

Karakteristik Lokus Mikrosatelit D8S1100 pada Populasi Monyet Ekor Panjang di Bukit Gumang, Karangasem, Bali.

Jefri Ndawa Rumba¹, I Gusti Agung Arta Putra^{2,3}, I Nengah Wandia^{1,3*}

1) Laboratorium Anatomi Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman tlp 0361-223791

2) Lab Anatomi Ternak FAPET. Unud

3) Pusat Penelitian Satwa Primata- Lembaga Penelitian dan Pengabdian
kepada Masyarakat Universitas Udayana
Bukit Jimbaran

* Correspondent Author (email : wandia@fkh.unud.ac.id)

ABSTRAK

Pengungkapan berbagai karakteristik genetik populasi memiliki nilai yang strategis. Selain merupakan khasanah informasi ilmiah, karakteristik tersebut dapat digunakan untuk memprediksi *viabilitas* masa depan suatu populasi, dan bahan pertimbangan untuk usaha-usaha konservasi. Mikrosatelit merupakan marka/penanda molekuler pilihan untuk studi pilihan genetik populasi. Mikrosatelit adalah segmen langsung dari materi genetik (DNA), sehingga penggunaannya sebagai marka molekuler akan lebih mencerminkan karakteristik genetik populasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengkarakterisasi lokus mikrosatelit D8S1100 dan mendapatkan informasi awal mengenai status polimorfisme sebelum dipilih sebagai marka molekuler dalam studi genetik populasi. Variabel yang diamati adalah jumlah dan jenis alel, frekuensi, dan heterozigositas. Sembilan belas sampel darah monyet dikoleksi dari di Bukit Gumang, Karangasem, Bali, sebagai sumber DNA. DNA total diekstraksi menggunakan QIAmp DNA Blood Mini Kit. Lokus mikrosatelit D8S1100 di amplifikasi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), sebanyak 30 siklus dengan suhu *annealing* 54⁰C. Selanjutnya, alel dipisahkan dengan elektroforesis pada gel poliakrilamid 7% dan dimunculkan dengan pewarnaan perak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya ditemukan satu jenis alel pada lokus D8S1100 dalam populasi monyet ekor panjang di Bukit Gumang dengan panjang

alel 196 pasang basa. Dapat disimpulkan bahwa lokus D8S1100 pada populasi monyet ekor panjang di Bukit Gumang bersifat monomorfik. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa lokus mikrosatelit D8S1100 kurang baik digunakan sebagai marka molekuler untuk mengkaji variasi genetik populasi monyet ekor panjang di Bukit Gumang.

Kata-kata kunci : *Lokus mikrosatelit D8S1100, Bukit Gumang, populasi monyet ekor panjang*

PENDAHULUAN

Struktur genetik populasi memberikan informasi penting mengenai apa yang telah terjadi dalam populasi di masa lalu, apa yang sedang terjadi sekarang, dan apa yang akan terjadi di masa depan. Pengungkapan struktur genetik populasi secara molekuler dapat dilakukan dengan menggunakan protein dan DNA. Namun DNA lebih memberikan kepastian pencerminan variasi genetik yang sebenarnya.

Salah satu marka molekuler pada tingkat DNA adalah mikrosatelit. Mikrosatelit (runutan nukleotida sederhana, di-, tri- atau tetranukleotida, yang berulang dalam genom, Whitton *et al.*, 1997) adalah segmen dari materi genetik (DNA), sehingga penggunaannya sebagai marka molekuler akan lebih mencerminkan struktur genetik populasi.

Mikrosatelit pada umumnya bersifat netral yaitu tidak menimbulkan kematian pada individu yang membawa alelnya (Morin *et al.*, 1997). Genotip individu dalam populasi merupakan kombinasi antar alel mikrosatelit tetuanya. Akumulasi tinggi suatu alel dalam populasi kemungkinan timbul, salah satunya, oleh intensitas kawin keluarga (*inbreeding*) yang tinggi. Melalui pemilihan marka molekuler mikrosatelit yang tidak terpaut satu dengan yang lainnya, marka molekuler mikrosatelit sangat baik untuk mengkaji berbagai parameter genetik populasi seperti diversitas genetik (heterosigositas), kawin acak, dan aliran genetik.

Tidak semua lokus mikrosatelit baik untuk mengungkapkan variasi genetik populasi. Lokus yang bersifat monomorfik tidak baik digunakan untuk mendeteksi polimorfisme/keragaman genetik populasi. Sedangkan lokus yang polimorfik lebih baik mendeteksi variasi genetik populasi. Beberapa penelitian yang dilakukan pada monyet ekor panjang di Bali (Wandia, 2003; Wandia *et al.*, 2009), telah berhasil mengkarakterisasi beberapa lokus mikrosatelit, tetapi karakterisasi lokus mikrosatelit D8S1100 pada monyet Bali belum pernah dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkapkan polimorfisme lokus mikrosatelit D8S1100 pada populasi monyet ekor panjang pura Bukit Gumang. Pura Bukit Gumang berada di kabupaten Karangasem dan dihuni oleh monyet ekor panjang dengan jumlah anggota populasi 174 ekor (Loudon *et al.*, 2006). Sampel darah monyet ekor panjang yang disampling dari populasi pura Bukit Gumang sebagai sumber DNA telah tersedia di Laboratorium Molekuler Pusat Penelitian satwa primata, Bukit Jimbaran – LPPM UNUD.

METODE PENELITIAN

Sampel darah

Sampling menggunakan metode *convenient*. Sejumlah 19 sampel darah monyet ekor panjang yang berasal dari populasi Bukit Gumang telah terkoleksi. Sampling telah dilakukan pada tahun 2007 dan darahnya disimpan di Laboratorium Molekuler Pusat Penelitian Satwa Primata (PPSP) Universitas Udayana.

Ekstraksi DNA Total

Ekstraksi DNA total 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 yang selanjutnya dicampur dengan menggunakan vortex selama 15 detik. Campuran ini diinkubasi pada suhu 56⁰C selama 10 menit, kemudian dipusing beberapa saat untuk menurunkan embun yang menempel pada tutup eppendorf. (2) Sebanyak

200 µl etanol (96-100%) ditambahkan pada sampel, dicampur menggunakan vortex selama 15 detik, dan dipusing beberapa saat untuk menurunkan embun yang menempel pada tutup eppendorf. (3) Campuran ini dimasukkan ke dalam *QIAamp spin column* dan dipusingkan pada 6000 x g selama 1 menit setelah ditutup terlebih dahulu. Selanjutnya, *spin column* ini diletakkan di dalam tabung 2 ml yang bersih, dan tabung yang mengandung filtrate dibuang. (4) Tutup *spin column* dibuka dengan hati-hati, dan 500 µl buffer AW1 dimasukkan. *Spin column* ditutup kembali, dan dipusing pada 6000 x g 1 menit. *Spin column* diletakkan di dalam tabung 2ml yang bersih, dan tabung yang mengandung filtrat dibuang. (5) Sebanyak 500 µl buffer AW2 dimasukkan ke dalam *spin column*, dan dipusing pada 20000 x g selama 3 menit. (6) *Spin column* dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml, ditambahkan 200 µl *buffer* AE, diinkubasi pada suhu ruangan (15-25⁰C) selama 1 menit, dan dipusingkan pada 6000 x g selama 1 menit. Larutan DNA selanjutnya disimpan dalam refrigerator.

Amplifikasi Lokus Mikrosatelit

Lokus mikrosatelit diamplifikasi melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan satu set primer D8S1100 yang mengapit lokus mikrosatelit tersebut. Setiap unit reaksi PCR mengandung 4mM MgCl₂; dNTP masing-masing 0,16 mM; sepasang primer masing-masing 0,4-0,8 mM; Taq DNA polymerase sebanyak 0,5-0,7U (Applied Biosystem N8080161). Ditambahkan 1,25 µl *buffer* 10x 1 µl *template* DNA, dan air deionase sehingga volume akhir 12,5 µl. Urutan pencampuran dilakukan secara bebas, kecuali Tag DNA Polymerase dicampur untuk yang terakhir. Campuran divorteks dan dipusingkan (Hillis *et al.* 1996).

Amplifikasi lokus mikrosatelit menggunakan mesin Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler. Kondisi PCR sebagai berikut: pra PCR selama satu siklus (94⁰C) 5 menit. PCR dilakukan selama tiga puluh siklus dengan tahapan sebagai berikut: tahapan *Denaturasi* (94⁰C/45 detik), *annealing* (54⁰C/45 detik), dan *Elongasi* (72⁰C/40 detik). Sedangkan post PCR: *Elongasi* (72⁰C/ 5 menit).

Elektroforesis

Pembuatan Gel Akrilamid 7% untuk sediaan 25 ml dengan cara sebagai berikut: menyiapkan gelas beker yang telah diisi air (DW) sebanyak 15 ml. Gelas beker yang telah terisi air ini, dimasukkan 5 x TBE sebanyak 5 ml, diaduk sampai homogen (jernih). Setelah itu, ditambahkan akrilamid 30 % sebanyak 5 ml, APS sebanyak 150 µl dan temed sebanyak 15 µl. Campuran digoyang hingga semua zat homogen dan dituang kedalam cetakan gel vertikal yang telah disiapkan. Sisir diletakkan diatas cetakan gel untuk membentuk sumur-sumur pemuat dan dibiarkan campuran memadat menjadi gel dengan tegangan 125 volt selama 90 menit. Setelah selesai, gel disiapkan untuk pewarnaan Perak.

Pewarnaan Perak

Pita dimunculkan dengan pewarnaan perak (*silver staining*) dengan cara sebagai berikut: setelah elektroforesis, 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 1 dibuang, kemudian gel dicuci dengan 200 ml air deionase selama 5 menit. Air dibuang, lalu dituangkan larutan ke-2 (2,4 ml NH₄OH dalam air deionase dengan volume akhir 200 ml) sambil digoyang selama 5 menit. Larutan ke-2 dibuang, selanjutnya dimasukkan larutan ke-3 (0,32 g AgNO₃, 0,08 ml NaOH 10 N, 0,8 ml NH₄OH dalam air deionase dengan volume akhir larutan 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 3 menit. Air bekas pencucian dibuang, lalu ditambahkan larutan ke-4 (4 g Na₂CO₃, 100 µl formaldehida dalam air deionase sehingga volume akhir 200 ml) sambil digoyang sampai muncul pita. Larutan ke-4 segera dibuang setelah pita muncul, dan dimasukkan larutan ke-5 (asam asetat glasial 1% dengan volume 200 ml) untuk menghentikan reduksi perak. Selanjutnya, gel dapat dipres atau direndam dulu dengan gliserol 20% sebelum 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, genotip ditentukan berdasarkan variasi pita alel.

Frekuensi alel

Frekuensi alel dihitung dengan rumus Nei (1987), sebagai berikut :

$$x_i = \frac{(2n_{ii} + \sum n_{ij})}{(2n)} \dots\dots\dots (1)$$

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 dihitung menggunakan rumus tidak bias dari Nei (1987) :

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

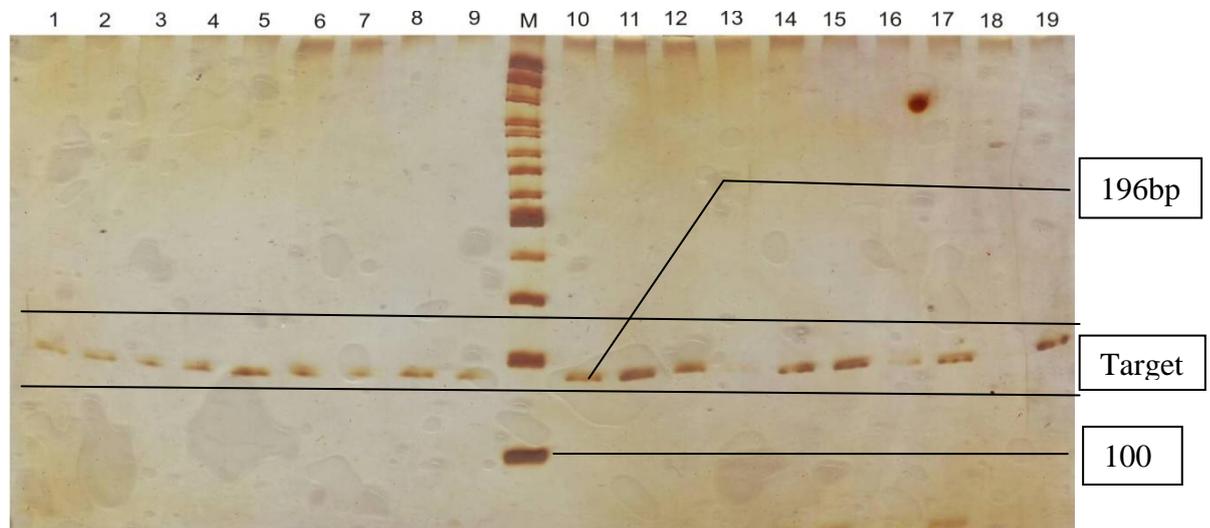
keterangan:

- h: heterozigositas
- n: jumlah sampel
- x_i : frekuensi alel i

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Alel dan Jumlah Alel

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 18 dari 19 sampel menghasilkan produk PCR. Analisis selanjutnya dilakukan pada 18 sampel tersebut. Dari 18 sampel hanya teridentifikasi 1 alel pada lokus mikrosatelit D8S1100 di populasi monyet ekor panjang Bukit Gumang. Panjang alel adalah 196 bp (Gambar 3). Keseluruhan sampel monyet ekor panjang (18 sampel) bergenotip homozigot (196/196) (Tabel 1).



Gambar 3. Alel Lokus D8S1100. Nomor menyatakan sampel (individu), huruf M menyatakan penanda (100 base pairs ladder). Genotip 1-19=196/196. Kecuali sampel nomor 18, alelnya tidak muncul.

Tabel 1. Genotip Monyet Ekor Panjang di Bukit Gumang Menggunakan Lokus Mikrosatelit D8S1100

No	Genotip	Jumlah Monyet (ekor)
1	196/196	18
	Total	18

Frekuensi Alel dan Heterozigositas

Hanya satu alel yang terdeteksi, yaitu alel 196. Sehingga frekuensinya tinggi (1) (Tabel 2).

Tabel 2. Frekuensi Lokus Mikrosatelit D8S1100 Alel Monyet Ekor Panjang di Bukit Gumang

No	Jenis Alel	Jumlah Alel	Frekuensi Alel
1	196	36	1
Total	1	36	1

Heterozigositas Lokus mikrosatelit D8S1100 adalah 0. Artinya, lokus mikrosatelit D8S1100 pada populasi monyet ekor panjang Bukit Gumang bersifat monomorfik (homozigot).

Pembahasan

Kemajuan yang terjadi pada teknik molekuler telah banyak membantu dalam menghasilkan data tentang variasi genetik pada tingkat DNA. Berbagai penelitian eksplorasi polimorfisme lokus mikrosatelit pada primata non-human (satwa primata) dengan menggunakan primer mikrosatelit manusia telah dilakukan (Kanthasmawy *et al.*, 2006). Polimorfisme dari genom ditetapkan dari hasil amplifikasi DNA dengan primer pengapit mikrosatelit yang alelnya dipisahkan dengan teknik pewarnaan perak (*silver staining*). Elektroforesis pada gel poliakrilamid mampu memisahkan DNA lebih sempurna dan jumlah yang dibutuhkan lebih sedikit, demikian pula metode pewarnaan perak lebih sensitif karena mampu mendeteksi DNA dengan kandungan lebih kecil dari 10µg/ µl (Allen *et al.*, 1984).

Karakteristik lokus mikrosatelit bervariasi pada berbagai populasi. Hasil penelitian menggunakan lokus mikrosatelit D8S1100 pada 19 monyet ekor panjang di Bukit Gumang teridentifikasi hanya 1 alel. 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 D18S536 (Paujiah, 2011) di populasi monyet ekor panjang Bedugul

teridentifikasi 4 alel, sedangkan di Alas Kedaton teridentifikasi 5 alel (Dasril, 2011). Karakterisasi lokus mikrosatelit D8S1100 pada populasi lainnya perlu dilakukan sehingga informasi mengenai kondisi polimorfismenya dapat diketahui sebelum pemilihan marker molekuler untuk studi variasi genetik populasi.

Heterozigositas merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik populasi (Tanabe *et al.*, 1999). Nilai heterozigositas monyet ekor panjang di Bukit Gumang menggunakan lokus mikrosatelit D8S1100 adalah 0. Hal ini berkaitan dengan sifat lokus mikrosatelit D8S1100 yang monomorfik homozigot. Hasil karakterisasi ini mengindikasikan bahwa lokus D8S1100 kurang baik untuk mengidentifikasi variasi genetik populasi monyet ekor panjang di Bukit Gumang.

SIMPULAN

Lokus mikrosatelit D8S1100 bersifat monomorfik pada populasi monyet ekor panjang di Bukit Gumang.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian yang sama dipopulasi lain menggunakan lokus mikrosatelit D8S1100. Untuk mengidentifikasi variasi genetik monyet ekor panjang di Bukit Gumang, lokus D8S1100 kurang baik digunakan sebagai marka molekuler.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada kepada staf laboratorium Pusat Penelitian Satwa Primata - LPPM Universitas Udayana yang telah membantu untuk menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, R.C., C.A., Saravis., H.R. Maurer. 1984. *Gel electrophoresis and isoelectric focusing of protein*. Walter de Gruiter. New York.
- Dasril, A.L.G. 2011. *Struktur Genetika Populasi Monyet Ekor Panjang di Alas Kedaton dengan Menggunakan Mikrosatelit D18S536*. Unpublished.
- Hillis, D.M., Morits, C., Mable, B.K. 1996. *Molecular Systematics*. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc. Publisher. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Kanthaswamy, S., A. Von, Dolen., J.D. Kurushima., Ona, Alminas., J. Roger., B. Ferguson., N.W. Lerche., P.C. Allen., D.G. Smith. 2006. *Microsatellite Markers for Standardized Genetic Management of Captive Colonies of Rhesus Macaques (Macaca mulatta)*. American Journal of Primatology. 68:73-95.
- Krawscjack, M., Schmidtke, J. 1994. *DNA Fingerprint*. BIOS Scientific Publisher Limited. Oxford.
- Loudon, J.E., Howells, M.E., Fuentes, A. 2006. *The Importance of Integrative Anthropology: A Preliminary Investigation Employing Primatological and Cultural Anthropological Data Collection Methods in Assessing Human-Monkey Co-existence in Bali, Indonesia*. Ecological and Environmental Anthropology. 2 (1): 2-12.
- Morin, P.A., Kanthaswamy, S., Smith, D.G. 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.
- Paujiah, M.M. 2011. *Polimorfisme Lokus Mikrosatelit D18S536 pada Populasi Monyet Ekor Panjang di Bedugul*. Unpublished.
- Tanabe, Y., H. Yokohama., J. Murakami., H. Kano., O. Tanawaki., H. Okabyashi., Y. Maeda., C. Koshimoto., K.Nozawa., K. Tumennasan., B. Dashnyman., T. Zhanciv. 1999. *Polimorphisms of The Plumage Colors, the Skin Variations and Blood Proteins in the Chirkens in Mongolia*. Report of the Sociaty for researches on Native livestock. 17: 139-153.

Wandia, I.N. 2003. *Mikrosatelit sebagai Penanda Molekul untuk Mengukur Polimorfisme Genetik Monyet Ekor Panjang di Sangeh, Bali*. J. Vet. 4(3): 93-100.

Wandia, I.N., Putra, I.G.A.A., Soma, I.G. 2009. *Polimorfisme Genetik Populasi Monyet Ekor Panjang (Macaca fascicularis) di Lokasi Pariwisata, Bali*. Fakultas Kedokteran Hewan. Laporan Funda Mental Dana DIPA Universitas Udayana Tahun Anggaran 2009.

Whitton, J., Rieseberg, L.H., Ungerer M.C. 1997. *Microsatellite loci are not conserved across the Asteraceae*. Mol. Biol. Evol. 14(2): 204-207.