

Polimorfisme Lokus Mikrosatelit D10S1432
Pada Populasi Monyet Ekor Panjang Di Sangeh

*Polymorphism of D10S1432 Microsatellite Locus on Long Tailed Macaque
Population in Sangeh*

F. Rell¹, S.K. Widyastuti², I.N. Wandia^{1,3*}

1 Lab Anatomi Veteriner FKH-UNUD Denpasar

2 Lab Penyakit Dalam Hewan Kecil FKH-UNUD Denpasar

3 Pusat Penelitian Satwa Primata LPPM-UNUD Bukit Jimbaran.

*Corresponding author email: wandia@fkh.unud.ac.id

ABSTRACT

Genetic polymorphisms are variations in the genetic structure of populations that represents the base level of biodiversities. This research aimed to assess the polymorphism of microsatellite locus of D10S1432 in the population of long-tailed macaques in Sangeh, Bali. A total of 18 blood samples collected as a source of DNA. DNA was extracted using QIAmp® DNA Blood Mini Kit. Microsatellite locus was amplified by polymerase chain reaction technique (PCR) with a total of 30 cycles, and a 57°C of annealing temperature. Furthermore, the alleles were separated by 7% polyacrylamide gel electrophoresis, and emerged with silver staining. The results showed that there were three types of alleles found at D10S1432 locus in the long-tailed macaques population in Sangeh. The alleles size varied from 170 bp to 186 bp. The allele frequencies were 0.28, 0.67, and 0.05 for allele 170, allele 174, and allele 186 consecutively. The heterozygosity of the locus was 0.48. It can be concluded that microsatellites locus D10S1432 is polymorphic in the long-tailed macaques population in Sangeh.

Key words: long-tailed macaques, genetic polymorphisms, D10S1432microsatellites locus, PCR, Sangeh

ABSTRAK

Polimorfisme genetik adalah variasi struktur genetik dalam satu populasi yang mewakili keanekaragaman hayati paling dasar. Penelitian ini ditujukan untuk mengungkap polimorfisme lokus mikrosatelit D10S1432 pada populasi monyet ekor panjang di Sangeh. Sejumlah 18 sampel darah dikoleksi sebagai sumber DNA. DNA total diekstraksi menggunakan QIAmp® DNA Blood Mini Kit. Lokus mikrosatelit diamplifikasi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) sebanyak 30 siklus dengan suhu *annealing* 57°C. Alel dipisahkan dengan elektroforesis pada gel poliakrilamid 7% dan dimunculkan dengan pewarnaan perak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 3 jenis alel ditemukan pada lokus D10S1432 dalam populasi monyet ekor panjang di Sangeh. Ukuran alel bervariasi dari 170 bp sampai 186 bp. Frekuensi masing – masing alel adalah 0,28, 0,67, dan 0,05, berurutan untuk alel 170, alel 174, dan alel 186. Heterozigositas lokus D10S1432 pada populasi monyet ekor panjang di Sangeh sebesar 0,48. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa lokus D10S1432 bersifat polimorfik pada populasi moyet ekor panjang di Sangeh.

Kata kunci : monyet ekor panjang, polimorfisme genetik, lokus mikrosatelit D10S1432, PCR, Sangeh

PENDAHULUAN

Sangeh merupakan suatu kawasan pariwisata yang terletak pada ketinggian antara 100 – 150 m dpl. Iklim di kawasan ini termasuk tipe C atau iklim agak basah dengan rata-rata curah hujan 2.700 – 3.200 mm/tahun dan suhu udara berkisar antara 18°C – 28°C. Keberadaan populasi monyet ekor panjang di Sangeh, 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 ini mengakibatkan akan menurunkan diversitas genetik (*heterosigositas*) dalam populasi dan mengancam kelestarian jangka panjang populasi *in situ* (Wandia *et al.*, 2009).

Polimorfisme genetik adalah variasi struktur genetik dalam satu populasi. Untuk mengetahui aman tidaknya satu populasi, pengungkapan *polimorfisme genetik* dapat memberikan gambaran apakah kehidupan suatu populasi tersebut dalam keadaan aman atau terancam. Suatu populasi dengan *polimorfisme genetik* yang rendah cenderung kehidupan jangka panjang terancam, sehingga perlu pemilihan langkah-langkah penyelamatan populasi ke depan dapat diambil dengan tepat (Wandia *et al.*, 2009).

Materi genetik berupa DNA dapat dipakai untuk mengungkap *polimorfisme genetik*. DNA adalah molekul polimer, yaitu terdiri atas rantai monomer nukleotida. Marka mikrosatelit merupakan marka genetik yang sering digunakan untuk mempelajari struktur populasi (Steffen *et al.*, 1993), pautan (*linkage*), dan pemetaan kromosom (Silva *et al.*, 1999). Berbeda halnya dengan marka protein, marka mikrosatelit merupakan segmen langsung dari genom (DNA) sehingga variasi genetik yang ditemukan mencerminkan variasi genetik yang sebenarnya. *Polimorfisme* mikrosatelit yang tinggi merupakan marka molekuler

yang baik untuk kajian genetika populasi (Smith *et al.*, 2000).

Wandia (2003, 2009) telah melakukan penelitian monyet ekor panjang di Sangeh menggunakan beberapa marka mikrosatelit. Namun, penelitian menggunakan lokus mikrosatelit D10S1432 belum pernah dilakukan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui polimorfisme lokus mikrosatelit D10S1432 pada populasi monyet ekor panjang di Sangeh.

MATERI DAN METODE

Cara Pengumpulan Data

Cara pengumpulan data menggunakan teknik sampling *convenient* yaitu mengambil sampel berdasarkan keberhasilan dalam menangkap atau menulup monyet.

Sampling monyet ekor panjang

Sejumlah 18 sampel darah monyet ekor panjang yang berasal dari populasi Sangeh, Bali berhasil dikoleksi. Monyet dibius dengan campuran ketamin HCl (dosis 10 mg/kg bobot badan) dan Xylasin (dosis 2 mg/kg bobot badan) dengan rasio 5:1 dengan cara ditulup. Darah sebanyak 5-10 ml diambil dari vena femoralis dengan menggunakan alat suntik 10 ml yang telah diisi EDTA 10% 0,1- 0,4 ml 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 µl yang selanjutnya dicampur dengan menggunakan vortex selama 15 detik. Campuran ini diinkubasi pada suhu 56°C 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 endorf. (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* diletakkan di dalam tabung 2 ml yang baru, 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 2 ml yang baru, dan tabung yang mengandung filtrate dibuang. (5) Sebanyak 500 µl buffer AW2 di masukkan ke dalam *spin column*, dan dipusing pada 14000 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 dipusing pada 6000 x g selama 1 menit. Larutan DNA kemudian disimpan di dalam refrigerator (Wandia *et al.*, 2009).

Amplifikasi Lokus Mikrosatelit

Lokus mikrosatelit di amplifikasi melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan satu set primer (D10S1432). Setiap unit reaksi PCR mengandung 1,5 mM MgCl₂; dNTP masing-masing 0,2mM; sepasang primer masing-masing 0,2mM; dan Taq DNA *polymerase* sebanyak 0,1U. Ke dalamnya ditambahkan 1,25 µl *buffer*10x, 1 µl *template* DNA, dan sejumlah air deionase sehingga volume akhir 12,5 µl. Amplifikasi lokus mikrosatelit menggunakan mesin Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler. Kondisi PCR sebagai berikut: Pra PCR, denaturasi (94⁰C) dilakukan selama 2 menit. PCR, PCR dilakukan selama tiga puluh siklus dengan tahapan sebagai berikut: denaturasi (94⁰C) selama 35 detik, *annealing* (57⁰C) selama 35 detik dan *elongasi* (72⁰C) selama 35 detik; dan post PCR, *elongasi* (72⁰C)

selama 5 menit. Produk PCR dipisahkan melalui elektroforesis dalam gel poliakrilamid 7% dengan volatse 125 volt selama 90 menit. Alel divisualisasi dengan perwarnaan perak (Wandia, 2007).

Analisis Data

Pita yang muncul pada gel poliakrilamid adalah suatu alel mikrosatelit. Keragaman alel mikrosatelit dapat dilihat dari beda jarak migrasi alel pada gel (Krawczak dan Schmidtke, 1994). Dengan sifat kodominan, genotipe ditentukan berdasarkan variasi pita alel. Frekuensi alel dalam populasi dihitung dengan rumus (1) Nei (1987).

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

x_i : frekuensi alel

n : jumlah sampel

n_{ii} : jumlah individu yang bergenotipe homozigot alel i

n_{ij} : jumlah individu yang bergenotipe heterozigot dengan alel i

Nilai heterozigositas dihitung menggunakan rumus tidak bias (2) dari Nei (1987).

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

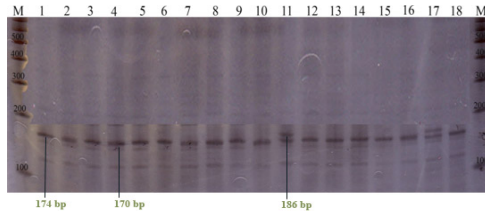
n : jumlah sampel

x_i : frekuensi alel ke i

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Alel pada masing-masing lokus mikrosatelit dalam populasi diidentifikasi berdasarkan perbedaan migrasi pita setelah dielektroforesis dengan gel poliakrilamid 7% selama 90 menit. 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 (Wandia *et al.*, 2009). Keragaman alel mikrosatelit D10S1432 ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1 Alel lokus D10S1432. Nomor menyatakan sampel (individu), huruf M menyatakan penanda (100 *base pairs ladder*). Genotip 1, 3, 5, 6, 9, 12, 14, 18 = 174/174; 2, 4, 7, 8, 10, 16 = 170/174; 13, 15 = 170/170; 11, 17 = 174/186

Berdasarkan pita yang muncul pada gel elektroforesis teridentifikasi 3 buah alel dengan panjang berkisar antara 170 – 186 bp. Dari 18 monyet ekor panjang, 10 individu bergenotipe homozigot dan 8 individu bergenotipe heterozigot (Tabel 1). Dari 3 buah alel yang terdeteksi, alel 174 memperlihatkan frekuensi tertinggi (0,67) sedangkan alel 186 menunjukkan frekuensi terendah (0,05) (Tabel 2). Nilai heterozigositas lokus mikrosatelit D10S1432 pada populasi monyet ekor panjang di Sangheh 0,48.

Tabel 1 Genotipe monyet ekor panjang di Sangheh lokus mikrosatelit D10S1432

No	Genotipe	Jumlah monyet (ekor)
1	170/170	2
2	170/174	6
3	174/174	8
4	174/186	2
Total		18

Tabel 2 Frekuensi alel mikrosatelit D10S1432 monyet ekor panjang di Sangheh

No	Jenis alel	jumlah alel	frekuensi alel
1	170	10	0,28
2	174	24	0,67
3	186	2	0,05
Total	3	36	1,00

Pembahasan

Perkembangan yang terjadi pada teknik molekuler telah membantu dalam menghasilkan data tentang variasi genetik pada tingkat DNA. Variabilitas genetik suatu populasi dapat diamati pada tingkat protein (isoenzim) dan tingkat DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) (Muladno, 2000). 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. Berbagai penelitian eksplorasi lokus mikrosatelit pada satwa primata dengan menggunakan primer mikrosatelit manusia telah dilakukan (Kanthasmawly *et al.*, 2006).

Karakteristik lokus mikrosatelit bervariasi pada berbagai populasi. Namun, karakteristik tersebut belum tentu sama pada populasi yang berbeda. Hasil penelitian menggunakan lokus mikrosatelit D10S1432 pada 18 monyet ekor panjang di Sangheh teridentifikasi 3 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 Pura Pulaki sedangkan di populasi Mekori ditemukan 8 alel (Wandia *et al.*, 2009).

Alel 186 dengan nilai frekuensi 0,05 yang merupakan frekuensi alel terendah pada penelitian ini perlu mendapatkan perhatian. Wandia (2001) melansir bahwa rendahnya frekuensi sejumlah alel kemungkinan besar akibat dari *random genetic drift* atau alel tersebut produk mutasi terkini sehingga belum tersebar keseluruh anggota populasi.

Heterozigositas merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik dalam populasi (Tanabe *et al.*, 1999). Semakin tinggi nilai heterozigositas maka

semakin tinggi kejadian outbreeding sehingga meningkatkan proporsi genotipe heterozigot (Noor, 2000). Populasi dengan tingkat heterozigositas rendah sangat sensitive terhadap perubahan alam karena potensial evolusi yang rendah (Frankham *et al.*, 2004). Keragaman genetik suatu populasi dapat memberi petunjuk mengenai keadaan populasi di masa mendatang (Nozawa *et al.*, 1982). Nilai heterozigositas monyet ekor panjang di Sangeh menggunakan lokus mikrosatelit D10S1432 adalah 0,48. Nilai ini lebih rendah dibandingkan dengan nilai lokus lain atapun populasi lain yang pernah dilakukan oleh Wandia *et al.* (2009) ($H=0,61$). Faktor yang mempengaruhi heterozigositas antara lain laju mutasi, jumlah populasi efektif, pola perkawinan (acak atau terpilih), migrasi (aliran genetik), dan seleksi (heterozigositas positif atau negatif) (Nozawa *et al.*, 1982).

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat diketahui bahwa *polimorfisme genetik* populasi monyet ekor panjang di Sangeh menggunakan marka mikrosatelit D10S1432 cukup rendah. Nilai heterozigositas yang rendah akan membahayakan kelestarian suatu spesies atau populasi (Nozawa *et al.*, 1996) karena tingginya *inbreeding* (Khan dan Sing, 1990). Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memastikan diversitas genetik populasi tersebut dengan menggunakan marka mikrosatelit yang lebih banyak. Monitoring dan evaluasi diversitas genetik populasi perlu dilakukan secara reguler (Mur, 2011). Hal ini merupakan langkah paling tepat untuk mengetahui adanya erosi genetik populasi sehingga usaha-usaha pencegahannya dapat dilakukan sedini mungkin.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa lokus D10S1432 bersifat polimorfik (ditemukan 3 buah alel) dengan heteosigositas sebesar 0,48 pada populasi monyet ekor panjang di Sangeh.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Kepala Pusat Penelitian Satwa Primata LPPM-UNUD yang telah memberikan fasilitas laboratorium untuk penelitian. Demikian pula, kepada rekan sejawat yang tergabung dalam grup penelitian molekuler, kami menyampaikan apresiasi atas semua bantannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ellegren H, Johansson M, Sandberg K, Anderson L. 1992. *Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse*. Anita. Genet.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2004. *A primer of conservation genetic*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Kanthaswamy S, Dolen AV, Kurushima JD, Alminas O, Roger J, Ferguson B, Lerche NW, Allen PC, Smith DG. 2006. Microsatellite marker for standardized genetic management of Captive Colonies of Reshus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology*. 68: 73 – 95.
- Khan F, Sing A. 1990. *Principles of genetics and animal breeding*. Jaypee Brother Medical Publishers. New Delhi.
- Krawczak M, Schmidtke J. 1994. *DNA Fingerprinting*. BIOS Scientific Publisher Limited. Oxford, UK.
- Muladno. 2000. *Polimorfisme dan analisis keterpautan microsatellites pada genom babi*. Hayati. 7(1): 11-15
- Mur MP. 2011. *Polimorfisme lokus mikrosatelit D18S536 pada populasi monyet ekor panjang di bedugul (Skripsi)*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Bali.

- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetic*. Colombia University Press. New York.
- Noor RR. 2000. *Genetik Ternak. Penebar Swadaya*. Jakarta.
- Nozawa K, Shotake T, Minezawa M, Kawamoto Y, Kawamot K, Kawamoto S. 1996. *Population genetic study of the Javanese macaque, Macaca fuscata*. In: variations in the Asian Macaques. T. Shotake and K. Wada 9 (eds). Tokai University Press. Tokyo, Japan: 1 – 36.
- Nozawa K, Shotake T, Kawamoto Y, Tanabe Y. 1982. *Population genetic of japanese monkey: II. Blood protein polymorphisms and population structure*. Primates. 23: 252 – 271.
- Silva F, Gusmao L, Amorim A. 1999. *Segregation analysis of tetra and pentanucleotide short tandem repeat polymorphism : Deviation from Mendelian expectations*. Electrophoresis. 20:1697-1701.
- Smith DG, Kanthasmawly S, Viary J, Cody L. 2000. Additional highly polymorphic microsatellites (STR) loci for estimating kinship in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology*. 50: 1-7.
- Steffen P, Eggen A, Dietz AB, Womack JE, Stranzinger G, Fries R. 1993. *Isolation and mapping polymorphic microsatellites in cattle*. Anim. Genet. 24:121-124.
- Tanabe Y, Yokoyama H, Murakami J, Kano H, Tanawaki O, Okabayashi H, Maeda Y, Koshimoto C, Nozawa K, Tummennasen K, Dashnyman B, Zhanchiv T. 1999. *Polymorphism of the plumage colors, the skin variation and blood proteins the native chickens in Mongolia*. Report Of The Society On Native Livestock 17:139 – 153.
- Wandia IN. 2001. *Variasi genetik populasi monyet ekor panjang (Macaca fascicularis) di bebarapa lokasi di Bali*. Tesis. Program Pasca Sarjana IPB:Bogor.
- 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 di lokasi pariwisata, Bali*. Fakultas Kedokteran Hewan. Laporan Fundamental Dana DIPA Universitas Udayana tahun anggaran 2009.