

Polimorfisme Locus Mikrosatelit D2S1368 pada Populasi Monyet Ekor Panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali

(POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE D2S1368 LOCUS IN LONG TAIL MONKEY POPULATION IN PUNCAK MUNDI TEMPLE, NUSA PENIDA ISLAND, KLUNGKUNG, BALI)

Tri Indra Erikson Sihombing¹, I Nengah Wandia^{2,3}, I Gede Soma^{2,3,4}

¹Mahasiswa Pendidikan Sarjana Kedokteran Hewan,

²Pusat Penelitian Satwa Primata LPPM, Universitas Udayana Kampus Unud, Bukit Jimbaran, Kuta, Badung, Bali,

³Laboratorium Anatomi dan Embriologi Veteriner,

⁴Laboratorium Fisiologi, Farmakologi, dan Farmasi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,

Jalan PB Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234;Telp/Fax: (0361) 223791
e-mail: wandia@unud.ac.id

ABSTRAK

Penelitian polimorfisme lokus mikrosatelit D2S1368 pada populasi monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali bertujuan untuk mengetahui jumlah alel, frekuensi alel, heterozigositas, *Polymorphism Information Content (PIC)* dan keseimbangan Hardy-Weinberg berdasarkan sebaran alel dengan Uji *Chi-Square* sebanyak enam sampel darah monyet ekor panjang diambil dari Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali. Sampel diekstraksi dengan menggunakan *QIAamp DNA Blood Mini Kits* produksi Qiagen. Teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dilakukan sebanyak 30 siklus dengan suhu *annealing* 50 C. Alel dipisahkan secara elektroforesis pada gel poliakrilamid 8% dan dimunculkan dengan perwarnaan perak (*silver staining*). Hasil penelitian menunjukkan heterozigositas lokus mikrosatelit D2S1368 rendah (0,29) dengan nilai PIC cukup informatif (0,28). Sebaran alel lokus menyimpang dari keseimbangan hukum Hardy-Weinberg. Berdasarkan hasil pengujian dapat disimpulkan lokus mikrosatelit D2S1368 bersifat polimorfik.

Kata-kata kunci: lokus mikrosatelit D2S1368; monyet ekor panjang; Pura Puncak Mundi; Pulau Nusa Penida; polimorfisme lokus.

ABSTRACT

The research of D2S1368 microsatellite locus polymorphism in population long-tailed macaques at Pura Puncak Mundi Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali aims to determine the number of alleles, allele frequencies, heterozygosity, polymorphism information content (PIC), and the Hardy-Weinberg Equilibrium of the distribution of the alleles with chi square test. A total of six long-tailed macaque blood samples was taken from Pura Puncak Mundi Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali. The samples was extracted using *QIAamp Qiagen DNA Blood Mini Kits*. Technique of PCR was performed by thirty cycles with annealing temperature of 50 C. Alleles were separated by electrophoresis on 8% polyacrylamide gel and presented with silver staining. The results showed that heterozygosity of D2S1368 microsatellite locus was low (0,29) with a PIC was quite informative value (0,28). The distribution of allele loci deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. It can be concluded that the D2S1368 microsatellite locus is polymorphic.

Keywords: D2S1368 microsatellite locus; long-tailed macaque; Nusa Penida Island, Puncak Mundi Temple; locus polymorphism .

PENDAHULUAN

Monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) merupakan genus primata yang paling banyak ditemukan di dunia. Monyet yang memiliki berat badan berkisar antara 4,7–8,3 kg (jantan) dan 2,5-5,7 kg (betina) menyebar luas di Asia Tenggara dan sekitarnya. Monyet ekor panjang dapat ditemukan di negara-negara seperti Filipina, Malaysia, Burma, India, Kamboja, Laos, Thailand dan Indonesia. Monyet ekor panjang selanjutnya menyebar di kepulauan selatan Indonesia berjalan dari barat ke timur dengan Jawa Timur sebagai pintu masuk penyebarannya ke Bali (Wandia, 2007).

Monyet ekor panjang di Pulau Bali berada dalam beberapa populasi lokal yang saling terpisah dan diduga berasal dari Pulau Jawa (Wandia, 2007). Pulau Bali mempunyai beberapa tempat alami bagi populasi monyet ekor panjang diantaranya Sangeh, Uluwatu, Kintamani, Taman Nasional Bali Barat, Karangasem dan Pulau Nusa Penida. Pulau Nusa Penida merupakan tempat tinggal monyet ekor panjang yang terletak di sebelah tenggara pulau Bali yang dipisahkan oleh Selat Badung (Tawan *et al.*, 2013). Beberapa tempat di Pulau Pulau Nusa Penida di antaranya Pura Giri Putri, Pura Puncak Mundi, Pura Paluang, dan Pura Saab yang kondisinya sedikit terisolasi. Populasi monyet ekor panjang yang terisolasi berisiko tinggi terjadinya *inbreeding* yang dapat menimbulkan penyimpangan genetik dan tekanan silang dalam atau *inbreeding depression* (Nozawa *et al.*, 1982). Kondisi ini menyebabkan menurunnya diversitas genetik (heterozigositas) dalam populasi dan mengancam kelestarian jangka panjang populasi *in-situ* (Wandia *et al.*, 2009).

Pengungkapan variasi genetik populasi sangat penting karena dapat digunakan sebagai dasar pengembangan dan penentuan strategi konservasi. Diversitas genetik suatu populasi dapat diungkapkan pada tingkat DNA menggunakan marka molekul mikrosatelit yang merupakan segmen langsung dari genom (Dewi *et al.*, 2013). Pengungkapan variasi genetik suatu populasi diperlukan beberapa marka genetik, dalam penelitian ini menggunakan lokus mikrosatelit. Pemilihan lokus ini didasari atas nilai PIC atau polimorfisme dari suatu lokus. Lokus yang lebih polimorfik akan jauh lebih baik untuk mengungkap variasi genetik dibandingkan yang lokus monomorfik (Wandia, 2007). Penelitian ini bertujuan mengungkap polirmorfisme lokus mikrosatelit D2S1368 pada populasi monyet ekor di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali. Informasi lokus ini sangat dibutuhkan untuk

menyingkap variasi genetik pada populasi monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali.

METODE PENELITIAN

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel darah populasi monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) yang berada di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali. Sampel diambil dengan menggunakan teknik *convenient sampling*. Sebanyak enam ekor monyet berhasil ditangkap dengan teknik pembiusan. Monyet dibius menggunakan ketamin HCl (dosis 10 mg/kg BB), dikombinasikan dengan xylazin (dosis 1-2 mg/kg BB) dengan cara ditulup. Darah sebanyak 3 ml diambil dari vena femoralis dengan menggunakan spuit 3 ml kemudian dimasukkan dalam tabung yang berisi *Etilena Diamina Tetra Asetat* (EDTA).

Ekstraksi DNA menggunakan *QIAamp DNA Blood Mini Kits* produksi *Qiagen* sesuai dengan protokol *Qiagen* (*QIAamp Handbook*, 2016). Amplifikasi lokus mikrosatelit D2S1368 dilakukan melalui PCR menggunakan satu set primer yang mengapit lokus mikrosatelit (Bradley *et al.*, 2000). Kondisi PCR sebagai berikut; *pre* PCR sebanyak satu siklus selama 3 menit. Proses PCR dilakukan selama 30 siklus dengan tahap sebagai berikut: tahapan denaturasi (94 °C) selama 30 detik, *annealing* (50 °C) selama 30 detik, dan elongasi (72 °C) selama 30 detik, sedangkan *post* PCR: elongasi (72 °C) selama 5 menit. Hasil amplifikasi dielektroforesis dengan gel poliakrilamid 8% selama 75 menit dengan tegangan 175 volt. Pita pada gel poliakrilamid 8% dimunculkan dengan pewarnaan perak.

Alel lokus mikrosatelit D2S1368 pada populasi monyet ekor panjang diidentifikasi berdasarkan perbedaan migrasi. Variabel yang diteliti dalam penelitian ini antara lain: frekuensi alel, nilai heterozigositas dan PIC (Nei, 1978 ; Botstein *et al.*, 1980), serta dilakukan uji sebaran alel sesuai hukum Hardy-Weinberg dengan uji *chi square* dengan titik kritis 0,05 (Li, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

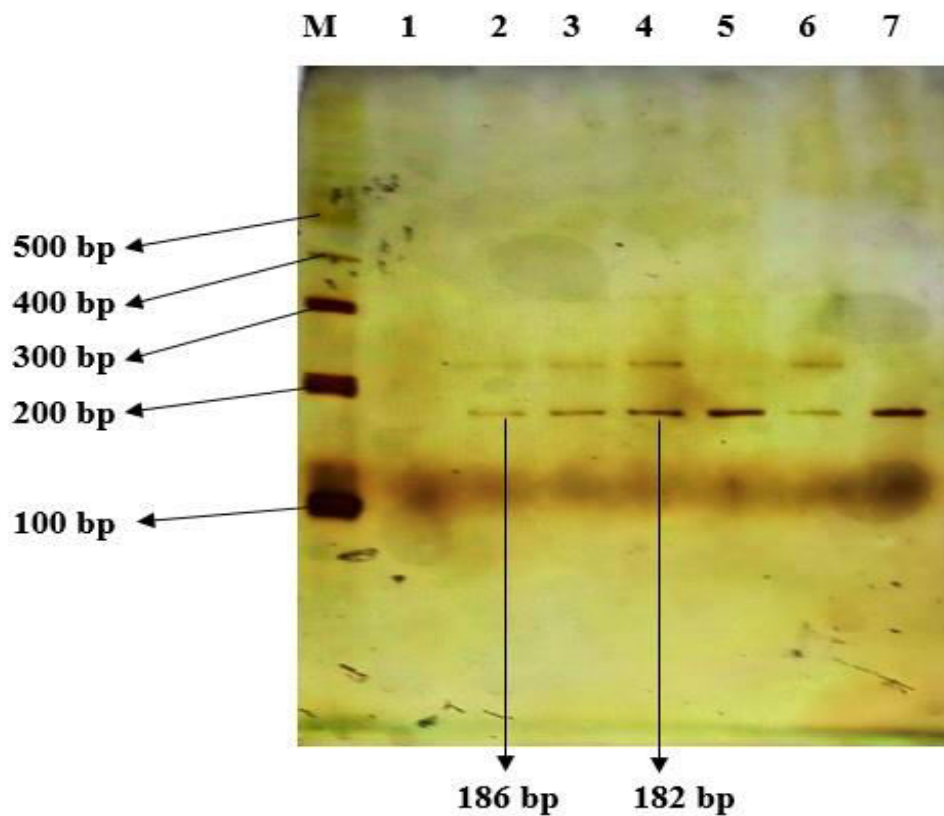
Identifikasi Jumlah dan Jenis Alel

Bedasarkan hasil penelitian pada lokus mikrosatelit D2S1368 pada populasi monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali didapatkan dua

jenis alel yaitu, alel 182 bp dan 186 bp (Gambar 1), dengan genotipe seperti yang ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Genotipe monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali dengan lokus mikrosatelit D2S1368

No	Genotip	Jumlah Monyet (Ekor)
1	182/182	1
2	186/186	5
Total	2	6



Gambar 1. Alel lokus mikrosatelit D2S1368 pada populasi monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali. Nomor menyatakan sampel (individu), huruf M menyatakan penanda (100 bp *DNA ladder*).

Frekuensi Alel

Frekuensi alel tertinggi lokus mikrosatelit D2S1368 pada populasi monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali adalah alel 186. Data selengkapnya disajikan ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Frekuensi alel lokus mikrosatelit D2S1368 populasi monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali

No	Jenis Alel	Jumlah Alel (n)	Frekuensi Alel
1	182	2	0,17
2	186	10	0,83
Total	2	12	1

Heterozigositas dan *Polymorphism Information Content (PIC)*

Nilai heterozigositas lokus mikrosatelit D2S1368 pada populasi monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali dihitung dengan menggunakan rumus tidak bias Nei 1978 adalah 0,29. Nilai PIC lokus mikrosatelit D2S1368 dengan menggunakan rumus Botstein (1980) adalah 0,28.

Keseimbangan Hardy-Weinberg

Hasil pengujian keseimbangan Hardy-Weinberg lokus mikrosatelit D2S1368 pada populasi monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali didapatkan hasil X^2 hitung adalah 5,92, sementara nilai X^2 tabel (0,05 dengan derajat bebas 1) adalah 3,84. Hasil perhitungan X^2 lebih besar dari X^2 tabel, maka dapat disimpulkan bahwa sebaran alel menyimpang dari keseimbangan Hardy-Weinberg.

Pembahasan**Alel dan Frekuensi**

Suatu lokus dinyatakan polimorfik apabila jumlah alel dalam populasi pada lokus tersebut lebih dari satu dengan frekuensi alel yang paling umum kurang atau sama dengan 0,95. Lokus polimorfisme suatu alel pada populasi penting diketahui untuk dapat melihat keadaan dari suatu populasi dalam keadaan aman atau terancam (Wandia *et al.*, 2009). Dari enam sampel yang diambil, alel teridentifikasi memiliki dua jenis alel yaitu alel 182 bp dan alel 186 bp. Penelitian yang dilakukan Wandia (2007) pada populasi monyet ekor panjang di Jawa Timur, Bali dan Lombok dengan menggunakan lokus mikrosatelit yang sama hanya menemukan satu alel yaitu alel 182 bp.

Polimorfisme atau frekuensi lokus mikrosatelit dapat berbeda-beda di masing-masing populasi. Monica (2012) menggunakan lokus mikrosatelit D13S765 pada populasi monyet ekor panjang Pura Pulaki ditemukan alel sebanyak lima buah dengan panjang basa berkisar 238-259 bp, penelitian dengan lokus mikrosatelit yang sama juga Nugraha (2018) pada populasi monyet ekor panjang Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali menemukan sebanyak empat buah alel dengan panjang basa berkisar antara 239 – 251 bp.

Penelitian dengan kejadian seperti diatas juga didapat oleh Gurning (2018) dan Rumba (2013) menggunakan lokus mikrosatelit D8S1100, dimana Gurning melakukan penelitian pada populasi monyet ekor panjang di Gunung Pengsong Lombok menemukan 3 buah dengan panjang basa berkisar 190-196 bp, sementara Rumba melakukan penelitian pada populasi monyet ekor panjang di Bukit Gumang, Karangasem, Bali menemukan satu buah alel saja dengan panjang basa 196 bp.

Kekhasan suatu populasi dapat dilihat dengan melihat langsung (fenotipe) dan secara genetik. Kekhasan populasi secara genetik yang paling penting adalah dengan mengetahui frekuensi alel populasi (Arisuryanti *et al.*, 2007). Frekuensi alel dapat dihitung berdasarkan perbedaan jarak migrasi pada pola protein albumin yang terekam di gel poliakrilamida, saat elektroforesis berlangsung, protein (molekul) akan bergerak menuju elektroda positif sampai pada jarak tertentu pada gel poliakrilamida tergantung pada berat molekul. Berat molekul yang semakin rendah sejalan dengan semakin jauh pula protein bergerak atau mobilitasnya tinggi. Protein dengan berat molekul tinggi atau besar, sebaliknya akan bergerak pada jarak yang lebih pendek atau mobilitasnya rendah (Mulliadi dan Arifin, 2010). Dua buah alel yang terdeteksi yaitu alel 182 bp memiliki frekuensi 0,17 dan alel 186 bp memiliki frekuensi 0,83 (Tabel 2).

Heterozigositas dan *Polimorphism Information Content* (PIC)

Heterozigositas merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik dalam populasi (Tanabe *et al.*, 1999). Nilai heterozigositas semakin tinggi berbanding lurus dengan tingginya kejadian *outbreeding* sehingga meningkatkan proporsi genotipe heterozigot. Populasi dengan tingkat heterozigositas rendah sangat sensitif terhadap perubahan alam karena potensial evolusi yang rendah (Wandia, 2007). Nilai heterozigositas memiliki acuan yang dibuat oleh Nei yaitu heterozigositas berkisar antara 0 (nol) sampai dengan 1 (satu) dengan ketentuan apabila nilai heterozigositas mendekati nol maka nilai heterozigositasnya rendah dan apabila nilai heterozigositas mendekati satu maka nilai heterozigositasnya tinggi. Nilai heterozigositas pada lokus mikrosatelit D2S1368 pada populasi monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali adalah 0,29 (rendah). Faktor yang berpotensi tinggi mempengaruhi rendahnya heterozigositas lokus D2S1368 antara lain pola perkawin dan migrasi (Nozawa *et al.*, 1982). Pola yang sama ditemukan juga sebelumnya oleh Wandia (2007) pada populasi monyet ekor panjang di Jawa Timur, Bali dan Lombok.

Nilai PIC dijadikan standar untuk mengevaluasi marka genetik. Nilai PIC dibagi menjadi tiga kelas yaitu, $PIC > 0,5$ = sangat informatif, kemudian $0,25 < PIC < 0,5$ = cukup informatif, dan $PIC < 0,25$ = rendah. Kaidah-kaidah *Polymorphism Information Content* (PIC) oleh Hildebrand (1992), hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai PIC lokus mikrosatelit D2S1368 di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali adalah 0,28 atau terbilang cukup informatif. Hal ini berkaitan dengan ditemukannya dua alel. Nilai PIC akan tinggi apabila alel yang ditemukan lebih dari dua dan nilai frekuensi yang tidak mencolok.

Keseimbangan Hardy-Weinberg

Keseimbangan Hardy-Weinberg memberikan informasi terkait dengan sebaran alel suatu lokus dalam suatu populasi. Keseimbangan Hardy-Weinberg dapat dianalisis menggunakan uji *Chi-Square* (X^2) (Li (2013)). Hasil penelitian ini mendapatkan nilai X^2 sebesar 5,92 dan nilai X^2 tabel sebesar 3,84 dengan $\alpha = 5\%$ (dengan derajat bebas 1). Nilai X^2 hitung lebih besar dari X^2 tabel, maka sebaran alel menyimpang dari keseimbangan Hardy-Weinberg. Faktor yang memungkinkan berkaitan dengan hal ini yaitu genotipe yang didapatkan semua homozigot, PIC lokus yang rendah. Untuk mengeneralisasi pada tingkat populasi apakah mengalami *inbreeding* maka perlu dilakukan pengujian sama dengan menggunakan lokus yang lebih banyak.

SIMPULAN

Lokus D2S1368 bersifat polimorfik pada populasi monyet ekor panjang di Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali. Sejumlah 2 alel yaitu 182 dengan frekuensi 0,17 dan alel 186 dengan frekuensi 0,8, heterosigositas sebesar 0,29, PIC sebesar 0,28 dan sebaran alel lokus menyimpang dari keseimbangan Hardy-Weinberg.

SARAN

Untuk mendapatkan keragaman genetik pada tingkat populasi, maka perlu dilakukan penelitian menggunakan marka molekuler yang lebih banyak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Genetika dan Kultur Jaringan, Pusat Penelitian Satwa Primata (PPSP), Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) universitas Udayana beserta jajarannya, Tim Primata universitas

Udayana, dan masyarakat Pura Puncak Mundi, Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali atas kesediaan dan dukungan fasilitas dalam penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Arisuryanti T, Handayani NSN, Daryono BS. 2007. *Genetika*. Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetik*. 32: 314-371.
- Bradley BJ, Boesch C, Vigilant L. 2000. Identification and Redesign of Human Microsatellite Markers for Genotyping Wild Chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) and Gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) DNA from Feces. *Conservation Genetics*. 1: 289-292.
- Dewi EK, Soma IG, Wandia IN. 2013. Diversitas Genetik Populasi Monyet Ekor Panjang Menggunakan Marka Molekul Morosatelit D3S1768. *Indonesia Medicus Veterinus*. 2(1): 43-57.
- Gurning SDS, Wandia IN, Soma IG. 2018. Karakteristik Locus Mikrosatelit D8S1100 Pada Populasi Monyet Ekor Panjang di Gunung Pengsong Lombok. *Indonesia Medicus Veterinus*. 7(5): 540-550.
- Hildebrand E, Torney DC, Wagner RP. 1992. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Science*, 20, 100–102.
- Li Yan. 2013. A comparison of tests for Hardy-Weinberg Equilibrium in national genetic household surveys. *BMC Genetics*. 14:14.
- Mulliadi D, Arifin J. 2010. Pendugaan Keseimbangan Populasi dan Heterozogositas Menggunakan Pola Protein Albumin Darah pada Populasi Domba Ekor Tipis (Javanese Thin Tailed) di Daerah Indramayu. *Jurnal Ilmu Ternak*. 10(2): 65-72.
- Monica WS, Widyastuti SK, Wandia IN. 2012. Keragaman Genetika Populasi Monyet Ekor Panjang di Pura Pulaki Menggunakan Marka Molekul Mikrosatelit D13S1765. *Indonesia Medicus Veterinus*. 1(1): 37-54.
- Nei M. 1978. Estimation Of Average Heterozygosity And Genetic Distance From A Small Number Of Individuals. *Genetics*. 89 : 583-590
- Nozawa K, Shotake T, Kawamoto Y, Tanabe Y. 1982. Population Genetic of Japanese Mongkey: Blood Protein Polymorphism and Population Structure. *Primates*. 23 (2): 252-271.
- Nugraha EY, Wandia IN, Soma IG. 2018. Variasi Genetik Populasi Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) di Pulau Nusa Penida, Klungkung, Bali. *J. Vet*. 19(4): 531-538.
- Rumba JN, Putra IGAA, Wandia. 2013. Karakteristik Locus Mikrosatelit D8S1100 Pada Populasi Monyet Ekor Panjang di Bukit Gumong, Karangasem, Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*. 2(1): 115-125.
- Tanabe S, Akiba T, Katoh M, Satoh T. 1999. Terminal deletion of chromosome 10q: Clinical features and literature review. *Pediatrics International*. 41(5): 565–567.
- Tawan IG, Suryadi M, Treman IW. 2013. Karakteristik Kawasan Karst Di Pulau Nusa Penida Kecamatan Nusa Penida Kabupaten Klungkung (Kajian Geomorfologi). *Jurnal Pendidikan Geografi Undiksha*. 1(1): 1-9.
- Wandia IN. 2007. Struktur dan Keragaman Genetik Populasi Lokal Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) di Jawa Timur, Bali dan Lombok. (Disertasi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Wandia IN, Putra IGAA, Soma IG. 2009. Polimorfisme Genetik Populasi Monyet Ekor Panjang di Lokasi Pariwisata, Bali. Fakultas Kedokteran Hewan. Laporan Fundamental Dana DIPA Universitas Udayana Tahun Anggaran 2009.