



APLIKASI PENANDA GENETIK D-LOOP MTDNA PADA ORANGUTAN KALIMANTAN (*PONGO SPP.*) ASAL KALIMANTAN BARAT

Hari Pravogo¹, Dedy D. Sholihin²

*Fakultas Kehutanan Universitas Tanjungpura
Departemen Biologi IPB Bogor*

Email korespondensi : hpyogo@yahoo.com

Abstrak

Kalimantan Barat memiliki dua sub species orangutan yaitu *Pongo pygmaeus pygmaeus* dan *P. p. wurmbii*. Secara alami kedua anak jenis ini terpisah oleh adanya sungai Kapuas. Alih fungsi lahan dan perburuan yang terjadi telah membuat penurunan populasi orangutan secara signifikan. Orangutan yang terdesak di kawasan perkebunan sawit atau lahan yang telah terfragmentasi lainnya banyak ditangkap, diperjual belikan dan dipelihara oleh masyarakat. Orangutan yang dipelihara masyarakat banyak yang telah disita oleh pihak berwenang dan dipelihara di pusat rehabilitasi agar dapat dilepasliarkan kembali ke habitat aslinya. Data yang tidak lengkap menyebabkan tidak diketahui berasal darimana orangutan sitaan tersebut. Teknologi biologi molekuler melalui pendekatan genetika membantu menentukan asal muasal orangutan yang diperoleh dari hasil sitaan. Penelitian ini juga dilakukan untuk mengetahui kekerabatan antara orangutan yang berada di TNBK dan TNDS. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keanekaragaman genetik yang dimiliki oleh orangutan (*Pongo pygmaeus*) yang terdapat di pusat rehabilitasi di Kabupaten Sintang dan Kabupaten Ketapang Kalimantan Barat dengan menggunakan penanda genetik D-loop. Metode yang dilakukan adalah dengan melakukan pengambilan sampel secara invasive berupa darah dan rambut dari orangutan yang dipelihara di pusat rehabilitasi. Dari sampel yang berhasil dianalisis dapat diketahui bahwa ada dua cluster yang terbentuk yang masing-masing mewakili sub species orangutan Kalimantan Barat

Kata kunci: biologi molekuler, D-loop, keanekaragaman genetik, Orangutan

PENDAHULUAN

Orangutan (*Pongo spp.*) merupakan salah satu kera besar yang masih bertahan di wilayah Asia Tenggara. Penyebarannya pada saat ini terbatas hanya di pulau Sumatera dan Kalimantan. Kelompok kera besar lainnya dapat dijumpai di benua Afrika yaitu dari jenis simpanse, bonobo dan gorilla (Zhi et al. 1996). Disebut dengan kelompok kera besar karena memiliki ukuran tubuh yang relatif besar dibandingkan jenis primata lainnya.

Dahulu orangutan dikelompokkan ke dalam satu jenis yang sama yaitu *Pongo pygmaeus*, kemudian para ahli membaginya menjadi dua sub species yaitu *Pongo pygmaeus pygmaeus* yang penyebarannya di pulau Kalimantan dan *P. p. abelii* yang memiliki

sebaran di pulau Sumatera (Van Bemmelen 1968 dan Jones 1969 dalam Meijaard et al. 2001; Warren et al. 2001). Perkiraan para ahli bahwa kedua sub jenis orangutan ini telah terisolasi satu sama lain selama 10.000-15.000 tahun yang lalu dan memiliki perbedaan morfologi yang sangat sedikit (Meijaard et al, 2001). Saat ini berdasarkan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi biologi molekuler, orangutan dikelompokkan menjadi dua jenis yang berbeda yaitu *Pongo pygmaeus* yang memiliki sebaran di pulau Kalimantan dan *Pongo abelii* yang memiliki sebaran di pulau Sumatera (Xu & Arnason. 1996; Zhi et al. 1996, Grooves 2001). Bahkan kini orangutan yang berada di pulau Kalimantan telah dibedakan menjadi tiga sub species yang

berbeda yaitu *P. p. pygmaeus*, *P. p. wurmbii* dan *P. p. morio* yang secara geografis dapat dilihat bahwa penyebaran ketiga jenis ini dipisahkan oleh tiga buah sungai yang besar di Kalimantan yaitu Kapuas, Mahakam dan Barito (Warren et al. 2001; Groves 2001).

Untuk melihat keragaman dan kekerabatan genetik antar populasi orangutan dapat diketahui dengan melakukan karakterisasi setiap sub populasi yang terjadi karena adanya fragmentasi habitat. Analisis bisa dilakukan berdasarkan DNA mitokondria (D-loop) atau dengan mikrosatelit. Aplikasi yang dapat dilakukan berdasarkan DNA mitokondria ataupun dengan mikrosatelit diantaranya dapat memetakan genetik suatu jenis atau populasi, mengidentifikasi DNA untuk individu dan penilaian terhadap keluarganya, phylogeny, populasi, dan konservasi genetik (Zhang & Zhang 2001).

Dalam upaya untuk mengetahui kualitas genetik, perlu dilakukan analisis genetika molekuler, kajian genetik lebih rinci menggunakan DNA mitokondria yang dapat digunakan untuk mengetahui luasnya penyebaran genetika orangutan dan aliran gen secara mendalam termasuk variasi genetik pada masing-masing populasi orangutan.

METODOLOGI

Penelitian dilakukan didalam kawasan Taman Nasional Betung Kerihun dan Danau Sentarum, yang dilaksanakan dari bulan April sampai Agustus 2012. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *non-invasive*, yaitu sampel diambil dari bagian tubuh satwa tanpa harus menangkap, mengganggu bahkan tanpa mengamati satwa tersebut, sampel diambil dari bagian tubuh yang ditinggalkan oleh satwa tersebut seperti rambut atau bulu yang luruh (Taberlet *et. al.* 1999). Hal ini seperti yang dilakukan oleh orangutan, yaitu pada saat beristirahat tidur akan melakukan *grooming* (merawat diri) dan biasanya beberapa rambut luruh di dalam sarangnya. Selain itu dilakukan juga pengambilan sampel berupa rambut dan

darah di Pusat Penyelamatan Satwa (IAR dan SOC) secara langsung. Selanjutnya sampel dianalisa di Laboratorium Biologi Molekuler-Pusat Antar Universitas IPB Bogor. Secara umum tahapan yang akan dilakukan di dalam laboratorium adalah sebagai berikut:

Persiapan sampel

Sampel rambut lepas yang berhasil dikumpulkan dimasukkan kedalam kantong plastik kecil yang bisa disegel dan dimasukkan ke dalam amplop kertas, dan diberi catatan lengkap meliputi posisi sarang secara geografis dan tanggal pengambilan. Pengambilan sampel secara langsung akan dilakukan di Pusat Penyelamatan Satwa IAR yang terletak di Kabupaten Ketapang dan di Sintang Orangutan Center (SOC) kabupaten Sintang Kalimantan Barat berupa darah segar dan rambut yang dicabut langsung dari individu orangutan. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung berukuran 3 ml, sampel darah diambil sebanyak 1 ml. kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi larutan ethanol absolut sebanyak 1 ml, selanjutnya dilakukan pengocokkan sehingga sampel darah akan tercampur dengan ethanol absolute, setelah tercampur tambahkan lagi larutan ethanol sampai penuh, dan simpan di dalam tempat kering (Duryadi *pers. comm.*).

Ekstraksi dan Purifikasi sampel

Isolasi DNA mengikuti Duryadi (2010), yaitu dengan memasukan sampel darah 200 µl ke dalam tabung ependorf baru, kemudian lakukan pencucian dengan cara mencampurkan larutan low TE sebanyak 1000 µl, selanjutnya divortex sampai kedua larutan ini tercampur dan teraduk, beberapa kali. Sampel dikeringkan pada kertas saring, setelah kering lakukan penggerusan sambil diberi larutan digest buffer 400 µl setelah hancur dan tercampur masukkan kedalam tabung yang baru dan lakukan vortex sampai teraduk secara merata, selanjutnya diinkubasi pada suhu 55°C selama 2 jam. Sampel selanjutnya ditambahkan phenol

sebanyak 400 µl, CIAA sebanyak 400 µl, dan NaCl 5 M sebanyak 40 µl. Setelah semua larutan disatukan lalu lakukan pengocokan secara pelan dalam suhu ruang ± 30 menit (kocok dengan tangan). Setelah itu lakukan sentrifuge dengan kecepatan 13000 rpm, lalu pindahkan supernatan ke tabung ependorf baru dan tambahkan ethanol absolut, berikutnya lakukan freezing overnite.

Sampel kemudian disentrifuge 12000 rpm dan buang ethanol absolut, selanjutnya tambahkan larutan alkohol 70% sebanyak 800 µl, lalu lakukan sentrifuge dengan kecepatan 12000 rpm dan buang supernatan. Kering udarakan sampel kurang lebih 20 menit sampai alkohol hilang, setelah kering tambahkan kedalam sampel tersebut larutan TE sebanyak 35 – 100 µl (tergantung dna), dan lakukan vorteks agar dna terlarut dalam larutan tersebut dan selanjutnya lakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu untuk melihat kualitas DNA pada sampel terlarut dilakukan elktroforesis.

Amplifikasi DNA

DNA yang telah diekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sebagian daerah *D-loop* adalah primer untuk orangutan. Amplifikasi fragmen DNA di daerah *D-loop* mitokondrion dilakukan dengan membuat 50µl campuran larutan yang terdiri dari Buffer, MgCl₂, dNTPs, DLOH_F, DLOH_R, Taq polymerase, dan DNA 2 µl. Pencampuran dilakukan secara berurutan, kemudian disentrifuse sebentar. Kondisi PCR yang digunakan untuk amplifikasi sebagian daerah *D-loop* mtDNA adalah sebagai berikut: tahap pertama pra-PCR (denaturasi awal) pada suhu 94°C, kemudian tahap kedua sebanyak 35 siklus dimulai dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, selanjutnya pada suhu 54°C selama 1 menit untuk penempelan primer (*annealing*), kemudian 72°C selama 45 detik

untuk untuk perpanjangan (*elongation*) dan diakhiri dengan *extention* pada suhu 72°C. Hasil PCR dielektroforesis. Penanda genetik atau marka yang akan digunakan yaitu marka individu (D-loop – DNA inti), marka sex (SRY dan GFX – DNA inti) serta marka populasi (mikrosatelit – DNA inti).

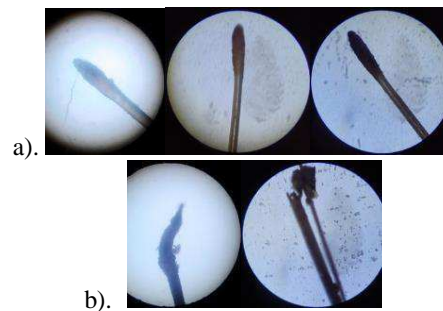
Sequencing

Produk PCR hasil amplifikasi dimurnikan dengan menggunakan DNA *purification kit* (Qiagen), selanjutnya konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan Spektrofotometer (Bio-Spectro Shimazu), setelah itu dilakukan *cycle sequencing* dengan melakukan reaksi PCR dengan menggunakan primer R H417 dengan *reagent* khusus untuk DNA *sequencing* (*DIG Dye* dari ABI). Kemudian hasil *cycle sequencing* dipurifikasi dan didenaturasi (95°C, 4 menit). Setelah itu dilakukan perunutan DNA dengan menggunakan alat perunut otomatis *ABI Prism* versi 3100-Avant Genetic Analyzer (USA). Hasil sequencing selanjutnya dianalisis dengan menggunakan software Mega4.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang berasal dari alam

Kondisi sampel yang berasal dari sarang ini sangat bervariasi, mulai dari jumlah yang sedikit yaitu hanya satu helai dalam satu sarang sampai dengan jumlah yang cukup banyak hingga mencapai lebih kurang 40 helai dalam satu sarang. Kondisi helaiannya juga bervariasi, terutama pada bagian akar rambut (*folikel*), pada helaian yang masih bagus akan dijumpai di bagian akar rambut (*folikel*) masih menonjol, sebaliknya pada helaian yang sudah rusak maka tidak dijumpai adanya tonjolan folikel (Gambar 1). DNA hanya dijumpai pada bagian akar rambut (*folikel*) sedangkan pada batang rambut tidak terdapat DNA (Heywood *et al.* 2003), sehingga bagian akar rambut ini sangat penting dalam keberhasilan ekstraksi (Boulwood *et al.* 1990).



Gambar 1: Kondisi rambut orangutan a). tampak masih mengandung folikel b). sudah rusak yang diambil dari sarang di alam

Seluruh sampel yang diperoleh dari alam yang dianalisis dengan menggunakan fragmen D-loop tidak mendapatkan DNA target. Analisis selanjutnya dilakukan dengan menggunakan gen SRY yang dapat digunakan untuk mengetahui jenis kelamin jantan dari sampel yang dianalisis dan didapatkan hasil yang signifikan.

Berdasarkan hasil analisis sampel rambut yang berasal dari alam dengan menggunakan gen SRY, dapat dilihat bahwa sampel CD1 yang berasal dari Camp Derian TNBK kemudian sampel PM.2 yang berasal dari Pulau Mayas yang terletak di koridor, sampel 387.1, 388.1 dan 385.2 yang diperoleh dari Bukit Selasih TNDS dapat diidentifikasi sebagai individu jantan. Sebaliknya beberapa sampel yang telah diekstraksi dan menunjukkan adanya DNA akan tetapi tidak menunjukkan adanya gen SRY setelah diamplifikasi maka dapat diduga sebagai individu betina. Beberapa sampel lainnya tidak menunjukkan adanya DNA dan tidak diketahui jenis kelamin individu tersebut.

Sampel yang berasal dari Pusat Rehabilitasi

Hasil penelitian menunjukkan sedikitnya ada 19 sampel telah berhasil dianalisis dengan menggunakan fragmen D-loop dan primer DLOH_F dan DLOH_R yang berasal dari pusat rehabilitasi Sintang dan Ketapang. Seluruh sampel yang didapat ini memiliki asal yang tidak jelas karena semuanya berasal dari hasil sitaan yang dipelihara oleh masyarakat.

Umumnya masyarakat yang memelihara juga tidak mengetahui asal orangutan ditangkap di alam, dengan demikian pada saat akan dilakukan pelepasliaran setelah dilakukan rehabilitasi akan mengalami kesulitan. Adanya kajian molekuler telah berhasil menganalisis sampel-sampel tersebut dan dapat mengelompokkannya.

Sampel dari pusat rehabilitasi dilakukan analisis dengan D-loop dan sexing. Analisis dengan cara sexing dari sampel pusat rehabilitasi adalah untuk verifikasi analisis yang dilakukan. Sampel dari alam dianalisis dengan menggunakan marker D-loop pada DNA mitokondria menunjukkan hasil negatif untuk semua sampel, akan tetapi pada saat analisis dilakukan pada DNA inti dengan menggunakan gen SRY sebagian sampel menunjukkan hasil positif.

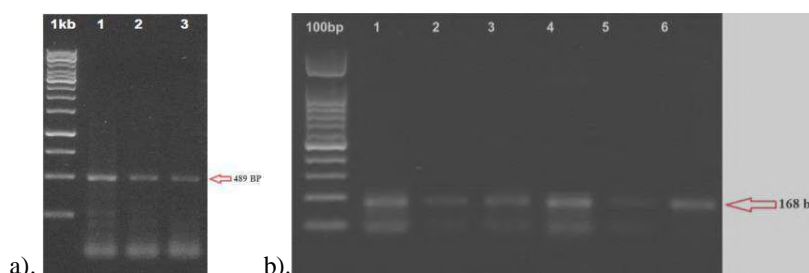
Hasil PCR

Analisis sampel rambut orangutan dari alam dengan menggunakan primer DLOH cukup sulit dilakukan sehingga tidak didapatkan hasil baik, dan tidak dapat dilakukan analisis lanjutan. Beberapa sampel darah dari pusat rehabilitasi dapat dilakukan dengan menggunakan primer ini. Sebaliknya dengan menggunakan primer SRY didapatkan hasil yang cukup baik dari sampel rambut yang didapat dari alam.

Teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi region gen yang diinginkan

dalam hal ini fragmen D-loop dan untuk mengetahui ukuran kuantitatif dari gen target setelah dilakukan elektroforesis. Amplifikasi dengan menggunakan primer DLOH_F dan DLOH_R pada sampel darah orangutan yang didapat dari pusat rehabilitasi menghasilkan

fragmen Dloop parsial dengan ukuran sebesar 489 bp. Hasil amplifikasi ini dimigrasikan pada gel agarose dengan metode elektroforesis didapat profil pita fragmen D-loop hasil PCR seperti pada Gambar 2.



Gambar 2: a). Profil pita hasil amplifikasi fragmen D-loop orangutan (*P. p. pygmaeus*) menggunakan primer DLOH_R dan DLOH_F dengan menggunakan sampel darah b). Profil pita hasil amplifikasi gen *sexing* orangutan (*P. p. pygmaeus*) menggunakan primer SRY_R dan SRY_F dengan menggunakan sampel rambut

Teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi region gen yang diinginkan dalam hal ini fragmen D-loop dan untuk mengetahui ukuran kuantitatif dari gen target setelah dilakukan elektroforesis. Amplifikasi dengan menggunakan primer DLOH_F dan DLOH_R pada sampel darah orangutan yang didapat dari pusat rehabilitasi menghasilkan fragmen Dloop parsial dengan ukuran sebesar 489 bp. Hasil amplifikasi ini dimigrasikan pada gel agarose dengan metode elektroforesis didapat profil pita fragmen D-loop hasil PCR seperti pada Gambar 2.

Teknik PCR juga dilakukan untuk mengetahui ukuran kuantitatif gen target dari sampel rambut yang berasal dari alam. Primer yang digunakan sama dengan analisis DNA untuk darah yaitu primer DLOH_F dan DLOH_R. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan hasil amplifikasi fragmen Dloop yang sama dengan sampel darah, akan tetapi dari semua hasil PCR dari sampel rambut ini tidak didapatkan hasil yang baik. Kemungkinan karena kondisi DNA pada akar rambut sudah rusak atau hancur atau minim sekali sehingga tidak didapatkan hasil yang baik. Akan tetapi pada saat dilakukan teknik PCR dengan

menggunakan primer SRY_F dan SRY_R untuk mengetahui jenis kelamin ternyata didapatkan hasil purifikasi yang baik (Gambar 2) purifikasi dengan menggunakan primer SRY ini menghasilkan gen *sexing* parsial berukuran 168 bp. Dari hasil purifikasi ini selanjutnya dimigrasikan pada gel agarose dengan metode elektroforesis dan hasilnya adalah seperti yang tertera pada Gambar 2.

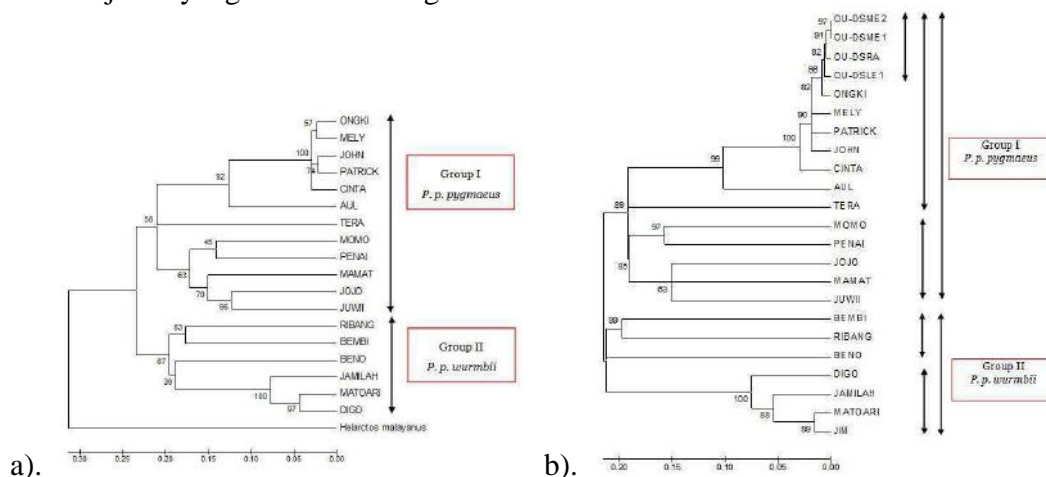
Hubungan Kekerbatan Antar Individu.

Untuk melihat hubungan evolusi antar individu digunakan *Neighbor-joining* (NJ) berdasarkan type mtDNA yang dimiliki masing-masing individu dan untuk mengetahui jaraknya (*Distance*) digunakan metode *P-distance*. Pada analisis lanjutan sebagai pembandingan atau *outgroup* digunakan control region dari *Helarctos malayanus* dari NCBI dengan kode akses AB098542. Berdasarkan pohon phylogeny dengan menggunakan metode *p-distance* maka didapat pengelompokkan seperti pada Gambar 3. pada gambar tersebut terlihat bahwa sampel yang digunakan telah terbagi menjadi dua kelompok utama. dengan menggunakan nilai statistik bootstrap 1000 kali dapat dilihat bahwa individu yang mempunyai

nilai kepercayaan tinggi (>90) merupakan individu-individu yang sudah memiliki kekerabatan yang erat artinya dari hasil ini mereka sudah mengelompok secara kuat misalnya pada *cluster* cinta dengan kelompok ongki, mely, john dan patrick, dan pada *cluster* lainnya yaitu individu jamilah dengan kelompok digo, matoari dan jim. pada kelompok atau individu yang memiliki kekerabatan yang lemah nilai kecil, maka posisinya masih bisa berubah.

Pohon phylogeny pada Gambar 3 dengan mengkombinasikan beberapa sampel dari TNDS yang diperoleh dari NCBI (sampel OU-DSME2, OU-DSME1, OU-DSRA DAN OU-DSLE1) yang digunakan oleh Warren *et al.* (2001) dengan kode akses AJ391100, AJ391101, AJ391102, AJ391103, maka dapat dilihat bahwa cluster bagian atas termasuk ke dalam sub jenis yang berada di bagian utara

sungai Kapuas yaitu anak jenis *P. p. pygmaeus*. beberapa sampel memiliki hubungan kekerabatan dengan tingkat kepercayaan 100% yaitu individu individu yang berasal dari sampel Warren *et al.* (2001) dengan individu Ongki, Mely, Patrick, John dan Cinta. Tingkat kepercayaan yang tinggi ini artinya cluster ini tidak akan bisa berubah lagi. Demikian juga dengan kluster yang beranggotakan Digo, Jamilah, Matoari dan Jim memiliki tingkat kepercayaan 100%. Individu Ribang menjadi standar untuk anak jenis *P. p. wurmbii*. Individu ini berdasarkan sejarahnya disita dari daerah Kaburai Kabupaten katingan Kalimantan Tengan. Berdasarkan hasil analisis dengan Mega4 individu ini membentuk kluster tersendiri, masing-masing gambar phylogenetik ini memperkuat kedudukan ribang pada kluster yang telah terbentuk tersebut.



Gambar 3: a). Pohon phylogenetik yang didapat dari fragmen D-loop mtDNA orangutan Kalimantan Barat dan sebagai *outgroup* adalah *Helarctos malayanus*. b). Pohon phylogenetik yang didapat dari fragmen D-loop mtDNA orangutan Kalimantan Barat dan sebagai standar pembandingan adalah data dari NCBI berupa sampel orangutan yang berasal dari TN Danau Sentarum (OU-DSME1, OU-DSME2, OU-DSRA dan OU-DSLE1)

Orangutan di Kalimantan menempati beberapa wilayah yang terpisah, pemisahan yang telah lama terjadi menyebabkan perbedaan DNA yang berada di tubuhnya. Perbedaan ini mempermudah untuk menempatkan kembali orangutan yang berasal dari pusat rehabilitasi ke habitat asalnya. Pemanfaatan penanda d-

Loop mtDNA dan SRY telah berhasil menunjukkan perbedaan antara populasi orangutan yang berbeda, maka dengan metode yang sama identifikasi asal muasal orangutan dari hasil pusat rehabilitasi dapat dilakukan dengan baik dan dapat mengembalikan orangutan ke habitat asalnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Boultonwood J, Abrahamson GM, Wainscoat JS. (1990). Structural DNA analysis from a single hair root by standard or pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 18 (15): hal muka-akhir (dimana tulisan dimuat)
- Groves C. (2001). *Primate Taxonomy*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Heywood DM, Skinner R, Cornwell P. (2003). Analysis of DNA in hair fibers. *Journal of Cosmetic Science* 54(No?): 21-27
- Meijaard E, Rijksen HD, Kartikasari SN. (2001). *Di Ambang Kepunahan !, Kondisi Orangutan Liar di Awal Abad ke-21*. Penyunting S.N. Kartikasari. The Gibbon Foundation Indonesia. Jakarta.
- Taberlet P, Waits LP, Luikart G (1999). Non invasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14(no?): 323 7.
- E. Meijaard, H.D. Rijksen, S.N. Kartikasari. *Di Ambang Kepunahan! Kondisi orangutan liar di awal abad ke-21; disunting oleh S.N. Kartikasari, Jakarta; The Gibbon Foundation Indonesia 2001.*
- Warren KS, Verschoor EJ, Langenhuijzen S, Heriyanto, Swan RA, Vigilant L, Heeney JL. (2001). Speciation and Intra subspecific of Bornean Orangutans, *Pongo pygmaeus pygmaeus*. *Mol. Biol. Evol.* 18(4): 472-480.
- Xu X, Arnason U. (1996). The Mitochondrial DNA Molecule of Sumatran Orangutan and a Molecular Proposal For Two (Bornean and Sumatran) Species of Orangutan. *J. Mol. Evol* 43: 431-437.
- Zhang Y.W, Ryder OA, Zhang YP. (2001). Genetic divergence of orangutan subspecies (*Pongo pygmaeus*), *J. of Mol. Evol.* 52(6): 516 -526.
- Zhi L, Karesh WB, Janczewski DN, Frazier-Taylor H, Sajuthi D, Gombek F, Andau M, Martenson JS, O'Brien SJ. (1996). Genomic Differentiation Among Natural Population of Orangutan (*Pongo pygmaeus*), [http://www.sciencedirect.com/science?](http://www.sciencedirect.com/science?download), download 23 July 2011.