

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Analisis Pakan Garangan Jawa

Analisis pakan menarik dilakukan pada garangan jawa, karena hewan ini berperan sebagai mesopredator dan memiliki variasi mangsa yang sangat luas. Analisis pakan digunakan untuk membantu pemahaman mengenai hubungan pemangsa dengan berbagai mangsa potensial dan lingkungan sekitar mereka. Pengetahuan tentang interaksi antara pemangsa dan mangsa sangat penting untuk memahami fungsi suatu spesies dalam suatu ekosistem (Boitani dan Powell, 2012; Sheppard dan Harwood, 2005). Selain itu, analisis pakan juga penting untuk mengkaji rantai makanan dalam suatu ekosistem. Kajian mengenai rantai makanan penting di bidang ekologi beragam, seperti biologi konservasi, agroekologi, penetrasi ekosistem oleh spesies asing, efek keanekaragaman hayati pada fungsi ekosistem, dan aliran energi di dalam dan di antara ekosistem (Pompanon dkk., 2012).

Garangan jawa (*Herpestes javanicus*) merupakan mamalia kecil yang termasuk dalam kelompok garangan (*mongoose*) (IUCN, 2016; Patou dkk., 2009). Berdasarkan data yang diperoleh IUCN *Redlist*, garangan jawa terdaftar sebagai spesies dengan status konservasi *Least Concern*. Habitat dari garangan jawa sangat bervariasi, yaitu lahan pertanian, lahan perkebunan, daerah pesisir, pengunungan,

hutan (alami dan buatan), padang rumput, habitat yang terdegradasi atau antropogenik, dan taman. Garangan jawa juga dapat tinggal dan hidup di daerah yang sangat dekat dengan tempat tinggal manusia (IUCN, 2016). Kondisi habitat garangan jawa yang sangat bervariasi menyebabkan makanan dari spesies ini sangat dipengaruhi oleh lingkungan sekitarnya, sehingga garangan jawa sangat bergantung pada peluang mangsa yang tersedia (Gorman, 1975; The Animal Diversity Web, 2014).

Garangan jawa memiliki peran ekologi sebagai mesopredator (Conner dan Morris, 2015; Corlett, 2007). Mesopredator memiliki peran penting dalam mengendalikan ekosistem. Kondisi populasi predator puncak yang menurun drastis diseluruh dunia, menyebabkan mesopredator sebagai pengendali utama dalam suatu ekosistem (Prugh dkk., 2009). Ciri utama yang menandakan garangan jawa sebagai mesopredator adalah garangan jawa memiliki variasi mangsa yang sangat beragam. Mangsa garangan jawa adalah ikan, burung, serangga, biji-bijian, tumbuhan, hewan pengerat, siput, dan reptil. Selain itu, garangan jawa dikenal sebagai agen pengendali biologi (*biocontrol agents*) untuk hewan pengerat (terutama tikus), ular, dan serangga (Khoobdel dkk., 2016; Mahmood dan Adil, 2016; Nellis dan Everard, 1983).

Sebagian besar garangan (*mongoose*) (termasuk garangan jawa) digunakan sebagai agen pengendali biologi untuk tikus (Messing, R. H. dan Wright, 2006). Bahkan garangan (*mongoose*) sengaja diintroduksi ke suatu daerah untuk

mengendalikan tikus, seperti yang terjadi di *Fijian Island* (Gorman, 1975), *Amami-Oshima Island* (Watari dkk., 2008) dan *Puerto Rico* (Pimentel, 1955). Populasi tikus penting untuk dikendalikan karena keberadaannya dianggap merugikan. Dampak negatif yang mendasari pentingnya pengendalian keberadaan tikus dalam suatu ekosistem adalah tikus sebagai sumber penyakit yang berpotensi dapat menular ke manusia dan satwa liar lainnya, dan sebagai hama pertanian (terutama pada tanaman pangan) (Banks dan Hughes, 2012; Himsworth dkk., 2013).

B. Identifikasi Pakan

Identifikasi mangsa merupakan salah satu bagian yang dilakukan dalam menganalisis pakan. Identifikasi mangsa penting dilakukan untuk mengetahui jenis-jenis mangsa yang dimangsa. Di lapangan, identifikasi mangsa sering kali tidak dapat ditentukan atau dikuantifikasi secara langsung, sehingga pada umumnya identifikasi mangsa dilakukan secara tidak langsung. Identifikasi mangsa secara tidak langsung yang dimakan oleh pemangsa dapat diketahui dengan menggunakan feses sebagai sampel (Boitani dan Powell, 2012; Mahmood dan Adil, 2016). Feses dapat digunakan sebagai sampel, karena feses merupakan produk akhir dari pencernaan sehingga dapat mengindikasikan mangsa suatu spesies. Selain itu, penggunaan feses sebagai sampel bersifat non-invasif dan mudah untuk diperoleh (Idaghdour dkk., 2003).

Identifikasi mangsa secara tidak langsung dapat dilakukan dengan metode konvensional, molekuler, atau gabungan dari keduanya (Boitani dan Powell, 2012;

Pompanon dkk., 2012; Xiong dkk., 2017). Identifikasi mangsa secara konvensional pada umumnya menggunakan pendekatan makroskopis dan mikroskopis (Maria dkk., 2018; Xiong dkk., 2017). Menurut Mahmood dan Adil (2016) dan Pompanon dkk. (2012), metode-metode identifikasi pakan konvensional (terutama mikroskopis) sangat bergantung pada bagian mangsa yang belum tercerna (bagian-bagian keras sisa makanan seperti tulang, bulu, rambut, sisik, batang, cangkang) (Gambar 1), pengetahuan ahli tentang morfologi mangsa, umumnya memakan waktu yang lama, dan seringkali tidak dapat memberikan identifikasi spesies yang dimangsa secara tepat.



Gambar 1. Bagian mangsa belum tercerna yang ditemukan dari sampel feses garangan jawa (*Herpestes javanicus*). (A) potongan tulang; (B) bulu burung; (C dan D) bagian serangga (Mahmood dan Adil, 2016).

Identifikasi pakan secara molekuler saat ini dapat dilakukan untuk menyempurnakan data yang diperoleh dari pendekatan secara konvensional.

Teknik ini memberikan hasil identifikasi spesies mangsa yang lebih akurat dalam sampel-sampel yang terdapat dalam kotoran dan menghindari banyak masalah identifikasi yang dilakukan secara visual dan mikroskopik (Boitani dan Powell, 2012). Selain itu, teknik ini menghasilkan identifikasi pakan yang lebih detail, terutama dalam mengidentifikasi bagian mangsa yang rusak akibat dicerna (Hope dkk., 2014). Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk identifikasi pakan adalah secara molekuler menggunakan PCR. Pendekatan secara molekuler dapat memberikan hasil yang lebih efektif dan akurat, walaupun mangsa yang diidentifikasi secara visual tidak dapat dikenali akibat proses pencernaan, serta pendekatan ini dapat digunakan untuk analisis pakan yang sangat kompleks dan efisien untuk memproses sampel dalam skala besar (King dkk., 2008; Xiong dkk., 2017).

C. Deskripsi Tikus

Keberadaan tikus dalam suatu ekosistem seringkali dianggap menimbulkan masalah bagi manusia. Permasalahan yang sering kali timbul dari keberadaan tikus adalah tikus sebagai hama tanaman agrikultura dan sebagai sumber dan penyebar berbagai penyakit (Banks, P. B. dan Hughes, 2012; Himsworth dkk., 2013). Tanaman agrikultura yang biasanya diserang oleh tikus diantaranya adalah padi, jagung, tebu, sawit, kelapa, kakao, kedelai, ubi, dan kacang hijau (Hoque dkk., 1998). Hubungan erat antara tikus dan manusia menyebabkan sulitnya menghindari penyakit bawaan yang dapat ditularkan dari

tikus. Penyakit yang bersumber dari tikus dapat ditularkan ke manusia baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Secara langsung dapat melalui urin, feses, liur, dan gigitan tikus, sedangkan secara tidak langsung dapat melalui gigitan vektor ektoparasit tikus (seperti kutu, pinjal, caplak, dan tungau). Beberapa penyakit yang dapat ditularkan tikus ke manusia adalah *murine typhus*, *scrub typhus*, leptospirosis, demam gigitan tikus, salmonellosis, cacar rickettsial, hymenolepsia, dan angiostrongylosis (Hoque dkk., 1998; Komariah dkk., 2010).

Tikus-tikusan atau Muridae merupakan mamalia yang termasuk dalam Ordo Rodentia atau hewan pengerat (Musser dan Newcomb, 1983). Tikus dapat hidup di beberapa habitat dan populasinya tersebar di seluruh dunia (kosmopolit), sehingga hal tersebut menandakan bahwa tikus mempunyai kemampuan adaptasi tinggi (Suyanto, 2006). Menurut Hedrich (2006), tikus dapat ditemukan di semua benua, kecuali di Antartika dan di banyak *oceanic island*. Mereka dapat menempati ekosistem mulai dari gurun yang kering hingga hutan tropis basah. Di dunia, tikus merupakan mamalia yang memiliki jumlah spesies terbesar, yaitu ada 2052 spesies (Nowak dan Walker, 1999). Tikus yang terdapat di Indonesia terbagi menjadi 3 subfamili, yaitu Murinae, Hydromyinae, dan Rhizomyinae. Beberapa jenis tikus yang dapat ditemukan di Indonesia diantaranya *Bandicota bengalensis*, *Bandicota indica*, *Mus cervicolor*, *Mus musculus*, *Mus caroli*, *Rattus argentiventer*, *Rattus tiomanicus*, *Rattus norvegicus*, dan *Rattus exulans* (Hoque dkk., 1988; Suyanto, 2006).

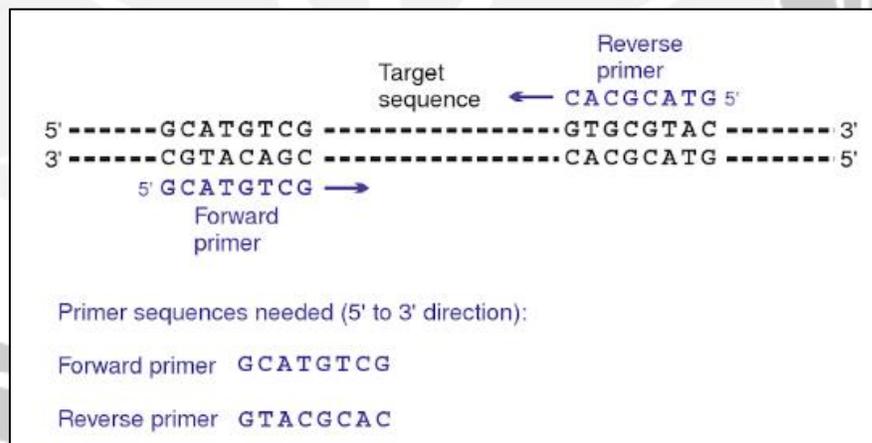
Umumnya tikus aktif di malam hari (nokturnal). Namun dalam beberapa kasus, tikus dapat menjadi hewan yang aktif di siang hari (diurnal). Hal tersebut dapat terjadi apabila populasi predator tikus yang aktif di malam hari lebih tinggi daripada populasi tikus, sehingga lebih berbahaya bagi tikus untuk aktif di malam hari daripada di siang hari (Fenn dan Macdonald, 1995; Lima dan Dill, 1990).

Jenis tikus dapat dibedakan berdasarkan ciri morfologinya. Parameter yang biasanya diamati dalam mengidentifikasi jenis tikus berdasarkan ciri morfologinya adalah ukuran standar (panjang badan dan kepala, panjang ekor, panjang kaki belakang, panjang telinga, bobot tubuh), rambut (biasanya yang diamati warna rambut), rumus puting susu, dan gigi. Namun, identifikasi jenis tikus berdasarkan morfologi hanya dapat dilakukan pada tikus dewasa. Hal ini dikarenakan umur tikus sangat mempengaruhi ukurannya. Selain itu, pada tikus yang belum dewasa (*juvenile* dan *subadult*) tidak bisa diamati alat kelamin sekundernya, karena belum berkembang dengan sempurna (Suyanto, 2006). Identifikasi tikus juga dapat dilakukan secara molekuler untuk mengatasi kesulitan dalam mengidentifikasi tikus berdasarkan ciri morfologinya. mtDNA (mitokondria DNA) dapat digunakan untuk mengidentifikasi tikus secara molekuler (Robins dkk., 2007).

D. Desain Primer Spesifik

Primer atau oligonukleotida rantai pendek (18-30 bp) merupakan salah satu komponen PCR yang diperlukan untuk mensintesis untai DNA secara *in vitro*.

Komponen ini berfungsi untuk membantu DNA polimerase mengenali DNA *template*, sehingga DNA polimerase dapat mensintesis untai DNA baru yang komplemen terhadap DNA *template* (Patil dan Biradar, 2008; Turner dkk., 2005). Proses PCR dapat berjalan dengan menggunakan sepasang primer atau *single primer*. Sepasang primer (1 set primer) terdiri dari primer *forward* (menyebabkan arah sintesis untai DNA maju) dan primer *reverse* (menyebabkan arah sintesis untai DNA mundur) (Gambar 2). Keduanya memiliki urutan basa nitrogen dari 5' ke 3' yang komplemen dengan ujung DNA *template* (Dale dan Scantz, 2007; Watanabe dkk., 2001; Williams dkk., 1990).



Gambar 2. Primer *forward* dan *reverse* (Dale dan Scantz, 2007).

Identifikasi suatu jenis organisme secara molekuler dengan PCR dapat dilakukan menggunakan primer universal maupun primer spesifik. Primer universal didesain untuk dapat mengamplifikasi beberapa jenis organisme, sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi beberapa jenis organisme. Primer spesifik

merupakan kebalikan dari primer universal. Primer spesifik didesain hanya untuk mengamplifikasi jenis organisme tertentu dan mensyaratkan bahwa primer tidak memiliki kecocokan dengan organisme non target (Erwanto dkk., 2012; Kocher dkk., 1989; Taberlet dkk., 1991; Ye dkk., 2012).

Informasi mengenai sekuen primer yang akan digunakan dalam PCR dapat diperoleh dari penelitian sebelumnya. Namun, apabila informasi tersebut belum tersedia dapat dilakukan desain primer. Dasar acuan yang digunakan untuk mendesain primer adalah sekuen DNA target (Dieffenbach dkk., 1993; Erwanto dkk., 2012; Ye dkk., 2012). Ada dua parameter penting dalam mendesain primer, yaitu spesifitas dan efisiensi primer dalam mengamplifikasi DNA target. Spesifitas diartikan sebagai frekuensi terjadinya *mispriming* yang mengarah pada terjadinya amplifikasi produk nonspesifik yang tidak diinginkan. Efisiensi juga penting dalam mendesain primer, hal ini terkait dengan jumlah ampikon yang dihasilkan dari proses PCR. Idealnya pasangan primer yang efisien akan menghasilkan peningkatan dua kali lipat ampikon dalam setiap siklus PCR (Dieffenbach dkk., 1993; Thornton dan Basu, 2011).

Desain primer untuk identifikasi jenis dengan pendekatan secara molekuler membutuhkan marka molekuler atau penanda molekuler. Penanda molekuler yang banyak digunakan berasal dari DNA sirkuler, yaitu DNA mitokondria. DNA mitokondria atau mtDNA dapat digunakan untuk identifikasi dan otentikasi spesies selain DNA inti. Salinan mtDNA yang terdapat di setiap sel

menjadikannya metode pilihan untuk identifikasi spesies, terutama ketika menganalisis sampel dengan sedikit atau tanpa DNA inti (Ono dkk., 2007; Rastogi dkk., 2007). mtDNA ini terletak pada daerah matriks mitokondria. Molekul mtDNA berbentuk sirkular tertutup berukuran kecil dengan pita yang *double-stranded*, tidak memiliki intron, jarang terjadi rekombinasi, dan bersifat monofiletik yang diturunkan secara maternal dalam bentuk haploid (Taanman, 1999). Menurut Rahayu dan Nugroho (2015), jumlah mtDNA berlimpah (100 - 10.000 salinan genom mitokondria) sehingga molekulnya mudah untuk diisolasi dibandingkan DNA inti.

mtDNA pada hewan biasanya terdiri dari 36 atau 37 gen, yaitu 2 untuk rRNA, 22 untuk tRNA, dan 12 atau 13 gen pengkode protein serta terdapat sekuens yang tidak mengkode protein yang dinamakan *control region* (CR) (Arif dkk., 2011). Standar dalam identifikasi spesies saat ini adalah amplifikasi dan sekuensing mtDNA (Caine, 2006). Locus yang digunakan dari mtDNA untuk identifikasi spesies harus menunjukkan variasi antarspesies tetapi sedikit variasi intraspesies. Locus yang digunakan umumnya adalah gen *cyt b*, *CO* (I - III), 12S rRNA dan 16S rRNA (Tobe dan Linacre, 2008).

CO merupakan bagian mtDNA yang bersifat sangat *conserved* di seluruh jenis organisme yang menggunakan fosforilasi oksidatif untuk metabolisme. *CO* mengkode protein yang berfungsi sebagai akseptor elektron terminal dalam rantai pernapasan, mengkatalisis reduksi oksigen ke air dan memompa proton melintasi

membran krista. Protein ini terdiri dari beberapa subunit, yaitu subunit I, II, dan III. *COI* sebagian besar terdapat dalam membran krista mitokondria. Gen *COI* mempunyai region yang bersifat *conserved* dan variatif, region yang bersifat *conserved* inilah yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu spesies. Selain itu, gen ini dapat digunakan untuk identifikasi jenis karena divergensi genetik intraspesifik lebih kecil dibandingkan divergensi interspesifik (Hebert dkk., 2003; Robins dkk., 2007; Waugh, 2007).

Menurut Dieffenbach dkk., (1993) dan Thornton dan Basu (2011), dalam mendesain primer ada beberapa parameter yang harus diperhatikan, yaitu sebagai berikut:

1. Primer yang optimal memiliki panjang sekitar 18-24 bp, karena cenderung menghasilkan produk yang sangat spesifik. Primer yang memiliki ukuran yang lebih panjang akan mengurangi efisiensi primer, sehingga menghasilkan produk yang lebih sedikit. Primer yang memiliki ukuran yang lebih pendek dapat menghasilkan produk yang nonspesifik. Primer yang memiliki ukuran kurang dari 18 bp hanya untuk sejumlah protokol PCR, seperti penggunaan *arbitrary* atau *random short* primer dalam memetakan genom sederhana.
2. *Melting temperature* (T_m) yang disarankan untuk primer berada pada kisaran 56-68°C. Nilai T_m pada pasangan primer harus cocok, apabila selisih nilai T_m pada pasangan primer terlalu besar dapat menyebabkan berkurangnya spesifitas dan

efisiensi dari pasangan primer. Perbedaan nilai T_m yang disarankan dalam suatu pasangan primer adalah 1°C .

3. Komposisi G + C dalam primer yang disarankan sebesar 50%.
4. Ukuran amplikon yang diinginkan.
5. Stabilitas ujung 3', posisi ini sangat penting untuk mengendalikan kemungkinan terjadinya *mispriming*. Pasangan primer tidak boleh memiliki ujung 3' yang saling komplementer, hal ini dikarenakan ujung 3' yang komplementer dapat menyebabkan terbentuknya primer dimer.
6. Urutan basa nitrogen berulang pada primer harus dihindari. Hal ini dapat menyebabkan kemungkinan terjadinya *mispriming*. Pengulangan ini harus dihindari, baik untuk nukleotida (misalnya TAAAAAGC yang memiliki 5 bp adenin secara berurutan) dan dinukleotida (misalnya TCTCTCTCTCTC).
7. *Self complementary* harus dihindari dalam mendesain primer. Primer yang memiliki urutan basa nitrogen yang komplementer terhadap primer itu sendiri atau terhadap pasangan primernya dapat menyebabkan terbentuknya primer dimer dan struktur *hairpin*. Keberadaan primer dimer dan struktur *hairpin* dapat mengurangi spesifitas dan efisiensi dari primer.

E. Uji Primer Spesifik

Uji terhadap suatu desain primer dapat dilakukan secara *in silico* dan uji *in vitro*. Uji *in silico* dilakukan menggunakan program komputer yang bertujuan untuk memprediksi spesifitas dan efisiensi desain primer terhadap prediksi amplikon yang dihasilkan dari penggunaan desain primer tersebut (Ficetola dkk., 2010; Henriques dkk., 2012). Program yang biasanya digunakan untuk uji *in silico* terhadap desain primer adalah Primer-BLAST (Ye dkk., 2012). Menurut Henriques dkk., (2012), uji *in silico* ini penting digunakan untuk meminimalisir kegagalan dalam uji berikutnya (yaitu *in vitro*) yang disebabkan oleh spesifitas dan efisiensi primer yang buruk. Namun, uji *in silico* tidak cukup untuk memprediksi spesifitas dan efisiensi desain primer, sehingga diperlukan uji lanjutan secara *in vitro*. Hal ini dikarenakan kondisi yang berbeda antara uji *in silico* dan *in vitro*. Kondisi amplifikasi secara *in vitro* lebih kompleks dibanding secara *in silico* sehingga perlu dilakukan konfirmasi dengan uji *in vitro* terhadap desain primer.

Uji *in vitro* terhadap desain primer dilakukan untuk membuktikan hasil dari uji *in silico*. Uji ini dapat dilakukan menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Ficetola dkk., 2010; Henriques dkk., 2012). PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah metode secara *in vitro* untuk memperbanyak sekuens DNA yang spesifik dengan bantuan enzim polimerase, dalam proses perbanyakannya sekuens DNA yang spesifik dibatasi oleh sepasang primer yang akan berhibridisasi pada sekuens DNA tersebut. Prinsip kerja PCR adalah perbanyak sekuens DNA spesifik yang diawali dengan pelekatan dNTP dalam reaksi termal mengikuti acuan

primer (Freeland dkk., 2011; Verkuil dkk., 2008). Menurut Lorenz (2012), komponen yang diperlukan pada reaksi PCR adalah akuades steril, PCR buffer, dNTP's, MgCl₂, primer, DNA *template*, dan DNA polymerase.

Mesin PCR atau *thermal cyclers* dalam reaksi PCR memungkinkan dilakukannya siklus PCR secara berulang pada suhu yang berbeda (Freeland dkk., 2011). PCR pada umumnya dalam 1 kali *running* melakukan siklus sebanyak 25-35 siklus (Lorenz, 2012). Menurut Fatima dan Mussaed (2018) dan Lorenz (2012), proses siklus pada PCR terdiri dari 3 tahap utama, yaitu *denaturation* pada suhu 94°C dengan durasi selama 10 - 60 detik, *annealing* yang berlangsung pada berlangsung selama 30 - 60 detik pada suhu 5°C di bawah T_m (*melting temperature*), dan *extention* atau *elongation* yang berlangsung pada suhu 70°C - 80°C dengan waktu yang dibutuhkan sangat dipengaruhi oleh ampikon dan DNA polimerase yang digunakan. Selain 3 tahapan utama yang sudah disebutkan, terdapat 3 tahapan lainnya yang terdiri dari *initial denaturation* atau *pre denaturaion* pada suhu 94°C - 98°C selama 1 -5 menit sebagai tahap awal, *final extension* pada suhu 70°C - 80°C selama 5 - 10 menit yang berlangsung setelah tahap *extension* atau *elongation*, yang dilanjutkan dengan *hold* pada suhu 4°C dengan durasi waktu yang tidak ada ketentuan khususnya.

F. Hipotesis

1. Hasil desain primer spesifik memiliki spesifitas dan efisiensi yang baik dalam mengidentifikasi jenis tikus yang dilakukan secara *in silico*.

2. Hasil desain primer spesifik dapat digunakan untuk mengamplifikasi dan mengidentifikasi jenis tikus pada pakan garangan jawa secara *in vitro* dengan spesifitas dan efisiensi primer yang baik.

