

Teknik Analisis Non-Invasif Mitokondria DNA (*MtDNA*) BILOU (*Hylobates klossii*, Miller 1903) Melalui *Polymerase Chain Reaction*

[THE NON-INVASIVE ANALYSIS TECHNIQUE FOR DNA MITOCHONDRIA OF BILOU
(*Hylobates klossii*) BY *POLYMERASE CHAIN REACTION*]

Ike N. Nayasilana¹, Sri Suci Utami Atmoko², Firman¹

¹Universitas Islam As-Syafi'iyah Jakarta

²Universitas Nasional Jakarta

Korespondensi : nayasilana@gmail.com

Abstrak : Teknik analisis non-invasif untuk mitokondria DNA bilou (*Hylobates klossii*) dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik molekuler yang dapat mendukung kesejahteraan hewan. Analisis non-invasif dari sampel tinja dapat menentukan sampel DNA dari daerah kontrol pada rRNA 12S. Sampel tinja dikumpulkan dari tiga pulau yang berbeda (Sipora, Siberut dan Pagai) dengan total 39 sampel yang diekstraksi untuk DNA. Analisis dilakukan di laboratorium Genetika Zoologi LIPI, Cibinong pada bulan Juli sampai Agustus 2005. Hasil tes PCR yang digunakan Qiagen QIAamp® DNA stool mini kit dan elektroforesis dapat menunjukkan bahwa sampel DNA dapat ditampilkan bahkan dalam konsentrasi terendah dari pengukuran spektrofotometer. Dengan demikian, hal itu dapat menjadi referensi baru di penelitian masa depan sebagai indikator konservasi manajemen yang sesuai dengan peraturan kesejahteraan hewan yang baik. Polaroid foto dari rRNA 12S (L = 1.091, H = 1478) yang diambil dengan transluminator UV dan kamera Polaroid MP4 dari produk PCR dengan *annealing* digunakan pada suhu 50°C dalam 30 detik, menunjukkan hasil dari pita penanda elektroforesis DNA berukuran antara 750 sampai 815 pb DNA ladder.

Abstract: *Polymerase Chain Reaction* is a non invasive molecular technique that can support animal welfare. Non-invasive analysis from fecal sample can determine DNA samples from the control region on 12S rRNA. Fecal samples were collected from three different islands (Sipora, Siberut and Pagai) with a total of 39 samples were extracted for DNA. The analyses were done at the laboratory of Genetic Zoology LIPI, Cibinong in July until August 2005. The results of the PCR test which used Qiagen QIAamp® DNA stool mini kit and electrophoresis can show that the sample displays the quality DNA from the fecal sample even in the lowest concentration of the spectrophotometer measurements. Thus, it has become a new reference in future research as an indicator of good management conservation in line with excellent animal welfare rules. The polaroid photos of the 12S rRNA (L=1091, H=1478) taken with UV transluminator and MP4 polaroid camera from the PCR products with annealing used at 50°C in 30 seconds, shows the results of this running process of electrophoresis DNA sized marker band processes between 750 until 815 pb DNA ladder.

Key words: *Hylobates klossii*, bilou, mtDNA, PCR, 12S rRNA, non-invasive technique.

Pendahuluan

Satwa primata merupakan jenis satwa yang memiliki penyebaran geografis yang sangat khas khususnya di Asia Tenggara. Salah satunya satwa primata *Hylobates klossii* ini memiliki penyebaran yang terbatas dan endemik di Indonesia. Kelompok *Hylobatidae* sulit untuk menyeberangi air, sungai ataupun laut, sehingga menyebabkan beberapa spesies *Hylobatidae* terpisah dan mereka berkembang menjadi spesies yang berbeda. Menurut Chivers (1977), nenek moyang *Hylobatidae* tersebar di dataran Asia Selatan dan meluas di Lempeng Sunda kurang dari tiga juta tahun yang lalu dengan populasi yang cukup melimpah dengan nenek moyang *Hylobatidae* yang mungkin berbeda dengan kera

besar (*Pongidae*) (Lekagul & McNeely, 1977). Ketika *Hominoidea* pertama muncul, peninggalan fosil mengindikasikan bahwa *Hylobatidae* terpisah taksonominya dengan *Pongidae* sebelum manusia dan *Pongidae* lebih dekat dengan manusia.

Keberadaan *Hylobatidae* diketahui pada masa Oligosin, Miosen Afrika, Miosen Eropa, Pliosen awal, dan Pleistosen Asia. Penemuan ini pertama kali diketahui dari bentuk *Pliopithecus* pada masa Miosen Eropa atau *Limnopithecus* dan pada masa Miosen Afrika Timur yang mirip dengan nenek moyang *Hylobatidae* modern. Penemuan fosil terbaru pun diketahui pada masa Miosen awal, yaitu *Krishnapithecus* di India Utara, *Micropithecus* di Afrika Timur, dan *Dionysopithecus* di Cina, namun dari fosil tersebut tidak ditemukan fosil kaki.

Sampel segar yang berasal dari individu yang baru melakukan defekasi segera dikoleksi dan dipreservasi dalam larutan alkohol 70% dalam wadah lisis. Bagian yang dikoleksi terutama bagian permukaan terluar feses yang diambil dengan cara mengoleskan bagian tersebut dengan *cotton bud*. Informasi jenis kelamin, kelas umur dan lokasi geografis dicatat berdasarkan GPS. Selain itu data sekunder berupa komposisi kelompok (jumlah individu dalam kelompok dan kelas usia) juga dicatat. Apabila selama eksplorasi di lapangan ditemukan feses bilou secara tidak sengaja (*adlibitum*) tanpa diketahui data individunya, maka feses tersebut tetap dikoleksi dan dipreservasi.

Seluruh analisis sampel DNA dan analisis datanya dilakukan selama 3 bulan (Juni-Agustus 2005) di Laboratorium Genetika Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong Bogor.

Bahan Ekstraksi Feses dan PCR

Bahan yang digunakan untuk preservasi sampel feses adalah dapar pengurai atau digesti (*lysis/digestion buffer*), proteinase-K, larutan fenol kloroform isoamil alkohol (PCI), dapar ASL (*stool lysis buffer*) (Qiagen), inhibitEX (Qiagen), dapar AL (Qiagen), dapar AW1 dan AW2 (*Wash buffer*) (Qiagen) dan dapar AE (*elution buffer*) (Qiagen), etanol absolut (96-100%), air miliQ dan air destilasi. Ekstraksi DNA dari feses dilakukan sesuai dengan metode yang dikembangkan Fernando *et al.* (2003).

Campuran bahan kimia yang digunakan adalah campuran modifikasi khusus PCR dan MgCl₂. Bahan kimia dalam proses amplifikasi fragmen DNA antara lain dNTP (deoxynucleoside triphosphates), enzim Taq polimerase, larutan RG-Rich, dan dua pasang primer sebagai pengujian.

1. Untuk pengujian pertama pada amplifikasi daerah sitokrom b, digunakan: H15149 (5'-AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3') sebagai primer *forward* dan L 14841 (5'-AAAAAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCATGA TGAAA-3') sebagai primer *reverse*.
2. Untuk pengujian kedua pada amplifikasi daerah 12S rRNA mtDNA, digunakan: H1478 (5'-GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT-3') sebagai primer *forward* dan L 1091 (5'-CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT-3') sebagai primer *reverse*.

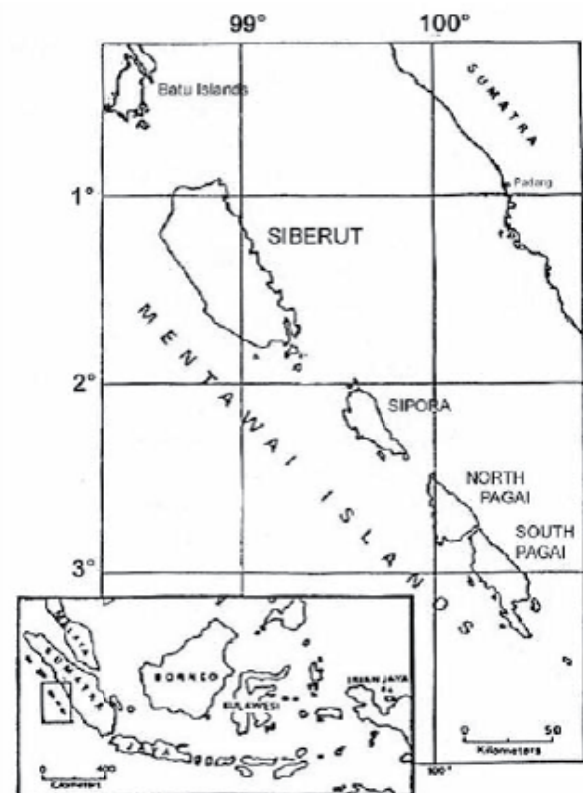
Bahan kimia yang digunakan untuk proses elektroforesis adalah 1x *buffer* TAE, *ethidium bromide* (10 mg/ml) agarose, DNA *ladder* dan *loading dye*. Selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi molekul DNA analisis *polymerase chain reaction* (PCR) dan penentuan hasil elektroforesis, jika pita/band molekul DNA terlihat terang maka

pengambilan dokumentasi dilakukan dengan menggunakan UV Tansilluminator + MP4 kamera polaroid.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Koleksi Sampel

Koleksi sampel dari ketiga pulau sebanyak 48 sampel (15 sampel di Siberut Utara, 5 sampel di Siberut Selatan, 17 sampel di Sipora, dan 11 sampel di Pagai Selatan) dan diantaranya 39 sampel telah dilakukan analisis mitokondria DNA. Beberapa sampel lainnya berasal dari spesies yang berbeda, yaitu *Macaca pagensis* (monyet Siberut). Hal ini diduga bahwa keberadaan 2 spesies yang berbeda ini terdapat *overlapping* (tumpang tindih) daerah kekuasaan, jelajah atau teritori. Ini juga dapat dibuktikan melalui data GPS yang tercatat melalui hasil pengamatan di lapangan dari tiga pulau yang berbeda (Gambar 3).



Gambar 3. Peta lokasi pengambilan sampel feses bilou (*Hylobates klossii*) di Mentawai [Whittaker, 2005 & 2006, Firman *et al.* 2003]

Selain itu pula melalui hasil pengamatan lebih lanjut karakteristik sampel yang berhasil dikumpulkan dari berbagai lokasi dan individu yang berbeda menyatakan bahwa antara *Hylobates klossii* (bilou) dengan *Macaca pagensis* (monyet siberut) memiliki

jenis *fecal* yang berbeda, seperti: bau, bentuk, warna, dan ukuran feses. Ciri feses bilou memiliki bau yang khas, seperti bau buah dan daun-daunan yang segar. Dari bentuk feses diperoleh hasil dari sisa makanan berupa biji seperti biji *Ficus sp*, sedangkan dari warna feses dapat diketahui perbedaannya dengan feses monyet siberut. Feses bilou berwarna kuning buah dan kehijauan kadang berwarna hijau muda bercampur jingga. Dari ukuran, feses bilou berukuran kurang lebih 3 cm berbentuk padatan bulat lonjong, namun sering juga ditemukan dalam bentuk agak cair. Hal ini memperkuat pustaka yang menyatakan bahwa kelompok Hylobatidae memiliki persentasi makanan lebih utama buah-buahan segar, pucuk-pucuk daun dan serangga kecil.

Penyimpanan sampel dalam tabung 5 ml dengan pengawet *buffer RNAase later* dan EDTA. Kriteria koleksi sampel feses ada yang segar maupun tidak segar. Pengambilan sampel feses padat dapat dilakukan dari bagian tengahnya karena diharapkan tersimpan DNA mitokondria yang berasal dari sel-sel epitel usus, sedangkan sampel feses yang cair dikoleksi sebagian besar dari sampel tersebut. Kendala feses cair adalah banyak terdapat bakteri-bakteri penyusun substrat atau tanah yang masuk ke dalam tabung, hingga terbawa dalam pengkoleksian sampel. Penandaan sampel sangat penting, yaitu waktu ditemukan sampel feses, nomor sampel, kode lokasi berdasarkan GPS, jenis kelamin serta perkiraan umur masing-masing individu bila memungkinkan.

Hasil Ekstraksi DNA dari Feses

Hasil ekstraksi DNA mitokondria dengan bantuan kit Qiagen QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit dan PCI (phenol chloroform isoamialcohol) dapat dilakukan dengan baik, walaupun melalui pengukuran spektrofotometer pada konsentrasi yang sangat kecil bila dibandingkan dengan penggunaan sampel yang berasal dari darah. Proses ekstraksi merupakan tahap terpenting dalam keberhasilan analisis DNA mitokondria yang merupakan proses penghancuran dinding sel (*lysis of cell walls*), penghilangan protein dan RNA (*cell digestion*), dan pengendapan DNA (*precipitation of DNA*), serta pemanenan.

Hasil Pengukuran Konsentrasi DNA dengan Spectrofotometer

Pengukuran konsentrasi DNA melalui spektrofotometer dengan hasil pemurnian (*purifikasi*) antara 1,3-8,3 nm dan konsentrasi yang dapat terukur berkisar antara 0,2-162,35 nm, melalui pengenceran 10 kali dari jumlah sampel. Ukuran molekul DNA yang teramat kecil hingga tidak dapat dilihat dengan kasat mata. Namun demikian ukuran (panjang-pendek), kuantitas (jumlah) DNA yang berhasil dimurnikan/*purifikasi* dan kualitas tingkat

purifikasi (kemurnian) molekul DNA dapat diketahui dengan pendugaan yang cukup akurat. Pengukuran kuantitas dan kualitas DNA dapat diduga melalui spektrofotometri sinar ultra violet, dengan bantuan alat spektrofotometer DU 650, buatan USA tipe Warburg-Christian Concentration.

Iradiasi sinar ultra violet yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan memungkinkan terbaca dan terukurnya konsentrasi molekul DNA, penyerapan sinar oleh nukleotida terhadap molekul DNA secara maksimal mencapai panjang gelombang 260 nm, sedangkan penyerapan maksimal oleh protein mencapai panjang gelombang 280 nm.

Kemurnian (*purifikasi*) DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein dalam larutan, molekul DNA yang telah terukur dapat diketahui mencapai nilai standar yang berkisar antara 1,8-2,0 nm. Jika nilai tersebut lebih kecil dari 1,8 nm maka dapat terindikasi mengalami kontaminasi protein, alkohol, atau fenol di dalam larutan. Kesulitan di dalam menemukan dan mengukur kemurnian, serta konsentrasi DNA ini karena DNA yang berada dalam tabung Eppendorf tersebut menyebar atau berada hanya satu titik saja. Setelah melalui pengukuran spektrofotometer ini tidak dapat ditemukan secara tepat dan akurat dan sering pula mengalami pengulangan dalam pengukuran kemurnian atau konsentrasi tersebut (Gambar 4).

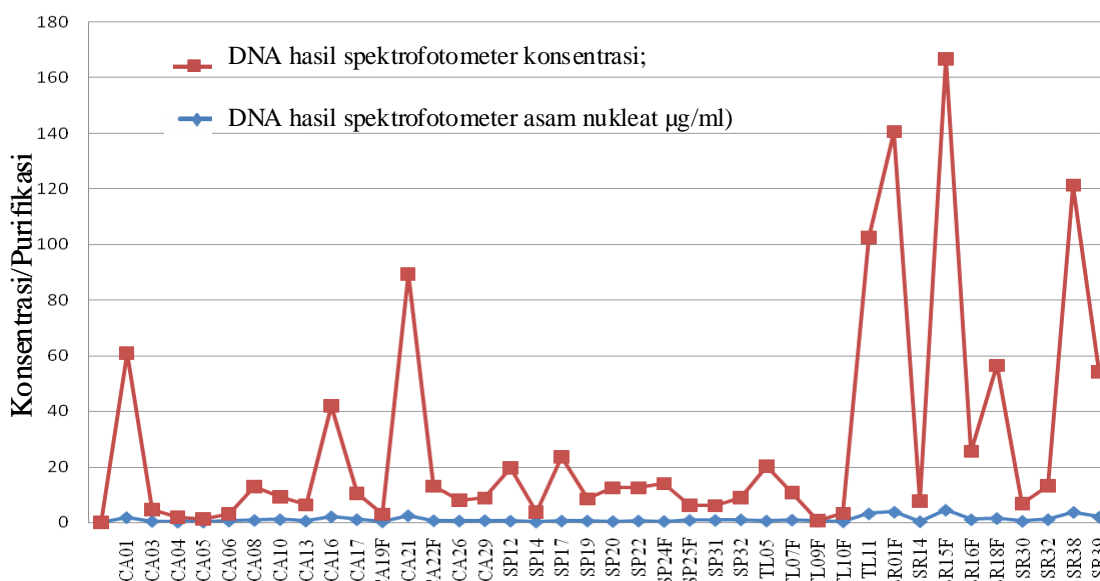
Elektroforesis Hasil Ekstraksi

Hasil *running* elektroforesis dengan foto UV transiluminator dan MP4 kamera polaroid, pita-pita ini tidak dapat dilihat atau terdeteksi dengan baik. Hal ini kemungkinan karena sulitnya menemukan DNA yang tersimpan dalam tabung Eppendorf dan tersebar diberbagai titik, sehingga kemungkinan sulitnya pengambilan pada pipetor saat *running*, ini juga yang menyebabkan konsentrasi DNA di dalam tabung yang rendah, walaupun melalui *purifikasi* DNA atau pemurnian DNA ini telah terlaksana dengan baik.

Hasil amplifikasi DNA melalui Polymerase Chain Reaction (PCR)

a. Amplifikasi daerah Cytocrom B

Pengujian kedua sampel, yaitu CA01 (konsentrasi DNA 59,05 nm) dan sampel SP12 (konsentrasi DNA 19,19 nm) dengan menggunakan sitokrom B untuk molekul DNA mitokondria di *location of universal primer* L14841 dan H15149 serta ukuran penanda 1000 pb DNA *ladder*. Pengaturan jumlah koktail dan sampel dalam larutan setiap sampel dan tabung Eppendorf masing-masing sebanyak 25 µl. Suhu dan waktu untuk proses PCR, yaitu 94°C selama 5 menit, 94°C selama 30 detik, 50°C selama 30 detik, 72 °C selama 1 menit dan 72 °C selama 5 menit dengan



Gambar 4. Hasil konsentrasi dan purifikasi DNA dengan spektrofotometer

perputaran dan perpanjangan (*elongisasi*) sebanyak 40 siklus, akan tetapi tidak terdeteksi pita-pita elektroforesis (*band*) saat *running* kemungkinan teknik PCR yang kurang tepat.

b. Amplifikasi daerah 12S rRNA mt DNA

Berdasarkan hasil pengujian elektroforesis menggunakan gel agarosa 2%, dari 2 sampel DNA memberi kemurnian dan konsentrasi yang cukup baik. Pengujian sampel ini ditujukan untuk membuktikan secara pasti molekul DNA yang terkandung dan tersimpan dalam larutan secara pasti. Dua sampel yang berhasil diamplifikasi melalui teknik PCR menggunakan primer L1091 dan H1478, dengan penggunaan suhu saat *annelling* adalah 94°C selama 5 menit. DNA mengalami denaturasi (pembelahan untai ganda menjadi untai tunggal), pada suhu 94°C selama 30 detik, proses ini mulainya DNA mengalami *elongisasi* atau perpanjangan. Apabila sasaran DNA banyak mengandung nukleotida G/C, maka suhu denaturasi dapat ditingkatkan. Proses denaturasi sangat ketat dan teliti dalam penggunaan suhunya karena apabila saat denaturasi ini kurang tepat atau gagal, maka proses renaturasi pun semakin cepat terjadi. Namun, proses denaturasi yang lama dan penggunaan waktu kurang tepat, maka proses kerja *taq polymerase* pun semakin terhambat, hingga menghambat pula dalam proses keberhasilan produk PCR yang terjadi. Namun biasanya sering pula dilakukan pre denaturasi selama 3-5 menit untuk meyakinkan bahwa DNA yang tersimpan dalam tabung Eppendorf 0,2 ml dengan cairan yang berada di dalamnya sebanyak 25 µl tersebut benar-benar ada dan siap untuk dilipatgandakan.

Setelah proses denaturasi selesai, maka proses *elongisasi* pun terjadi pada suhu 50°C selama 30 detik.

Proses ini merupakan proses *annealing* ataupun proses penempelan primer pada DNA yang telah terbelah pada daerah yang terspesifik dengan baik. Primer-primer tersebut biasanya menyimpan 18-25 pasang basa dan menyimpan 50-60% basa G+C dan perhitungan formulasi *annealing* tersebut sama, serta penggunaan suhu yang sama pada suhu 72°C tahap pertama selama 1 menit, dan suhu 72°C tahap kedua selama 5 menit, maka daerah tersebut dapat berhasil fikasi yaitu di daerah 12S rRNA mitokondria DNA (mtDNA), melalui perputaran dan perpanjang saat (*elongisasi*) selama 40 siklus (Tabel 1).

Tabel 1. Proses amplifikasi

Proses inisiasi	Suhu: 94°C	Waktu: 5'
Denaturasi	94°C	30''
Annealing	50°C	30''
Ekstensi/elongisasi	92°C	1'
Ekstensi akhir	72°C	5'

Daerah yang merupakan mtDNA ribosom dibandingkan dengan DNA penanda ukuran yang besarnya 1000 pb DNA *ladder*, maka pita-pita elektroforesis yang terbentuk berada pada kisaran 750-815 pb, ukuran pita-pita ini dapat dilihat saat dilakukan pewarnaan dengan *ethidium bromide* selama 10 menit dan pemotretan menggunakan UV Tansilluminator + MP4 kamera polaroid.

Pembahasan

Pengoleksian sampel feses merupakan teknik yang telah lama ditinggalkan oleh para peneliti, hal ini karena sulitnya pencarian dan penemuan DNA yang terkandung dalam feses tersebut. Namun pengoleksian sampel feses sebagai penelitian lebih

(keturunan yang berasal dari maternal) yang menyimpan kode genetik penting dan sering mengalami mutasi, mutasi inilah yang lebih cepat terjadi hingga 5-10 kali lebih cepat dibandingkan dengan mutasi yang terjadi pada sel inti atau nukleus, hingga mutasi terus- menerus dalam suatu sel dan (Qiagen) dan dapar AE (*elution buffer*) (Qiagen) untuk analisis ekstraksi mitokondria DNA pada bilou.

Analisis DNA yang digunakan dalam penelitian ini merupakan analisis DNA mitokondria (mtDNA). Hal ini merupakan pendekatan yang cukup baik untuk mengetahui pola perkawinan ataupun pola kekerabatan suatu spesies. DNAm_t merupakan penurunan sifat yang berasal dari maternalitas (keturunan yang berasal dari maternal) yang menyimpan kode genetik penting dan sering mengalami mutasi, mutasi inilah yang lebih cepat terjadi hingga 5-10 kali lebih cepat dibandingkan dengan mutasi yang terjadi pada sel inti atau nukleus, hingga mutasi terus- menerus dalam suatu sel dan dan dalam suatu spesies menyebabkan terjadinya evolusi pada individu ataupun spesies tersebut.

Penggunaan 12S rRNA, karena selain mempunyai beberapa daerah amplifikasi dan peruntutan dengan urutan yang sangat terpelihara. Molekul ini mudah digunakan dalam eksperimen daripada 23S rRNA. Sementara 5S rRNA dengan ukuran yang lebih kecil (kurang dari 120 nukleotida) hanya mengandung sedikit informasi dalam molekulnya (Brock, 1991 dalam Wijayanti 1996).

Perbandingan urutan basa yang *conserve* dari ribosomal RNA, digunakan sebagai dasar penentuan hubungan kekerabatan antar organisme. 12S rRNA sebagai sub unit kecil ribosom pada eukariotik, mempunyai fungsi yang setara dengan 16S rRNA pada organisme prokariotik, hingga 12S rRNA digunakan sebagai dasar pohon filogenetik untuk organisme eukariotik.

Simpulan

Teknik analisis non-invasif mitokondria DNA bilou (*Hylobates klossii*) melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) lebih efektif dilakukan pada daerah 12S rRNA dengan penggunaan *annealing* suhu 50°C selama 30 detik dan di *location of universal primer* L=1091, H=1478, melalui penanda ukuran di kisaran antara 750-815 pb DNA *ladder*.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada: Danielle J. Whittaker (USA), Laboratorium Zoologi Genetika (LIPI, Cibinong), Dannile N. Lumban Tobing (Departemen Biologi FMIPA-UI), Departemen Biologi, FMIPA-UIA.

Daftar Pustaka

- Abegg C, Thierry B.** 2002. The Phylogenetic status of Siberut Macaques: Hints from Bared teeth display. *Primate Report* 63: 73-78
- Chivers DJ.** 1977. The Lesser Apes. Di dalam: His Serene Highness Prince Rainier II of Monaco, Bourne GH, Editor. *Primate Conservation*. London: Academic Pr. hlm 539-598.
- Firman, Novi H, Abegg C.** 2003. *Study awal populasi konservasi satwa primata di Siberut utara*. Sumatera Barat. Seminar Ilmiah Pekan Ilmiah Biologi 2004 di Universitas Islam As-Syafi'iyah. Jakarta.
- Geissmann, T.** 1995. Gibbon systematics and species identification. *International Zoo News* 42: 467-501.
- Groves C.** 2001. *Primate Taxonomy*. Smithsonian Institution Press. USA
- Lekagul B, McNeely JA.** 1977. *Mammals of Thailand*. Bangkok: Kurusapha Ladprao Pr.
- Marshall J, Sugardjito J.** 1986. Gibbon systematic. *Di dalam: Comparative Primate Biology Vol. 1: Systematics, Evolution and Anatomy*. London: Alan. R. Liss. hlm 137-185.
- Preuschoft H.** 1998. *Grzimek's Encyclopedia Mammals Vol.2* New York: Mc. Graw-Hill
- Suryo.** 1990. *Genetika*. Gadjah Mada University – Press. Yogyakarta. (tidak dipakai di dalam)
- Whittaker DJ.** 2005. New population estimates for the endemic Kloss's gibbon *Hylobates klossii* on the Mentawai Islands, Indonesia. *Oryx* Vol. 39 No. 4: 458-461
- Whittaker DJ.** 2006. A Conservation Action Plan for the Mentawai Primates. *Primate Conservation* 2006 (20): 95–105