tabel 3.1 Kriteria parameter primer yang baik (ideal)

Parameter	Kriteria ideal	Referensi
Panjang primer	18-24 bp	(Hung dan Weng, 2016)
%GC	40-60%	(Chuang <i>et al.</i> , 2013)
GC clamp	1-3 basa	(Morozov <i>et al.</i> , 2019)
	50-62°C	(Chuang <i>et al.</i> , 2013)
Suhu leleh (T _m)	(selisih T _m <i>forward</i> dan <i>reverse</i> maksimal 5°C)	(Sasmitha <i>et al.</i> , 2014)
Suhu penempelan (T _a)	3-5°C dibawah suhu leleh (T _m) (45-57°C)	(Green dan Sambrook, 2019)
<i>Hairpin</i>	ΔG lebih dari -2 kcal/mol (ujung 3' end) ΔG lebih dari -3 kcal/mol (<i>internal</i>)	(Iquebal <i>et al.</i> , 2015)
<i>Self-dimer</i> dan <i>Heterodimer</i>	ΔG lebih dari -5 kcal/mol (<i>internal</i>) ΔG lebih dari -6 kcal/mol (ujung 3'end)	(Iquebal <i>et al.</i> , 2015)
<i>Run & Repeat</i>	Tidak lebih dari 4 pengulangan	(Sasmitha <i>et al.</i> , 2018)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kandidat Primer Gen 16S rRNA *Nesolagus netscheri*

Data sekuen gen 16S rRNA dari famili Leporidae merupakan bahan utama yang diperlukan sebagai *DNA template* untuk desain primer. Setelah dilakukan pencarian pada *GenBank* NCBI, didapatkan 9 data sekuen gen 16S rRNA (Lampiran 1). Pemilihan kandidat primer berasal dari data sekuen dengan tingkat homologi tinggi yang ditandai dengan *highlight* gelap pada nukleotidanya (Lampiran 3). Setelah dilakukan pemilihan primer secara manual, didapatkan 3 primer *forward* dan 3 primer *reverse*. Menurut Sihotang *et al.* (2021), penentuan kandidat primer dipilih dengan mempertimbangan kriteria primer seperti panjang basa nukleotida, %GC, suhu T_m serta struktur sekunder. Urutan basa primer gen 16S rRNA yang telah didesain secara manual dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Urutan basa Primer *forward* dan *reverse* gen 16S rRNA untuk spesies *Nesolagus netscheri*

Nama Primer	Sekuen Primer (5'-3')	Letak basa nukleotida	Panjang basa (bp)
435F	CTAAAGAGGGACAGCTCTTTAG	435-456	22
516F	GCAGCCATCAATTAAGAAAGCG	516-537	22
604F	TAACTGGACTAATCTATAAA	604-623	20
1369R	CTTCAATAGCGGTTGCACCA	1369-1389	20
1346R	GGATGTCCTGATCCAACATC	1346-1365	20
1322R	CGTAAACCCTATTGTCGATG	1322-1341	20

Keterangan: 435F (*forward*); 1369R (*reverse*)

Primer *forward* diambil dari daerah awal sekuen pada ujung 5' dan kandidat primer *reverse* diambil dari daerah akhir sekuen pada ujung 3' yang

conserved. Posisi basa nukelotida pemilihan primer dihitung berdasarkan sekuen terpanjang dari data yang digunakan yaitu dengan panjang 1507 bp pada spesies *Nesolagus timminsi* (NC_063946.1). Panjang kandidat primer yang didesain memiliki kisaran 20-22 basa. Menurut Hung dan Weng (2016), panjang primer tersebut termasuk kedalam kriteria panjang basa primer ideal karena berkisar antara 18-24 basa. Handoyo dan Rudiretna (2001) menambahkan bahwa Panjang primer lebih dari 30 basa akan mengakibatkan terjadi proses hibridasi dengan primer lain sehingga akan menghambat terbentuknya polimerasi DNA.

Berdasarkan hasil pemilihan urutan primer secara manual, kandidat pasangan primer didapatkan dengan mengkombinasikan primer *forward* dan *reverse* sehingga didapatkan sembilan pasangan primer untuk gen target 16SrRNA spesies *Nesolagus netscheri* (tabel 4.2). Sembilan kandidat primer tersebut diseleksi kembali sesuai dengan beberapa kriteria primer yang baik untuk proses PCR. Menurut Sasmito *et al.* (2014), keberhasilan dalam melakukan proses amplifikasi DNA menggunakan PCR sangat dipengaruhi oleh karakteristik primer yang digunakan.

Tabel 4.2. Sembilan kandidat pasangan primer gen 16S rRNA

Nama Primer	Sekuen Primer <i>Forward</i> (5'-3')	Sekuen Primer <i>Reverse</i> (3'-5')
16S-01	CTAAAGAGGGACAGCTCTTTAG	CTTCAATAGCGGTTGCACCA
16S-02	CTAAAGAGGGACAGCTCTTTAG	GGATGTCCTGATCCAACATC
16S-03	CTAAAGAGGGACAGCTCTTTAG	CGTAAACCCTATTGTCGATG
16S-04	GCAGCCATCAATTAAGAAAGCG	CTTCAATAGCGGTTGCACCA
16S-05	GCAGCCATCAATTAAGAAAGCG	GGATGTCCTGATCCAACATC
16S-06	GCAGCCATCAATTAAGAAAGCG	CGTAAACCCTATTGTCGATG
16S-07	TAACTGGACTAATCTATAAA	CTTCAATAGCGGTTGCACCA
16S-08	TAACTGGACTAATCTATAAA	GGATGTCCTGATCCAACATC
16S-09	TAACTGGACTAATCTATAAA	CGTAAACCCTATTGTCGATG

Tabel 4.3 Spesies yang terjaring oleh kandidat pasangan primer 16S rRNA

Kandidat primer	Spesies Terjaring	Nomor Akses
16S-01	<i>Nesolagus timminsi mitochondrion, complete genome</i>	>NC_063946.1
16S-02	<i>Nesolagus timminsi mitochondrion, complete genome</i>	>NC_063946.1
16S-03	<i>Nesolagus timminsi mitochondrion, complete genome</i>	>NC_063946.1
16S-04	<i>Nesolagus timminsi mitochondrion, complete genome</i>	>NC_063946.1
16S-05	<i>Nesolagus timminsi mitochondrion, complete genome</i>	>NC_063946.1
16S-06	<i>Nesolagus timminsi mitochondrion, complete genome</i>	>NC_063946.1
16S-07	<i>Nesolagus timminsi mitochondrion, complete genome</i>	>NC_063946.1
16S-08	<i>Nesolagus timminsi mitochondrion, complete genome</i>	>NC_063946.1
16S-09	<i>Nesolagus timminsi mitochondrion, complete genome</i>	>NC_063946.1

Hasil pengecekan menggunakan program *Primer-BLAST* menunjukkan primer yang didesain bisa membaca urutan nukleotida yang sama dengan data sekuen spesies *Nesolagus timminsi* yang tersedia di *Genebank*. Spesies lain yang tidak terjaring oleh kandidat pasangan primer disebabkan karena jumlah *mismatches* yang banyak dan juga kurangnya data sekuen yang tersedia pada *genebank*. Spesies *Nesolagus netscheri* masih belum banyak tersedia urutan basa pada *Genebank* terutama pada gen penanda 16S rRNA. Menurut Fernandes (2013), *mismatches* dengan lebih dari tiga dalam satu primer dapat menghambat proses pemanjangan primer sehingga produk PCR tidak dapat terbentuk.

4.2. Analisis Spesifitas Kandidat Primer Gen 16S rRNA Spesies *Nesolagus netscheri*

Pasangan primer hasil desain primer untuk spesies *Nesolagus netscheri* diuji lebih lanjut berdasarkan parameter primer ideal primer menggunakan program *OligoAnalyzer*. Hasil analisis kriteria kandidat pasangan primer terdapat pada tabel 4.3. Berdasarkan hasil analisis kriteria pasangan primer menunjukkan

bahwa primer 16S-04, 16S-05 dan primer 16S-06 merupakan pasangan primer dengan parameter terbaik karena memenuhi semua kriteria kecuali 1 parameter yaitu *self dimer*. Sifat-sifat kesembilan kandidat primer menunjukkan kelebihan dan kelemahan tersendiri dan memiliki potensi terbentuknya dimer. Menurut Green dan Sambrook (2018), potensi terjadinya struktur dimer dapat diatasi dengan memodifikasi kondisi PCR secara *in vitro*.

Primer 16S-04 memenuhi kriteria desain primer yang baik dan ideal dengan panjang primer 20-22 bp, suhu T_m 55°C - $55,8^\circ\text{C}$, kandungan GC 45,5%, - 50% dengan selisih nilai T_m yaitu $0,8^\circ\text{C}$. Struktur sekunder dari primer 16S-04 memenuhi kriteria untuk *hairpin* dan *hetero-dimer*, akan tetapi struktur sekunder *self dimer* tidak memenuhi kriteria karena energi bebasnya kurang dari nilai standar *self dimer*. Menurut Hall *et al.* (2010), nilai energi bebas struktur sekunder secara teori tidak dapat ditoleransi, akan tetapi secara praktisi keadaan tersebut dapat diatasi dengan pengoptimalan prosedur dan kondisi amplifikasi tertentu.

Pasangan primer *forward* dan *reverse* 16S-05 memenuhi kriteria primer yang ideal dengan panjang primer 20-22 bp, %GC 45,5% - 50%, suhu T_m 55°C - $55,8^\circ\text{C}$ dengan selisih nilai T_m yaitu $2,1^\circ\text{C}$. Selisih T_m antara primer *forward* dan *reverse* yang paling baik yaitu tidak lebih dari 5°C . Menurut Sasmito *et al.* (2014), jika selisih nilai T_m lebih dari 5°C dapat menyebabkan terjadinya penurunan efisiensi proses amplifikasi. Primer dengan T_m terlalu tinggi dan melebihi 70°C akan mengalami *mispriming* pada temperatur yang rendah dan akan membentuk ikatan yang terlalu kuat antar DNA *template* dan primer sehingga mengakibatkan produk PCR yang dihasilkan menjadi rendah.

Tabel 4.4. Kriteria Parameter Pasangan Primer 16S rRNA

Nama Pasangan Primer		Panjang Primer (bp)	%GC (%)	GC Clamp	T _m (°C)	T _a	Hairpin (kcal.mole ⁻¹)	Self Dimer (kcal.mole ⁻¹)	Hetero-dimer	Run	Repeat
16S-01	435F	22	45.5	1	52.3	47.3	-4.56*	-9.62*	-4.74	3	2
	1369R	20	50	3	55.8		-1.3	-7.05*		-	2
16S-02	435F	22	45.5	1	52.3	47.3	-4.56*	-9.62*	-7.94*	3	2
	1346R	20	50	2	52.9		-1.78	-6.35*		-	-
16S-03	435F	22	45.5	1	52.3	45.7	-4.56*	-9.62*	-7.74*	3	2
	1322R	20	45	3	50.7		0.35	-6.76*		3	-
16S-04	516F	22	45.5	3	55	50	0.82	-5.36*	-5.09	3	-
	1369R	20	50	3	55.8		-1.3	-7.05*		-	2
16S-05	516F	22	45.5	3	55	47.9	0.82	-5.36*	-5	3	-
	1346R	20	50	2	52.9		-1.78	-6.35*		-	-
16S-06	516F	22	45.5	3	55	45.7	0.82	-5.36*	-5.37	3	-
	1322R	20	45	3	50.7		0.35	-6.76*		3	-
16S-07	604F	20	25*	-	42.1	37.1	0.4	-3.4	-5.02	3	2
	1369R	20	50	3	55.8		-1.3	-7.05*		-	2
16S-08	604F	20	25*	-	42.1	37.1	0.4	-3.4	-6.6*	3	2
	1346R	20	50	2	52.9		-1.78	-6.35*		-	-
16S-09	604F	20	25*	-	42.1	37.1	0.4	-3.4	-3.07	3	2
	1322R	20	45	3	50.7		0.35	-6.76*		3	-

Keterangan: *(tidak memenuhi kriteria parameter ideal primer)

Primer 16S-06 juga masuk kedalam kategori primer yang ideal kecuali pada parameter *self-dimer* memiliki nilai maksimal energi bebas yang bisa dihasilkan masih dibawah nilai standar. Energi bebas pada *self dimer* harus lebih besar dari -6 kcal/mol (Fakih *et al.*, 2021). Primer 16S-06 memiliki energi bebas *self dimer* lebih kecil dari -6 kcal/mol, akan tetapi masih mendekati nilai maksimal energi bebas yang baik dengan selisih angka sebesar -0.76 kcal/mol. Parameter lainnya pada primer 16S-06 telah memenuhi ketentuan standar primer yang baik. Salah satunya yaitu selisih suhu T_m antara primer *forward* dan primer *reverse* berdasarkan hasil analisis *OligoAnalyzer* sebesar $4,3^{\circ}\text{C}$.

Persentase GC pada pasangan primer 16S-01 sampai 16S-06 memenuhi %GC karena berada pada rentang 40-60%. %GC yang diperoleh pada kandidat primer 16S-04 dan 16S-05 yaitu 45,5% untuk *froward* dan 50% pada primer *reverse*. Primer *forward* pada primer 16S-07, 16S-08 dan 16S-09 tidak memenuhi kriteria %GC karena hanya terdapat 25% kandungan basa Guanin dan Sitosin. Primer dengan kandungan GC% yang rendah menurut Handoyo dan Rudiretna (2001) dapat menurunkan efisiensi proses PCR yang disebabkan karena primer tidak mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada *template*. Hal serupa disampaikan juga oleh So *et al.* (2020) bahwa G dan C memiliki lebih banyak ikatan hirogen sehingga bersifat lebih stabil dibandingkan basa A dan T.

Kandungan basa GC pada primer 604F *forward* tidak memenuhi standar persentase kandungan GC karena hanya terdapat 25% GC dari 20 basa pada primer tersebut. Persentase GC mempengaruhi nilai T_m suatu primer dan ikatan antara untai pada DNA. Hal tersebut sesuai dengan hasil nilai T_m yang dimiliki

primer 604F yaitu hanya sebesar $42,1^{\circ}\text{C}$ sehingga meimbulkan selisih nilai T_m yang jauh antara primer *forward* dan primer *reverse* pada primer 16S-07, 16S-08, dan 16S-09 sehingga ketiga primer tersebut tidak termasuk kategori primer ideal. Menurut Maitriani *et al.* (2016), persentase GC pada desain primer akan mempengaruhi nilai T_m dan ikatan antar untai DNA karena proses pemutusan ikatan hidrogen basa G dan C membutuhkan suhu dan energi yang besar.

Kriteria *GC clamp* pada semua pasangan primer memenuhi kriteria dengan maksimal *GC clamp* yang dimiliki yaitu 3 pada ujung 3'end. Keberadaan basa guanin dan sitosin di ujung 3' membantu terbentuknya stabilitas ikatan antara primer dengan DNA *template* yang diperlukan untuk menginisiasi pemanjangan untai DNA karena memiliki 3 ikatan hidrogen (ThermoFisher, 2016). Disampaikan juga oleh Mardalisa *et al.* (2021) jika *GC clamp* yang terlalu banyak pada ujung 3'end dapat menyebabkan terjadinya *mispriming* dan pembentukan struktur sekunder. Yustianadewi *et al.* (2018) menyampaikan bahwa GC dengan lebih dari 5 basa akan menurunkan spesifitas primer dikarenakan basa adenin dan timin lebih toleran terhadap *mismatch* dibandingkan basa guanin dan sitosin.

Berdasarkan dari segi komposisi primernya, basa adenin atau timin pada ujung primer 3'end dari primer perlu dihindari seperti pada primer 604F (AAA), karena basa adenin atau timin lebih rentan terhadap *mismatch* daripada guanin atau sitosin. Oleh karena itu, keberadaan guanin atau sitosin di ujung 3' primer sangat membantu kestabilan ikatan antara primer dengan DNA *template* untuk proses inisiasi. Menurut Saraswati dan Wahyuni (2019), ikatan antara basa G dan C adalah ikatan yang kuat karena terdiri dari 3 ikatan hidrogen.

Proses amplifikasi seharusnya tidak mengandung *secondary structure* berupa *hairpin*, *hetero-dimer* dan *self-dimer* karena dapat menyebabkan primer tidak dapat menempel pada DNA *template*. Struktur sekunder dapat berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas produk PCR, hal ini dikarenakan kemampuan primer menempel akan berkurang pada *template*. Menurut Astari *et al.* (2021), stabilitas struktur sekunder ditentukan oleh energi bebas (ΔG) yang diperlukan untuk memecah struktur sekunder yang terbentuk pada primer.

Nilai ΔG pada struktur *hairpin* yang diperoleh kandidat pasangan primer 16S-04 memenuhi standar nilai *hairpin* yaitu -0,82 kcal/mol untuk primer *forward* dan -1.3 kcal/mol pada primer *reverse*. Struktur *hairpin* tersebut dapat dipecah menggunakan energi bebas yang dihasilkan. Sasmito *et al.* (2014) menyatakan bahwa struktur sekunder *hairpin* dapat dipecah jika ΔG lebih besar dari -3 kcal/mol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandidat primer 16S-04 membentuk struktur sekunder *hairpin*, namun dapat dengan mudah dipecah karena memiliki nilai ΔG yang lebih besar dari -3 kcal/mol. *Hairpin* yang stabil dapat menyebabkan primer terlipat membentuk struktur *loop* sehingga primer yang terlipat tidak dapat menempel pada DNA *template*.

Energi bebas *self dimer* yang diperoleh pada 9 kandidat pasangan primer tidak ada yang memenuhi standar nilai *self dimer* kecuali primer 604F yaitu -3,4 kcal/mol. *Self dimer* yang terbentuk pada kandidat primer tidak dapat dipecah karena energi bebas yang dihasilkan terlalu kecil dari nilai energi bebas yang ideal. *Self dimer* yang stabil menurut Fatmawati dan Panjaitan (2022) akan menyebabkan primer yang sejenis berikatan satu sama lain sehingga primer tidak

bisa mengamplifikasi sekuen target. Menurut Sasmito *et al.* (2014), ΔG yang diperlukan untuk memecah *self dimer* lebih besar dari -6 kcal/mol.

Struktur sekunder *Heterodimer* yang terbentuk pada pasangan primer 16S-02, 16S-03 dan 16S-08 tidak dapat dipecah karena energi bebas yang dihasilkan terlalu kecil yaitu dibawah -6 kcal/mol. Primer 16S-04 dan 16S-05 memiliki energi bebas *heterodimer* lebih besar dari nilai standar yaitu -5.09 kcal/mol dan -5 kcal/mol secara berturut-turut sehingga energi bebas tersebut bisa memecah ikatan yang terjadi jika suatu primer berikatan dengan primer pasangannya. Menurut Iquebal *et al.* (2015), ikatan *Self dimer* dan *heterodimer* dapat dipecah dengan energi bebas lebih dari -5 kcal/mol apabila ikatan yang terbentuk berada diujung 3' end dan lebih dari -6 kcal/mol apabila ikatan berada di tengah primer.

Faktor lain yang harus diperhatikan dalam memilih primer yang baik yaitu pada spesifitas primer seperti *repeats* atau pengulangan pada nukleotida secara berurutan dan *runs*. Menurut Anika *et al.* (2019), primer yang baik tidak boleh terdapat pengulangan 4 kali bahkan lebih *repeats* dan *runs* agar tidak terjadi *falsepriming* atau kesalahan penempelan primer pada suhu *annealing* dan produk yang diinginkan tidak sesuai. Primer 16S-04, 16S-05 dan 16S-06 masih memenuhi kriteria *repeats* dan *runs* dimana maksimal *repeats* dan *runs* yang terjadi yaitu 3 kali pengulangan.

Jumlah pengulangan (*run*) pada primer 516F dan 604F yaitu 3 pengulangan basa adenin (AAA) dan pada primer 435F terjadi 3 kali pengulangan pada basa adenin, guanin dan timin serta pengulangan 3 kali basa adenin dan sitosin pada primer 1322R. Pengulangan tersebut masih termasuk kedalam kisaran

ideal *run* yang diperbolehkan yaitu maksimal 4 kali pengulangan. Menurut Fatmawati dan Panjaitan (2022), *run* dan *repeat* yang tinggi dengan lebih dari 4 pengulangan dapat menyebabkan terjadinya *mispriming* sehingga DNA *polymerase* membuat salinan yang salah pada produk ampikon PCR.

Pasangan primer 16S-05 dan 16S-06 tidak terdapat *repeats* sama sekali pada basa nukleotidanya dimana tidak terdapat pengulangan basa secara berurutan pada primer yang didesain. Maksimal *repeats* yang terbentuk pada kandidat pasangan primer yang didesain yaitu sebanyak 2 pengulangan yang berarti semua primer yang didesain telah memenuhi kriteria primer ideal pada parameter *repeats*. Menurut Sasmito *et al.* (2014), *repeats* yang berjumlah lebih dari 4 kali perlu dihindari karena dapat menyebabkan terbentuknya struktur *hairpins*.

4.3. Analisis Primer Gen 16S rRNA Hasil Desain Secara *In Silico*

Hasil PCR secara *in silico* menunjukkan kandidat pasangan primer yang telah didesain dapat menempel pada beberapa sekuen genom yang diambil dari *GeneBank* dengan estimasi panjang produk PCR yang beragam (tabel 4.4). Primer 16S-04 dapat menempel pada sekuen genom *Nesolagus timminsi* pada nukleotida ke 516 sampai 537 pada primer *forward* dan posisi nukleotida ke 1357 sampai 1376 pada primer *reverse* dengan tingkat *mismatch* sebesar 0%. Menurut Purwakasih dan Achyar (2021), PCR *in silico* digunakan untuk mensimulasikan dan memprediksi penempelan primer pada sekuen DNA *template* yang ada, sehingga bisa meminimalisir kesalahan pada saat melakukan PCR secara *in vitro*.

Pengujian kandidat pasangan primer menggunakan *software FastPCR* tidak ditemukan adanya kecocokan dengan spesies *Nesolagus netscheri* karena

data sekuen gen 16S rRNA spesies tersebut belum tersedia di *database GeneBank*. Estimasi panjang amplicon yang bisa terbentuk berkisar antara 727 sampai 942 pasang basa dengan data acuan dari data sekuen *Nesolagus timminsi*. Menurut Noer *et al.* (2021), panjang urutan gen 16S rRNA sekitar 1.550 bp dimana primer akan mengamplifikasi daerah gen 16S rRNA dan diperoleh amplicon berukuran parsial dari 16S rRNA.

Tabel 4.5. Hasil Uji PCR *In Silico* dengan *Software FastPCR*

Nama Primer	Panjang Amplicon (bp)
16S-01	942
16S-02	919
16S-03	894
16S-04	861
16S-05	838
16S-06	813
16S-07	779
16S-08	752
16S-09	727

Kandidat primer yang didesain memiliki urutan yang sama dengan sekuen dari spesies lain pada famili Leporidae dengan persentase kecocokannya 95% sampai dengan 100%. Persentase tersebut menggambarkan seberapa besar *mismatch* yang terjadi pada primer dengan DNA *template*. Semakin besar persentase yang dihasilkan, maka primer yang digunakan memiliki kecocokan yang semakin besar, begitu juga sebaliknya. Menurut Zahrani *et al.* (2022), primeryang baik memiliki rangkaian nukleotida yang unik sehingga tidak menempel pada organisme lain. Berdasarkan hasil yang terdapat pada tabel dan didukung dengan parameter primer ideal, pasangan primer 16S-04, 16S-5 dan 6S-06 cukup baik untuk digunakan pada proses PCR.

Panjang amplicon dari masing-masing kandidat primer menandakan estimasi panjang basa produk yang dapat dihasilkan saat amplifikasi menggunakan PCR secara *in vitro*. Panjang amplicon dari amplifikasi tergantung pada tujuan penelitian sehingga pemilihan primer juga dapat disesuaikan dengan data sekuen awalnya. Daerah yang akan diamplifikasi yaitu gen penanda 16S rRNA spesies *Nesolagus netscheri*. Menurut Fakhri *et al.* (2021), panjang amplicon dengan metode PCR menunjukkan suatu panjang basa yang dihasilkan dalam proses pemanjangan DNA. Hasil dari pengujian PCR *in silico* bisa digunakan sebagai tolak ukur keberhasilan dalam amplifikasi DNA.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Pasangan primer yang diusulkan untuk identifikasi spesies *Nesolagus netscheri* dari penelitian ini yaitu pasangan primer 16S-04, 16S-05 dan 16S-06 walaupun masih belum memenuhi satu parameter struktur sekunder yaitu *self-dimer*. Pasangan primer tersebut dapat menjaring spesies *Neolagus timminsi* yang merupakan satu genus dengan *Nesolagus netscheri* melalui uji PCR secara *in silico* dengan estimasi panjang produk primer 16S-04 sebesar 861 pasang basa dan 838 pasang basa untuk primer 16S-05 serta 813 untuk primer 16S-06. Struktur dimer yang kemungkinan dapat terbentuk pada proses PCR masih dapat diatasi dengan melakukan optimasi pada kondisi PCR secara *in vitro*.

5.2. Saran

Kandidat pasangan primer perlu dilakukan validasi secara *in vitro* sebagai salah satu tahap pengujian lanjutan sehingga didapatkan pasangan primer yang terbaik dari hasil desain primer untuk mengamplifikasi DNA dari spesies *Nesolagus netscheri*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elsalam K. A. (2003). Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design. *African Journal of Biotechnology*. 2(5): 91-95. doi: 10.5897/AJB2003.000-1019
- Abramov, A. V., Tikhonov, A. N. dan Orlov, N. L. (2016). Recent Record of Annamite Striped Rabbit *Nesolagus timminsi* (Mammalia, Leporidae) from Vietnam. *Russian Journal of Theriology*. 15(2): 171–174.
- Alsamman, A. M., Ibrahim, S. D., dan Hamwieh, A. (2019). KASPSpoon: an in vitro and in silico PCR analysis tool for high-throughput SNP genotyping. *Bioinformatics*. 35(17): 3187–3190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz004>
- Anika, M., Putri, D. H., dan Wahyuni. (2019). Primer design for identification of beta- carotene encoding genes in cassava. *Bio Sains*. 4(1): 39–47.
- Astari, D. D., Dewi, S. G., Setyaningrum, S., dan Lidya, B. (2021). Perancangan Primer untuk Deteksi Kandungan Gen Cytochrome b Babi dengan Metode Polymerase Chain Reaction dan Aplikasinya pada Berbagai Produk Industri. *Fullerene Journal of Chemistry*. 6(2): 110-117.
- Borah, P. (2011). Primer Design for PCR. *Science Vision*. 11(3): 134-136.
- Bustin, S., dan Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14(November), 19–28. doi: 10.1016/j.bdq.2017.11.001. PMID: 29201647; PMCID: PMC5702850.
- Campbell, N.A.(2003). *Biologi Edisi Kelima jilid II*. Jakarta: Erlangga.
- Chuang, L. Y., Cheng, Y. H., dan Yang, C. H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*. 35(10): 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Daigle, D., Simen, B. B., dan Pochart, P. (2011). High-throughput sequencing of PCR unit 7.5 products tagged with universal primers using 454 life sciences systems. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Issue 96). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0705s96>
- Diss, T. (2003). *The Polymerase Chain Reaction: Molekular Biology in Cellular Pathology*. United Kingdom: John Willey and Sons, Ltd.

- Ethica, S. N., Sulistyanyngtyas, A. R., dan Darmawati, S. (2019). In-silico specificity comparison between GMF-GMR and JMF-JMR primers for detecting moaC genes of food spoilage bacteria pseudomonas spp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 292(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/292/1/012033>
- Fakih, T. M., Wijaya, S., dan Priani, S. E. (2021). Desain Primer Gen 12S SRNA Dari DNA Mitokondria Babi (*Sus Scrofa*) Secara In Silico Sebagai Kandidat Primer Dalam Analisis Molekuler Kehalalan Produk. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 8(3): 316.
- Fatmawati, F., dan Panjaitan, R. S. (2022). Primer design of the cellulase gene from *Bacillus cereus*. *Journal Of Pharmacy And Biological Sciences*. 17(1): 17–21. <https://doi.org/10.9790/3008-1701021721>.
- Fauna and Flora International. (1998). *Rare rabbit and cat captured on film*. Fauna & Flora News: 3.
- Flux, J. E. C. (1990). *The Sumatran Striped Rabbit. in Rabbits, Hares and Pikas: Status Survey and Conservation Action Plan (eds J.A. Chapman & J.E.C. Flux)*. Halaman. 137–139. IUCN, Gland, Switzerland.
- Green, M. R., dan Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019(6): 436–456. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- Habbane, M., Montoya, J., Rhouda, T., Sbaoui, Y., Radallah, D., Emperador, S. (2021). Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases . *Biomedicines*. 9(10): 1364.
- Hall, J. D., Fucikova, K., Lo, C., A., Lewis, L., dan Karol, K. (2016). An Assessment of proposed DNA Barcode in Freshwater Green Algae. *Cryptogamie, Algologie*. 31(4): 529-555.
- Handoyo, D., dan Rudiretna, A. (2001). Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Pusat Studi Bioteknologi*. 9(1): 17–29.
- Hung, J. dan Weng, Z. (2016). Designing Polymerase Chain Reaction Primers Using Primer3Plus. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 821-826.
- Iquebal, M. A., Jaiswal, S., Mukhopadhyay, C. S., Sarkar, C., Rai, A., & Kumar, D. (2015). Applications of Bioinformatics in Plant and Agriculture. *In PlantOmics: The Omics of Plant Science (pp. 1–825)*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2172-2>

- Jin, C. Z., Tomida, Y., Wang, Y. dan Zhang, Y. Q. (2010). First Discovery of Fossil *Nesolagus* (Leporidae, Lagomorpha) from Southeast Asia. *Science China Earth Sciences*. 53(8): 1134–1140.
- Kalendar, Ruslan. (2022). *A Guide to Using FASTPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Analysis*. 10.1007/978-1-0716-1799-1_16.
- Kartika, A. I. (2018). Optimasi *Annealing Temperature Primer* mRNA RECK dengan Metode *One Step* qRT-PCR. *Jurnal Labora Medika*. 2(1): 22- 31.
- Maitriani, L. K. B., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (2016). Desain Primer Untuk Amplifikasi Fragmen Gen *Inha* Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (Mdr-Tb) dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Cakra Kimia (Indonesian Ejournal Of Applied Chemistry)*. 3(3): 89-95.
- Maksum, I. P. (2017). *PCR dalam Investigasi Penyakit Mitokondria*. Alqaprint Jatinangor: Bandung. ISBN 978-623-6523-71-1.
- Mardalisa, Suhandono, S., Yanti, N., Rozi, F., Nova, F., dan Primawati. (2021). Bioinformatic analysis in designing mega-primer in overlap extension PCR cloning (OEPC) technique. *International Journal on Informatics Visualization*. 5(2): 139–143. <https://doi.org/10.30630/joiv.5.2.459>
- Margono, B. A., Turubanova, S., Zhuravleva, I., Potapov, P., Tyukavina, A., Baccini, A., Goetz, S. dan Hansen, M. C. (2012). Mapping and Monitoring Deforestation and Forest Degradation In Sumatra (Indonesia) Using Landsat Time Series Data Sets From 1990 to 2010. *Environmental Research Letters*. 7(3):1-16. doi:10.1088/1748- 9326/7/3/034010.
- McCarthy, J., Holden, J., Martyr, D. dan McCarthy, K. (2019). *Nesolagus netscheri*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019: e.T14662A45178557. Accessed on 02 September 2023.
- Medrano RFV, De Oliveira CA. (2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol Biotechnol*. 56(7). <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9734-4>.
- Meijaard, E. dan Sugardjito, J. (2008). *Nesolagus netscheri*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. (2008). Available at: [www. iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (Access: 28 Agustus 2023)
- Muhsinin, S., Sulastri, M. M., dan Dadih, S. (2018). Deteksi Cepat Gen *InvA* pada *Salmonella* spp. dengan Metode PCRm. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. 5 (3): 23 – 26.

- Mullis, Kary.B, Francois Ferre, Richard A. Gibbs. (1994). *The Polymerase Chain Reactions*. Springer: New York.
- Nastiti, H. R.R., Kuncara, R. B.. (2023). Desain Primer Untuk Deteksi Gen *Diphtheria Toxin* Repressor (DtxR) Sebagai Biomarker Bakteri *Corynebacterium Diphtheriae* Menggunakan *In Silico* PCR. *Jaringan Laboratorium Medis*. 5(02): 136–143. 10.31983/jlm.v5i2.10588.
- Ng, Y. S. dan Turnbull, D.M. (2016). Mitochondrial disease: Genetics and management. *J. Neurol.* 263, 179–191.
- Nguyen, T. V., Tilker, A., Nguyen, A., Horig, L., Axtner, J., Schmidt, A., Le, M., Nguyen, A. H. Q., Rawson, B. M., Wilting, A. dan Fickel. J. (2021). Using Terrestrial Leeches to Assess the Genetic Diversity of an Elusive Species: The Annamite striped rabbit *Nesolagus timminsi*. *Environmental DNA*. 3(4): 780-791.
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri Secara Molekuler Menggunakan 16S rRNA. *Biological Science and Education Journal*. 1(1): 1-6.
- Noerdjito, M. dan Maryanto, I. (2001). *Jenis-jenis Hayati yang Dilindungi Perundang-undangan Indonesia*. Museum Zoologicum Bogoriense, LIPI, The Nature Conservancy dan USAID, Cibinong, 221 hal.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrov, D., Rasputin, K., Syabro, M., dan Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 28(8): 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.
- Olsen, G. J, dan Carl R. W. (1993). RNA : A Key to Phylogeny. *The FASEB Journal*. 7: 113–123.
- Padhi BK, Pelletier G, Shwed PS. (2020). A bioinformatics workflow for the evaluation of RT-qPCR primer specificity: Application for the assessment of gene expression data reliability in toxicological studies. *Regul Toxicol Pharmacol*. 111. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104575>
- Paneto, G. G., dan Careta, F. (2014). Designing primers for snapshot technique. In: Basu, C. (eds) PCR Primer Design. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1275, pp. 165–172). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_12

- Pazdernik, N. (2012). *The oligo analyzer™ tool*. Integrated DNA Technologies, Inc. <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/using-the-oligoanalyzer-program>.
- Pikoil, M. R., Syahda, M. N., Rahmah, F. A. dan Suharti. (2023). Analisis Gen *tufA* Secara *In Silico* untuk Primer Identifikasi Mikroalga *Trebouxiophyceae*. *Al-Kaunyah: Jurnal Biologi*. 17(1): 201-211.
- Purwakasih, D. B. Dan Achyar, A. (2021). Desain Primer dan PCR *In Silico* untuk Deteksi *Shigella* Sp. pada Sampel Air Minum Isi Ulang. *Serambi Biologi*. 6(1):1-6.
- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A. dan Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*. 4(1): 30–36. doi: 10.3329/akmmcjv4i1.13682.
- Rahayu, D. A. dan Jannah, M. (2019). *DNA Barcode Hewan dan Tumbuhan Indonesia*. Yayasan Indsporasi Ide berdaya: Jakarta.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., dan Andrade, M. J. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1275, vii.
- Ruslan, K., Lee, D., dan Schulman, A. H. (2011). Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*. 98: 137–144.
- Saputra, R. F., Setiawan, A., Yustian, I. dan Patriono, E. (2019). DNA Extraction of Sumatran Striped Rabbit from Tissue Samples. *Biovalentia: Biological Research Journal*. 5(2): 46–49.
- Saraswati, H., Seprianto, dan Wahyuni, F. D. (2019) Desain Primer Secara *In Silico* untuk Amplifikasi Gen *CryIII* dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 3(1): 33- 38.
- Sari, E. N., Dewi, R. W., Yowani, S. C., Yustiantara, P. S. (2018). Desain Primer untuk Amplifikasi Regio Promoter Gen *inhA* Isolat P016 Multidrug Resistance Mycobacterium tuberculosis dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Farmasi Udayana*. 7(1): 34.

- Sasmitha, L. V., Yustiantara, P. S., dan Yowani, S. C. (2018). Desain DNA Primer Secara *In Silico* sebagai Pendeteksi Mutasi Gen *gyrA Mycobacterium tuberculosis* Untuk Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal Of Applied Chemistry)*. 6(1): 63-69.
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R. Dan Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer Pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Informatika Medis 2014*: 93–102. <http://snimed.fit.uui.ac.id/>.
- Satiyarti, R. B., Nurmilah, dan Rosahdi, T. D. (2017). Identifikasi Fragmen Dna Mitokondria Pada Satu Garis Keturunan Ibu Dari Sel Epitel Rongga Mulut Dan Sel Folikel Akar Rambut. *Biosfer: Jurnal Tadris Biologi*. 8(1): 13–27.
- Schai-Braun, S. dan Hackländer, K (2016). *Family Leporidae (Hares and Rabbits)*. In: Wilson, D. E., Lacher J. R., Mittermeier R. A, *Handbook of the Mammals of the World* 6., 62-149. Lynx Edicions, Barcelona; ISBN 978-84-941892-3-4.
- Septiari, I. G. A. A., Yustiantara, P. S., Yowani, S. C. (2015). Analisis Primer untuk Amplifikasi Promoter inhA Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *J Kim*. 9(1):117-123.
- Setiawan, A., Iqbal, M., Halim, A., Saputra, R. F., Setiawan, D. Dan Yustian, I. (2019). First Description of an Immature Sumatran Striped Rabbit (*Nesolagus netscheri*), with Special Reference to the Wildlife Trade in South Sumatra. *Mammalia*. 250–252.
- Setiawan, A., Iqbal, M., Jauhari, S., Zamroni, Jarulis, dan Yustian, I. (2022). First Release of a Captured Sumatran Striped Rabbit *Nesolagus netscheri* (Schlegel, 1880) Into the Wild. *Ecologica Montenegrina*. 52: 53–56.
- Setiawan, A., Iqbal, M., Komarudin, Saputra, R. F., Setiawan, D. Dan Yustian, I. (2018). New Reports of the Presence and Ecology of the Sumatran Striped Rabbit (*Nesolagus netscheri*) in South Sumatra. *Mammalia*. 82(6): 589–91.
- Setiawan, A., Iqbal, M., Susilowati, O., Setiawan, D., Maharsi, M. P. K. dan Yustian, I. (2023). Status of the Sumatran Striped Rabbit *Nesolagus netscheri* in Isau-Isau Wildlife Reserve, South Sumatra Province, Indonesia. *Journal of Threatened Taxa*. 15(2): 22746–22748.
- Shan, W., Tursun, M., Zhou, S., Zhan, Y., Dai, H. (2021). Complete Mitochondrial genome sequence of *Lepus yarkandensis* Günther, 1875 (Lagomorpha, Leporidae): characterization and phylogenetic analysis. *Zookeys*. 1012 135-150. Oi: 10.3897/zookeys.1012.59035.

- Sihotang, M. A.E.D., Erwinda, Y. E., Suwarni, E. Dan Lusianti, E. (2021). Desain Primer dan Analisis in Silico untuk Amplifikasi Gen mt-Co1 pada Tikus got (*Rattus norvegicus*). *Eruditio : Indonesia Journal of Food and Drug Safety*. 1(1): 20-29.
- So, K. Y. K., Fong, J. J., Lam, I. P. Y., dan Dudgeon, D. (2020). Pitfalls during in silico prediction of primer specificity for eDNA surveillance. *Ecosphere*. 11(7), 1–16. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3193>
- Suparman, Ahmad, H. Dan Ahmad, Z. (2016). Desain Primer PCR Secara *In Silico* Untuk Amplifikasi Gen COI Pada Kupu-Kupu *Papilio ulysses* Linnaeus dari Pulau bacan. *Jurnal Pendidikan Matematika dan IPA*. 7(1): 14-24.
- Suryadi, P., Ratnayani, K., dan Yowani, S. (2014). Desain Primer untuk Amplifikasi Gen katG Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *J Kim*, 8(1), 77–82.
- Suyadi. (2011). Deforestation in Bukit Barisan Selatan National Park, Sumatra, Indonesia. *Jurnal Biologi Indonesia*. 7(2): 195-206.
- Thermofisher. (2016). *Real-time PCR handbook*. Appliedbiosystem. 2-68. Viljoen,
- Tilker, A., Timmins, R.J., Nguyen The Truong, A., Coudrat, C.N.Z., Gray, T., Le Trong Trai, Willcox, D.H.A., Abramov, A.V., Wilkinson, N. dan Steinmetz, R. (2019). *Nesolagus timminsi*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019: e.T41209A45181925. Accessed on 02 September 2023.
- Vidya, T. N. C., Sukumar, R and Melnick, D. J. (2009). Range-Wide mtDNA Phylogeography Yields Insights into the Origins of Asian Elephants. *Proceedings Biological Sciences*. 276: 893-902.
- Wasdili, F. A. Q. (2019). Analisis Spesifitas Primer Deteksi Salmonella typhimurium dengan Metode Real-Timer PCR. *The 1st Proceeding Publication of Creativity and Research Medical Laboratory Technology*. DIV, 54-60.
- Wilson D. E. dan Reeder D.M. (2005) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. The Johns Hopkins University Press. United States of America. ISBN 0-8018-8221-4.
- Yang, L., Wang. C., Wang, L., Xu, C., Chen, K. (2013). An Efficient Multiplex PCR Assay for Early Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in Transgenic Plant Material. *Turk J Agric*. 37: 157-162.
- Yudianto, A. (2020). *Pemeriksaan Forensik DNA Tulan dan Gigi: Identifikasi*

pada DNA Lokus STR CODIS Y-STRs, dan mtDNA. Bandung: Sintesa Book.

- Yustinadewi, Putu, S., dan Inna, N. (2018). Teknik perancangan primer untuk sekuen gen MDR-1 varian 1199 pada sampel buffy coat pasien anak dengan LLA. *Jurnal Metamorfosa*. 5(1): 105–111. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16>
- Zahrani, A., Mardini, I. dan Pane, E. R. 2022. Desain Primer Secara *in Silico* untuk Mengidentifikasi Tikus dengan Menggunakan Gen *Cytochrome Oxidase I*. *Prodising Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan*. 5.320-329.
- Zein, M. S. A. dan Prawiradilaga, D. M. (2013). *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Jakarta: Kencana-Prenadamedia Group.