

Literature Review: Aplikasi Penanda Molekuler untuk Analisis Keanekaragaman Genetik Hewan

Ajeng Mudaningrat¹, Flora Umaya², Farah Ayu Afdhila Syahriza³, Yustinus Ulung Anggraito⁴, Ning Setiati⁵

Program Studi Magister Ilmu Pengetahuan Alam, Pascasarjana,
Universitas Negeri Semarang

E-mail: ajengmudaningrat87@students.unnes.ac.id

Abstract

Background: Molecular markers (DNA markers) are DNA sequences that are easily detected to characterize or detect certain genetic diversity, one of which is in animals. There are various marker systems used with their respective characteristics. Some of the molecular markers include RFLP, RAPD, ISSR, SSR, and SNP. The purpose of this study was to analyze genetic diversity in animals using molecular marker applications.

Methods: The method used is literature review using reputable national and international journals.

Results: Based on the results of a literature review, the genetic diversity of various species such as catfish, deer, tilapia, crabs, seahorses, ducks, cattle and buffaloes can be analyzed for genetic diversity using various molecular markers either by using PCR-RFLP, RAPD, ISSR, SSR, or SNPs.

Conclusion: The application of molecular markers can be used to analyze animal genetic diversity

Keywords: *Animal Genetic Diversity, DNA Marker*

Abstrak

Latar Belakang: Penanda molekuler (DNA Marker) merupakan urutan DNA yang mudah dideteksi untuk mengkarakterisasi atau mendeteksi keragaman genetik tertentu salah satunya pada hewan. Sistem penanda yang digunakan terdapat berbagai macam dengan ciri khas masing-masing. Beberapa penanda molekuler diantaranya RFLP, RAPD, ISSR, SSR, dan SNP. Tujuan dari penelitian ini untuk menganalisis keanekaragaman genetik pada hewan menggunakan aplikasi penanda molekuler.

Metode: Metode yang digunakan yaitu literatur review menggunakan jurnal nasional dan internasional bereputasi.

Hasil: Berdasarkan hasil literatur review, keragaman genetik berbagai spesies seperti lele, rusa, ikan nila, kepiting, kuda laut, itik, sapi dan kerbau dapat dianalisis keragamannya dengan menggunakan berbagai penanda molekuler baik dengan menggunakan penanda PCR-RFLP, RAPD, ISSR, SSR, ataupun SNP.

Kesimpulan: Aplikasi penanda molekuler dapat digunakan untuk menganalisis keanekaragaman genetik hewan.

Kata Kunci: Keanekaragaman Genetik Hewan, Penanda Molekuler.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan keanekaragaman hayati dan non-hayati tidak dapat digunakan secara berlebihan, dalam artian harus memperhatikan kondisi populasi hayati dan non hayati agar dapat memperoleh pemanfaatan secara berkelanjutan. Dalam menjaga pemanfaatan sumber daya alam serta keanekaragaman hayati dan non hayati untuk kesejahteraan bagi masyarakat dan negara perlu diadakannya konservasi agar pemanfaatan sumber daya alam dan kenakeragamannya selalu terjaga serta dapat membantu membangun kehidupan masyarakat serta negara (Guntur & Slamet, 2019). Sands, (2013) mengidentifikasi ada 6 (enam) penyebab utama hilangnya keanekaragaman hayati yaitu: (1) pertumbuhan dan meningkatnya konsumsi atas sumber daya alam hayati maupun nonhayati; (2) pengabaian spesies dan ekosistem; (3) kebijakan yang buruk; (4) efek dari sistem perdagangan global, (5) ketidakseimbangan distribusi sumber daya dan (6) kegagalan memberi nilai terhadap keanekaragaman hayati. Indonesia mempunyai kepentingan yang sangat serius dengan perlindungan satwa liar/fauna langka dari dampak perdagangan internasional karena Indonesia mempunyai beberapa jenis satwa liar/fauna yang terancam punah akibat perdagangan internasional. Apabila hal tersebut tidak ditangani secara serius, maka bisa mengakibatkan kepunahan satwa liar/fauna yang pada gilirannya dapat mempengaruhi kelangsungan perikehidupan dan kesejahteraan manusia dan makhluk hidup lainnya, ketentuan-ketentuan CITES tersebut wajib diperhatikan oleh masing-masing negara peserta dalam perundang-undangan nasionalnya yang sudah barang tentu berkaitan dengan kedaulatan suatu negara (Naiborhu, 2021).

Penilaian dan pelestarian keanekaragaman hayati populasi liar sangat penting untuk meminimalkan hilangnya variasi genetik. Metode molekuler berperan penting dalam memperkirakan keragaman genetik antar individu dengan membandingkan genotipe pada sejumlah lokus polimorfik (Arif & Khan, 2009). Penilaian keanekaragaman genetik dapat dilakukan dengan

menggunakan suatu penanda molekuler. Suatu penanda (marker) merupakan karakter atau sifat yang dapat diturunkan atau diwariskan pada keturunannya, dapat berasosiasi maupun berkorelasi dengan genotip tertentu, dan dapat digunakan untuk mengkarakterisasi/mendeteksi genotip tertentu. Suatu sifat yang dapat dipakai sebagai penanda apabila sifat tersebut secara tegas diwariskan pada keturunannya dan linkage (terkait) dengan sifat yang dikehendaki. Dari sejarah perkembangannya, penanda ini dapat dikelompokkan sebagai penanda morfologi, penanda sitologi, dan penanda molekuler (Nuraida, 2012).

Penanda molekuler adalah alat yang sangat diperlukan untuk menentukan variasi genetik dan keanekaragaman hayati dengan tingkat akurasi dan reproduktivitas yang tinggi (Arif & Khan, 2009). Penanda molekuler memiliki kelebihan karena sifat polimorfik, kodominan, perilaku netral selektif, pengujian yang mudah dan cepat, reproduktivitas tinggi dan pertukaran data yang mudah antar laboratorium (Chinnappareddy, et al., 2013). Terdapat berbagai sistem penanda yang tersedia diantaranya panjang fragmen restriksi (RFLP), DNA polimorfik yang diamplifikasi acak (RAPD), pengulangan urutan antar-sederhana (ISSR), mikrosatelit atau pengulangan urutan sederhana (SSR), dan polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) (Chinnappareddy, et al., 2013). Berdasarkan latar belakang di atas, diperlukan kajian lebih mendalam mengenai aplikasi penanda molekuler untuk menganalisis keragaman genetik hewan. Tujuan dari penulisan ini untuk menganalisis keanekaragaman genetic hewan menggunakan aplikasi penanda molekuler. Pembahasan ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai secara luas kepada masyarakat mengenai prinsip kerja, kelebihan dan kekurangan masing-masing penanda molekuler yang digunakan.

MATERI DAN METODE

Kajian studi literatur dilakukan pada bulan Mei sampai dengan Juni 2023. Sumber acuan/pustaka diambil berdasarkan hubungan atau relasinya dengan judul studi literatur yang akan dikaji. Sumber pustaka tersebut berupa artikel yang diambil dari jurnal nasional dan

internasional yang bereputasi. Pencarian artikel ini menggunakan Google scholar, Harzing Publish or Perish, dan ProQuest. Dalam pembuatan literature review diawali dengan pembuatan resume dan kerangka studi literature secara umum yang memuat hal-hal penting yang akan dikaji berdasarkan judul yang telah ditentukan. Tahap berikutnya adalah mulai menyusun studi literatur sesuai dengan kerangka yang telah disusun berdasarkan informasi-informasi yang telah diperoleh dari berbagai sumber acuan kemudian dianalisis secara deskriptif dan dievaluasi serta dilanjutkan dengan pembuatan kesimpulan (Ningsih, et al., 2023).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penanda PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Selama tahun 1980-an, analisis penanda genetik telah bergeser dari penggunaan penanda protein untuk penanda DNA, khususnya sebagai konsekuensi dari meningkatnya jumlah potensi penanda tersedia. Penggunaan pertama RFLP dalam konstruksi dari peta genetik manusia disarankan sebagai metode umum analisis genetik. Konsep menggunakan polimorfisme urutan DNA sebagai penanda genetik dikembangkan dengan munculnya penanda polimorfisme panjang fragmen restriksi (RFLP) (Adhikari, et al., 2017). Penanda PCR-RFLP adalah teknik penanda molekuler pertama dan satu-satunya sistem penanda berdasarkan hibridisasi. Individu dari spesies yang sama menunjukkan polimorfisme sebagai akibat dari penyisipan/penghapusan (dikenal sebagai InDels), mutasi titik, translokasi, duplikasi dan inversi. Isolasi dari DNA murni adalah langkah pertama dalam metodologi RFLP. Ini DNA dicampur dengan enzim restriksi yang diisolasi dari bakteri dan enzim ini digunakan untuk memotong DNA pada lokus tertentu (dikenal sebagai situs pengenalan). Ini menghasilkan sejumlah besar fragmen dengan perbedaan panjang. Elektroforesis gel agarosa atau poliakrilamid (PAGE) diterapkan untuk pemisahan fragmen ini dengan memproduksi serangkaian band. Setiap band mewakili satu fragmen yang memiliki panjang berbeda. Penghapusan

pasangan basa, mutasi, inversi, translokasi dan transposisi merupakan penyebab utama terjadinya variasi yang mengakibatkan Pola RFLP. Variasi ini menyebabkan keuntungan atau kerugian situs pengenalan, menghasilkan fragmen dengan berbagai panjang dan polimorfisme. Enzim restriksi tidak akan memotong fragmen jika variasi pasangan basa tunggal terjadi di situs pengakuan. Namun, jika mutasi titik ini terjadi dalam satu kromosom tetapi tidak pada yang lain, itu disebut heterozigot untuk penanda, karena kedua band hadir (Nadeem, et al., 2018).

Teknik PCR-RFLP sudah digunakan untuk mendeteksi keragaman kuda laut (*Hippocampus comes*) di Perairan Bintan Kepulauan Riau. Kuda laut (*Hippocampus come*) merupakan spesies unik yang memiliki sistem reproduksi kehamilan terjadi pada organisme jantan. Menurut IUCN dan CITES, kuda laut tercatat sebagai terancam punah atau rentan dan spesies Apendiks II. Tujuan dari penelitian yang dilakukan oleh Meikasari, et al., (2019) adalah untuk mengidentifikasi keragaman alelik berdasarkan *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Sampel diambil dari perairan Tanjung Berakit, Bintan, Kepulauan Riau. Sebanyak 11 individu spesies dianalisis dua jenis restriksi enzim, EcoRI dan AluI. Parameter yang dihitung terdiri dari keragaman haplotipe, frekuensi haplotipe, dan heterozigositas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada dua jenis fragmentasi DNA berdasarkan enzim restriksi. Enzim EcoRI tidak mampu memotong fragmen DNA target. Enzim AluI mampu melewati fragmen DNA target sehingga dapat divisualisasikan oleh dua alel. Nilai keragaman genetik yang kurang dari satu menunjukkan bahwa keragaman genetik pada populasi kuda laut spesies (*Hippocampus come*) yang ada di perairan Bintan tergolong rendah (Meikasari, et al., 2019).

Teknik PCR-RFLP yang dilakukan pada penelitian Henrik, et al., (2018) berbeda pada enzim restriksi yang digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman morfometrik dan genetik itik Tegal, Magelang, dan hasil persilangannya. Masing-masing 10 ekor itik betina Tegal, Magelang, Galang, dan Maggal yg berumur 20 minggu digunakan sebagai kelompok materi penelitian.

Morfometrik yang diukur adalah bobot badan, lingkaran dada, panjang badan, panjang shank, panjang leher, dan lebar pubis. Pengukuran polimorfisme Gen Sitokrom b DNA mitokondria menggunakan sampel darah diambil dari sepuluh bebek betina masing-masing Tegal, Magelang, Galang, dan Maggal. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0.01$) pada bobot badan, lingkaran dada, panjang badan, dan panjang leher antar kelompok, sedangkan panjang shank dan lebar pubis tidak berbeda nyata. Jarak genetik antara itik Gallang dengan Maggal (0.206) lebih tinggi dibanding itik Tegal dengan Magelang (0.169). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa persilangan resiprok meningkatkan keragaman morfometrik dan keragaman genetik itik lokal Indonesia (Henrik, et al., 2018).

Teknik PCR-RFLP yang dilakukan dalam penelitian Rahat, et al., (2020) memiliki kesamaan dengan penelitian Meikasari, et al., (2019). Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi sapi (*Bos taurus*) dan kerbau (*Bubalus bubalis*) dengan menggunakan gen mitokondria cytochrome-b (Cyt-b). Ukuran gen adalah 1140 bp, tetapi diperkuat dengan 359 bp yang dibelah oleh endonuklease restriksi spesifik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi spesies melalui gen Cyt-b dengan menggunakan analisis PCR-RFLP. Digunakan 55 sampel darah dikumpulkan dari berbagai spesies hewan peliharaan. Teknik PCR-RFLP meliputi pengambilan sampel, ekstraksi DNA, amplifikasi PCR dan analisis menggunakan RFLP. DNA diekstraksi dari seluruh darah melalui kit ekstraksi darah. DNA dari sampel ini diamplifikasi melalui PCR menggunakan primer Cyt-b universal. Produk yang diamplifikasi diperlakukan dengan enzim restriksi Alu I. Fragmen yang dihasilkan dilihat pada gel agarosa 3,0%. Hasil penelitian menunjukkan gen Cyt-b diamplifikasi dari semua hewan yang dimasukkan. Band yang berbeda diamati dibandingkan dengan 50 tangga DNA bp. Hewan diidentifikasi pada dasar RFLP yang dimediasi oleh enzim restriksi Alu1. Hewan peliharaan berdasarkan gen Mitokondria Cyt-b melalui proses PCR-

RFLP (Rahat, et al., 2020).

Aplikasi penanda PCR-RFLP dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies dan keragaman genetik dalam suatu populasi. Kelebihan PCR-RFLP adalah murah, mudah didesain, berlaku untuk analisis polimorfisme nukleotida tunggal serta mikronidel, tidak ada persyaratan untuk instrumen mahal, tidak ada persyaratan untuk pelatihan ekstensif untuk staf laboratorium. Kelemahan dalam metode PCR-RFLP adalah membutuhkan waktu yang panjang karena melalui dua tahap analisis yaitu PCR itu sendiri dan pemotongan DNA hasil PCR dengan enzim restriksi (Ningsih, et al., 2023).

Penanda RAPD

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) adalah penanda molekuler yang digunakan untuk mengamplifikasi (menggandakan) dan memvisualisasikan variasi sekuens DNA di antara individu atau spesies yang berbeda dengan menggunakan primer acak (Niklas, 2021). Pada pengaplikasiannya, RAPD dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik berbagai spesies, salah satunya yaitu menganalisis keragaman genetik pada kepiting. Kepiting (*Scylla olivacea*) adalah kelompok hewan invertebrata dengan persebaran yang luas dan termasuk dari ordo Decapoda. Penelitian yang dilakukan oleh Aini, et al., (2020), bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik pada kepiting tapal kuda/mimi (*Carcinoscorpius rotundicauda* dan *Tachypleus gigas*) menggunakan RAPD. Pada penelitian ini, mimi (*Carcinoscorpius rotundicauda* dan *Tachypleus gigas*) diambil kemudian di ekstraksi DNA nya dan didapatkan sebanyak 13 jenis primer yang selanjutnya dilakukan amplifikasi PCR dengan metode RAPD untuk mengetahui keragaman genetiknya. Berdasarkan hasil analisis RAPD yang dilakukan, menunjukkan bahwa setiap primer menampilkan jumlah serta ukuran fragmen yang masing-masing berbeda. Keragaman genetik pada penelitian ini didasarkan pada derajat polimorfisme dan heterozigositas, hasil analisis menunjukkan bahwa nilai derajat polimorfisme cenderung sedang serta beresiko mengarah ke rendah. Meskipun demikian, penggunaan RAPD pada

penelitian ini memiliki pengaruh. Hal ini dikarenakan pada setiap primer yang digunakan dengan analisis RAPD memiliki situs penempatannya masing-masing. Penggunaan RAPD pada penelitian ini juga dapat mendeteksi polimorfisme yang disebabkan oleh adanya mutasi poin, dimana dalam penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat mutasi insersi dan delesi yang terjadi pada saat amplifikasi sehingga hasil heterozigositas yang terdapat pada *Carcinoscorpius rotundicauda* dan *Tachypleus gigas* tergolong rendah serta homogen.

Penelitian terkait analisis keragaman genetik dengan menggunakan RAPD pada hewan juga dilakukan oleh Normala, et al., (2021), tujuan dalam penelitian tersebut yaitu untuk menganalisis keragaman genetik antara lele dumbo (*Clarias gariepinus*) triploid dan diploid dengan menggunakan marka RAPD. Metode yang dilakukan hampir sama, yaitu melalui tahap ekstraksi DNA kemudian dilakukan amplifikasi PCR dengan metode RAPD. Hasil amplifikasi didapatkan 80 primer, dimana ukuran fragmen yang dihasilkan memiliki jumlah dan ukuran yang berbeda. Ukuran fragmen yang dihasilkan bervariasi, mulai dari 180 bp sampai 3000 bp. Di antara 80 primer yang digunakan dalam penelitian ini, hanya tiga primer yang menunjukkan persentase polimorfisme yang tinggi; yaitu, OPB 16 (71,43%), OPC 14 (61,90%), dan OPD 12 (75,00%), dimana ketiga primer ini dipilih untuk analisis genetik semua sampel ikan triploid dan diploid. Hasil penelitian ini sendiri tidak menunjukkan adanya perbedaan mendasar antara ikan lele dumbo triploid dan diploid menggunakan metode RAPD. Pemilihan RAPD untuk penelitian ini didasarkan pada kemungkinan untuk mengidentifikasi penanda diagnostik yang dapat digunakan sebagai penanda SCAR untuk mendeteksi ikan lele triploid, akan tetapi dendrogram yang dihasilkan UPGMA untuk ikan triploid dan diploid juga tidak dipisahkan menjadi kelompok yang berbeda sehingga menampilkan diferensiasi yang tidak jelas ketika pengelompokan individu.

Pada aplikasinya, penanda molekuler dengan menggunakan RAPD telah berhasil diterapkan untuk berbagai hal, diantaranya

yaitu untuk mengidentifikasi spesies, analisis keragaman genetik, penentuan jenis kelamin ataupun identifikasi hibrida (Bardachi, et al, 2020). Selain sebagai analisis keragaman genetik kepiting dan lele dumbo, Penanda RAPD juga dapat diaplikasikan untuk mengetahui keragaman genetik beberapa spesies lain, contohnya yaitu nyamuk, ikan, tikus dan lain sebagainya. Berdasarkan penelitian di atas, penggunaan RAPD memiliki beberapa keuntungan, seperti metodenya yang sederhana serta membutuhkan kuantitas DNA yang relatif sedikit (5-25 ng DNA) pada setiap rantai PCR serta kemampuannya yang cukup cepat dalam mendeteksi polimorfisme di sejumlah lokus. Akan tetapi, biaya tinggi untuk metode RAPD dapat menghambat kegunaan komersialnya karena ini bukan alternatif yang lebih murah, selain itu kekurangan lain dari RAPD adalah tingkat pengulangannya yang cukup rendah meskipun dapat dijaga dengan konsistensi kondisi ketika PCR berlangsung (Petjul, et al., 2017).

Penanda SSR

Penanda Simple Sequence Repeat (SSR) atau bisa disebut dengan mikrosatelit merupakan jenis penanda atau marka DNA yang terdiri dari pasangan satuan urutan nukleotida sederhana berulang dan terdiri atas 1-6 bp (Lucia, et al., 2016). Pada prinsipnya, SSR digunakan dengan mendeteksi suatu segmen DNA yang mengandung pola sederhana dari basa nitrogen. Menurut Heyward et al., (2015), SSR merupakan penanda yang memiliki sifat kodominan. Hal ini dikarenakan SSR dapat digunakan untuk membedakan alel heterozigot dan homozigot sehingga dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi induk suatu individu ataupun menganalisis adanya keanekaragaman genetik. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sembiring et al., (2022), bertujuan untuk menganalisis variasi genetik dari ikan pasir yang diperoleh dari berbagai daerah di Indonesia seperti: Nusa Tenggara Timur (Desa Papagarang; Kecamatan Komodo-Labuan Bajo; Kabupaten Manggarai Barat); Kalimantan Tengah (desa Sungai bakau dan desa Teluk bogam; kabupaten Kumai, wilayah Kotawaringin Barat); Tanjung Pinang (desa Teluk Bakau, kabupaten Gunung Kijang,

wilayah Bintan); Lombok Timur (Desa Sekaroh, Kecamatan Jerowaru); Maluku Tenggara (Desa Ngilngof, Pulau Kei Kecil); Sulawesi Selatan (Desa Lawallu, Kecamatan Soppeng, Kabupaten Barru) dan Bali Barat (Desa Pejarakan, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng).

Parameter keragaman genetik pada penelitian tersebut didasarkan pada jumlah alel yang terdeteksi (N_a), nilai heterozigositas yang diamati (H_o), dan nilai heterozigositas yang diharapkan (H_e) yang kemudian dihitung dengan menggunakan program GenAIEx 6.5. Hasil penelitian dengan menggunakan SSR menunjukkan bahwa keanekaragaman genetik ikan pasir asal Lombok Timur memiliki polimorfisme dan heterozigositas tertinggi (0,787) dengan jarak genetik terdekat dengan Tanjung Pinang. Heterozigositas merupakan ukuran keragaman genetik berdasarkan proporsi individu heterozigot dalam populasi, dimana semakin tinggi heterozigositas maka semakin banyak gen yang terlibat serta berkontribusi terhadap tingkat keragaman suatu populasi.

Pengaplikasian SSR untuk analisis keragaman genetik juga dilakukan oleh Dias, (2020), dimana penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik dari ikan nila tilapia (*Oreochromis niloticus*, L. 1758) populasi asli dari Afrika timur dengan populasi stok (terstruktur). Metode penelitian yang dilakukan yaitu dengan menginvestigasi total 664 individu yang kemudian dilakukan perbandingan antara *Oreochromis niloticus* dari Afrika timur dengan populasi ikan *Oreochromis niloticus* dari Ethiopia dan Burkina Faso. Hasil penelitian dengan menggunakan SSR menunjukkan bahwa di Afrika timur, struktur genetik sesuai dengan lokasi geografis dan aktivitas antropogenik (Isolasi berdasarkan jarak untuk Afrika Timur, $R_2 = 0,67$ dan Uganda, $R_2 = 0,24$). *O. niloticus* dari Danau Turkana (Kenya) diisolasi, sedangkan di Uganda, meskipun populasinya agak mirip satu sama lain, dua spesies asli ini dapat ditentukan. Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua kelompok ini berkelompok pada kumpulan gen dari populasi non-pribumi yang berbeda. Selain itu, percampuran dan kemungkinan hibridisasi dengan spesies Nila lain mungkin telah berkontribusi pada

keragaman genetik yang ditemukan di beberapa populasi seperti Danau Victoria. Terdapat faktor lain yang mungkin memengaruhi variasi genetik ikan nila. Sebagai contoh, sebagian besar populasi telah mengalami penurunan keragaman genetik, yang dapat diakibatkan oleh penurunan populasi yang terjadi secara ekstrim ($GW, < 0,5$) yang disebabkan oleh penangkapan berlebih, erosi genetik karena fragmentasi atau efek yang diakibatkan adanya aktivitas stocking (persebaran).

Penggunaan SSR dalam penelitian tersebut menunjukkan bahwa SSR dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik, SSR juga dapat digunakan untuk membedakan struktur populasi genetik, menganalisis model reproduksi, dan mendeteksi spesies yang berkerabat dekat secara lebih baik. Kelebihan dari Simple Sequence Repeat (SSR) sendiri yaitu jumlahnya yang cukup banyak dalam genom, letaknya yang menyebar antar kromosom, memiliki tingkat informasi yang tinggi, penanda genetik yang dapat dilakukan secara berulang serta dapat dilakukan antar spesies (Mason, 2015). Meskipun memiliki manfaat yang cukup banyak, akan tetapi SSR juga memiliki beberapa kekurangan. Diantaranya yaitu apabila primernya belum dikembangkan, maka pengembangan primernya memerlukan biaya yang lebih mahal. Selain itu, apabila terjadi perubahan pada letak penempelan alel, maka akan terjadi alel kosong (null alleles) yang dapat menyebabkan kesalahan pada hasilnya (Heyward, et al., 2015).

Penanda ISSR

Salah satu penanda molekuler yang cepat dan terjangkau adalah inter simple sequence repeats (ISSR) (Safari, et al., 2013). Penanda ini mengenali fragmen DNA pendek berulang (2-6 bp) di seluruh genom. Sejak Lokus ISSR memiliki rasio polimorfisme yang tinggi, banyak alel dapat diamati karena ISSR adalah alat yang ideal untuk menentukan kesamaan dan perbedaan antar genotipe (Abdelmigid, 2012). Dengan bantuan analisis statistik marka ISSR, yaitu rasio kesamaan antara spesies yang ditargetkan dapat dengan mudah dibawa keluar (Maras, et al., 2020). ISSR adalah teknik PCR yang menggunakan

primer yang mengamplifikasi daerah di antara urutan sederhana yang diulang dalam genom (Steffler et al, 2016). Pada penelitian Amin Elimanifar, et al., (2020) dengan judul penelitian 'Using ISSR Genomic Fingerprinting to Study the Genetic Differentiation of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) from Iran and Neighbor Regions with the Focus on the Invasive American *Artemia franciscana*' bahwa pada penelitian ini membahas tentang spesies *Artemia* yaitu genus krustasea kecil yang dikenal sebagai udang garam atau brine shrimp. *Artemia* hidup di lingkungan air asin dan memiliki kemampuan untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang ekstrem. *Artemia* sering digunakan sebagai pakan dalam budidaya ikan dan udang karena kandungan nutrisi yang tinggi. Selain itu, *Artemia* juga digunakan dalam penelitian biologi sebagai model organisme untuk mempelajari berbagai aspek biologi, seperti genetika, ekologi, dan fisiologi. Beberapa spesies *Artemia* juga dianggap sebagai spesies invasif karena kemampuannya untuk menyebar ke lingkungan baru dan mengganggu ekosistem asli. Metode ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) yang digunakan untuk memeriksa variasi genom pada 83 individu *Artemia* dari 14 lokasi yang berbeda secara geografis. Sebanyak 15 primer ISSR dianalisis untuk membedakan variasi genetik intra- dan interspesifik dalam dan di antara populasi *Artemia* yang diuji. Dari 15 primer ISSR yang diuji, lima dipilih karena pola pita PCR yang jelas. Data ISSR kemudian dianalisis menggunakan algoritma pengelompokan berbasis model Bayesian yang diimplementasikan dalam program STRUCTURE versi 2.3. Hasil analisis ISSR menunjukkan bahwa tidak ada tingkat diferensiasi geografis yang signifikan di antara populasi *Artemia* yang diuji. Namun, metode ISSR tidak dapat menunjukkan tingkat variasi genetik yang tinggi pada *A. urmiana*, yang mungkin disebabkan oleh perbedaan dalam tingkat variasi gen mitokondria dan nuklir serta kemungkinan terjadinya peristiwa hibridisasi di masa lalu. Selain itu, tabel dan grafik yang menunjukkan indeks genetik seperti N_a , N_e , I , H_e , uH_e , PPL, NB, NPB, dan matriks jarak genetik N_e juga disajikan dalam penelitian ini.

Kelebihan ISSR pada penelitian ini adalah kemampuannya untuk membedakan variasi genetik intraspesifik dan interspesifik dalam dan di antara populasi *Artemia* yang diuji. ISSR juga memiliki kelebihan dalam menghasilkan pola pita PCR yang jelas dan mudah diinterpretasikan, serta dapat digunakan untuk mempelajari variasi genetik pada organisme tanpa memerlukan informasi sekuens genom sebelumnya.

Kekurangan ISSR pada penelitian ini adalah bahwa metode ini tidak dapat mengungkapkan tingkat variasi genetik yang tinggi pada *A. urmiana*, yang mungkin disebabkan oleh perbedaan dalam tingkat variasi gen mitokondria dan nuklir serta kemungkinan terjadinya peristiwa hibridisasi di masa lalu. Selain itu, ISSR juga memiliki kelemahan dalam menghasilkan pola pita PCR yang ambigu dan sulit diinterpretasikan, serta dapat terpengaruh oleh faktor teknis seperti kualitas DNA dan kondisi PCR. Oleh karena itu, ISSR sebaiknya digunakan bersama dengan metode lain seperti sekuensing genomik untuk memperoleh informasi yang lebih lengkap tentang variasi genetik pada organisme yang diteliti.

Berbeda dengan penelitian di atas, kegunaan dari aplikasi metode ISSR sebagai keragaman genetik juga ditunjukkan pada penelitian dari Kriangwanich, (2021) dengan judul penelitian 'Feasibility of melting fingerprint obtained from ISSR-HRM curves for marine mammal species identification' dengan tujuan penelitian untuk mengembangkan metode analisis genetik yang efektif dan akurat untuk identifikasi spesies dan klasifikasi mamalia laut pada tingkat spesies dan subspecies. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengevaluasi keefektifan metode ISSR-HRM dalam membedakan spesies mamalia laut yang serupa secara morfologi dan untuk mengevaluasi potensi metode ini sebagai alat screening mandiri untuk identifikasi mamalia laut yang terdampar.

Metode ISSR-HRM bekerja dengan menggabungkan teknik Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) dengan High Resolution Melting (HRM). Dalam metode ISSR-HRM, DNA sampel mamalia laut diekstraksi dan kemudian diamplifikasi menggunakan primer ISSR yang universal. Setelah amplifikasi, produk PCR

dipanaskan secara bertahap dan HRM digunakan untuk memonitor perubahan suhu pada PCR. Perubahan suhu ini memungkinkan untuk membedakan produk PCR yang berbeda dan menghasilkan sidik jari DNA yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies dan klasifikasi mamalia laut pada tingkat spesies dan subspecies. Metode ISSR-HRM dapat digunakan sebagai alat screening mandiri dan efektif untuk diskriminasi spesies dan klasifikasi mamalia laut. Metode ini juga terbukti sebagai alat selektif yang dapat digunakan secara praktis di laboratorium dan mungkin sangat berguna dalam mengidentifikasi mamalia laut yang terdampar, terutama beberapa jenis cetacea yang memiliki morfologi yang sangat mirip.

Hasil dari metode ISSR pada penelitian ini menunjukkan bahwa analisis ISSR-HRM dapat digunakan sebagai alat screening mandiri dan efektif untuk diskriminasi spesies dan klasifikasi mamalia laut pada tingkat spesies dan subspecies. UBC847 memiliki tingkat akurasi dan presisi rata-rata tertinggi dengan nilai 76,06% dan 75,22%, masing-masing, dengan sensitivitas 93% dan nilai spesifisitas 40%. Metode ISSR-HRM juga terbukti sebagai alat selektif yang dapat digunakan secara praktis di laboratorium dan mungkin sangat berguna dalam mengidentifikasi mamalia laut yang terdampar, terutama beberapa jenis cetacea yang memiliki morfologi yang sangat mirip. Namun, evaluasi pendekatan ini dengan jumlah sampel yang lebih tinggi per spesies mungkin diperlukan dalam penelitian lebih lanjut.

Perbedaan metode ISSR pada penelitian ini dengan yang lain adalah penggunaan teknik High Resolution Melting (HRM) untuk memonitor perubahan suhu pada PCR dalam menghasilkan sidik jari DNA yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies dan klasifikasi mamalia laut pada tingkat spesies dan subspecies. Metode ISSR-HRM pada penelitian ini juga menggunakan primer ISSR yang universal dan memiliki panjang yang berbeda-beda, yaitu 15-18 mer. Selain itu, penelitian ini juga menggunakan 8 primer ISSR yang terpilih dari 34 primer ISSR yang di skringing untuk menghasilkan sidik jari DNA yang dapat

membedakan spesies mamalia laut yang serupa secara morfologi. Metode ISSR-HRM pada penelitian ini terbukti sebagai alat selektif yang dapat digunakan secara praktis di laboratorium dan mungkin sangat berguna dalam mengidentifikasi mamalia laut yang terdampar, terutama beberapa jenis cetacea yang memiliki morfologi yang sangat mirip. Dengan demikian, perbedaan metode ISSR pada penelitian ini dengan yang lain adalah penggunaan teknik HRM dan primer ISSR yang terpilih untuk menghasilkan sidik jari DNA yang dapat membedakan spesies mamalia laut pada tingkat spesies dan subspecies dengan akurasi dan presisi yang tinggi.

Meskipun mempunyai beberapa kelebihan, penelitian ini juga mempunyai beberapa kekurangan seperti jumlah sampel yang terbatas pada beberapa spesies mamalia laut, yang dapat membatasi kemampuan untuk mengidentifikasi perbedaan antara spesies yang sangat mirip secara morfologi. Selanjutnya, metode ISSR-HRM memerlukan primer universal yang dapat menghasilkan sidik jari DNA yang tidak spesifik untuk spesies tertentu, sehingga memerlukan kontrol referensi selama proses interpretasi data. Meskipun demikian, metode ISSR-HRM tetap memiliki kelebihan dalam memberikan hasil yang akurat dan efektif dalam identifikasi spesies mamalia laut pada tingkat spesies dan subspecies.

Penanda SNP

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) merupakan variasi genetik yang terjadi pada satu nukleotida tunggal dalam genom individu yang paling umum terjadi pada genom manusia dan hewan. SNP dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk mempelajari keragaman genetik dan struktur populasi dari suatu spesies. Selain itu, menurut Fitzpatrick et al (2020) penanda molekuler SNP juga digunakan dalam penyelamatan genetik pada spesies yang terancam punah. Metode SNP digunakan untuk memanfaatkan variasi genetik pada SNP dalam genom individu untuk menghasilkan dataset genotipe SNP yang dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik dan struktur populasi (Campbell, 2019).

Penelitian dari Kharzinova et al (2022) dengan judul penelitian Genome-Wide SNP

Analysis Reveals the Genetic Diversity and Population Structure of the Domestic Reindeer Population (*Rangifer tarandus*) Inhabiting the Indigenous Tofalar Lands of Southern Siberia'. Pada penelitian ini, metode SNP (Single Nucleotide Polymorphism) digunakan untuk mempelajari keragaman genetik dan struktur populasi dari populasi rusa domestik Tuva. sampel DNA dari 183 individu rusa domestik Tuva dianalisis menggunakan Illumina Bovine HD Genotyping BeadChip untuk menghasilkan data genotipe SNP. Data tersebut kemudian diproses dengan menggunakan perangkat lunak PLINK v1.90 untuk melakukan kontrol kualitas dan pemfilteran data SNP. Langkah-langkah pemfilteran yang dilakukan meliputi penghapusan lokus yang terletak pada kromosom seks, lokus yang genotipnya kurang dari 90% pada individu, dan alel langka dengan $geno < 0.1$ - $mind > 0.1$ - $maf < 0.05$ plink commands. SNP dengan nilai disequilibrium linkage (LD) antara sepasang SNP tunggal yang sama dengan $r^2 > 0,05$ juga dihapus dari analisis selanjutnya. Setelah semua langkah pemfilteran selesai dilakukan, dataset akhir terdiri dari 183 individu dan mencakup 6.786 SNP. Dataset genotipe SNP dari empat ras rusa domestik lainnya dan populasi liar rusa juga digunakan untuk membandingkan keragaman genetik dan struktur populasi antara populasi rusa Tuva dan populasi lainnya. Setelah semua langkah pemfilteran selesai dilakukan, dataset akhir terdiri dari 183 individu dan mencakup 6.786 SNP. Selain itu, dataset genotipe SNP dari empat ras rusa domestik lainnya dan populasi liar rusa juga digunakan untuk membandingkan keragaman genetik dan struktur populasi antara populasi rusa Tuva dan populasi lainnya.

Dari hasil analisis, penelitian ini menunjukkan bahwa populasi rusa domestik Tuva memiliki keragaman genetik yang tinggi dan struktur populasi yang berbeda dengan populasi rusa domestik lainnya dan populasi liar rusa. Hal ini menunjukkan bahwa populasi rusa domestik Tuva memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber daya genetik yang penting untuk konservasi dan pemuliaan rusa domestik. Kelebihan metode SNP pada penelitian ini dapat dilihat dari kemampuannya untuk menghasilkan data genetik yang sangat

akurat dan dapat digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada populasi rusa sehingga dapat memperoleh informasi tentang keragaman genetik pada tingkat genomik dan mempelajari hubungan kekerabatan antara individu dalam populasi. Penelitian ini juga membandingkan keragaman genetik pada populasi rusa di wilayah Tuva dengan populasi rusa di wilayah lain di Rusia dan populasi rusa liar. Oleh karena itu, metode SNP dapat menjadi alat yang berguna dalam memahami keragaman genetik pada populasi rusa dan dapat membantu dalam upaya konservasi dan manajemen populasi rusa di masa depan (Kharzinova et al., 2022).

Penggunaan metode SNP juga terdapat pada penelitian dari Jessica L. Petersen et al (2013) dengan judul penelitian Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-Wide SNP Data yang membahas tentang penggunaan SNP marker untuk memberikan deskripsi yang lebih detail tentang keragaman ras kuda dengan menggunakan set genom SNPs otosomal dan sampel 814 kuda dari 36 ras yang berbeda dengan tujuan untuk mengidentifikasi hubungan antara ras kuda yang sebagian besar mencerminkan asal geografis dan sejarah ras yang diketahui serta untuk mengevaluasi tingkat keragaman dalam ras kuda yang berbeda. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengidentifikasi populasi kuda dengan keragaman genetik yang rendah dan tingkat perkawinan sedarah yang tinggi.

Metode SNP (Single Nucleotide Polymorphism) digunakan pada penelitian ini untuk melakukan genotyping pada sampel kuda menggunakan Illumina SNP50 Beadchip. Metode ini memanfaatkan variasi tunggal nukleotida pada DNA yang terjadi pada satu posisi tertentu dalam genom. Pada penelitian ini, sebanyak 54.602 SNP markers digunakan untuk mengidentifikasi keragaman genetik pada 814 kuda dari 36 ras yang berbeda. Setelah dilakukan genotyping, data SNP yang diperoleh kemudian diproses dengan melakukan pruning untuk menghilangkan SNPs dengan MAF (Minor Allele Frequency) kurang dari 0,05, SNPs yang gagal genotyping pada setidaknya 99% individu, dan SNPs pada kromosom ECAX. Selain itu, SNPs yang berada dalam LD (Linkage Disequilibrium) antar ras kuda juga dihilangkan. Data SNP

yang telah diproses kemudian digunakan untuk melakukan analisis keragaman genetik, seperti pembuatan pohon filogenetik, analisis struktur populasi, dan estimasi ukuran populasi efektif.

Langkah-langkah metode SNP yang dilakukan pada penelitian ini pertama, sampel DNA diisolasi dari darah atau rambut kuda menggunakan metode standar. Selanjutnya, sampel DNA diendapkan dengan menambahkan isopropanol dan diputar pada kecepatan tinggi selama 15 menit pada suhu 4°C. Sampel DNA dicuci dua kali dengan etanol 70% dan dikeringkan. Kurang lebih 1 mg DNA digunakan untuk genotyping SNP menggunakan Illumina SNP50 Beadchip sesuai dengan protokol pabrik. Kemudian, data genotipe SNP diekstraksi dari data intensitas mentah menggunakan Genome Studio (Illumina) dengan ambang batas skor minimum gencall 0,15. Data SNP diproses dengan melakukan pruning untuk menghilangkan SNPs dengan MAF kurang dari 0,05, SNPs yang gagal genotyping pada setidaknya 99% individu, dan SNPs pada kromosom ECAX. 7. SNPs yang berada dalam LD antar ras kuda juga dihilangkan. Data SNP yang telah diproses digunakan untuk melakukan analisis keragaman genetik, seperti pembuatan pohon filogenetik, analisis struktur populasi, dan estimasi ukuran populasi efektif.

Salah satu kekurangan dari penggunaan SNP pada penelitian ini adalah adanya kemungkinan terjadinya bias dalam SNP ascertainment. Hal ini terjadi karena SNP yang digunakan pada penelitian ini berasal dari SNP50 Beadchip Illumina yang didasarkan pada sekuens genom kuda yang terutama berasal dari ras Thoroughbred. Oleh karena itu, SNP yang terdeteksi lebih banyak pada ras Thoroughbred dan ras yang terpengaruh oleh Thoroughbred, sehingga dapat mempengaruhi hasil analisis keragaman genetik pada ras-ras tersebut. Selain itu, penggunaan SNP juga memiliki keterbatasan dalam mengidentifikasi variasi genetik pada daerah genom yang tidak tercakup oleh SNP yang digunakan.

Penelitian ini menggunakan 54.602 SNP markers yang telah diproses dengan melakukan pruning untuk menghilangkan

SNPs dengan MAF (Minor Allele Frequency) kurang dari 0,05, SNPs yang gagal genotyping pada setidaknya 99% individu, dan SNPs pada kromosom ECAX. Selain itu, SNPs yang berada dalam LD (Linkage Disequilibrium) antar ras kuda juga dihilangkan. Hal ini dapat meningkatkan kualitas data dan mengurangi bias dalam analisis. Sedangkan penelitian sebelumnya menggunakan jumlah SNP markers yang berbeda dan kriteria pruning yang berbeda. Analisis keragaman genetik yang komprehensif berbeda dengan penelitian yang sebelumnya, seperti pembuatan pohon filogenetik, analisis struktur populasi, dan estimasi ukuran populasi efektif. Hal ini dapat memberikan informasi yang lebih lengkap tentang hubungan antara ras kuda dan tingkat keragaman genetik dalam ras kuda yang berbeda. Di bawah ini disajikan tabel berisi aplikasi teknik penanda molekuler dalam menganalisis keanekaragaman genetik.

Tabel 1. Penelitian Keanekaragaman Hayati di Indonesia dan Luar Negeri menggunakan Teknik Penanda Molekuler.

| No. | Judul | Nama dan Tahun | Teknik Penanda Molekuler | Metode |
|-----|---|----------------------------------|--------------------------|---|
| 1. | Using ISSR Genomic Fingerprinting to Study the Genetic Differentiation of <i>Artemia</i> Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) from Iran and Neighbor Regions with the Focus on the Invasive American <i>Artemia franciscana</i> | Amin, <i>et al</i> (2020) | ISSR-PCR | ISSR-PCR menggunakan 15 primer ISSR. Terpilih lima primer karena pola pita PCR yang jelas. Data genotipe ISSR kemudian dianalisis dengan algoritma pengelompokan berbasis model Bayesian yang diimplementasikan dalam program STRUCTURE v. 2.3. Populasi diatribusikan ke dalam jumlah potensial dari kelompok (K=1-10) dan parameter keragaman genetik |
| 2. | Feasibility of melting fingerprint obtained from ISSR-HRM curves for marine mammal species identification | Wannapi mol, <i>et al</i> (2021) | ISSR-HRM | Amplifikasi DNA menggunakan delapan primer ISSR yang telah disaring. Setelah itu, analisis High Resolution Melting (HRM) dilakukan pada produk amplifikasi ISSR menggunakan PCRmax Eco 48. Melting fingerprints dari lima spesies mamalia laut yang berbeda dihasilkan dari analisis HRM dan Uji buta ganda dilakukan pada 140 individu dari lima spesies mamalia laut yang berbeda. Data melting fingerprints dianalisis untuk membedakan spesies mamalia laut dengan tingkat sensitivitas yang tinggi. |
| 3. | Genome-Wide SNP Analysis Reveals the Genetic Diversity and Population Structure of the Domestic Reindeer Population (<i>Rangifer tarandus</i>) Inhabiting the Indigenous Tofalar Lands of Southern Siberi | Veronika, <i>et al</i> (2022) | SNP | Sampel DNA dari 183 individu rusa domestik Tuva dianalisis menggunakan Illumina BovineHD Genotyping BeadChip untuk menghasilkan data genotipe SNP. Setelah itu proses menggunakan perangkat lunak PLINK v1.90 untuk melakukan kontrol kualitas dan pemfilteran data SNP. Setelah semua langkah pemfilteran selesai dilakukan, dataset akhir terdiri dari 183 individu dan mencakup 6.786 SNP. Dataset genotipe SNP juga digunakan untuk membandingkan keragaman genetik dan struktur populasi antara populasi rusa Tuva dan populasi lainnya. |
| 4. | Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-Wide SNP Data | Jessica, <i>et al</i> (2013) | SNP | Pada penelitian ini untuk melakukan genotyping pada sampel kuda menggunakan Illumina SNP50 Beadchip. Setelah dilakukan genotyping, data SNP yang diperoleh kemudian diproses dengan melakukan pruning untuk menghilangkan SNPs dengan MAF (<i>Minor Allele Frequency</i>) kurang dari 0,05. Data SNP yang telah diproses kemudian digunakan untuk melakukan analisis keragaman |

| No. | Judul | Nama dan Tahun | Teknik Penanda Molekuler | Metode |
|-----|--|------------------------------------|--------------------------|---|
| | | | | genetik, seperti pembuatan pohon filogenetik, analisis struktur populasi, dan estimasi ukuran populasi efektif. |
| 5. | Revealing Genetic Diversity and Population Structure of Endangered Altay White-Headed Cattle Population Using 100 K SNP Markers | Bo Liu, <i>et al</i> (2022) | SNP | Metode SNP pada penelitian ini menggunakan teknologi SNP chip Illumina BovineSNP50 untuk menghasilkan data genetik pada 46 sampel Altay white-headed cattle. Setelah itu dilakukan proses quality control dan mendapatkan 85.993 lokus SNP yang digunakan untuk analisis komponen utama dan analisis hubungan genetik. |
| 6. | Genetic Diversity Horseshoe Crabs (<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i> and <i>Tachypleus gigas</i>) based on Random Amplified Polymorphic DNA marker. | Aini, <i>et al</i> (2020) | RAPD | <i>Carcinoscorpius rotundicauda</i> and <i>Tachypleus gigas</i> yang didapatkan kemudian dilakukan pengukuran dan diisolasi dan ekstraksi DNA untuk memperoleh total genom sesuai dengan arahan protokol GeneAID Kit. Setelah itu <i>screening</i> 13 jenis primer dilakukan sebagai tahap analisis RAPD. Kemudian dilakukan elektroforesis dengan memasukkan ke dalam sumur pada <i>gel agrose</i> 1,5%. Setelah itu, dilakukan visualisasi dengan bantuan sinar UV. |
| 7. | Genetic Variation between Triploid and Diploid <i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822) using RAPD Markers. | Normala, <i>et al</i> (2021) | RAPD | Triploid pada ikan lele dumbo diperoleh dengan metode pemuliaan dan induksi, kemudian dilakukan ekstraksi DNA pada 30 juvenil masing-masing progeni triploid ataupun diploid. Setelah itu dilakukan amplifikasi PCR yang selanjutnya dilakukan elektroforesis dan dianalisis di bawah sinar UV. |
| 8. | Molecular genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i> , L. 1758) in East African natural and stocked populations. | Dias <i>et al</i> (2020) | SSR | Menginvestigasi total 664 individu yang kemudian dilakukan perbandingan antara <i>Oreochromis niloticus</i> dari Afrika timur dengan populasi ikan <i>Oreochromis niloticus</i> dari Ethiopia dan Burkina Faso menggunakan pendanda SSR. Pada artikel ini tidak dijelaskan dengan rinci bagaimana tahapan dalam penelitian. |
| 9. | The genetic variation analysis of sandfish (<i>Holothuria scabra</i>) population using simple sequence repeats (SSR) | Sembiring, <i>et al</i> (2022) | SSR | Sampel ikan <i>sandfish</i> sebanyak 15 individu dilakukan ekstraksi dan pemurnian DNA, kemudian dilakukan amplifikasi PCR dengan KODFX-Neo kit. Setelah itu dilakukan pemisahan dalam 2 tahap, dengan <i>gel agrose</i> dan dilakukan pemisahan otomatis pada mesin <i>sequencer</i> ABI PRISM <i>genetic analyzer</i> . |
| 10. | PCR-RFLP as a detection method of allelic diversity | Meikasari, <i>et al.</i> , (2019). | PCR-RFLP | Metode yang digunakan yaitu 1) pengumpulan data genetik, 2) isolasi dan ekstraksi DNA, 3) Uji kualitas DNA |

| No. | Judul | Nama dan Tahun | Teknik Penanda Molekuler | Metode |
|-----|---|--------------------------------|--------------------------|---|
| | seahorse <i>Hippocampus comes</i> (Cantor, 1849) from Bintan waters, Riau Island | | | menggunakan proses elektroforesis, 4) Amplifikasi fragmen DNA dan visualisasi gen 16S rRNA, 5) Pemotongan dan visualisasi fragmen DNA, 6) Analisis data genetik. |
| 11. | Morphometrics and genetic diversity of Tegal, Magelang and their crossbred ducks based on Cytochrome b gene | Henrik, <i>et al.</i> , (2018) | PCR-RFLP | Isolasi DNA dan Amplifikasi didasarkan pada petunjuk kit isolasi DNA. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan thermal cycler mesin pada <i>cyt b</i> mtDNA dan desain oligonukleotida primer spesifik dari gen sitokrom <i>b</i> dilakukan berdasarkan database dari GenBank EU678239.1. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> yang dilakukan pada produk PCR menggunakan enzim restriksi endonuklease <i>HaeIII</i> untuk 6 jam pada suhu 37°C. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis variansi klasifikasi satu arah. Untuk mengetahui polimorfisme gen Cytochrome <i>b</i> (<i>cyt b</i>) DNA mitokondria digunakan <i>Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (PCR-RFLP). Jarak genetik dianalisis berdasarkan nilai heterozigositas, sedangkan pohon filogeni direkonstruksi menggunakan software MEGA 6. |
| 12. | Domestic animals' identification using PCR-RFLP analysis of cytochrome <i>b</i> gene | Rahat, <i>et al.</i> , (2020) | PCR-RFLP | Teknik PCR-RFLP meliputi pengambilan sampel, ekstraksi DNA, amplifikasi PCR dan analisis menggunakan RFLP. |

SIMPULAN

Penanda molekuler merupakan suatu fragmen yang spesifik (DNA atau protein) yang dapat diidentifikasi dan ditemukan dalam lokasi yang spesifik dalam genom, serta digunakan untuk menandai posisi gen tertentu serta karakteristik tertentu yang diwariskan. Beberapa penanda molekuler diantaranya PCR-RFLP, RAPD, ISSR, SSR, dan SNP. Penanda molekuler memiliki banyak kegunaan, diantaranya untuk menganalisis keragaman genetik pada hewan. Berdasarkan hasil literatur review, keragaman genetik berbagai spesies seperti lele, rusa, ikan nila, kepiting, kuda laut, itik, sapi dan kerbau dapat dianalisis keragaman genetiknya dengan menggunakan berbagai penanda molekuler baik dengan menggunakan penanda PCR-RFLP, RAPD, ISSR, SSR, ataupun SNP.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmigid, H. M. (2012). "Efficiency of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) Markers for Genotype Fingerprinting and Genetic Diversity Studies in Canola." *African Journal of Biotechnology*, 11 (24): 6409–19.
- Adhikari, S., Saha, S., Biswas, A., Rana, T. S., Bandyopadhyay, T. K., & Ghosh, P. (2017). Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *The Nucleus*, 60, 283-297.
- Aini, K., Hawis, H. (2020). Genetic Diversity of Horseshoe Crabs (*Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus gigas*) based on Random Amplified Polymorphic DNA marker. *Journal of*

- Natural Resources and Environmental Management. 10(1). 124-137.
- Amin Eimanifar, Alireza Asem, Pei-Zheng Wang, Weidong Li and Michael Wink. (2020). Using ISSR Genomic Fingerprinting to Study the Genetic Dierentiation of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) from Iran and Neighbor Regions with the Focus on the Invasive American *Artemia franciscana*. Diversity Journal, 132(12). 1-21.
- Arif, I. A. & Khan, H. A., (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. Animal Biodiversity and Conservation, 32.1: 9–17.
- Bardacki, F., (2020). The Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in Sex Discrimination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Journal Turk Biology. 24(1). 169-175.
- Campbell, M.R., Vu, N.V., LaGrange, A.P., Hardy, R.S., Ross, T.J., Narum, S.R. (2019). Development and application of single-nucleotide polymorphism (SNP) genetic markers for conservation monitoring of Burbot populations. Trans. Am. Fish. Soc., 148, 661–670.
- Chinnappareddy, L. R. D., Khandagale, K., Chennareddy, A., & Ramappa, V. G. (2013). Molecular markers in the improvement of *Allium* crops. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 49(4), 131-139.
- Dias, Papius., Manuel, Curto., Esays, Alemayehu. (2020). Molecular genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L. 1758) in East African natural and stocked populations. BMC Evolutionary Biology. 20(16).
- Fitzpatrick, S.W.; Bradburd, G.S.; Kremer, C.T.; Salerno, P.E.; Angeloni, L.M.; Funk,W.C. (2020). Genomic and fitness consequences of genetic rescue in wild populations. Curr. Biol, 30, 517–522.
- Guntur, W. S., & Slamet, S. (2019). Kajian kriminologi perdagangan ilegal satwa liar. Recidive, 8(2), 176-186.
- Henrik, H., Purwantini, D., & Ismoyowati, I. (2018). Morphometrics and genetic diversity of Tegal, Magelang and their crossbred ducks based on Cytochrome b gene. Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture, 43(1), 9-18.
- Heyward, AC., Tollenaere, R., Morgan, J., Batley, J. (2015) Molecular marker applications in plants. In: Batley J (ed) Plant Genotyping. Springer, New York, NY, pp 13-27.
- Lucia, Maria., Luciane, Santini., Augusto. (2016). Microsatellite Markers: What They Mean and Why They are So Useful. Journal Genetics and Molecular Biology. 39(3). 312-328.
- Maraş-Vanlıoğlu, F. G., Yaman, H., & Kayaçetin, F. (2020). Genetic diversity analysis of some species in Brassicaceae family with ISSR markers. Biotech Studies, 29(1), 38-46.
- Mason, AS. (2015), SSR Genotyping. In: Batley J (ed) Plant Genotyping. Springer, New York, NY, pp 77-89.
- Meikasari, N. S., Nurilmala, M., Butet, N. A., & Sudrajat, A. O. (2020). PCR-RFLP as a detection method of allelic diversity seahorse *Hippocampus comes* (Cantor, 1849) from Bintan waters, Riau Island. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 404, No. 1, p. 012046). IOP Publishing.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., ... & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 32(2), 261-285.
- Naiborhu, N. S. R. (2021). Tanggung Jawab Negara Terhadap Perdagangan Satwa Liar Dan Keanekaragaman Hayati Melalui Kerjasama Negara-Negara Asean. Bina Hukum Lingkungan, 5(2), 262-286.
- Niklas, Aleksandra., Dorota, Olszewska. (2021). Application of the RAPD Technique to Identify Genetic Diversity in Cultivated Forms of *Capsicum annum* L. Journal Biotechnologia (Pozn). 102(2). 209-223.
- Ningsih, O. S., Detha, A. I., & Wuri, D. A. (2023). Studi Literatur Metode Diagnosis Anisakis. Jurnal Veteriner Nusantara, 6(1), 91-114.
- Normala, Jalil., Victor, Tosin., Azizul, Alim. (2021). Genetic Variation between Triploid and Diploid *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) using RAPD Markers. Vet Scie. 8(75). 1-12.
- Nuraida, D. (2012). Pemuliaan tanaman cepat

- dan tepat melalui pendekatan marka molekuler. *EI-Hayah*, 2(2).
- Petjul, K., Sangdae, A., 2017. Using Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of *Barbodes* spp in Thailand. *Journal Biology Science*. (11)2. 1-6.
- Rahat, M. A., Haris, M., Ullah, Z., Ayaz, S. G., Nouman, M., Rasool, A., & Israr, M. (2020). Domestic animals' identification using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Advancements in Life Sciences*, 7(3), 113-116.
- Safari, S., Mehrabi, A. A., & Safari, Z. (2013). Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessment of genetic diversity in *Brassica napus* genotypes. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(3), 273–279.
- Philippe Sands, (2003). *Principles of International Environmental Law*, Second Editions, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Sembiring, S., J, Hutapea., R, Pratiwi. (2022). The genetic variation analysis of sandfish (*Holothuria scabra*) population using simple sequence repeats (SSR). *Journal International Conference on Tropical Wetland Biodiversity and Conservation*. 1(2).
- Steffler LM, Dolabella SS, Ribolla PE, Dreyer CS, Araujo ED, Oliveira RG, Martins WF, La Corte R. (2016). Genetic variability and spatial distribution in small geographic scale of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under different climatic conditions in Northeastern Brazil. *Parasit Vectors* 9(1):530
- Jessica L. Petersen et al. (2013). Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-Wide SNP Data. *Plos One*, 8. 1-16
- Veronika Ruslanovna Kharzinova et al. (2022). Genome-Wide SNP Analysis Reveals the Genetic Diversity and Population Structure of the Domestic Reindeer Population (*Rangifer tarandus*) Inhabiting the Indigenous Tofalar Lands of Southern Siberia. *Diversity Journal*. 900(14).1-1