

# KARAKTERISTIK MARKA GENETIK DAERAH CYTOCHROME B SEBAGAI ACUAN KONSERVASI GENETIK HARIMAU SUMATERA

Ulfi Faizah<sup>1</sup>, Dedy Duryadi Solihin<sup>2</sup> dan Ligaya Ita Tumbelaka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>FMIPA Universitas Negeri Surabaya, (ulfi\_faizah05@yahoo.com);

<sup>2</sup>FMIPA Institut Pertanian Bogor;

<sup>3</sup>FKH Institut Pertanian Bogor

## ABSTRACT

*The number of Sumatran tiger (**Panthera tigris sumatrae**) now has been decreasing and threatened for extinction. Therefore, the conservation effort must be done, including genetic conservation. Cytochrome b (Cyt. b) at Deoxyribonucleic Acid mitochondrial (mtDNA) have been used a lot to learn genetic diversity and phylogenetic relationship. The aims of this research are (1) to analyze genetic diversity based on genetic marker with partial Cyt. b region from Sumatran tiger; (2) to determine Sumatran tiger phylogeny among tigers subspecies in the world. Amplification with Polymerase Chain Reaction (PCR) method in partial Cyt. b used primer UF-06 and UF-07 (675 base pair). Next, all PCR products are sequenced. The data are analyzed by Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. using multiple alignments with other tigers sequence from NCBI GenBank. Phylogeny reconstruction analyzed by Neighbor-Joining method with 1000 bootstrapped. Based on partial Cyt. b genetic marker, the results are (1), there are two specific nucleotide sites on Sumatran tiger (sites 118 (Guanin) and 369 (Adenin)); (2) the phylogeny of Sumatran tiger is compared to other tiger subspecies in the world, The Sumatran tiger has the closest relation with the Indian tiger and the farthest relation with the South Chinese tiger. From this research, Cyt. b genetic marker is suitable for Sumatran tiger genetic conservation reference to differentiate among subspecies of tiger.*

**Key words:** sumatran tiger, genetic conservation, Cyt. b

## PENGANTAR

Dahulu Harimau Sumatera ditemukan hampir di seluruh Pulau Sumatera, tetapi saat ini Dirjen Perlindungan Hutan dan Pelestarian Alam (PHPA) memperkirakan sekitar 400 Harimau Sumatera hidup di lima Taman Nasional (TN) yang ada di Sumatera sedangkan 100 ekor yang lain berada di daerah yang tidak terlindungi (STT 2007). Dikarenakan jumlahnya yang semakin menurun, IUCN (2006) mengategorikan Harimau Sumatera dalam status “critically endangered” atau satwa langka yang kritis yaitu kategori tertinggi dari ancaman kepunahan. Sedangkan CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) memasukkan Harimau Sumatera ke dalam Appendix: 1, artinya kategori hewan yang sangat dilarang untuk diperdagangkan baik pada tingkat nasional maupun internasional (Inskipp 2005).

Memahami dan mempertahankan keragaman genetik suatu populasi sangat penting dalam konservasi karena keragaman genetik yang tinggi akan sangat membantu suatu populasi beradaptasi terhadap perubahan-perubahan yang terjadi di lingkungan sekitarnya. Dengan mengetahui status genetik suatu populasi, dapat dirancang suatu program konservasi untuk menghindari kepunahan dan membantu pengembangan rencana pengelolaan kelangsungan hidupnya (Damayanti 2007).

Cytochrome b (Cyt. b) adalah salah satu bagian yang banyak digunakan untuk penelitian mengenai hubungan spesies dari genus atau famili yang sama karena daerah penyandi protein ini tidak begitu variatif/conserved sehingga menguntungkan dijadikan *barcoding*/ marka genetik untuk identifikasi kemurnian spesies (Widayanti 2006).

Penelitian genetik tentang Cyt.b pada berbagai subspecies harimau telah dilakukan (Cracraft *et al.* 1998, Lou *et al.* 2004) tetapi informasi genetik mengenai Harimau Sumatera terutama tentang bagian Cyt. b masih kurang. Penelitian ini menggunakan fragmen Cyt. b bagian akhir untuk mendapatkan data keragaman genetik sehingga dapat mengetahui karakteristik marka genetik mtDNA pada Harimau Sumatera. Data tersebut dapat digunakan sebagai acuan dalam konservasi genetik Harimau Sumatera yang bermanfaat untuk mengidentifikasi kemurnian genetik dan mengetahui hubungan kekerabatannya.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian berupa DNA Harimau Sumatera yang berasal dari darah empat ekor Harimau Sumatera dari Taman Safari Indonesia, Cisarua-Bogor. Ke empat ekor Harimau Sumatera tersebut merupakan hasil tangkapan langsung dari habitatnya yang berasal dari empat daerah berbeda di

Sumatera yaitu Medan, Riau, Jambi, dan Bengkulu (HS1c, HS2c, HS3c, dan HS4c).

Isolasi DNA menggunakan metode ekstraksi fenol (Duryadi 1997, 2005). Amplifikasi dengan Metode PCR pada daerah Cyt. b parsial menggunakan primer UF-06 (F):

5'GCAGCAGTCCACCTCCTATTCCTT 3'  
dan primer UF-07 (R):  
5'GCTTTGGGTGCTGATGGTGGGGC TA3'

Larutan pereaksi pada penelitian ini menggunakan Go Tag® PCR Core Systems dari Promega. Total campuran untuk tiap reaksi PCR adalah 50 µl dengan komposisi PCR untuk mengamplifikasi daerah Cyt. b parsial seperti pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Komposisi PCR untuk mengamplifikasi daerah Cyt. b parsial

| Komposisi                    | Cyt. b parsial |
|------------------------------|----------------|
| DNA template                 | 4 µl           |
| Primer Forward (20pmol/ µl)  | 1,5 µl         |
| Primer Reverse (20 pmol/ µl) | 1,5 µl         |
| dNTP (10mM)                  | 1 µl           |
| 5x buffer                    | 5 µl           |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)    | 3 µl           |
| 5 unit Taq (5u/ µl)          | 0,25 µl        |
| ddH <sub>2</sub> O           | 33,75 µl       |

Proses PCR pada penelitian ini menggunakan mesin *GeneAmp<sup>(R)</sup> PCR system 2400* (Perkin-Elmer). Kondisi PCR untuk mengamplifikasi daerah target penelitian terdapat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Kondisi PCR untuk mengamplifikasi daerah Cyt. b parsial

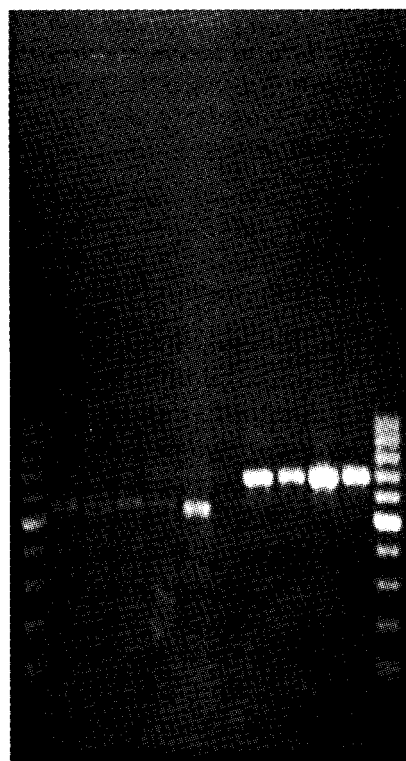
| Kondisi          | Cyt. b parsial  |
|------------------|-----------------|
| Predenaturasi    | 94°C / 5 menit  |
| Denaturasi       | 94°C / 45 detik |
| Annealing        | 52°C / 1 menit  |
| Extension        | 72°C / 1 menit  |
| Final ekstension | 72°C / 7 menit  |
| Siklus           | 35 x            |
| Volume           | 50 µl           |

Proses sekuensing dilakukan di First BASE Laboratories Sdn Bhn– Malaysia. Data hasil pembacaan sekuen dianalisis dengan menggunakan program MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007). Hasil analisis basa nukleotida berupa matriks perbandingan perbedaan jumlah (*number of differences*).

Analisis filogeni menggunakan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* dengan 1000 kali pengulangan. *Multiple alignment* untuk daerah Cyt. b parsial menggunakan data sekuen harimau dari *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) yaitu 30 sampel sekuen Cyt. b parsial berbagai subspecies harimau dari penelitian Cracraft (1998) dan sebuah sekuen lengkap dari genbank (EF551003) sebagai pembanding.

## HASIL

Hasil amplifikasi daerah Cyt. b parsial mtDNA dengan menggunakan primer UF-06 dan UF-07 pada ke empat sampel Harimau Sumatera menghasilkan produk PCR berukuran 675 pb (Gambar 1).



**Gambar 1.** Hasil amplifikasi daerah Cyt. b parsial. No. 1–4: DNA hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer UF-06 dan UF-07, No. 5: DNA penanda 100 pb (Fermentas)

Analisis keragaman basa-basa nukleotida di daerah Cyt. b parsial dilakukan dengan menambahkan data dari *GenBank* untuk *multiple alignment*, basa nukleotida yang dibandingkan sepanjang 549 pb. Hasil *multiple alignment* menunjukkan sembilan buah situs basa nukleotida yang beragam dari berbagai subspecies harimau (Tabel 3). Hal

ini membuktikan bahwa daerah Cyt. b memang merupakan daerah dengan variasi basa nukleotida yang rendah.

## PEMBAHASAN

Salah satu penyebab keragaman basa-basa nukleotida adalah adanya mutasi. Harimau Sumatera mempunyai dua situs basa nukleotida di daerah Cyt. b parsial yang spesifik dibandingkan dengan subspecies harimau yang lain yaitu pada situs basa nukleotida No. 118 (basa nukleotida ke-706 dari Cyt. b utuh) dengan basa nukleotida G (Guanin) dan situs basa nukleotida No. 369 (basa nukleotida ke-957 dari Cyt. b utuh) dengan basa nukleotida A (Adenin). Pada harimau subspecies lain (*P. t. corbetti*, *P. t. tigris*, dan *P. t. altaica*), situs ke-118 basa nukleotidanya adalah Adenin

(A) dan situs ke 369 basa nukleotidanya adalah Guanin (G). Perubahan basa purin A menjadi basa purin G dan perubahan basa purin G menjadi basa purin A menunjukkan bahwa pada situs tersebut Harimau Sumatera mengalami mutasi substitusi (penggantian satu pasang nukleotida oleh pasangan nukleotida lainnya) jenis transisi (penggantian satu basa purin oleh basa purin yang lain, A ↔ G).

Hubungan kekerabatan sampel Harimau Sumatera dalam penelitian ini dengan subspecies harimau lain dapat dibandingkan berdasarkan matrik jumlah rata-rata dari perbedaan basa nukleotida (Tabel 4).

Data antara Harimau Sumatera dari penelitian ini dibandingkan dengan Harimau Sumatera dari *GenBank* (Cracraft *et al.* 1998), tidak terdapat perbedaan basa-basa

**Tabel 3.** Sembilan situs basa nukleotida yang beragam di daerah Cyt. b parsial (549 pb) pada beberapa subspecies harimau (Sekuen acuan *Panthera tigris* [Pt. x], EF551003)

| Sampel           | 66/(654) | 118/(706) | 131/(719) | 320/(908) | 369/(957) | 411/(999) | 501/(1089) | 505/(1093) | 510/(1098) |
|------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| Pt. x            | C        | A         | C         | C         | G         | A         | A          | T          | C          |
| HS1              | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| HS2              | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| HS3              | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| HS4              | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. Sum su1      | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. Sum su2      | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. Sum su3      | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. Sum su4      | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. Sum su5      | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. Sum su6      | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. Sum su7      | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. Sum su9      | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. Sum su10     | C        | G         | T         | T         | A         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. cor c1       | T        | A         | T         | T         | G         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. cor c2       | T        | A         | T         | T         | G         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. tig b5       | C        | A         | T         | T         | G         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. tig b6       | C        | A         | T         | T         | G         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. tig b7       | C        | A         | T         | T         | G         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. tig b8       | C        | A         | T         | T         | G         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. tig b9       | C        | A         | T         | T         | G         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. alt s1       | C        | A         | C         | C         | G         | A         | A          | C          | A          |
| Pt. alt s2       | C        | A         | C         | C         | G         | A         | A          | C          | A          |
| Pt. alt s3       | C        | A         | C         | C         | G         | A         | A          | C          | A          |
| Pt. alt s4       | C        | A         | C         | C         | G         | A         | A          | C          | A          |
| Pt. alt s5       | C        | A         | C         | C         | G         | G         | G          | C          | A          |
| Pt. alt s6       | C        | A         | C         | C         | G         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. alt s7       | C        | A         | C         | C         | G         | A         | A          | C          | A          |
| Pt. alt s8       | C        | A         | C         | C         | G         | G         | A          | C          | A          |
| Pt. alt s10      | C        | A         | C         | C         | G         | A         | G          | C          | A          |
| Pt. alt s11      | C        | A         | C         | C         | G         | A         | G          | C          | A          |
| Pt. alt s12      | C        | A         | C         | C         | G         | A         | A          | C          | A          |
| Pt. alt s13      | C        | A         | C         | C         | G         | G         | G          | C          | A          |
| Pt. alt s14      | C        | A         | C         | C         | G         | A         | G          | C          | A          |
| Pt. alt s15      | C        | A         | C         | C         | G         | A         | A          | C          | A          |
| Jenis Substitusi | Ti       | Ti        | Ti        | Ti        | Ti        | Ti        | Ti         | Ti         | Tv         |

Keterangan: Nomor dalam kurung adalah nomor situs nukleotida pada Cyt. b utuh Ti (Transisi), Tv (Transversi)

**Tabel 4.** Matrik jumlah rata-rata dari perbedaan jumlah basa nukleotida di daerah Cyt. b parsial (549 pb) beberapa subspecies harimau

| Subspecies                     | <i>P. t. "x"</i> | <i>P. t. sumatrae</i> | <i>P. t. corbetti</i> | <i>P. t. tigris</i> | <i>P. t. altaica</i> |
|--------------------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| <i>P. t. "x"</i> (n = 1)       |                  |                       |                       |                     |                      |
| <i>P. t. sumatrae</i> (n = 13) | 7                |                       |                       |                     |                      |
| <i>P. t. corbetti</i> (n = 2)  | 6                | 3                     |                       |                     |                      |
| <i>P. t. tigris</i> (n = 5)    | 5                | 2                     | 1                     |                     |                      |
| <i>P. t. altaica</i> (n = 14)  | 3                | 5                     | 4                     | 3                   |                      |

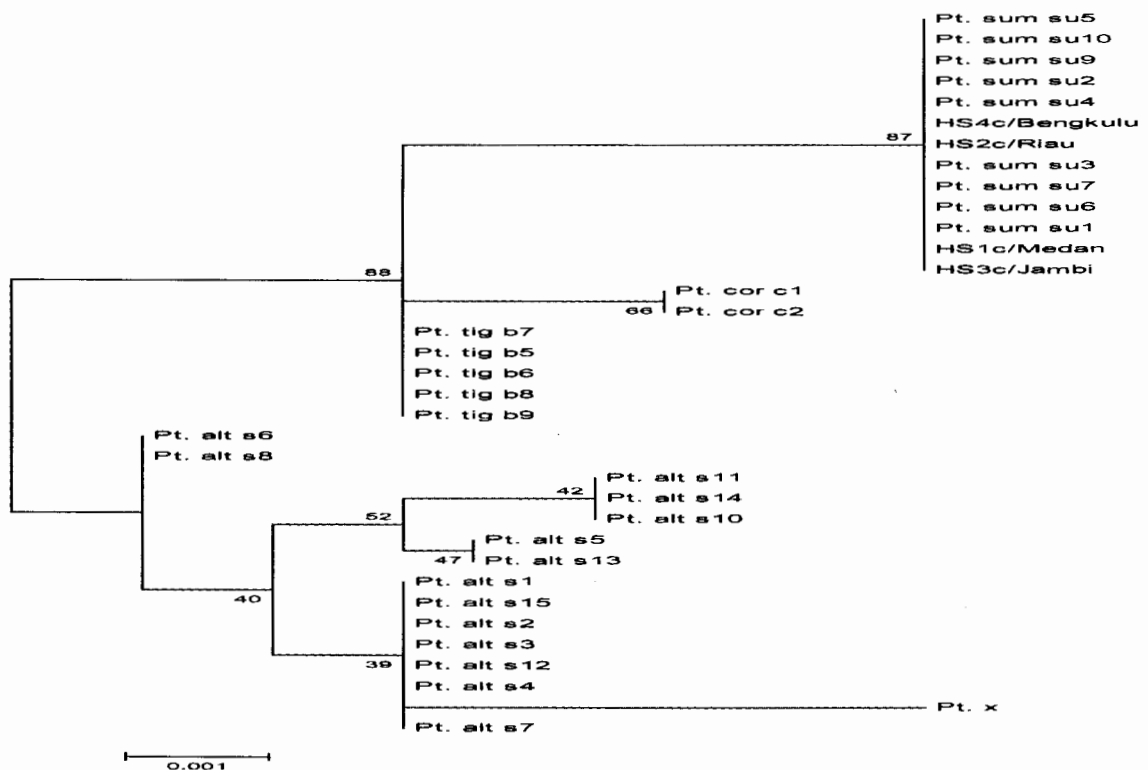
Keterangan: n = number/jumlah

nukleotida yang dimilikinya. Hal ini berarti bahwa antara individu Harimau Sumatera dari semua sampel yang ada (n = 13) tidak beragam (homogen atau monomorf). Hasil perbandingan pada Tabel 3. menunjukkan Harimau Sumatera dengan sub spesies lain memiliki perbedaan nukleotida terkecil dengan *P. t. tigris*, sedangkan yang terbesar dengan *Panthera tigris acuan* (*P. t. "x"*).

Rekonstruksi pohon filogeni untuk mengetahui pengelompokan dan hubungan kekerabatan antara berbagai subspecies harimau berdasarkan perbedaan jumlah basa-basa nukleotida Cyt. b parsial terdapat pada Gambar 2.

Dari Gambar 2. terlihat bahwa pohon filogeni yang terbentuk terbagi menjadi dua kluster besar. Kluster besar

pertama terdiri dari subkelompok *P. t. tigris*, *P. t. corbetti* dan *P. t. sumatrae*. Dalam hubungan kekerabatan, *P. t. tigris* lebih dekat dengan *P. t. corbetti* namun lebih jauh dengan Harimau Sumatera walaupun masih dalam satu kluster besar yang sama. Kelompok harimau Sumatera terpisah jelas dengan kelompok subspecies harimau yang lain. Ke empat sampel Harimau Sumatera yang digunakan pada penelitian ini (HS1c, HS2c, HS3c, dan HS4c) tergabung menjadi satu kelompok tersendiri dengan sembilan sampel Harimau Sumatera dari *GenBank* berdasarkan Cracraft *et. al.* (1998) (Pt. sum su1, Pt. sum su2, Pt. sum su3, Pt. sum su4, Pt. sum su5, Pt. sum su6, Pt. sum su7, Pt. sum su9, dan Pt. sum su10). Kluster besar kedua adalah kelompok

**Gambar 2.** Filogeni berdasarkan perbedaan jumlah dari basa-basa nukleotida di daerah Cyt. b parsial (549 pb) beberapa subspecies harimau

yang terdiri dari *P. t. altaica* dan *P. t. "x"*. Kelompok *P. t. altaica* ini sangat beragam karena terdiri dari beberapa subkelompok.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada daerah Cyt. b parsial Harimau Sumatera mempunyai situs-situs basa nukleotida spesifik yang terdiri dari situs nukleotida No. 130 (Guanin) dan No. 369 (Adenin). Hal yang sama ditemukan pula oleh Cracraft *et al.* (1998) pada Harimau Sumatera yang ada di berbagai kebun binatang (asal usul dari daerah Sumatera mana tidak jelas). Oleh karena itu situs-situs spesifik tersebut dapat digunakan sebagai marka genetik dalam mengidentifikasi kemurnian genetik dari Harimau Sumatera apabila akan dilakukan usaha konservasi genetiknya.

## KEPUSTAKAAN

- Cracraft J, Feinstein J, Vaughn J, Helm-Bychowski K. 1998. Sorting out tigers (*Panthera tigris*): Mitochondrial sequences, nuclear inserts, systematics, and conservation genetics. *Anim Conser* 1: 139-150.
- Damayanti CS. 2007. Peranan Studi Genetik dalam Kegiatan Konservasi. <http://vetopia.wordpress.com/2007/11/02/peranan-studi-genetik-dalam-kegiatan-konservasi> [14 Agustus 2008].
- Duryadi D. 1997. *Isolasi dan Purifikasi Mitochondrian (mtDNA)*. Laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSH) Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Duryadi D. 2005. *Prinsip-Prinsip dalam Teknologi Molekuler*. Pelatihan singkat Teknik Biologi Molekuler "Kerjasama Pusat Studi Ilmu Hayati, Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat Institut Pertanian Bogor dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas". Bogor.
- Inskipp, T. & Gillett, H J. (Eds.) 2005. *Checklist of CITES Species and Annotated CITES Appendices and Reservations*. <http://www.cites.org/eng/resources/species.html> [30 Maret 2007].
- [IUCN] International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2006. *2006 IUCN Red List of Threatened Species*. <http://www.iucn.org/themes/ssc/redlist2006/redlist2006.htm> [30 Maret 2007].
- Luo SJ, Kim JH, Johnson WE, van der Walt J, Martenson J, et al. *et al.* 2004. Phylogeography and genetic ancestry of tiger (*Panthera tigris*). *PloS Biology* 2 (12): e442.
- [STT] The Sumateran Tiger Trust. 2007. *Sumatran Tiger*. <http://www.tigertrust.info/theSumaterantiger.htm>. [16 Maret 2007].
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- Widayanti R. 2006. Kajian Penanda Genetik Gen Cytochrome B dan Daerah D-loop pada *Tarsius* sp. [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.