

Efektivitas Metode Pengambilan Sampel Non-Invasif untuk Amplifikasi Gen COI pada *Rattus norvegicus*

Salsabila Puteri Syahrina^{1*}, Badruzsaufari²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Indonesia.

*Email korespondensi: salsabilapsr.17@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efektivitas metode pengambilan sampel non-invasif dalam amplifikasi gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) pada tikus *Rattus norvegicus*. Sampel yang digunakan berupa feses. Metode non-invasif dipilih karena mampu meminimalkan stres dan cedera pada hewan serta mendukung prinsip animal welfare dan 3R. Ekstraksi DNA sampel feses dilakukan menggunakan metode CTAB termodifikasi dengan penambahan polyvinylpyrrolidone (PVP), proteinase K, dan pemurnian menggunakan chloroform:isoamyl alcohol serta presipitasi isopropanol-ammonium asetat. DNA hasil ekstraksi diamplifikasi menggunakan PCR dengan target gen COI mitokondria. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode non-invasif mampu menghasilkan DNA yang dapat diamplifikasi pada gen COI, meskipun kualitas DNA sampel feses cenderung lebih rendah akibat adanya inhibitor PCR. Penambahan BSA dan PVP membantu meningkatkan keberhasilan amplifikasi DNA. Penelitian ini menunjukkan bahwa metode non-invasif berpotensi digunakan sebagai alternatif identifikasi molekuler tikus secara lebih aman dan etis.

Kata kunci: COI; Feses; Non-invasif; *Rattus norvegicus*; PCR

PENDAHULUAN

Rattus norvegicus merupakan rodent sinantropik yang sangat dekat dengan aktivitas manusia sehingga sering digunakan sebagai model biologis sekaligus dianggap sebagai hama perkotaan dan reservoir potensial berbagai agen zoonosis (Hastuti & Sulasmi, 2017). Ketepatan identifikasi spesies penting bukan hanya untuk kepentingan taksonomi, tetapi juga untuk pengendalian populasi, pemantauan risiko kesehatan, dan kajian biodiversitas. Di ranah biologi molekuler, identifikasi berbasis DNA memberi keunggulan dibandingkan pendekatan morfologi karena dapat diterapkan pada sampel yang rusak, kecil, atau bercampur dengan kontaminan.

Pada penelitian hewan laboratorium, pengambilan sampel non-invasif semakin dipilih karena selaras dengan prinsip kesejahteraan hewan. Sampel feses adalah sumber DNA yang paling mudah diakses tanpa prosedur invasif. Pendekatan molekuler menggunakan DNA barcoding menjadi alternatif yang lebih akurat. Gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) mitokondria merupakan marka genetik yang umum digunakan karena memiliki variasi interspesifik tinggi namun relatif konservatif dalam satu spesies. Gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) telah lama diakui sebagai penanda utama DNA barcoding hewan. Folmer *et al.* (1994) memperkenalkan primer universal untuk mengamplifikasi fragmen COI, sedangkan Hebert *et al.* (2003a, 2003b) menegaskan peran COI sebagai inti sistem identifikasi hayati pada hewan. Meskipun demikian, studi lanjutan menunjukkan bahwa primer universal tidak selalu bekerja optimal pada semua takson karena adanya mismatches dan variasi urutan, sehingga kualitas DNA *template* tetap menjadi faktor penentu keberhasilan PCR (Geller *et al.*, 2013). Amplifikasi gen COI menggunakan PCR memungkinkan identifikasi spesies secara cepat dan sensitif.

Penggunaan metode non-invasif semakin berkembang karena mampu meminimalkan stres dan cedera pada hewan. Sampel non-invasif seperti feses dapat digunakan untuk memperoleh DNA tanpa tindakan pembedahan maupun pengambilan darah. Feses memiliki keunggulan praktis di lapangan tetapi sering membawa inhibitor PCR seperti polisakarida kompleks, pigmen, asam empedu, dan produk degradasi lain yang dapat menurunkan efisiensi amplifikasi sehingga diperlukan optimasi metode ekstraksi DNA (Oikarinen *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2008; Srirungruang *et al.*, 2022).

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efektivitas metode pengambilan sampel non-invasif berupa feses dalam amplifikasi gen COI pada tikus *Rattus norvegicus*.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Penelitian ini menggunakan sampel feses segar *Rattus norvegicus* sebagai sumber DNA. Proses ekstraksi DNA dilakukan menggunakan buffer PBS 1×, buffer CTAB, polyvinylpyrrolidone (PVP), β-mercaptoethanol, proteinase K, chloroform:isoamyl alcohol (24:1), isopropanol dingin, ammonium asetat, etanol 70%, dan *nuclease free water* (NFW). Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan MyTaq HS Red Mix, primer universal LCO1490 dan HCO2198, serta bovine serum albumin (BSA). Visualisasi DNA dilakukan menggunakan gel agarosa dalam buffer TBE 0,5× dengan bantuan DNA ladder dan *loading dye*. Peralatan yang digunakan meliputi mikropipet, sentrifus, vortex, *thermal cycler* PCR, *waterbath*, spektrofotometer UV-Vis, mikrotube 1,5 mL, dan perangkat elektroforesis.

Pengambilan Sampel

Sampel berupa feses segar diperoleh dari *Rattus norvegicus* yang dipelihara dalam kandang individu. Sampel dikumpulkan menggunakan spatula steril kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube steril 1,5 mL dan disimpan pada suhu -20°C hingga proses ekstraksi DNA dilakukan.

Ekstraksi DNA Feses

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode CTAB termodifikasi. Sampel feses sebanyak 0,08–0,10 g dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 mL kemudian ditambahkan 850 µL PBS 1× dan dihomogenkan menggunakan vortex. Suspensi disentrifugasi pada 500 × g selama 4 menit dan supernatan dipindahkan ke tabung baru. Proses pencucian menggunakan PBS dilakukan sebanyak dua kali. Supernatan kemudian disentrifugasi kembali pada 13.000 rpm selama 5 menit hingga diperoleh pellet.

Pellet ditambahkan 800 µL buffer CTAB panas (65°C) dan 0,01 g PVP kemudian dihomogenkan. Selanjutnya ditambahkan 16 µL β-mercaptoethanol dan 15 µL proteinase K, lalu campuran diinkubasi menggunakan *waterbath* pada suhu 65°C selama 60 menit. Setelah inkubasi, sampel disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit dan supernatan dipindahkan ke tabung baru.

Tahap pemurnian pertama dilakukan menggunakan *chloroform:isoamyl alcohol* (24:1) dengan perbandingan 1:1 terhadap volume supernatan. Campuran dihomogenkan menggunakan inversi perlahan kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit. Fase atas dipindahkan ke tabung baru dan tahap pemurnian diulangi sebanyak dua kali. Tahap pemurnian kedua menggunakan *choloform* pekat dengan perbandingan 1:1 terhadap volume supernatan. Campuran dihomogenkan menggunakan inversi perlahan kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C.

DNA dipresipitasi menggunakan 600 µL isopropanol dingin dan 60 µL ammonium asetat kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 24 jam. Sampel disentrifugasi pada 13.000 × g selama 10 menit hingga terbentuk pellet DNA. Pellet dicuci menggunakan etanol 70%, dikeringkan selama 15–20 menit, kemudian diresuspensi menggunakan 30–50 µL NFW.

Kuantifikasi DNA

Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Sampel DNA diencerkan menggunakan NFW sebelum proses pengukuran dilakukan.

Amplifikasi PCR Gen COI

Amplifikasi fragmen gen *cytochrome c oxidase subunit I* (COI) dari DNA mitokondria dengan metode PCR menggunakan kit My Taq HS Red Mix 2x (Bioline) dan primer: BatL5310R dan R6036RF1 (Tabel 1). Komposisi campuran pereaksi PCR sebanyak 25 µl terdiri atas *nuclease free water* (5,5 µl), My Taq HS Red Mix 2X (12,5 µl), masing-masing primer (10 mM) sebanyak 1 µl dan DNA *template* (50 ng/ µl) sebanyak 2 µl.

Tabel 1. Primer Gen COI yang digunakan untuk Amplifikasi Sampel DNA Lendir Ikan

Primer	Sekuen
BatL5310R	5'-TCTAGGTTAGTTGAGGAGTAGG-3'
R6036RF1	5'-TGATTCTTCGGCCACCCAGAAAGT-3'

Program amplifikasi dilakukan menggunakan *thermal cycler* dengan tahap initial denaturation pada suhu 94°C selama 2 menit. Tahap tersebut dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 58°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Setelah seluruh siklus selesai, dilakukan final extension pada suhu 72°C selama 8 menit, kemudian produk PCR disimpan pada suhu 4°C hingga tahap elektroforesis dilakukan.

Elektroforesis

Visualisasi produk PCR (amplikon) dilakukan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1%. Gel dibuat dengan melarutkan 0,3 g agarosa ke dalam 30 mL buffer TBE 0,5×, kemudian dipanaskan hingga homogen. Setelah larutan agak dingin, ditambahkan *Diamond Nucleic Acid Dye* sebanyak 1 µL dan larutan dituangkan ke dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir pembentuk sumur, kemudian didiamkan hingga memadat. Sampel produk PCR dicampurkan dengan *loading dye* sebelum dimasukkan ke dalam sumur gel. Marker DNA yang digunakan yaitu VC 1000 bp Plus DNA Ladder. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama ±40 menit. Hasil migrasi DNA kemudian diamati dan didokumentasikan menggunakan UV transilluminator. Amplifikasi dinyatakan berhasil jika muncul pita (band) tunggal dan jelas pada gel agarosa dengan ukuran sekitar 700 bp yang sesuai dengan yang pernah dilaporkan oleh Herbert *et al.*, (2003) mengenai jumlah basa untuk gen COI sebanyak 658 bp yang diamplifikasi sebagai penanda DNA *barcoding* (Pentinnasari *et al.*, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Pengukuran DNA dengan Spektrofotometer

DNA hasil ekstraksi menunjukkan variasi konsentrasi dan kemurnian antar sampel. Berdasarkan hasil pengukuran spektrofotometer, konsentrasi DNA berkisar antara 1,29–13,63 ng/µL dengan rasio A260/A280 antara 1,62–1,89.

Tabel 2. Hasil Pengukuran DNA

Sampel	Konsentrasi DNA (ng/µL)	Rasio A260/A280	Keterangan
F1	13,63	1,80	DNA murni dan berkualitas baik
F2	10,01	2,34	DNA terindikasi kontaminasi RNA
F3	1,29	1,74	DNA cukup murni dengan konsentrasi rendah
F4	2,48	-	Konsentrasi DNA rendah, rasio tidak terdeteksi
F5	6,6	0,87	DNA terindikasi kontaminasi protein atau senyawa pengotor

Nilai konsentrasi dan rasio kemurnian DNA yang berbeda pada setiap sampel diduga dipengaruhi oleh karakteristik feses sebagai sampel non-invasif yang memiliki kandungan senyawa penghambat (*PCR inhibitor*) seperti polisakarida kompleks, pigmen empedu, protein, serta sisa metabolisme pencernaan. Senyawa tersebut dapat ikut terisolasi bersama DNA sehingga memengaruhi kualitas DNA dan keberhasilan amplifikasi PCR. Selain itu, DNA yang berasal dari feses umumnya memiliki tingkat degradasi lebih tinggi dibandingkan DNA dari jaringan segar karena terpapar aktivitas enzimatis dan kondisi lingkungan selama proses ekskresi (Acharya *et al.*, 2017).

Sampel F1 menunjukkan rasio A260/A280 sebesar 1,80 yang menandakan kualitas DNA relatif baik dan mendekati kisaran DNA murni. Menurut Lucena-Aguilar *et al.* (2016), rasio A260/A280 sebesar 1,8–2,0 menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang baik untuk analisis molekuler. Sebaliknya, nilai rasio yang terlalu tinggi pada sampel F2 (2,34) diduga disebabkan oleh kontaminasi RNA atau residu reagen ekstraksi yang belum terpisahkan secara optimal.

Konsentrasi DNA yang rendah pada sampel F3 dan F4 diduga dipengaruhi oleh rendahnya jumlah DNA target yang berhasil dipisahkan dari matriks feses serta kemungkinan kehilangan pellet DNA selama tahap pencucian dan presipitasi. Keberadaan senyawa inhibitor dalam sampel feses juga dapat menghambat proses ekstraksi maupun amplifikasi PCR sehingga menyebabkan rendahnya konsentrasi DNA hasil isolasi (Schrader *et al.*, 2012).

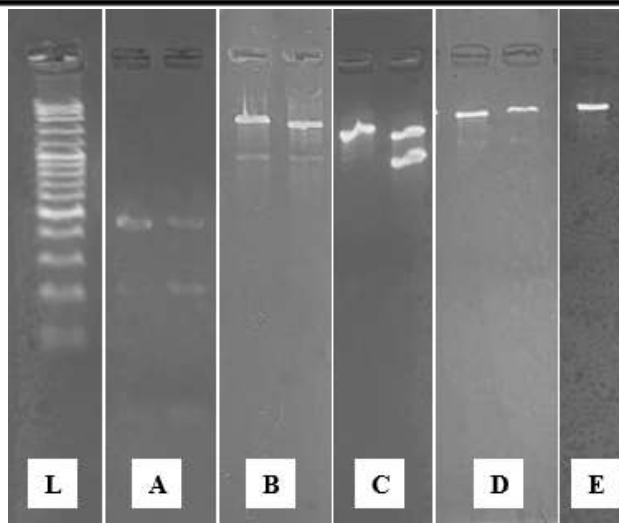
Nilai rasio A260/A280 pada sampel F5 sebesar 0,87 menunjukkan kemungkinan adanya kontaminasi protein atau senyawa organik lain yang masih terbawa selama proses ekstraksi. Kontaminasi tersebut dapat menghambat aktivitas DNA polimerase sehingga menurunkan efisiensi amplifikasi PCR. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan metode CTAB termodifikasi dengan penambahan PVP dan β -mercaptoethanol untuk membantu mengurangi senyawa inhibitor pada sampel feses. Penambahan PVP diketahui mampu mengikat senyawa fenolik dan metabolit pengganggu lain yang dapat memengaruhi kualitas DNA hasil ekstraksi (Suman *et al.*, 2021).

Dengan demikian, variasi kualitas DNA pada penelitian ini diduga tidak hanya dipengaruhi oleh faktor teknis selama proses ekstraksi DNA, tetapi juga dipengaruhi oleh karakteristik alami sampel feses yang memiliki kandungan inhibitor tinggi dan tingkat degradasi DNA yang berbeda pada setiap sampel

B. Hasil Elektroforesis DNA

Visualisasi produk PCR menggunakan elektroforesis menunjukkan bahwa variasi suhu *annealing* memengaruhi keberhasilan amplifikasi gen COI dari DNA feses *Rattus norvegicus*. Hasil elektroforesis memperlihatkan adanya perbedaan intensitas pita DNA, kemunculan *double band*, serta tingkat spesifisitas amplifikasi pada setiap suhu *annealing* yang digunakan. Berdasarkan hasil optimasi, suhu *annealing* 58°C menghasilkan pita DNA paling spesifik dibandingkan suhu lainnya (Gambar 1).

Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk memperoleh kondisi amplifikasi PCR yang paling spesifik terhadap gen COI dari DNA feses *Rattus norvegicus*. Variasi suhu *annealing* yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, dan 58°C. Hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% dan diamati berdasarkan keberadaan pita DNA, intensitas pita, serta munculnya pita non-spesifik atau *double band*.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis PCR. DNA ladder VC 1000 bp plus (L), suhu annealing 50.0°C (A), 52.0°C(B), 54.0°C (C), 56.0°C (D), 58.0°C (E)

Suhu *annealing* 50°C hingga 54°C masih menunjukkan adanya pita tambahan dan *double band* yang menandakan terjadinya amplifikasi non-spesifik. Kondisi tersebut terjadi karena suhu *annealing* yang relatif rendah menyebabkan primer masih dapat berikatan dengan daerah DNA yang tidak sepenuhnya komplementer. Ikatan primer yang kurang spesifik menyebabkan terbentuknya lebih dari satu fragmen amplifikasi selama proses PCR (Lorenz, 2012). Selain itu, munculnya smear tipis pada beberapa lajur menunjukkan bahwa kualitas DNA *template* hasil ekstraksi feses masih dipengaruhi oleh keberadaan senyawa inhibitor.

Sampel feses diketahui mengandung berbagai inhibitor PCR, seperti bilirubin, polisakarida kompleks, asam empedu, hemoglobin, serta senyawa humat yang dapat menghambat aktivitas DNA polimerase dan menurunkan efisiensi amplifikasi DNA (Schrader *et al.*, 2012). Keberadaan inhibitor tersebut dapat menyebabkan pita DNA tampak samar, terbentuk smear, maupun munculnya amplifikasi non-spesifik pada hasil elektroforesis.

Suhu *annealing* 56°C menghasilkan pita DNA target yang lebih jelas dan jumlah pita non-spesifik mulai berkurang dibandingkan suhu sebelumnya. Peningkatan suhu *annealing* meningkatkan selektivitas penempelan primer terhadap DNA target sehingga amplifikasi non-spesifik dapat ditekan. Dieffenbach *et al.* (1993) menyatakan bahwa suhu *annealing* yang lebih tinggi akan meningkatkan kestabilan ikatan primer dengan DNA target dan mengurangi kemungkinan terjadinya *mispriming*.

Suhu *annealing* 58°C menghasilkan pita DNA tunggal yang jelas tanpa adanya *double band*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa suhu *annealing* 58°C merupakan kondisi optimal untuk amplifikasi gen COI menggunakan primer forward dan reverse yang digunakan pada penelitian ini. Pita DNA tunggal menunjukkan bahwa primer mampu mengamplifikasi fragmen target secara spesifik sehingga menghasilkan produk PCR yang lebih baik.

Keberhasilan amplifikasi pada suhu *annealing* 58°C juga diduga dipengaruhi oleh kualitas DNA *template* yang digunakan. Tahap optimasi awal hingga suhu 54°C menggunakan DNA *template* dengan konsentrasi 13,62 ng/μL, sedangkan suhu 56°C hingga 58°C menggunakan DNA hasil ekstraksi ulang dengan konsentrasi 6,6 ng/μL akibat keterbatasan jumlah *template* sebelumnya. Meskipun konsentrasi DNA pada tahap akhir lebih rendah, hasil amplifikasi pada suhu 58°C justru menunjukkan pita DNA yang

lebih spesifik. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa keberhasilan PCR tidak hanya dipengaruhi oleh konsentrasi DNA, tetapi juga oleh tingkat kemurnian DNA dan keberadaan inhibitor dalam sampel.

DNA *template* dengan kualitas baik akan meningkatkan efisiensi kerja DNA polimerase sehingga menghasilkan pita DNA yang jelas dan spesifik. Sebaliknya, DNA yang mengalami degradasi atau masih mengandung inhibitor dapat menyebabkan amplifikasi tidak sempurna dan menghasilkan pita non-spesifik (Sidstedt *et al.*, 2020). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa optimasi suhu *annealing* berperan penting dalam meningkatkan keberhasilan amplifikasi gen COI dari sampel non-invasif berupa feses *Rattus norvegicus*.

C. Hasil Amplifikasi Gen COI

Hasil amplifikasi gen COI menggunakan metode PCR menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi dari sampel feses *Rattus norvegicus* masih dapat digunakan sebagai DNA *template* untuk menghasilkan produk amplifikasi. Visualisasi hasil PCR melalui elektroforesis memperlihatkan adanya pita DNA pada beberapa sampel, meskipun intensitas dan spesifisitas pita berbeda pada setiap suhu *annealing* yang digunakan.

Suhu *annealing* 50°C hingga 54°C masih menghasilkan pita DNA non-spesifik dan double band. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa primer belum berikatan secara optimal dengan DNA target sehingga terbentuk fragmen amplifikasi lain di luar target gen COI. Suhu *annealing* yang terlalu rendah menyebabkan primer lebih mudah menempel pada daerah DNA yang tidak sepenuhnya komplementer sehingga meningkatkan kemungkinan terjadinya amplifikasi non-spesifik. Menurut Sipos *et al.* (2022), suhu *annealing* merupakan faktor penting dalam menentukan spesifisitas PCR karena suhu yang terlalu rendah dapat meningkatkan pembentukan produk amplifikasi non-target.

Peningkatan suhu *annealing* menghasilkan kualitas amplifikasi yang lebih baik. Suhu *annealing* 56°C menghasilkan pita DNA yang lebih jelas dan jumlah pita non-spesifik mulai berkurang dibandingkan suhu sebelumnya. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa peningkatan suhu *annealing* mampu meningkatkan spesifisitas penempelan primer terhadap DNA target sehingga proses amplifikasi berlangsung lebih optimal.

Amplifikasi paling optimal diperoleh pada suhu *annealing* 58°C yang menghasilkan pita DNA tunggal dengan intensitas jelas tanpa double band. Hasil tersebut menunjukkan bahwa suhu *annealing* 58°C merupakan kondisi paling sesuai untuk amplifikasi gen COI menggunakan DNA hasil ekstraksi feses *Rattus norvegicus*. Pita DNA tunggal menunjukkan bahwa primer forward dan reverse mampu mengenali daerah target secara spesifik sehingga menghasilkan produk amplifikasi yang sesuai dengan target gen COI. Keberhasilan amplifikasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa metode pengambilan sampel non-invasif menggunakan feses memiliki potensi untuk digunakan dalam analisis molekuler *Rattus norvegicus*. Meskipun DNA feses umumnya memiliki tingkat degradasi tinggi dan mengandung berbagai inhibitor PCR, DNA hasil ekstraksi masih dapat diamplifikasi setelah dilakukan optimasi kondisi PCR dan suhu *annealing*.

Kualitas DNA *template* juga memengaruhi hasil amplifikasi PCR. Tahap optimasi awal hingga suhu *annealing* 54°C menggunakan DNA *template* dengan konsentrasi 13,62 ng/μL, sedangkan tahap selanjutnya menggunakan DNA hasil ekstraksi ulang dengan konsentrasi 6,6 ng/μL. Meskipun konsentrasi DNA lebih rendah, amplifikasi pada suhu 58°C menghasilkan pita DNA yang lebih spesifik. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa keberhasilan PCR tidak hanya dipengaruhi oleh konsentrasi DNA, tetapi juga oleh tingkat kemurnian DNA dan rendahnya kandungan inhibitor pada *template* DNA.

DNA *template* yang masih mengandung inhibitor dapat menyebabkan terbentuknya smear, pita samar, maupun amplifikasi non-spesifik akibat terganggunya aktivitas DNA polimerase. Sampel feses diketahui mengandung berbagai inhibitor seperti polisakarida, bilirubin, asam empedu, dan senyawa humat yang dapat menghambat proses amplifikasi DNA (Sidstedt *et al.*, 2020). Selain itu, kualitas DNA yang baik akan meningkatkan efisiensi kerja DNA polimerase sehingga produk PCR yang dihasilkan tampak lebih jelas dan spesifik pada gel elektroforesis (Alberti *et al.*, 2021).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa optimasi suhu annealing menjadi tahapan penting dalam memperoleh amplifikasi gen COI yang optimal dari sampel non-invasif berupa feses. Suhu annealing 58°C mampu menghasilkan amplifikasi paling spesifik sehingga dapat digunakan sebagai kondisi PCR optimal untuk penelitian lanjutan terkait identifikasi molekuler *Rattus norvegicus*.

D. Pembahasan Metode Non-Invasif

Metode non-invasif merupakan teknik pengambilan sampel biologis tanpa menyebabkan cedera, rasa sakit, maupun gangguan fisik secara langsung terhadap hewan. Metode ini berkembang pesat dalam penelitian molekuler dan konservasi satwa karena dinilai lebih aman, praktis, dan sesuai dengan prinsip kesejahteraan hewan (*animal welfare*) serta konsep 3R (*replacement, reduction, dan refinement*). Penggunaan sampel non-invasif memungkinkan proses identifikasi molekuler dilakukan tanpa tindakan pembedahan, pengambilan darah, maupun euthanasia sehingga risiko stres pada hewan dapat diminimalkan (Schilling *et al.*, 2022).

Sampel feses menjadi salah satu jenis sampel non-invasif yang paling banyak digunakan dalam penelitian genetika satwa karena mudah diperoleh dan tidak memerlukan kontak langsung dengan hewan. Selain itu, pengambilan sampel feses memungkinkan pengumpulan sampel secara berulang tanpa memengaruhi perilaku maupun kondisi fisiologis hewan. Zemanova (2021) menyatakan bahwa metode non-invasif berbasis feses memiliki efektivitas tinggi dalam penelitian genetika satwa liar karena mampu menghasilkan DNA yang dapat digunakan untuk analisis molekuler sekaligus meminimalkan dampak terhadap hewan penelitian.

Penelitian ini menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi dari sampel feses *Rattus norvegicus* masih dapat digunakan sebagai DNA *template* untuk amplifikasi gen COI menggunakan metode PCR. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode non-invasif memiliki potensi untuk digunakan dalam identifikasi molekuler tikus tanpa memerlukan pengambilan jaringan atau darah. Keberhasilan amplifikasi DNA pada penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa sampel feses dapat dimanfaatkan sebagai sumber DNA dalam studi genetika, identifikasi spesies, monitoring populasi, hingga konservasi satwa liar (de Flamingh *et al.*, 2023).

Meskipun memiliki berbagai keunggulan, penggunaan sampel non-invasif berupa feses juga memiliki beberapa keterbatasan. DNA yang berasal dari feses umumnya memiliki konsentrasi rendah dan tingkat degradasi lebih tinggi dibandingkan DNA dari jaringan segar. Selain itu, feses mengandung berbagai senyawa inhibitor PCR seperti polisakarida, bilirubin, asam empedu, hemoglobin, serta senyawa humat yang dapat menghambat aktivitas DNA polimerase selama proses amplifikasi (Sidstedt *et al.*, 2020). Kondisi tersebut menyebabkan hasil amplifikasi DNA dari sampel feses sering kali menghasilkan pita samar, smear, maupun amplifikasi non-spesifik apabila metode ekstraksi dan kondisi PCR tidak dioptimalkan dengan baik.

Penggunaan metode CTAB termodifikasi pada penelitian ini bertujuan mengurangi pengaruh inhibitor yang terdapat pada sampel feses. Penambahan

polyvinylpyrrolidone (PVP) membantu mengikat senyawa fenolik dan metabolit organik pengganggu, sedangkan β -mercaptoethanol membantu mencegah oksidasi senyawa inhibitor selama proses ekstraksi DNA. Selain itu, penambahan bovine serum albumin (BSA) pada campuran PCR membantu meningkatkan keberhasilan amplifikasi dengan cara menetralkan inhibitor yang masih tersisa pada DNA *template*.

Keunggulan lain dari metode non-invasif yaitu proses pengambilan sampel lebih efisien dan fleksibel untuk penelitian lapangan. Sampel feses dapat dikumpulkan langsung dari lingkungan tanpa perlu menangkap hewan secara intensif sehingga metode ini sangat sesuai digunakan pada satwa liar, hewan yang sensitif terhadap stres, maupun spesies yang sulit ditangkap. Schilling *et al.* (2022) menjelaskan bahwa penggunaan metode non-invasif terus meningkat dalam penelitian satwa liar karena mampu menghasilkan data molekuler yang baik dengan dampak minimal terhadap hewan penelitian.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode non-invasif berbasis sampel feses memiliki potensi besar untuk digunakan dalam identifikasi molekuler *Rattus norvegicus*. Meskipun kualitas DNA hasil ekstraksi masih bervariasi akibat keberadaan inhibitor dan degradasi DNA, optimasi metode ekstraksi serta suhu *annealing* PCR mampu meningkatkan keberhasilan amplifikasi gen COI. Dengan demikian, metode non-invasif dapat menjadi alternatif yang efektif, aman, dan lebih etis dalam penelitian genetika maupun monitoring populasi tikus.

KESIMPULAN

Metode pengambilan sampel non-invasif menggunakan feses dapat digunakan untuk memperoleh DNA dan melakukan amplifikasi gen COI pada tikus *Rattus norvegicus*. Metode ekstraksi DNA CTAB termodifikasi dengan penambahan PVP, β -mercaptoethanol, dan proteinase K mampu menghasilkan DNA yang cukup baik untuk analisis PCR. Penggunaan BSA membantu meningkatkan keberhasilan amplifikasi DNA pada sampel feses yang mengandung inhibitor PCR. Metode non-invasif berbasis feses berpotensi digunakan sebagai alternatif identifikasi molekuler yang lebih aman, efektif, dan sesuai prinsip kesejahteraan hewan.

AFTAR PUSTAKA

- Acharya, K. P., Paudel, P. K., Neupane, P. R., Köhl, M., & Jnawali, S. R. (2017). Comparing non-invasive genetic sampling techniques for wildlife studies. *BMC Research Notes*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2481-y>
- Alberti, A., Poma, A., & Rossi, C. (2021). DNA quality assessment and optimization for molecular analysis in degraded biological samples. *Biopreservation and Biobanking*, 19(6), 456–464. <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0025>
- de Flamingh, A., Ishida, Y., Pečnerová, P., Vilchis, S., Siegismund, H. R., van Aarde, R. J., Malhi, R. S., & Roca, A. L. (2023). Combining methods for non-invasive fecal DNA enables whole genome and metagenomic analyses in wildlife biology. *Frontiers in Genetics*, 13, 1021004. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1021004>
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*, 3(3), S30–S37. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Geller, J., Meyer, C., Parker, M., & Hawk, H. (2013). Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), 851–861. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12138>
- Hastuti, U. S., & Sulasmi, E. S. (2017). Identifikasi tikus rumah (*Rattus norvegicus*) sebagai reservoir penyakit zoonosis di kawasan permukiman. *Jurnal Biologi Tropis*, 17(2), 45–52.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(Suppl. 1), S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63, e3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0067>
- Oikarinen, S., Tauriainen, S., Viskari, H., Simell, O., Knip, M., Virtanen, S., Hyöty, H., & Ilonen, J. (2009). PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *Journal of Clinical Virology*, 44(3), 211–214. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.12.017>
- Pentinsaari, M., Hebert, P. D. N., & Mutanen, M. (2016). Barcoding beetles: A regional survey of 1872 species reveals high identification success and unusually deep interspecific divergences. *PLoS ONE*, 11(9), e0161311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161311>
- Schilling, A. K., Iacolina, L., Gazzola, A., Scandura, M., & Zanet, S. (2022). A review of non-invasive sampling in wildlife disease and health research. *Animals*, 12(13), 1719. <https://doi.org/10.3390/ani12131719>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(9), 2009–2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
- Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., & Nikolausz, M. (2022). Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(4), fiac021. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac021>
- Srirungruang, S., Chankhamhaengdech, S., & Pongsupasamit, S. (2022). Optimization of fecal DNA extraction for PCR amplification in wildlife samples. *Biodiversitas*, 23(7), 3561–3568. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230726>

- Suman, S., Singhal, S., Sharma, A., & Kumar, V. (2021). Optimization of CTAB-based DNA extraction protocol for challenging biological samples. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4567–4575. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06419-8>
- Tang, J. N., Zeng, Z. G., Wang, H. N., Yang, T., Zhang, P. J., Li, Y. L., Zhang, A. Y., Fan, W. Q., & Zhang, Y. (2008). An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 75(3), 432–436. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.016>
- Zemanova, M. A. (2021). Non-invasive genetic assessment is an effective wildlife research tool when compared with other approaches. *Genes*, 12(11), 1672. <https://doi.org/10.3390/genes12111672>