

**Polimorfisme Lokus Mikrosatelit D18S536 pada Populasi Monyet Ekor Panjang di
Pancasari, Bali**

MIKEU PAUIAH MUR¹, I GEDE SOMA², I NENGAH WANDIA^{1,3*}

¹Lab Anatomi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

²Lab fisiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

³Pusat Penelitian Satwa Primata, LPPM UNUD, Bukit Jimbaran

*Correspondent Author: email: ikkegoo@gmail.com

ABSTRAK

Marka molekul mikrosatelit merupakan segmen langsung dari genom (DNA) sehingga variasi genetik yang ditemukan mencerminkan variasi genetik yang sebenarnya. Penelitian ini untuk mengkaji polimorfisme lokus mikrosatelit D18S536 pada populasi monyet ekor panjang di Pancasari, Bali. Sejumlah 10 sampel darah telah dikoleksi dan DNA total diekstraksi menggunakan QIAamp DNA Blood Mini Kit dari Qiagen. Lokus mikrosatelit D18S536 di amplifikasi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dengan suhu *annealing* 54°C. Alel dipisahkan dengan elektroforesis pada gel poliakrilamid 7% dan dimunculkan dengan pewarnaan perak. 4 jenis alel pada lokus D18S536 dalam populasi monyet ekor panjang di Pancasari dengan panjang alel berkisar 160-172 bp. Frekuensi alel bervariasi, alel 168 (0,45) memiliki frekuensi tertinggi disusul alel 164 (0,25), alel 160 (0,2) dan alel 172 (0,1). Heterosigositas lokus D18S536 sebesar $h = 0,72$. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa lokus D18S536 pada populasi monyet ekor panjang di Pancasari bersifat polimorfik.

Keywords : Mikrosatelit D18S536 , Monyet Ekor Panjang, Pancasari, Variasi genetik

PENDAHULUAN

Sebaran populasi monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) cukup luas di Indonesia (Muhibbudin, 2005). Di pulau Bali, populasi monyet ekor panjang dapat ditemukan di 43 lokasi, (Fuentes dan Gamerl, 2005) dan saat ini lokasi populasi telah bertambah menjadi. Populasi monyet ekor panjang terbesar umumnya ditemukan dikawasan yang telah dimanfaatkan sebagai objek wisata seperti Sangeh, Padangtegal Ubud, Alas Kedaton, Pulaki, Uluwatu (Fuentes dan Gamerl, 2005).

Pancasari merupakan suatu kawasan pariwisata yang terletak pada ketinggian ± 1240 m dari permukaan laut. Daerah ini sangat sejuk dengan temperatur rata-rata 18°C pada malam hari

dan 24⁰C pada siang hari. Keberadaan populasi monyet ekor panjang di Pancasari, yang terpisah dengan populasi yang lain menyebabkan peluang terjadinya kawin antar anggota keluarga (*inbreeding*) di dalam populasi tersebut meningkat, dan kuantitas aliran genetik (*gene flow*) antar populasi menurun. Kondisi selanjutnya akan menurunkan diversitas genetik (*heterosigositas*) populasi dan mengancam kelestarian jangka panjang populasi *in situ* (Wandia *et al.*, 2009).

Polimorfisme genetik (struktur genetik) populasi adalah kondisi intrinsik (genetik) suatu populasi. Pengungkapan polimorfisme genetik dapat memberikan gambaran apakah kehidupan suatu populasi dalam keadaan aman atau terancam (Wandia *et al.*, 2009). Namun, data molekular mengenai monyet ekor panjang yang ada di Pulau Bali sangat minim .

Marka mikrosatelit berperan penting dalam menganalisis kelangsungan hidup populasi. Berbeda halnya dengan marka protein, marka mikrosatelit merupakan segmen langsung dari genom (DNA) sehingga variasi genetik yang ditemukan pencerminan variasi genetik yang sebenarnya. Polimorfisme mikrosatelit yang tinggi merupakan marka molekular yang baik untuk kajian genetika populasi (Smith *et al.*, 2000).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jumlah alel, frekuensi alel, dan heterosigositas pada lokus mikrosatelit D18S536. Monyet ekor panjang disampling dari populasi Pancasari, Bali. Sampel darah telah dikoleksi dan tersedia di Laboratorium Molekular Pusat Penelitian Satwa Primata LPPM UNUD.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Sejumlah 10 sampel darah monyet ekor panjang yang berasal dari populasi Pancasari, Bali telah terkoleksi pada tahun 2007. Sampel yang diteliti telah tersedia Laboratorium Molekular 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 ependorf 1,5 µl 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 ependorf. (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 ependorf. (3) Campuran ini dimasukkan ke dalam *QIAamp spin column* dan dipusing pada 6000 x g selama 1 menit setelah ditutup terlebih dahulu. Selanjutnya, *spin column* ini diletakkan didalam tabung 2 ml yang bersih, dan tabung yang mengandung filtrat dibuang. (4) Tutup *spin column* dibuka dengan hati-hati, dan 500 µl buffer AW1 dimasukkan. *Spin coloum* ditutup kembali, dan dipusing pada 6000 x g selama 1 menit. *Spin column* diletakkan di dalam tabung 2ml yang bersih, dan tabung yang mengandung filtrate dibuang. (5) Sebanyak 500 µl buffer AW2 di masukkan 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 I menit, dan dipusing pada 6000 x g selama 1 menit (Wandia *et al.*, 2009) . DNA selanjutnya disimpan dalam refrigerator.

Amplifikasi lokus Mikrosatelit

Setiap unit reaksi PCR mengandung 2 mM MgCl₂; dNTP masing-masing 0,2mM; sepasang primer masing-masing 0,2mM; Taq DNA *polymerase* sebanyak 0,2U. Ke dalamnya ditambahkan 1,25 µl *buffer* 10x 1 µl *template* DNA, dan sejumlah 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 sebentar. Amplifikasi lokus mikrosatelit menggunakan mesin Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler. Kondisi PCR sebagai berikut: Pra PCR; denaturasi (94⁰C) selama 5 menit. PCR, PCR dilakukan selama tiga puluh siklus dengan tahapan sebagai berikut : Tahapan denaturasi (94⁰C) selama 45 detik , *annealing* (54⁰C) selama 45 detik, dan elongasi (72⁰C) selama 40 detik; dan post PCR elongasi (72⁰C) selama 5 menit.

Elektroforesis

Gel Poliakrilamit 7% dengan volume 25 ml dibuat dengan langkah sebagai berikut: Masukkan air (DW) 15 ml ke dalam gelas beker. Selanjutnya tambahkan 5 x TBE sebanyak 5 ml, akrilamid 30 % sebanyak 5 ml, APS sebanyak 150 µl, dan Temed sebanyak 15 µl, kemudian

campuran digoyang-goyang hingga homogen. Tuangkan campuran kedalam cetakan gel vertikal yang telah disiapkan. Letakkan sisir di atas cetakan gel untuk membentuk sumur-sumur pemuat. Elektroforesis dijalankan tegangan 125 volt selama 90 menit.

Pewarnaan Perak

Pita dimunculkan dengan pewarnaan perak (*silver staining*) sebagai berikut, setelah elektroforesis, gel dilepas dari cetakan dan ditempatkan pada wadah gel. Tuangkan larutan ke-1 (terdiri dari CTAB 0,2 g dalam air deionase dengan volume akhir 200 ml) 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 tuangkan 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 masukkan 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. Buang larutan ke-3, dan cuci dengan 200 ml air deionase selama 3 menit. Air deionase dibuang, dan cuci dengan air deionase lagi selama 3 menit. Air bekas pencucian dibuang, lalu tambahkan 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

a. Jumlah alel

Pita yang muncul pada gel poliakrilamid adalah suatu alel mikrosatelit. Keragaman alel mikrosatelit dapat dilihat dari beda jarak migrasi alel pada gel (Krawck dan Schmidtke, 1994).

b. Frekuensi alel

Frekuensi alel dihitung dengan rumus (1) dari 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

c. Heterosigositas

Nilai heterosigositas merupakan ukuran keragaman genetik, dengan nilai heterosigositas dihitung menggunakan rumus tidak bias (2) dari Nei (1987) sebagai berikut:

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

keterangan:

h : heterosigositas

n : jumlah sampel

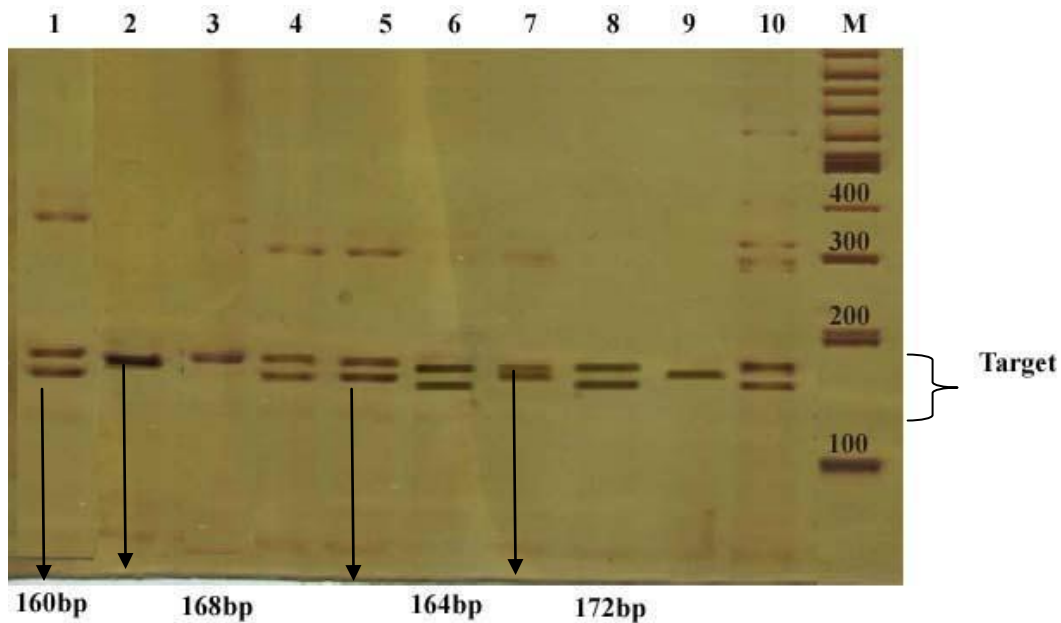
x_i : frekuensi alel ke i

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Identifikasi Alel

Lokus dinyatakan polimorfik apabila jumlah alel suatu lokus dalam populasi lebih dari satu dengan frekuensi alel yang paling umum kurang atau sama dengan 0,95. Alel pada masing-masing lokus mikrosatelit dalam populasi diidentifikasi berdasarkan perbedaan migrasi pita setelah dielektroforesis dengan gel poliakrilamid 7% selama 90 menit (Gambar 1).



Gambar 1. Alel lokus D18S536. Nomor menyatakan sampel (individu), huruf M menyatakan penanda (100 *base pairs* ladder). Genotip 1, 4, 5, 10 = 160/168; 2 = 164/164; 3,9 = 168/168; 6,8 = 164/172; 7 = 164/168

Berdasarkan pita yang muncul pada gel elektroforesis teridentifikasi 4 buah alel dengan panjang berkisar antara 160-172 bp. Dari 10 monyet ekor panjang, tiga individu bergenotip homozigot dan yang lain bergenotip heterosigot (Tabel 1).

Tabel 1. Genotip Monyet Ekor Panjang Di Pancasari Dengan Lokus Mikrosatelit D18S536

No	Genotip	Jumlah Monyet (ekor)
1	160/168	4
2	164/164	1
3	168/168	2
4	164/168	1
5	164/172	2
Total	5	10

Frekuensi Alel

Dari 4 buah alel yang terdeteksi, alel 168 memperlihatkan frekuensi tertinggi (0,45) sedangkan alel 172 menunjukkan frekuensi terendah (0,1) (Tabel 2). Nilai lokus mikrosatelit D18S536 sebesar 0,72.

Tabel 2. Frekuensi Lokus Mikrosatelit D18S536 Alel Monyet Ekor Panjang Di Pancasari.

No	Jenis Alel	Jumlah Alel	Frekuensi Alel (%)
1	160	4	0.2
2	164	5	0.25
3	168	9	0.45
4	172	2	0.1
Total	4	20	1.00

Pembahasan

Polimorfisme suatu populasi dapat memberi petunjuk mengenai keadaan populasi di masa mendatang (Nozawa *et al.*,1982). Pada tingkat DNA variabilitas genetik populasi dapat diungkap dengan menggunakan berbagai marka molekul, salah satunya adalah mikrosatelit. Beberapa karakter mikrosatelit seperti alel mudah dibedakan, memiliki tingkat variabilitas yang tinggi, dan mudah didekati melalui teknik PCR (Ellegren *et al.*,1992), menjadikan mikrosatelit sebagai penanda molekuler semakin meningkat. Polimorfisme mikrosatelit dari genom ditetapkan dari hasil amplifikasi DNA dengan primer pengapit mikrosatelit yang alelnya dipisahkan dengan elektroforesis pada gel poliakrilamid dan dilanjutkan 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 10 ng/ μ L (Allen *et al.*,1984). Dengan mengidentifikasi pita yang timbul setelah elektroforesis (satu pita untuk homosigot dan dua pita untuk heterosigot pada organisme diploid), genotip satu individu dapat ditentukan dan frekuensi alelnya dalam populasi dapat dihitung (Lessa dan Apflebaum, 1993).

Karakteristik lokus mikrosatelit bervariasi pada berbagai populasi. Hasil penelitian menggunakan lokus mikrosatelit D18S536 pada 10 monyet ekor panjang di Pancasari, Bali teridentifikasi 4 jenis alel. Jumlah alel ini belum tentu sama dengan jumlah alel yang ditemukan di populasi lain. Sebagai contoh, pada lokus D4S2456 ditemukan 5 alel di populasi Pulaki sedangkan di populasi Mekori ditemukan 8 alel (Wandia *et al.*, 2009).

Frekuensi alel terendah pada monyet ekor panjang di Pancasari, Bali perlu mendapat perhatian seperti pada alel 172 (0,1). Rendahnya frekuensi sejumlah alel kemungkinan besar sebagai akibat dari *random genetic drift*. Kemungkinan lain bahwa alel tersebut produk mutasi terkini sehingga belum tersebar keseluruh anggota populasi (Wandia, 2001). Mutasi lokus mikrosatelit menyangkut penambahan atau pengurangan jumlah motif (runutan nukleotida yang terulang). Dua alasan yang digunakan untuk menerangkan proses penambahan dan pengurangan motif adalah *slipped strand mispairing* dan pindah silang tidak sama (*unequal crossing over*) saat replikasi DNA (Awise, 1994). Suatu Penambahan atau pengurangan motif pada mikrosatelit memberikan keuntungan karena alel dalam satu lokus mudah dibedakan melalui elektroforesis. Lokus mikrosatelit dengan motif tetranukleotida akan lebih mudah dibedakan jenis alelnya melalui teknik PCR (Kanthaswamy *et al.*, 2006).

Heterosigositas merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik dalam populasi (Tanabe *et al.*, 1999). Semakin tinggi nilai heterosigositas suatu populasi maka semakin tinggi kejadian *outbreeding* sehingga meningkatkan proporsi genotip heterosigot (Noor, 2000). Nilai heterosigositas rendah akan membahayakan kelestarian suatu spesies atau populasi (Nozawa *et al.*, 1996) karena tingginya angka *inbreeding* (Khan And Sing, 1990). Populasi dengan tingkat heterosigositas sangat sensitif terhadap perubahan alam karena potensial evolusi yang rendah (Frankham *et al.*, 2004)

Nilai heterosigositas monyet ekor panjang di Pancasari, Bali menggunakan lokus mikrosatelit D18S536 adalah $h=0,72$. Bila dibandingkan dengan lokus yang lain ataupun dengan populasi lain yang pernah dilakukan oleh Wandia *et al* (2009) lokus D18S536 memiliki tingkat keragaman genetik yang cukup tinggi. Faktor-faktor yang mempengaruhi heterosigositas antara lain laju mutasi, jumlah populasi efektif, pola perkawinan (acak atau terpilih), migrasi (aliran genetik), dan seleksi (heterosigositas positif dan negatif) (Nozawa *et al.*, 1982). Penelitian dengan menggunakan lokus yang berbeda perlu dilakukan pada populasi monyet ekor panjang di

Pancasari, Bali untuk memastikan keragaman genetik populasi tersebut. Keragaman genetik harus terus dikaji untuk mengetahui lebih dini status genetik suatu populasi dan sebagai bahan pertimbangan dalam penyusunan langkah konservasi.

SIMPULAN

Lokus D18S536 bersifat polimorfik pada populasi monyet ekor panjang di Pancasari, Bali. Sejumlah 4 alel ditemukan lokus D18S536 dengan frekuensi masing-masing alel 168 (0.45), alel 164 (0.25), alel 160 (0.2) dan alel 172 (0.1), serta heterosigositas sebesar 0.72.

UCAPAN TERIMA KASIH

Allah SWT atas segala hal yang diberikanNYA, Laboratorium Molekular Pusat Penelitian Satwa Primata (PPSP), LPPM Universitas Udayana, orang tua (Murni Dan Suki) yang selalu memberikan dukungan moril dan doa dan teman-teman seperjuangan Wa Ode Santa monica, Evi Kumala Dewi, Jefri Dawa Rumba, Alda Dasril Gaol, Nuri Dwi Yudarini, Henny Yanuarti, dan Firmansyah yang selalu memberikan motivasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen R.C., C.A. Saravis., H.R. Maurer. 1984. *Gel electrophoresis and isoelectric focusing of protein*. Walter de Gruyter. New York.
- Awise JC. 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman and Hall Inc. New York.
- Ellegren, H., M. Johansson., K. Sandberg., L. Andersson. 1992. *Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse*. Anita. Genet.
- Fuentes A., Gamerls S. 2005. *Dissproportionate participation by age/sex classes in aggressive interaction between long-tailed macaques (macaca fascicularis) and human tourist at padangtegal monkey forest, Bali, Indonesia: Brief Report*. American Journal of Primatology 66: 197-204.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. 2004. *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge.
- 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.

Khan, F., Sing, A. 1990. *Principles of Genetics and Animal Breedin.* Jaypee Brother Medical Publishers. New Delhi..

Krawczak M., Schmidtke J. 1994. *DNA Fingerprinting.* BIOS Scientific Publisher Limited. Oxford, UK.

Lessa, E.P., G. Apledbaum. 1993. *Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequens.* Moleculer Ecology, 2: 119-129.

Muhibuddin. 2005. *Studi perilaku satwa liar kera ekor panjang (macaca fascicularis Raffles, 1821) untuk pengembangan ekowisata di kawasan hutan wisata kali urang Yokyakarta.* (tesis). Yokyakarta: Program Studi Ilmu Kehutanan. Jurusan Ilmu-ilmu Pertanian. Sekolah Pascasarjana UGM.

Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetic.* Colombia University Press. New York

Noor, R.R. 2000. *Genetik Ternak.* Penebar Swadaya. Jakarta.

Nozawa, K., T. Shotake., M. Minezawa., Y. Kawamoto., K. Kawamoto., S. Kawamoto. 1996. *Population-genetic studies of the Javanese macaque, Macaca fuscata.* In: *Variations in the Asian Macaques.* T. Shotake and K. Wada (eds.). Tokai University Press. Tokyo, Japan: 1-36.

Nozawa, K., T. Shotake., Y. Kawamoto., Y. Tanabe. 1982. *Population genetic of japanese monkeys: II. Blood protein polymorphisms and population structure.* *Primates.* 23: 252-271.

Smith DG, Kanthasmawy S, Viary J., Cody L.2000. *Additional higly polymorphic microsatelit (STR) loci for estimating kinship in rhesus macaques (macaca mulatta).* American Journal Of Primatology.50: 1-7.

Tanabe, Y., H. Yokoyama., J. Murakami., H. Kano., O. Tanawaki., H. Okabayashi., Y. Maeda., C. Koshimoto., K. Nozawa., K. Tumennasan., B. Dashnyman., T. Zhanchiv. 1999. *Polymorphisms Of The Plumage Colors, The Skin Variations And Blood Proteins In The Native Chickens In Mongolia.* Report Of The Sociaty For Researches On Native Livestock 17: 139-153.

Wandia, I.N. 2001. *Variasi Genetik Populasi Monyet Ekor Panjang (Macaca fascicularis) Di Beberapa Lokasi Di Bali.* Tesis. Program Pasca Sarjana IPB: Bogor.

Wandia, I.N., Putra, Arta., I.G.A., Soma.I.G. 2009. *Polimorfisme Genetik Populasi Monyet Ekor Panjang (Macaca fascicularis) di Lokasi Pariwisata, Bali*. Laporan Penelitian Tahun Anggaran 2009 DIPA Universitas Udayana: Bali.