

ANALISIS DNA MITOKONDRIA BADAK SUMATERA DALAM KONSERVASI GENETIK

Handayani, Dedy Duryadi Solihin, Hadi S Alikodra.

Universitas Islam Assyafiyah Jakarta Timur

Institut Pertanian Bogor

Email:-

ABSTRAK

Populasi badak Sumatera dewasa ini semakin terancam keberadaannya. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya adalah semakin maraknya perburuan liar, rusaknya habitat alamnya yang disebabkan oleh konversi hutan yang cenderung tidak terkendali. Populasi kecil lebih rentan pada penurunan keragaman genetik karena efek inbreeding serta terfiksasinya beberapa alela tertentu dalam populasi sehingga hewan tersebut menjadi monomorf dan mengalami penurunan kemampuan berevolusi atau adaptasinya pada lingkungan yang berubah. Selain itu berkurangnya populasi, faktor lain adalah terjadinya fragmentasi suatu habitat yang akan mendorong putusnya aliran gen (*gen flow*) dan meningkatnya *genetic drift*. Keragaman genetik turut menentukan keberhasilan konservasi populasi. Oleh karena itu penelitian keragaman genetik dari populasi Badak Sumatera merupakan langkah penting yang harus dilakukan, dan keberhasilan penelitian ini merupakan langkah dalam konservasi badak Sumatera.

Pengumpulan sampel darah berasal dari SRS (Suaka Rhino Sumatera) TN Way Kambas Lampung. Sample berupa darah dari 2 ekor badak sumatera berjenis kelamin betina (Rosa & Bina) dan 2 ekor badak jantan (Torgamba & Andalas). Isolasi dan purifikasi DNA Total dilakukan menggunakan metode Duryadi. Amplifikasi daerah CO I pada badak Sumatera dilakukan dengan PCR menggunakan pasangan *primer* RHCOIF dan RHCOIR.

Amplifikasi daerah CO I pada badak Sumatera dilakukan dengan menggunakan pasangan *primer* RHCOIF dan RHCOIR menghasilkan fragmen DNA berukuran 711 bp. Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar individu badak Sumatera dan spesies badak lain melalui penggunaan analisis perhitungan *Pairwise Distance* dengan *p-distance* dapat ditunjukkan matriks perbedaan genetik antara badak Sumatera dan badak outgroup (badak India dan badak Afrika), hasil perhitungan berdasarkan daerah CO I parsial menunjukkan nilai jarak genetik berkisar antara 0.016 sampai 0.147. Jarak genetik pada Bina (♀) terlihat dekat dengan Torgamba (♂) sebesar 0.007. Hubungan kekerabatan CO I menggunakan Neighbor-Joining dengan pengolahan bootstrap 1000 terlihat bahwa badak putih Afrika berbeda kelompok dengan badak Asia. Di dalam kelompok badak Asia terlihat bahwa badak India sama dengan kelompok dengan badak Sumatera (Indonesia). Di dalam badak Sumatera (Indonesia) sendiri terjadi keragaman. Berdasarkan hasil sekuen gen CO I terdapat situs-situs spesifik pada badak Sumatera sebesar 67% hasil tersebut dapat digunakan sebagai data base dalam penelitian-penelitian selanjutnya.

Kata kunci: badak Sumatera, DNA, mitokondria, konservasi

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Indonesia merupakan negara hutan hujan tropis yang memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi dan dikenal sebagai salah satu *Megabiodiversity Country*. Pulau Sumatera salah satu pulau di Indonesia yang dapat menjadi gambaran kekayaan daerah tropis di Asia. Hal tersebut bisa dilihat dari flora dan fauna yang ada di pulau ini, yaitu satu diantaranya adalah badak Sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*, Fischer 1814).

Terdapat lima jenis badak yang masih hidup di dunia, tiga jenis berada di Asia yaitu *Rhinoceros unicornis* (badak India), *Rhinoceros sondaicus* (badak Jawa), *Dicerorhinus sumatrensis* (badak Sumatera) dan dua jenis lainnya berada di Afrika yaitu *Ceratotherium simum* (badak putih Afrika) dan *Diceros bicornis* (badak hitam Afrika) Lekagul & McNelly (1977).

Menurut Alikodra (2002) populasi satwa liar dapat berkembang stabil ataupun menurun sesuai dengan kondisi perubahan komponen lingkungannya. Selain faktor di atas terancamnya populasi badak Sumatera juga akibat hidupnya yang soliter dan sensitif terhadap aktivitas manusia dan pengganggu lainnya, serta proses perkembangbiakan yang lambat dengan keturunan yang dihasilkannya pun sangat terbatas.

Populasi kecil lebih rentan pada sejumlah efek genetik yang merugikan, misalnya penurunan keragaman karena efek inbreeding serta terfiksasinya beberapa alela tertentu dalam populasi sehingga hewan tersebut menjadi monomorf dan mengalami penurunan kemampuan berevolusi atau adaptasinya pada lingkungan yang berubah. Selain itu berkurangnya populasi, faktor lain adalah terjadinya fragmentasi suatu habitat yang akan mendorong putusnya aliran gen (*gen flow*) dan meningkatnya *genetic drift* dan *inbreeding* (kawin silang dalam) antar populasi (Frankham *et al.* 2002).

Mempertahankan keanekaragaman genetika dalam suatu populasi merupakan salah satu cara dari manajemen populasi bagi spesies yang terancam punah. Dalam usaha melindungi semua jenis satwa liar dari kepunahan termasuk badak Sumatera, pemerintah Republik Indonesia mengeluarkan peraturan perundangan untuk perlindungan semua jenis satwa liar yang dikeluarkan pada tahun 1931 No. 266. Di



samping itu badan Internasional yang bergerak dalam bidang konservasi sumberdaya alam IUCN (*Internasional Union For Conservation of Nature and Natural Resources*) juga telah memberikan perhatian terhadap kelestarian badak yang dimasukkan dalam kategori “*Endangered*” atau genting (IUCN 1996) dengan membuat Suaka Rhino Sumatera (SRS). Suaka ini terdapat di dalam kawasan Taman Nasional Way Kambas dengan areal seluas 9000 Ha, didominasi oleh ekosistem hutan hujan dataran rendah sedangkan lainnya adalah hutan rawa dengan lingkup yang kecil, dan dikelola secara khusus dan intensif.

Pada penelitian ini penentuan keragaman genetik spesies badak Sumatera terutama keragaman individu dalam populasi dilakukan dengan menggunakan *Cytochrome Oxidase I* (CO I) dari genom DNA mitokondria (mtDNA). Penelitian penentuan keragaman genetik spesies badak Sumatera di Indonesia belum pernah dilakukan, dan penelitian ini adalah yang pertama di Indonesia. Hasil ini diharapkan dapat dijadikan data base dalam usaha manajemen populasi dan konservasinya.

Tujuan Penelitian

1. Menentukan tingkat keragaman genetik individu antar spesies.
2. Menentukan tingkat kekerabatan individu antar spesies.
3. Mengetahui jarak genetik dari empat individu.

Manfaat Penelitian

Diharapkan dapat memberikan informasi tentang keragaman genetik badak Sumatera sebagai penanda dalam usaha pengelolaan program-program penangkaran atau usaha konservasi seperti untuk perkawinan dalam mencegah terjadinya “*in breeding*”. Di samping itu juga diharapkan dapat dimanfaatkan untuk mempelajari keragaman genetik dan biologi populasi badak Sumatera serta informasi proses penurunan keragaman genetik, dan memberikan kontribusi terhadap upaya penyelamatan badak Sumatera agar terhindar dari kepunahan.

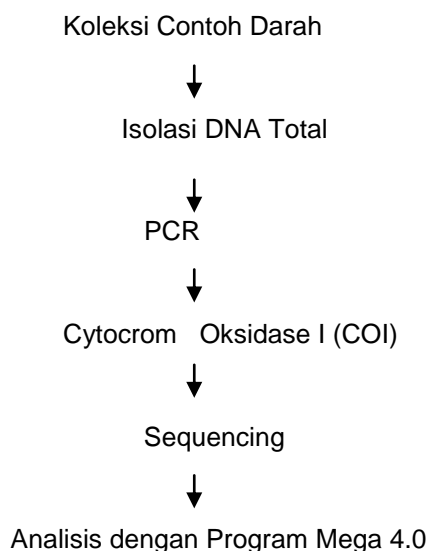
Hipotesis

Daerah *Cytocrom oksidase I* merupakan bagian dari genom mitokondria yang bersifat hypervariable dan pada daerah inipun didapat keragaman genetik yang bersifat spesifik, dan dapat mengungkapkan adanya perbedaan intraspecies secara filogeografi.

BAHAN DAN METODE

Tahapan Penelitian

Tahapan dari penelitian ini dilakukan sesuai dengan prosedur di bawah ini:



Koleksi Contoh Darah

Sampel darah berasal dari SRS (Suaka Rhino Sumatera) TN Way Kambas. Sample berupa darah dari 2 ekor badak sumatera berjenis kelamin betina dan 2 ekor badak jantan. Darah diambil dengan menggunakan disposable syringe 10 ml pada daerah *vena auricularis* (bagian telinga) dari masing-masing individu badak, kemudian darah dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diisi alkohol absolut sebanyak 10 ml, dan diberi label menurut masing-masing sampel individu.

Isolasi DNA Total

Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode Duryadi (2005). Darah badak Sumatera yang disimpan dalam alkohol absolut diambil dan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml (eppendorf tube), dicuci dengan Tris-EDTA konsentrasi rendah (*low TE*). Kemudian ditambahkan *lysis buffer*. Selanjutnya supernatan dibuang, endapan ditambah washing buffer. Setelah itu larutan ditambah dengan digestion buffer dan sample diinkubasi dalam inkubator pada suhu 55⁰C selama semalam. Selanjutnya ditambahkan fenol sebanyak 500 µl. Kemudian ditambah kloroform isoamil alkohol (CIAA) sebanyak 500 µl. Dan Cairan bagian atas dipindahkan ke dalam tabung baru, ditambah etanol absolut 2x volume. Endapan DNA dicuci menggunakan etanol 70 %. DNA yang diperoleh dikeringkan pada suhu ruang. DNA dilarutkan dalam larutan TE, kemudian diinkubasi pada pemanas air pada suhu 37⁰C selama 15 menit. Sampel DNA disimpan pada suhu -20⁰C. DNA dilihat kualitasnya dengan dimigrasikan pada gel agarosa 1,2%. Hasil yang didapatkan dalam dilihat dengan bantuan UV.

Amplifikasi CO I

Amplifikasi CO I menggunakan pasangan *primer* hasil desain sendiri berdasarkan data runutan badak India (*Rhinoceros unicornis*) dengan kode akses (NC001779). Primer tersebut didesain menggunakan software primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Kedua pasang primer tersebut yaitu Primer untuk mengamplifikasi sekuen CO I partial dengan primer RHCOIF & RHCOIR (Handayani 2008).

Proses amplifikasi CO I menggunakan mesin GeneAmp^R PCR system 2400 (Perkin Elmer). Kondisi PCR yang digunakan adalah : predenaturasi pada suhu 94⁰C, denaturasi pada suhu 94⁰C selama 45 detik, tahap penempelan primer (*annealing*) pada suhu 51⁰C, *extension* pada suhu 72⁰C diulang sebanyak 35 siklus. Reaksi PCR diakhiri dengan polimerasi (*final exstension*) pada suhu 72⁰C.

Adapun reaksi PCR untuk tiap campuran pada daerah CO I adalah 50 µl dengan komposisi air 34,25µl, 5µl buffer PCR, MgCl 2,5 µl, 1 µl dNTP mix, primer RHLDF atau RHCOIF, primer RHLDR atau RHCOIR, 5 µl DNA templete dan 0,25 µl Taq DNA polymerase (Promega).

Sekuensing Fragmen COI dan D-Loop Parsial

Perunutan DNA hasil PCR di lakukan di PT. CHAROEN POKPCHAND INDONESIA.

ANALISIS DATA

Data-data polimorphisme panjang fragmen dianalisis dengan menggunakan program MEGA versi 4.0 Beta Release (Moleculer Evolutionary Genetic Analysis) (Tamura *et al.* 2007).

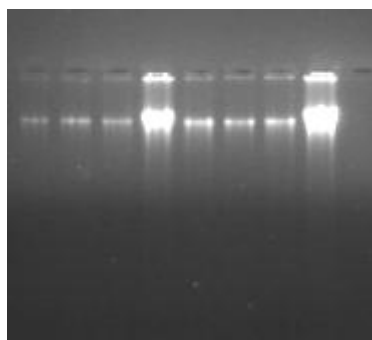
HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA Total

Penelitian ini menggunakan empat sampel darah dari *Dicerorhinus sumatrensis* yang berasal dari SRS TN. Way Kambas Lampung. Hasil purifikasi DNA totalnya setelah dimigrasikan pada gel agarose 2 % disajikan pada gambar dibawah ini.



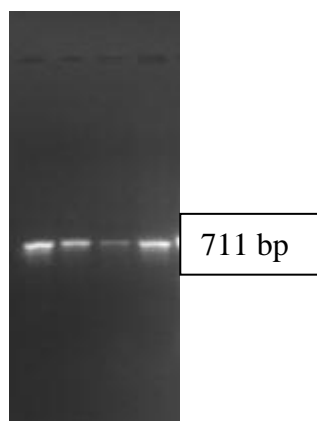
1 2 3 4 1a 2a 3a 4a



Amplifikasi Cytokrom Oksidase I (CO I)

Amplifikasi CO I pada badak Sumatera dilakukan dengan menggunakan pasangan *primer* RHCOIF dan RHCOIR (Handayani 2008). Produk PCR hasil amplifikasi pasangan *primer* RHCOIF menempel pada posisi ke-22 sampai dengan 57 (5371-5397) dan *primer* RHCOIR menempel pada posisi basa ke-746 sampai dengan 772 (6056-6081). Daerah CO I menghasilkan fragmen DNA berukuran 711 bp pada semua contoh *Dicerorinus*. Hasil amplifikasi pasangan *primer* tersebut terdapat dalam gambar dibawah ini.

1 2 3 4



Keterangan: No 1. Torgamba (Badak Sumatera♂), No.2. Andalas (Badak Sumatera♂); No.3. Rosa (Badak Sumatera ♀); No. 4. Bina (Badak Sumatera♀)

Sekuensi CO I Parsial dan Keragaman Runutan Nukleotida

Setelah dilakukan sekuensing pada produk PCR menunjukkan situs beragam. Adapun perbedaan susunan nukleotida yang terdapat antara keempat badak Sumatera dengan outgroupnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Perbedaan susunan basa Nukleotida badak India, badak putih Afrika, dari GenBank dan empat individu badak Sumatera hasil penelitian ini (n=711)

	<i>R. unicornis</i>	<i>C. simum</i>	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina
<i>R. unicornis</i>	-					
<i>C. simum</i>	103	-				
Torgamba	99	100	-			
Andalas	99	100	12	-		
Rosa	95	93	10	10	-	
Bina	100	101	5	10	11	-

Tabel 1 menunjukkan perbedaan basa nukleotida diantara keempat individu badak Sumatera dengan badak India adalah berkisar 95 – 100 nukleotida sedangkan dengan badak putih Afrika 93 – 101 nukleotida. Akan tetapi diantara keempat badak Sumatera sendiri perbedaan hanya 5 – 11 nukleotida. Rosa (♀) memiliki beda nukleotida 10 dengan Torgamba (♂), dan dengan Andalas (♂) memiliki perbedaan 10



nukleotida. Antara Rosa (♀) dengan Bina (♀) terdapat perbedaan 11 Nukleotida, sedangkan antara Torgamba (♂) dengan Andalas (♂) berbeda 10 nukleotida. Hanya antara Torgamba (♂) dengan Bina (♀) perbedaannya relatif kecil yaitu hanya 5 nukleotida.

Berdasarkan ukuran runutan CO I parsial sepanjang 711 bp pada badak Sumatera, badak India dan badak Afrika, maka didapatkan situs-situs spesifik khususnya pada badak Sumatera sebesar 67% .

Jarak Genetik badak Sumatera dan Outgrupnya badak India dan Afrika

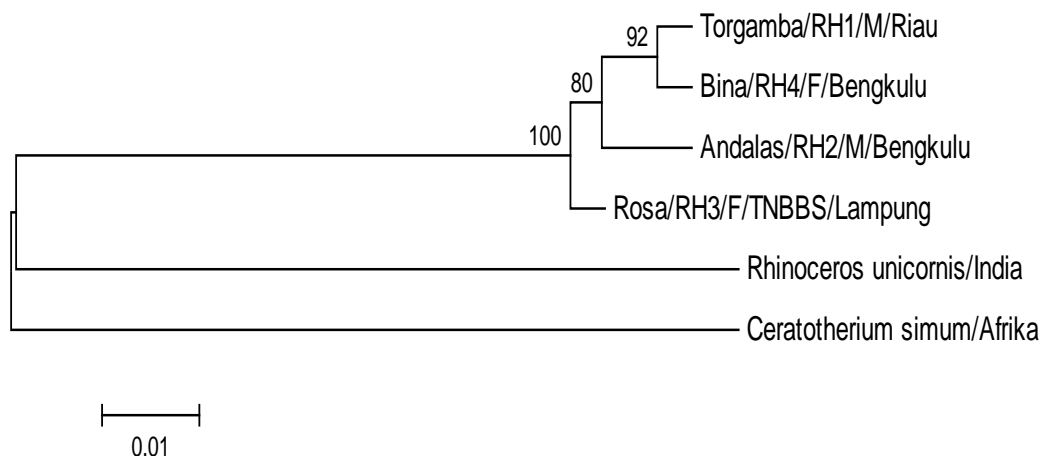
Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar individu badak Sumatera dan spesies badak lain. Tabel 2 menunjukkan hasil jarak genetik berdasarkan perbedaan sekuen COI.

Tabel 2 Jarak genetik berdasarkan metode *Pairwis Distance dengan p-distance* pada badak India dan badak putih Afrika GenBank dan empat individu badak Sumatera hasil penelitian ini (n=711)

	<i>R. unicornis</i>	<i>C. simum</i>	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina
<i>R. unicornis</i>	-					
<i>C. simum</i>	0.147	-				
Torgamba	0.142	0.143	-			
Andalas	0.142	0.143	0.017	-		
Rosa	0.136	0.133	0.14	0.014	-	
Bina	1.142	0.144	0.007	0.014	0.016	-

Hasil perhitungan berdasarkan daerah CO I parsial menunjukkan nilai jarak genetik berkisar antara (0,016) sampai (0,147). Dari tabel diatas terlihat bahwa keempat badak Sumatera memiliki jarak genetik relatif besar bila dibandingkan dengan outgrupnya. Adapun dendogramnya dapat dilihat pada Gambar 1.

Hubungan Kekerabatan Badak Sumatera Berdasarkan Sekuen CO I



Gambar 1 Dendogram Neighbor-Joining dengan pengolahan bootstrap 1000 ulangan dari nukleotida daerah CO I parsial badak Sumatera, badak India dan badak putih Afrika (berukuran 711 nt)

Dari gambar diatas terlihat bahwa badak putih Afrika berbeda kelompok dengan badak Asia. Di dalam kelompok badak Asia terlihat bahwa badak India sama satu kelompok dengan badak Sumatera (Indonesia) walaupun memiliki perbedaan jumlah cula. Dan di dalam badak Sumatera (Indonesia) sendiri terjadi keragaman. Torgamba terlihat satu kluster dengan Bina, namun Andalas dan Rosa terlihat jauh kekerabatannya baik dengan Torgamba maupun Bina.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan



1. Berdasarkan ukuran runutan CO I parsial sepanjang 711 bp pada badak Sumatera, badak India dan badak Afrika, maka didapatkan situs-situs spesifik khususnya pada badak Sumatera sebesar 67%
2. Berdasarkan dendogram daerah CO I parsial pengelompokan badak Sumatera dengan badak India terlihat satu kluster/kelompok sedangkan badak Afrika berbeda.
3. Bahwa keempat badak Sumatera memiliki jarak genetik relatif besar bila dibandingkan dengan outgrupnya

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan marka yang lain dalam penentuan keragaman genetik spesies badak Sumatera.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan bagian lain selain darah dalam menganalisis DNA badak Sumatera.

DAFTAR PUSTAKA

- Alikodra HS. 2002. *Pengelolaan satwaliar jilid 1*. Departemen Pendidikan dan kebudayaan Direktorat Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- Aquardo CF, Greenberg BD. 1982. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *J Genetics*. 103: 287-312.
- Brown WM, George M, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *J Genetics*. 76 (4):1967-1971.
- Brown, Dowling ET, Moritz C, WM. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18:269-292.
- Charlesworth D, Charlesworth B. 1987. inbreeding depression and its evolutionary consequence. *Annual review of Ecology and Systematics*. 18: 237-268.
- Duryadi D. 1994. peran DNA mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. *J Hayati* 1(1):1-4.
- Duryadi D. 1997. *Isolasi dan purifikasi mitochondrian (mtDNA)*. Laboraturium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSH) Institut Pertanian Bogor, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Duryadi D. 2005. *Prinsip-prinsip dalam teknologi molekuler*. Pelatihan singkat Teknik Biologi Molekuler "kerjasama Pusat Studi Ilmu Hayati, Lembaga penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat Institut Pertanian Bogor dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas. Bogor.
- Fernando P, Polet G, Foad N, Linda. 2006. Genetic diversity, phylogeny and conservation of the Javan rhinoceros (*Rhinoceros sondaicus*). *Journal Conservation Genetik*. 7: 439-448.
- Frankham RJD et al. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- IUCN. 1996. *The IUCN red list of threatened animals*, IUCN, Gland, Switzerland.
- Yang DY, Speller CF. 2006. Co-amplification of cytochrome *b* and D-loop mtDNA fragments for the identification of degraded DNA samples. *J Molecular Ecology*. 6: 605-608.
- Lekagul B, McNelly. 1977. *Mammals of Thailand*. Sahakarnbhat Co. Bangkok.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA: Moleculer Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Advance Access published May 7. Oxford University Press. Mol Bio 10. 1093/molbev/msm 092.

PERTANYAAN

Penanya: Bambang Fajar (Universitas Mataram)

Apakah yang bisa kita manfaatkan secara langsung untuk konservasi badak? Bagaimana perkawinan yang selektif, resiko apabila terjadi terjadi *inbreeding*?

Jawab:

Untuk manfaat, karena dalam penangkaran jadi bentuk kandang dibentuk pedoks, karena badak itu hidup soliter. Pada saat masa kawin baru disatukan dalam 1 kandang.

