

## **Karakteristik Locus Mikrosatelit D7S1789 pada Populasi Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) di Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, Bali.**

Characteristics of Microsatellite Locus D7S1789 on Long-Tailed Macaques (*Macaca fascicularis*) Population in Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, Bali.

BASYOFI DWIWANDANA<sup>(1)</sup>, I KETUT SUATHA<sup>(1)</sup>, I NENGAH WANDIA<sup>(1,2,\*)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratorium Anatomi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana  
Jln. P.B. Sudirman. Tlp. 0361-223791

<sup>2)</sup>Laboratorium Molekuler Pusat Penelitian Satwa Primata Lembaga Penelitian dan Pengabdian  
Kepada Masyarakat, Universitas Udayana

<sup>\*</sup> Corresponding author. Email: [wandia@fkh.unud.ac.id](mailto:wandia@fkh.unud.ac.id)

### **ABSTRACT**

Microsatellite is a direct segment of genetic material (DNA), allowing its use as molecular markers will better reflect the genetic characteristics of populations. The study was conducted to characterize the microsatellite locus D7S1789 and to explore its polymorphism. Observed variables were the amount and type of allele, the frequency, and heterozygosity. A total of 18 blood samples was collected from long-tailed macaques population in Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, Bali as a source of DNA. Total DNA was extracted using QIAmp DNA Blood Mini Kit from Qiagen. D7S1789 microsatellite locus was amplified by polymerase chain reaction technique (PCR), as total as 30 cycles with annealing temperature of 57°C. Furthermore, the allele was separated by polyacrylamide gel electrophoresis 8% with a voltage of 110 volts for 110 minutes and emerged with silver staining. The result showed that only one type of allele found at locus D7S1789 in the long-tailed macaques population in Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, Bali with a length of 216 base pairs of allele. The D7S1789 locus in a population of long-tailed macaques in Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, Bali is monomorphic (homozygous). The result indicates that microsatellite locus D7S1789 poorly used as molecular markers to assess genetic variation in long-tailed macaques populations in Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud Bali.

Keywords : *Macaca fascicularis*, Microsatellite, D7S1789, DNA, Ubud.

### **ABSTRAK**

Mikrosatelit merupakan segmen langsung dari materi genetik (DNA), sehingga penggunaannya sebagai marka molekuler akan lebih mencerminkan karakteristik genetik dari suatu populasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengkarakterisasi lokus mikrosatelit D7S1789 dan mengungkapkan status polimorfismenya pada populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, Bali. Variabel yang diamati adalah jumlah dan jenis alel, frekuensi dan heterozigositas. Sejumlah 18 sampel darah dikoleksi dari populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana Padang Tegal Ubud Bali sebagai sumber DNA. DNA total diekstraksi menggunakan QIAmp DNA Blood Mini Kit dari Qiagen. Locus mikrosatelit D7S1789 diamplifikasi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) sebanyak 30 siklus dengan suhu *annealing* 57°C. Selanjutnya, alel dipisahkan dengan elektroforesis pada gel poliakrilamid 8% dengan tegangan 110 volts selama 110 menit dan dimunculkan dengan pewarnaan perak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya ditemukan satu jenis alel pada lokus D7S1789 pada populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana Padang Tegal Ubud Bali dengan panjang alel 216 pasang basa. Locus D7S1789 pada populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana Padang Tegal Ubud Bali bersifat monomorfik (homozigot). Hasil penelitian mengindikasikan bahwa lokus mikrosatelit D7S1789 kurang baik digunakan sebagai marka molekuler untuk mengkaji variasi genetik populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana Padang Tegal Ubud Bali.

**Kata kunci** : *Macaca fascicularis*, Mikrosatelit, D7S1789, DNA, Ubud.

## PENDAHULUAN

Monyet ekor panjang yang berada di wilayah pulau Bali diduga berasal dari pulau Jawa. Di pulau Bali, populasi monyet ekor panjang dapat ditemukan di 43 lokasi yang berbeda, (Southern, 2002; Fuentes and Gamerl, 2005). Keberadaan monyet ekor panjang di Bali memiliki makna penting bagi masyarakat. Beberapa tempat dijadikan objek wisata dan telah berkontribusi terhadap peningkatan kesejahteraan kehidupan masyarakat sekitarnya. Populasi yang dimanfaatkan sebagai obyek wisata diantaranya populasi di Sangeh, Wenara Wana Ubud, Alas Kedaton, Uluwatu dan Pulaki.

Wenara Wana yang berada di Desa Padang Tegal, Kecamatan Ubud, Kabupaten Gianyar. Merupakan salah satu kawasan yang banyak dihuni oleh monyet ekor panjang. Berdasarkan data terakhir yang diperoleh pada bulan November 2011, populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana Ubud berjumlah 614 ekor dan terbagi menjadi 4 kelompok (Brotcorne, 2011). Keberadaan populasi monyet ekor panjang ini perlu diperhatikan kelestariannya, karena memiliki peranan penting bagi perekonomian masyarakat di daerah Ubud.

Salah satu marka molekuler pada tingkatan DNA adalah mikrosatelit. Mikrosatelit merupakan suatu penanda atau marka molekuler pilihan untuk studi mengenai struktur genetik dari suatu individu. Mikrosatelit (runutan nukleotida sederhana, di-, tri- atau tetranukleotida, yang berulang dalam genom, Whitton *et al.*, 1997) adalah segmen materi genetik (DNA), sehingga penggunaannya sebagai suatu marka molekuler akan lebih mencerminkan struktur genetik dari suatu populasi. Mikrosatelit bersifat netral yaitu tidak akan menyebabkan kematian pada individu yang membawa alelnya (Morin *et al.*, 1997).

Lokus yang lebih bersifat monomorfik tidak baik digunakan dalam mendeteksi polimorfisme atau keragaman genetik populasi. Sedangkan lokus yang bersifat polimorfik akan lebih baik guna mendeteksi variasi genetik antar populasi. Beberapa penelitian yang telah dilakukan pada monyet ekor panjang di Bali (Wandia, 2003; Wandia *et al.*, 2009), berhasil mengkarakterisasikan beberapa lokus mikrosatelit, tetapi karakterisasi pada lokus mikrosatelit D7S1789 pada populasi monyet ekor panjang di Bali belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi lokus mikrosatelit D7S1789 pada populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana Padang Tegal Ubud Bali.

## MATERI DAN METODE

### Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah :

- a. Jumlah dan jenis alel, banyaknya alel pada lokus mikrosatelit D7S1789 pada populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud.
- b. Frekuensi alel, proporsi relatif dari masing-masing alel lokus D7S1789 populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud.
- c. Heterosigositas, merupakan nilai untuk mencerminkan keragaman gen yang menggunakan frekuensi alel.

### Cara Pengumpulan Data atau Sampling

Sampling menggunakan teknik *Convenient* dan telah dilakukan pada tahun 2007 selanjutnya darah disimpan di Laboratorium Molekular Pusat Penelitian Satwa Primata (PPSP) Universitas Udayana.

### Koleksi Darah

Sejumlah 18 sampel darah monyet ekor panjang yang berasal dari populasi di Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, telah dikoleksi. Monyet dibius menggunakan ketamine HCl (dosis 10 mg/kg bobot badan), dikombinasi dengan xylazine (1-2 mg/kgBB) dengan cara ditulup. Darah sebanyak 5-10 ml diambil dari vena femoralis dengan menggunakan alat suntik 10 ml yang telah diisi 0,1-0,4 ml EDTA 10% sebagai antikoagulan.

### Ekstraksi DNA Total

Ekstraksi DNA menggunakan QIAamp DNA Blood Kits produksi Qiagen dengan cara sebagai berikut: (1) Sebanyak 20 µl protease Qiagen, 200 µl sampel darah, dan 200 µl buffer AL dimasukkan ke dalam eppendorf 1,5 ml selanjutnya dicampur dengan bantuan vortex selama 15 detik. Campuran ini diinkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit, kemudian dicentrifuge beberapa saat untuk menurunkan embun yang menempel pada penutup eppendorf. (2) Sebanyak 200 µl etanol (96-100%) ditambahkan pada sampel, dicampur dengan bantuan vortex selama 15 detik dan dicentrifuge beberapa saat untuk menurunkan embun yang menempel pada penutup eppendorf. (3) Campuran ini dimasukkan ke dalam QIAamp spin column dan dicentrifuge pada

6000xg selama 1 menit setelah sebelumnya ditutup terlebih dahulu. Selanjutnya, spin column ini diletakkan di dalam tabung 2 ml yang bersih, dan tabung sebelumnya dibuang. (4) Tutup spin column dibuka dengan hati-hati dan 500 µl buffer AW1 dimasukkan. Spin column ditutup kembali dan dicentrifuge pada 6000xg selama 1 menit. Spin column diletakkan di dalam tabung 2 ml yang bersih dan tabung sebelumnya dibuang. (5) Sebanyak 500 µl buffer AW2 dimasukkan ke dalam spin column dan dicentrifuge pada 14000xg selama 3 menit. (6) Spin column dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml, ditambahkan 200 µl buffer AE, diinkubasi pada suhu ruangan (15-25°C) selama 1 menit dan dicentrifuge pada 6000xg selama 1 menit.

### **Amplifikasi Lokus Mikrosatelit**

Lokus mikrosatelit D7S1789 diamplifikasi melalui Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan menggunakan satu set primer yang fungsinya untuk mengapit lokus mikrosatelit tersebut.

Setiap unit reaksi PCR mengandung 1,25 µl buffer 10x; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; dNTP 0,2 mM; sepasang primer sebanyak 0,2-0,2 mM; air deionase sebanyak 8,05 µl; 1 µl template DNA dan Taq DNA polymerase sebanyak 0,1 U (Applied Biosystem N8080161) sehingga volume akhir 12,5 µl. Campuran divorteks dan dicentrifuge (Hillis et al., 1996).

Amplifikasi lokus mikrosatelit menggunakan mesin Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler. Kondisi PCR sebagai berikut: pra PCR sebanyak satu siklus (94°C) selama 2 menit. PCR dilakukan selama 30 siklus dengan tahapan sebagai berikut: tahapan Denaturasi (94°C) selama 35 detik, annealing (57°C) selama 35 detik, dan Elongasi (72°C) selama 35 detik. Sedangkan post PCR: Elongasi (72°C) selama 5 menit.

### **Elektroforesis**

Tahapan awal dari proses elektroforesis adalah pembuatan gel poliakrilamid 8% untuk sediaan 25 ml dengan cara sebagai berikut: menyiapkan gelas beker yang telah diisi air deionase (DW) sebanyak 15,8 ml. Kemudian gelas beker dimasukkan 10x TBE sebanyak 2,5 ml, diaduk sampai homogen (jernih). Setelah itu, ditambahkan akrilamid 30 % sebanyak 6,7 ml, APS sebanyak 150 µl dan temed sebanyak 15 µl. Campuran digoyang hingga semua zat tercampur dengan baik (homogen) dan dituang ke dalam cetakan gel vertikal yang telah disiapkan. Sisir

diletakkan di atas cetakan gel untuk membentuk sumur-sumur pemuat dan dibiarkan campuran memadat hingga menjadi gel.

Selanjutnya, elektroforesis pada gel poliakrilamid vertikal dengan cara mencampurkan 1  $\mu$ l produk PCR dengan 0,2  $\mu$ l 5x loading dye yang akan dimasukkan ke dalam sumur gel poliakrilamid. Sisir pada gel dilepas dan sampel yang telah diproses siap dimasukkan pada sumur-sumur yang terbentuk pada gel. Alat elektroforesis dihidupkan dengan tegangan 110 volt selama 110 menit. Setelah selesai, gel disiapkan untuk tahap pewarnaan Perak.

### **Pewarnaan Perak**

Pita pada gel poliakrilamid 8% dimunculkan dengan pewarnaan perak (*silver staining*) dengan cara sebagai berikut: gel dilepaskan dari cetakan dan ditempatkan pada wadah gel. Larutan ke-1 (terdiri dari CTAB 0,2 g dalam air deionase dengan volume akhir 200 ml) dituangkan ke dalam wadah gel dan biarkan gel terendam selama 5 menit sambil digoyang. Larutan ke-1 dibuang, kemudian gel dicuci dengan 200 ml air deionase selama 5 menit. Air dibuang, lalu dituangkan larutan ke-2 (2,4 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  dalam air deionase 200 ml) biarkan gel terendam sambil digoyang selama 5 menit. Larutan ke-2 dibuang, selanjutnya dituangkan larutan ke-3 (0,32 g  $\text{AgNO}_3$  + 80  $\mu$ l  $\text{NaOH}$  + 0,8 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  dalam air deionase 200 ml) dan digoyang selama 7 menit. Larutan ke-3 dibuang, dan dicuci dengan 200 ml air deionase selama 3 menit. Air deionase dibuang dan dicuci dengan air deionase lagi selama 2 menit. Air bekas pencucian dibuang, lalu ditambahkan larutan ke-4 (3 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 100  $\mu$ l formaldehida dalam air deionase 200 ml) sambil digoyang hingga muncul pita. Larutan ke-4 segera dibuang setelah pita muncul dan dimasukkan larutan ke-5 (asam asetat glasial 1% yang dicampur dengan air deionase dengan volume 200 ml) untuk menghentikan reduksi perak. Selanjutnya, gel dapat dipres untuk tujuan penyimpanan yang lama.

### **Analisis Data**

#### **Identifikasi alel dan jumlah alel**

Pita yang muncul pada gel poliakrilamid adalah suatu alel mikrosatelit. Keragaman alel mikrosatelit dapat dilihat dari beda jarak migrasi alel pada gel (Krawscjack and Schmidtke, 1994). Dengan asumsi kodominansi, genotipe ditentukan berdasarkan variasi pita alel.

**Frekuensi alel**

Frekuensi alel dari tiap lokus dalam populasi dihitung dengan menggunakan rumus Nei (1987), sebagai berikut :

$$x_i = \frac{(2n_{ii} + \sum n_{ij})}{(2n)}$$

Keterangan:

$x_i$  : frekuensi alel i

$n$  : jumlah sampel

$n_{ii}$ : jumlah individu bergenotip homozigot dengan alel i

$n_{ij}$ : jumlah individu bergenotip heterosigot dengan alel i

**Heterozigositas**

Nilai heterozigositas merupakan ukuran keragaman genetik. Nilai heterozigositas dihitung menggunakan rumus tidak bias dari Nei (1987) sebagai berikut:

$$h = \frac{2n (1 - \sum x_i^2)}{(2n - 1)}$$

keterangan:

$h$ : heterozigositas

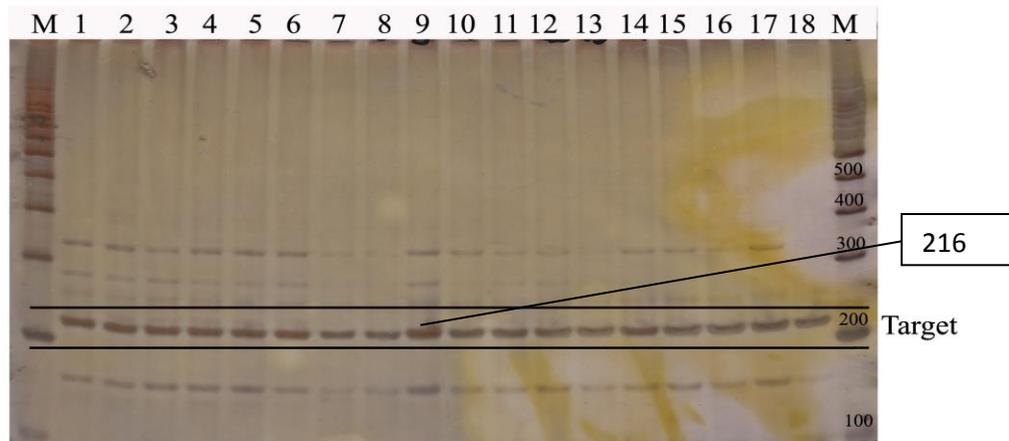
$n$ : jumlah sampel

$x_i$ : frekuensi alel i

**HASIL DAN PEMBAHASAN****Hasil****Identifikasi Alel dan Frekuensi Alel**

Lokus tersebut dapat dinyatakan polimorfik apabila jumlah alelnya yang terdapat pada lokus tersebut lebih dari satu dan dengan frekuensi alel paling umum kurang atau sama dengan 0.95 (Wandia *et al.*, 2009). Alel pada masing-masing lokus mikrosatelit dalam suatu populasi diidentifikasi berdasarkan perbedaan migrasi pita setelah dielektroforesis dengan menggunakan gel poliakrilamid 8% selama 110 menit.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 18 sampel produk PCR, hanya teridentifikasi 1 alel pada lokus mikrosatelit D7S1789 di populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana Padang Tegal Ubud. Panjang alel adalah 216 bp (Gambar 3). Keseluruhan sampel monyet ekor panjang (18 sampel) bergenotipe homozigot (216/216), sehingga frekuensi alel 216 bp adalah 100%.



**Gambar 1.** Alel Lokus D7S1789. Nomor menyatakan sampel (individu), huruf M menyatakan penanda (100 base pairs ladder). Genotipe individu 1-18 = 216/216.

### Heterozigositas

Heterozigositas populasi monyet ekor panjang yang berada di Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, menggunakan lokus mikrosatelit D7S1789 yang dihitung menggunakan rumus tidak bias dari Nei (1987) adalah 0. Artinya, lokus mikrosatelit D7S1789 pada populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, bersifat monomorfik (homozigot).

### Pembahasan

Kemajuan yang sangat pesat pada bidang molekuler telah banyak membantu dalam menghasilkan suatu data tentang variasi genetik pada tingkatan DNA. Polimorfisme dari genom dapat ditetapkan dari hasil amplifikasi DNA dengan primer pengapit mikrosatelit yang alelnya dipisahkan dengan bantuan teknik pewarnaan perak (silver staining). Elektroforesis pada gel poliakrilamid mampu memisahkan DNA lebih sempurna dengan jumlah yang dibutuhkan lebih sedikit, demikian pula dengan metode pewarnaan perak yang lebih sensitif karena mampu

mendeteksi keberadaan DNA dengan kandungan yang lebih kecil dari 10µg/ µl (Allen *et al.*,1984).

Hasil penelitian menggunakan lokus mikrosatelit D7S1789 pada 18 sampel darah dari populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana Padang Tegal Ubud teridentifikasi hanya 1 alel sehingga lokus tersebut bersifat monomorfik (homozigot). Jumlah alel ini belum tentu sama dengan jumlah alel yang ditemukan di populasi lain. Sebagai contoh, penelitian menggunakan lokus mikrosatelit D1S533 (Wandia *et al.*, 2009) pada populasi monyet ekor panjang di Ubud teridentifikasi 4 alel. Akan tetapi pada populasi monyet ekor panjang di daerah Mekori hanya terdeteksi 1 alel. Demikian juga pada lokus mikrosatelit D4S2456 yang mendeteksi ada 6 alel pada populasi monyet ekor panjang di Ubud, sedangkan di daerah Mekori teridentifikasi sebanyak 8 alel. Ini mengindikasikan adanya variasi karakteristik lokus mikrosatelit pada populasi yang berbeda. Oleh karena itu, karakterisasi lokus mikrosatelit D7S1789 pada populasi lainnya perlu dilakukan juga sehingga informasi mengenai kondisi polimorfismenya dapat diketahui.

Karena hanya satu alel yang muncul (216) maka frekuensi alel pada populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud, ini adalah 1. Heterozigositas merupakan salah satu parameter akurat yang digunakan untuk mengukur tingkat keragaman atau variasi genetik populasi (Tanabe *et al.*, 1999). Nilai heterozigositas monyet ekor panjang di Wenara Wana, Padang Tegal Ubud menggunakan lokus mikrosatelit D7S1789 adalah 0. Hal ini berkaitan erat dengan sifat lokus mikrsatelit D7S1789 yang monomorfik homozigot. Hasil karakterisasi ini mengindikasikan bahwa lokus D7S1789 kurang baik untuk mengidentifikasi variasi genetika populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana, Padang Tegal, Ubud.

### SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa lokus mikrosatelit D7S1789 bersifat monomorfik pada populasi monyet ekor panjang di Wenara Wana Padang Tegal Ubud karena hanya terdapat satu alel (216 bp) dengan frekuensi alel 1,0 dan heterozigositas menggunakan marka melekul mikrosatelit D7S1789 adalah 0.

## SARAN

Adapun saran setelah melakukan penelitian ini yaitu lokus mikrosatelit D7S1789 kurang baik digunakan sebagai marka molekuler untuk mengidentifikasi variasi genetik monyet ekor panjang di Wenara Wana Padang Tegal Ubud sehingga perlu dilakukan penelitian yang sama lebih lanjut pada populasi monyet ekor panjang di lain tempat menggunakan lokus mikrosatelit D7S1789.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ditujukan kepada kepala Laboratorium Molekuler Pusat Penelitian Satwa Primata Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Udayana yang telah berkenan meminjamkan ruang lab untuk proses penelitian dan kepada saudara Fedri Rell yang telah bersedia meluangkan waktunya guna membantu dalam semua tahapan proses penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Allen RC, Saravis CA, Maurer HR. (1984). *Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Protein*. Walter de Gruiter. New York.
- Brotcorne F. (2011). *Eco-ethology and Population Viability Analysis of Long-tailed Macaques (Macaca fascicularis) in Bali (Indonesia): Impact of Habitat type and Degree of Anthropization*. Kerjasama University of Liege (Belgium) dengan Pusat Penelitian Satwa Primata LPPM UNUD. Progress Report.
- Fuentes A, Gamerls S. (2005). *Dissproportionate Participation by Age/Sex Slases in Aggressive Interaction Between Long-tailed Macaques (Macaca fascicularis) and Human Tourist at Padang Tegal Monkey Forest, Bali, Indonesia: Brief Report*. American Journal of Primatology. 66: 197-204.
- Hillis DM, Morits C, Mable BK. (1996). *Molecular Systematics*. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc. Publisher. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Krawscjack M, Schmidtke J. (1994). *DNA Fingerprint*. BIOS Scientific Publisher Limited. Oxford.
- Morin PA, Kanthaswarny S, Smith DG. (1997). *Simple Sequence Repeats (SSR) Polymorphisms for Colony Management and Population Genetics in Rhesus macaques (Macaca mulata)*. American Journal of Primatology. 42 : 199-213.
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetic*. Columbia University Press. New York.
- Southern MW. (2002). *An assement of potential habitat corridors and landscape ecology for long-tailed macaque (macaca fascicularis) on Bali, Indonesia*. Thesis. Washington: Central Washington University.

- Tanabe Y, Yokohama H, Murakami J, Kano H, Tanawaki O, Okabyashi H, Maeda Y, Koshimoto C, Nozawa K, Tumennasan K, Dashnyman B, Zhanciv T. (1999). *Polimorphisms of The Plumage Colors, the Skin Variations and Blood Proteins in the Chirkens in Mongolia*. Report of the Society for researches on Native livestock. 17: 139-153.
- Wandia IN. (2003). *Mikrosatelit sebagai Penanda Molekul untuk Mengukur Polimorfisme Genetik Monyet Ekor Panjang di Sangeh, Bali*. J. Vet. 4(3): 93-100.
- Wandia IN, Putra IGAA, Soma IG. (2009). *Polimorfisme Genetik Populasi Monyet Ekor Panjang (Macaca fascicularis) di Lokasi Pariwisata, Bali*. Fakultas Kedokteran Hewan. Laporan Fundamental Dana DIPA Universitas Udayana Tahun Anggaran 2009.
- Whitton J, Rieseberg LH, Ungerer MC. (1997). *Microsatellite loci are not conserved across the Asteraceae*. Mol. Biol. Evol. 14(2): 204-207.