

**ANALISIS DNA MITOKONDRIA BADAK SUMATERA
DALAM KONSERVASI GENETIK**

HANDAYANI



**SEKOLAH PASCA SARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2008**

**SURAT PERNYATAAN MENGENAI TESIS
DAN SUMBER INFORMASI**

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa tesis saya dengan judul **Analisis DNA Mitokondria Badak Sumatera dalam Konservasi Genetik** adalah benar-benar hasil asli karya saya dengan arahan komisi pembimbing, dan bukan jiplakan atau tiruan dari tulisan siapapun serta belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun.

Bogor, 3 September 2008

Handayani
NIM. G351050101

ABSTRACT

*HANDAYANI. DNA Mitochondria Analysis to Sumatran Rhino (*Dicerorhinus sumatrensis*) in Genetic Conservation. Under the supervision of DEDY DURYADI SOLIHIN, and HADI S ALIKODRA*

Research on the genetics of Sumatran Rhino had been conducted at the Laboratory of Molecular Biology in March 2007 to March 2008. The aims were determining level of genetic diversity of inter-species individual, determining the phylogeny of inter-species individuals, and finding out the genetic distance of four individuals. Blood samples were taken from 2 female Sumatran rhinos (Rosa and Bina) and 2 male Sumatran rhinos (Torgamba and Andalas) from the SRS (Sumatran Rhino Sanctuary), Way Kambas National Park. Analyses was conducted using the CO I gene and D-loop mtDNA. The primers used to amplified sequence of D-Loop partial were RHDLF and RHDLR, while sequence of CO I partial were RHCOIF and RHCOIR. Data were analyzed using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) program with African White rhino, African black rhino and Indian rhino from GenBank as the out-groups. The phylogeny were analyzed Neighbor-Joining (NJ) method with 1000 bootstrapped. The PCR product was 711 bp long of CO I gene area, while the D-Loop partial was 677 bp-size DNA fragments. The D-loop DNA sequence also showed that the Sumatran rhinos were significantly different with the African rhinos despite their similarity in appearance, both rhinos had two horns. The Sumatran rhinos apparently had a closer genetic distance with Indian rhinos which had single horn. This suggested that the geographical distribution more influenced by the phylogeny rather than the number of horn.

Keyword: Sumatran Rhino, DNA, mitochondrial, Conservation

RINGKASAN

HANDAYANI. Analisis DNA mitokondria badak Sumatera dalam konservasi genetik. Dibimbing oleh DEDY DURYADI SOLIHIN, dan HADI S ALIKODRA

Terdapat lima jenis badak yang masih hidup di dunia, tiga jenis berada di Asia dua jenis diantaranya hidup di Indonesia, namun kedua jenis badak ini yaitu *Rhinoceros sondaicus* (badak Jawa), dan *Dicerorhinus sumatrensis* (badak Sumatera) statusnya terancam punah (*endangered*). Badak Sumatera adalah satu-satunya badak Asia yang memiliki dua cula dengan struktur tubuh gelap dan warna kulit coklat kemerahan serta tertutup rambut, sehingga seringkali disebut *hairy rhinoceros*.

Badak Sumatera tersebar di Pulau Sumatera dan Kalimantan (Borneo). Akan tetapi daerah penyebaran badak di Kalimantan sudah sangat langka dan jarang ditemui, hanya terdapat di Sabah dengan jumlah populasi 25 individu. Demikian pula di Sumatera jumlahnya semakin menurun dengan peta sebaran yang sudah sangat terbatas pada daerah tertentu saja terutama berada di Taman Nasional Gunung Leuser (Aceh), Taman Nasional Kerinci Seblat (Bengkulu), Taman Nasional Bukit Barisan Selatan (Sumatera Selatan) dan Taman Nasional Way Kambas, Lampung.

Diketahui populasi badak Sumatera berdasarkan data jejak (*footprint*) yang terdapat di dalam kawasan hutan Taman Nasional Way Kambas Lampung hanya berjumlah 15-25 ekor, sedangkan Taman Nasional Bukit Barisan Selatan 60-80 ekor, dan Taman Nasional Kerinci Seblat 2-3 ekor, dan hasil survey terbaru pada tahun 2005 populasi badak Sumatera berdasarkan data jejak (*footprint*) yang dilaporkan hanya tinggal 20 - 27 ekor. Hal ini menunjukkan bahwa populasi yang ada sekarang ini sangat mencemaskan, dan dikhawatirkan kondisi populasi yang sudah kecil itu akan semakin menurun. Kondisi ini disebabkan oleh masih terus berlangsungnya perambahan dan penjarahan hutan di TN Way Kambas termasuk aktivitas perburuan liar.

Dari informasi yang didapat terlihat bahwa populasi badak Sumatera dewasa ini semakin terancam keberadaannya. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya adalah semakin maraknya perburuan liar, rusaknya habitat alamnya yang disebabkan oleh konversi hutan yang cenderung tidak terkendali.

Populasi kecil lebih rentan pada penurunan keragaman genetik karena efek inbreeding serta terfiksasinya beberapa alela tertentu dalam populasi sehingga hewan tersebut menjadi monomorf dan mengalami penurunan kemampuan berevolusi atau adaptasinya pada lingkungan yang berubah. Selain itu berkurangnya populasi, faktor lain adalah terjadinya fragmentasi suatu habitat yang akan mendorong putusnya aliran gen (*gen flow*) dan meningkatnya *genetic drift*. Keragaman genetik turut menentukan keberhasilan konservasi populasi. Oleh karena itu penelitian keragaman genetik dari populasi Badak Sumatera merupakan langkah penting yang harus dilakukan, dan keberhasilan penelitian ini merupakan langkah dalam konservasi badak Sumatera.

Pengumpulan sampel darah berasal dari SRS (Suaka Rhino Sumatera) TN Way Kambas. Sample berupa darah dari 2 ekor badak Sumatera berjenis kelamin

betina (Rosa & Bina) dan 2 ekor badak jantan (Torgamba & Andalas). Isolasi dan purifikasi DNA Total DNA dilakukan menggunakan metode Duryadi. Amplifikasi daerah CO I pada badak Sumatera dilakukan dengan menggunakan pasangan *primer* RHCOIF dan RHCOIR. Sedangkan amplifikasi daerah *D-Loop* partial pada badak Sumatera menggunakan *primer* RHDLF dan RHDLR.

Amplifikasi daerah CO I pada badak Sumatera dilakukan dengan menggunakan pasangan *primer* RHCOIF dan RHCOIR menghasilkan fragmen DNA berukuran 711 bp. Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar individu badak Sumatera dan spesies badak lain melalui penggunaan analisis perhitungan *Pairwise Distance* dengan *p-distance* dapat ditunjukkan matriks perbedaan genetik antara badak Sumatera dan badak outgroup (badak India dan badak Afrika), hasil perhitungan berdasarkan daerah CO I parsial menunjukkan nilai jarak genetik berkisar antara 0.016 sampai 0.147. Jarak genetik pada Bina (♀) terlihat dekat dengan Torgamba (♂) sebesar 0.007. Hubungan kekerabatan CO I menggunakan Neighbor-Joining dengan pengolahan bootstrap 1000 terlihat bahwa badak putih Afrika berbeda kelompok dengan badak Asia. Di dalam kelompok badak Asia terlihat bahwa badak India sama dengan kelompok dengan badak Sumatera (Indonesia). Di dalam badak Sumatera (Indonesia) sendiri terjadi keragaman.

Sedangkan amplifikasi daerah *D-Loop* partial pada badak Sumatera menggunakan *primer* RHDLF dan RHDLR menghasilkan fragmen DNA berukuran 677 bp. Berdasarkan sekuen D-loop parsial menunjukkan nilai jarak genetik berkisar antara 0.007 sampai 0.164. Jarak genetik pada Rosa (♀) 0.007 terlihat dekat dengan Torgamba (♂). Hubungan kekerabatan badak Sumatera dengan badak India dan badak putih Afrika berdasarkan daerah D-loop polanya hampir sama dengan hasil pada COI yaitu badak Asia terpisah dengan badak Afrika. Akan tetapi antara badak Sumatera dan badak India walaupun berbeda dalam jumlah culanya tetapi masuk dalam satu kelompok. Berdasarkan hasil sekuen gen CO I terdapat situs-situs spesifik pada badak Sumatera sebesar 67%, sedangkan berdasarkan daerah D-loop sebesar 77% hasil tersebut dapat digunakan sebagai data base dalam penelitian-penelitian selanjutnya. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa marka genetik yang lebih akurat digunakan adalah D-loop dibandingkan dengan marka genetik CO I.

Kata kunci: badak Sumatera, DNA, mitokondria, konservasi

PRAKATA

Sujud syukur Alhamdulillah dan segala puji penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Sasaran yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Maret 2007 sampai dengan bulan Maret 2008 adalah keragaman genetik, yang berjudul **Analisis DNA Mitokondria Badak Sumatera dalam Konservasi Genetik**.

Bagian utama penelitian adalah daerah CO I dan daerah D-loop DNA mitokondria untuk mengetahui keragaman genetik dan hubungan kekerabatan diantara individu badak Sumatera dan spesies badak lain di dunia. Penelitian analisis DNA badak Sumatera di Indonesia belum pernah dilakukan sebelumnya dan pertama di Indonesia. Penelitian ini memberikan informasi yang sangat penting sebagai *database* badak Sumatera.

Penelitian ini dapat terlaksana dengan adanya dukungan dari semua pihak, sehingga penulis mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada guru-guru yang baik Dr. Ir. Dedy Duryadi Solihin, DEA sebagai Ketua Komisi Pembimbing, Prof. Dr. Ir. Hadi S Alikodra, MS sebagai anggota Komisi Pembimbing yang telah mendukung, meluangkan waktu, pikiran dan tenaganya dalam membimbing penulis sejak dalam perkuliahan, penulisan proposal sampai selesai penulisan karya Ilmiah ini. Semoga Guru-guru penulis diberikan pahala oleh Allah SWT.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Islam Assyafiiyah atas dukungannya. Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada Tatang Mitra Setia, M. Si, dan dr. Marcel Adi CTR, Justuhadi dan Waladi atas dukungan dan kerjasamanya. Penulis mengucapkan terima kasih kepada dr. Dedi Candra dan dr. Andri beserta para *Keeper-keeper* SRS atas bantuan selama koleksi sample darah di SRS. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Jakaria, S.pt, M.Si dan Heri atas bantuannya dan dukungannya selama di Laboraturium. Penulis mengucapkan terima kasih kepada kepala Laboraturium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) Institut Pertanian Bogor Dr. Ir. Dedy Duryadi Solihin, DEA, atas segala fasilitas alat dan bahan yang dapat penulis gunakan mulai dari isolasi, ekstraksi DNA total sampai pelaksanaan amplifikasi PCR daerah CO I dan D-loop DNA Mitokondria.

Akhirnya, terima kasih penulis sampaikan kepada Aan Tukiman (Bapak) dan Muminah (Alm/Ibu), atas dukungan, pengertian dan doanya. Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi manajemen konservasi di Indonesia dan khususnya di Suaka Rhino Sumatera (SRS) TN. Way kambas Lampung.

Bogor, 3 September 2008

Handayani

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Jakarta pada tanggal 26 Mei 1981 sebagai anak ke enam dari enam bersaudara dari pasangan Aan Tukiman dan Mu'minah (Alm). Pendidikan Sekolah Dasar (MI Darussa'adah) Jakarta ditamatkan pada tahun 1994, kemudian dilanjutkan pada MTS Darussa'adah tamat tahun 1997 dan MA Saadatudarain tamat pada tahun 2000. Kesempatan melanjutkan pendidikan sarjana dengan beasiswa pendidikan dari NAGAO-Jepang selama empat tahun dimulai pada tahun 2000 sampai 2004 pada Program Studi Biologi Jurusan Konservasi Fakultas MIPA Universitas Islam Assyafi'iyah, lulus pada tahun 2005. Dan pada tahun 2005 melanjutkan pendidikan ke program Magister pada program Studi Biologi, Sekolah Pascasarjana IPB pada tahun 2005 dan lulus 2008. Penulis memperoleh kesempatan penelitian ini pada laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSH) Institut Pertanian Bogor atas kerja sama Pembimbing Dr. Ir. Dedy Duryadi Solihin, DEA.

Penulis bekerja sebagai Genetics Analys di WWF- Indonesia sejak bulan Juli sampai sekarang untuk penelitian DNA badak Jawa.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
PENDAHULUAN	
Latar Belakang	1
Tujuan Penelitian	4
Manfaat Penelitian	4
Hipotesis Penelitian	4
TINJAUAN PUSTAKA	
Klasifikasi Badak Sumatera	6
Morfologi	7
Ekologi	8
Penyebaran	10
Genetika Konservasi	10
Tekanan Silang Dalam (<i>Inbreeding Depression</i>)	11
Tekanan Silang Luar (<i>Out breeding Depression</i>)	11
Struktur DNA Mitokondria	12
<i>Polymerase Chain reaction</i> (PCR)	16
Peranan Konservasi Genetik	17
BAHAN DAN METODE	
Tempat dan Waktu	19
Koleksi contoh darah	20
Isolasi DNA total	20
Amplifikasi CO I dan D-loop DNA Mt	21
Analisis Data	22
HASIL DAN PEMBAHASAN	
DNA Total	23
Amplifikasi Cytocrom Oksidase I (CO I)	23
Sekuensi Daerah CO I Parsial dan Keragaman Runutan Nukleotida....	24
Jarak Genetik badak Sumatera dan Outgrupnya badak India dan Afrika	26
Hubungan Kekerabatan Badak Sumatera Berdasarkan Sekuen CO I	
Amplifikasi D-loop DNA Mt	27
Sekuensi Daerah D-loop Parsial dan Keragaman Runutan nukleotida...	28
Jarak Genetik badak Sumatera dan Outgrupnya badak India dan Afrika	30
Hubungan kekerabatan berdasarkan sekuen D-loop DNA Mt	31
PEMBAHASAN UMUM	33

SIMPULAN DAN SARAN	
Simpulan	35
Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	37
DAFTAR LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Ciri dari tiga sub spesies badak Sumatera	7
2. Morfologi lima spesies badak di dunia	8
3. Primer untuk sekuen CO I parsial dan D-Loop pada badak Sumatera	21
4. Perbedaan susunan basa nukleotida badak Indoa, badak putih Afrika, dari GenBank dan empat individu badak Sumatera hasil penelitian	25
5. Jarak genetik berdasarkan metode <i>Pairwie Distance dengan p-distance</i> pada badak India dan badak putih Afrika GenBank dan empat individu badak Sumatera hasil penelitian	26
6. Perbedaan susunan basa Nukleotida empat individu badak Sumatera hasil penelitian ini dengan standar nukleotida badak India dari GenBank (679 nukleotida)	29
7. Perbedaaan susunan basa Nukleotida empat individu badak Sumatera hasil penelitian ini dengan standar nukleotida badak India dari GenBank (667 nukleotida)	30
8. Jarak genetik berdasarkan metode <i>Pairwier Distance dengan P-distance</i> pada empat individu badak Sumatera dengan badak India dan badak putih Afrika (n = 679)	30

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. <i>Dicerorhinus sumatrensis</i>	6
2. Lima spesies badak di dunia	8
3. Peta penyebaran badak Sumatera di TNWK dan TNBBS	10
4. Genom mitokondria mamalia	14
5. Spektrofotometer DNA total badak Sumatera setelah dimigrasikan dalam gel agarose 1,2 % pada tegangan 90 volt selama 45 menit	23
6. Sketsa letak penempelan primer RHCOIF dan RHCOIR untuk mengamplifikasi pada daerah CO I badak Sumatera	24
7. Hasil amplifikasi daerah CO I dengan menggunakan pasangan primer RHDLF dan RHDLR setelah dimigrasikan dalam gel agarose 1.2 % pada tegangan 90 volt selama 45 menit	24
8. Dendogram Neighbor-Joining dengan pengolahan bootstrap 1000 ulangan dari nukleotida daerah CO I parsial badak Sumatera, badak India dan badak putih Afrika (berukuran 716 nt)	27
9. Hasil amplifikasi daerah CO I dengan menggunakan pasangan primer RHDLF dan RHDLR setelah dimigrasikan dalam gel agarose 1.2 % pada tegangan 90 volt selama 45 menit	27
10. Sketsa letak penempelan primer RHCOIF dan RHCOIRmenganplifikasi pada daerah D-loop DNA Mt	28
11. Dendogram Neighbor-Joining dengan pengolahan bootstrap 1000 ulangan dari nukleotida daerah D-loop DNA Mt parsial badak Sumatera, badak India dan badak putih Afrika (berukuran 679 nt)	31
12. Dendogram D-Loop berdasarkan p-distance dengan Neighbor- Joining menggunakan pengolahan bootstrap 1000 ulangan (667 nukleotida)	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Lokasi pengambilan sampel darah di SRS	43
2. Profil sample darah empat badak Sumatera untuk analisis gen CO I dan daerah D-loop DNA Mt	44
3. Lokasi penempelan primer RHCOIF dan RHCOIR pada sekuen basa nukleotida gen COI parsial badak Sumatera	46
4. Lokasi penempelan primer RHDLF dan RHDLR pada sekuen basa nukleotida daerah D-loop parsial badak Sumatera	47
5. Komposisi bahan pereaksi yang digunakan untuk isolasi DNA dari Sample darah	48
6. Pensejajaran nukleotida berdasarkan hasil sekuen gen CO I	49
7. Pensejajaran nukleotida berdasarkan hasil sekuen D-loop DNA Mt	52
8. Situs-situs spesifik badak Sumatera berdasarkan sekuen CO I	55
9. Situs-situs spesifik badak Sumatera berdasarkan sekuen D-loop DNA Mt	57
10. Hasil <i>blast</i> sekuens badak Sumatera pada situs NCBI dan nomor akses.....	59

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Indonesia merupakan negara hutan hujan tropis yang memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi dan dikenal sebagai salah satu *Megabiodiversity Country*. Pulau Sumatera salah satu pulau di Indonesia yang dapat menjadi gambaran kekayaan daerah tropis di Asia. Hal tersebut bisa dilihat dari flora dan fauna yang ada di pulau ini, yaitu satu diantaranya adalah badak Sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*, Fischer 1814).

Terdapat lima jenis badak yang masih hidup di dunia, tiga jenis berada di Asia yaitu *Rhinoceros unicornis* (badak India), *Rhinoceros sondaicus* (badak Jawa), *Dicerorhinus sumatrensis* (badak Sumatera) dan dua jenis lainnya berada di Afrika yaitu *Ceratotherium simum* (badak putih Afrika) dan *Diceros bicornis* (badak hitam Afrika) Lekagul & McNelly (1977). Dari tiga jenis badak yang hidup di Asia, dua jenis diantaranya hidup di Indonesia, namun kedua jenis badak ini statusnya terancam punah (*endangered*). Badak Sumatera tersebar di Pulau Sumatera dan Kalimantan (Borneo). Akan tetapi daerah penyebaran badak di Kalimantan sudah sangat langka dan jarang ditemui, hanya terdapat di Sabah dengan jumlah populasi 25 individu. Demikian pula di Sumatera jumlahnya semakin menurun dengan peta sebaran yang sudah sangat terbatas pada daerah tertentu saja terutama berada di Taman Nasional Gunung Leuser (Aceh), Taman Nasional Kerinci Seblat (Jambi), Taman Nasional Bukit Barisan Selatan (Sumatera Selatan) dan Taman Nasional Way Kambas, Lampung (YMR 1998).

Menurut Penny (1987) badak Sumatera mempunyai daerah penyebaran yang luas yaitu meliputi daerah Bengal (India), Burma, Pegunungan Thailand, Kamboja, Vietnam, Laos dan Malaysia (Foose & van Strein 1997; WWF 2002).

Berdasarkan dari Hasil survey Program konservasi Badak Indonesia (PKBI) pada tahun 2004 diketahui populasi badak sumatera berdasarkan data jejak (*footprint*) ini yang terdapat di dalam kawasan hutan Taman Nasional Way kambas Lampung hanya berjumlah 15-25 ekor, sedangkan Taman Nasional Bukit Barisan Selatan 60-80 ekor, dan Taman Nasional Kerinci Seblat 2-3 ekor, dan hasil survey terbaru pada tahun 2005 populasi badak Sumatera berdasarkan data

jejak (*footprint*) yang dilaporkan hanya tinggal 20 - 27 ekor (Isnan *et al.* 2005). Hal ini menunjukkan bahwa populasi yang ada sekarang ini sangat mencemaskan, dan dikhawatirkan kondisi populasi yang sudah kecil itu akan semakin menurun. Kondisi ini disebabkan oleh masih terus berlangsungnya perambahan dan penjarahan hutan di TNWK termasuk aktivitas perburuan liar.

Dari informasi yang kami dapat terlihat bahwa populasi badak Sumatera dewasa ini semakin terancam keberadaannya. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya adalah semakin maraknya perburuan liar, rusaknya habitat alamnya yang disebabkan oleh konversi hutan yang cenderung tidak terkendali. Menurut Alikodra (2002) populasi satwa liar dapat berkembang stabil ataupun menurun sesuai dengan kondisi perubahan komponen lingkungannya. Selain faktor diatas terancamnya populasi badak Sumatera juga akibat hidupnya yang soliter dan sensitif terhadap aktivitas manusia dan pengganggu lainnya, serta proses perkembangbiakan yang lambat dengan keturunan yang dihasilkannya pun sangat terbatas. Badak Sumatera memiliki periode masa mengandung (*gestation period*)-nya selama 15-18 bulan dengan 1 anak per kelahiran. Badak Sumatera mulai bereproduksi pada usia 7-8 tahun dengan jarak 3-4 tahun antar periode anakan atau masa sapih (Nowak 1991). Periode generasi (*generation period*) yang panjang atau lama dan permasalahan dalam tingkat reproduksi (*reproduction rate*) yang rendah merupakan ciri dari populasi mahluk hidup yang rentan dengan kepunahan, dan hilangnya keanekaragaman genetik akan lebih cepat pada populasi kecil dibandingkan dengan populasi yang besar (Christine *et al.* 1983; Primack 1998).

Populasi kecil lebih rentan pada sejumlah efek genetik yang merugikan, misalnya penurunan keragaman karena efek inbreeding serta terfiksasinya beberapa alela tertentu dalam populasi sehingga hewan tersebut menjadi monomorf dan mengalami penurunan kemampuan berevolusi atau adaptasinya pada lingkungan yang berubah. Selain itu berkurangnya populasi, faktor lain adalah terjadinya fragmentasi suatu habitat yang akan mendorong putusya aliran gen (*gen flow*) dan meningkatnya *genetic drift* dan *inbreeding* (kawin silang dalam) antar populasi (Frankham *et al.* 2002).

Akibat dari populasi yang menurun dengan tajam di alam akan mengakibatkan hewan ini berada pada status meningkatnya peluang menuju kepunahan (Ellstrand *et al.* 1993).

Mempertahankan keanekaragaman genetika dalam suatu populasi merupakan salah satu cara dari manajemen populasi bagi spesies yang terancam punah. Dalam usaha melindungi semua jenis satwa liar dari kepunahan termasuk badak Sumatera, pemerintah Republik Indonesia mengeluarkan peraturan perundangan untuk perlindungan semua jenis satwa liar yang dikeluarkan pada tahun 1931 No. 266. Di samping itu badan Internasional yang bergerak dalam bidang konservasi sumberdaya alam IUCN (*Internasional Union For Conservation of Nature and Natural Resources*) juga telah memberikan perhatian terhadap kelestarian badak yang dimasukkan dalam kategori “*Endangered*” atau genting (IUCN 1996) dengan membuat Suaka Rhino Sumatera (SRS).

Di SRS telah melakukan usaha konservasi berupa konservasi semi *insitu* dalam bentuk penangkaran. Suaka ini terdapat di dalam kawasan Taman Nasional Way Kambas dengan areal seluas 9000 Ha, didominasi oleh ekosistem hutan hujan dataran rendah sedangkan lainnya adalah hutan rawa dengan lingkup yang kecil, dan dikelola secara khusus dan intensif. Tujuan dari suaka badak ini adalah untuk peningkatan reproduksi dalam menambah jumlah populasi di alam. Apabila usaha ini berhasil maka sangat mendukung dalam menekan laju kepunahan dan dapat melestarikan keberadaan badak sumatera tersebut.

Keragaman genetik turut menentukan keberhasilan konservasi populasi. Oleh karena itu penelitian keragaman genetik dari populasi Badak Sumatera merupakan langkah penting yang harus dilakukan, dan apabila penelitian ini berhasil maka langkah konservasinya lebih terarah.

Walaupun data mengenai filogeni (kekerabatan) badak Sumatera belum banyak dilaporkan, akan tetapi beberapa peneliti sudah mulai mengeksplorasinya, diantaranya Morales *et al.* (1997) mengungkapkan keragaman genetik, dan konservasi badak Sumatera. Dilaporkan juga oleh Xu *et al.* (1996) mengenai perbandingan DNA antara badak putih Afrika, badak hitam Afrika dengan badak India dengan analisis seluruh pada genom DNA mitokondria (12SrRNA, 16SrRNA, ND1, ND2, CO I, CO II, ATP, CO III, ND3, ND4, ND5, ND6, Cyt b

dan D-loop), dan Fernando *et al.* (2006) mengungkapkan keragaman genetik, filogeni dan konservasi badak Jawa dengan analisis pada genom DNA D-Loop. Selain itu Jama *et al.* (1993) mengungkapkan mengenai sekuensi daerah D-loop, dan bagian, tRNA, tRNA^{Pro}, dan tRNA^{Phe} dari badak hitam Afrika (*Diceros bicornis*).

Pada penelitian ini penentuan keragaman genetik spesies badak Sumatera terutama keragaman individu dalam populasi dilakukan dengan menggunakan Cytochrome Oxidase I (CO I) dan D-Loop dari genom DNA mitokondria (mtDNA). Penelitian penentuan keragaman genetik spesies badak Sumatera di Indonesia belum pernah dilakukan, dan penelitian ini adalah yang pertama di Indonesia. Hasil ini diharapkan dapat dijadikan data base dalam usaha manajemen populasi dan konservasinya.

Tujuan Penelitian

1. Menentukan tingkat keragaman genetik individu antar spesies.
2. Menentukan tingkat kekerabatan individu antar spesies.
3. Mengetahui jarak genetik dari empat individu.

Manfaat Penelitian

Diharapkan dapat memberikan informasi tentang keragaman genetik badak Sumatera sebagai penanda dalam usaha pengelolaan program-program penangkaran atau usaha konservasi seperti untuk perkawinan dalam mencegah terjadinya “*in breeding*”. Disamping itu juga diharapkan dapat dimanfaatkan untuk mempelajari keragaman genetik dan biologi populasi badak Sumatera serta informasi proses penurunan keragaman genetik, dan memberikan kontribusi terhadap upaya penyelamatan badak Sumatera agar terhindar dari kepunahan.

Hipotesis

Daerah Cytochrom oksidase I merupakan bagian dari genom mitokondria yang bersifat hypervariable juga. Pada daerah inipun didapat keragaman genetik yang bersifat spesifik, dan dapat mengungkapkan adanya perbedaan intraspecies secara filogeografi.

Daerah D-Loop merupakan bagian dari genom mitokondria yang bersifat hypervariable. Adanya keragaman genetik pada daerah ini bersifat spesifik, yang dapat mengungkapkan adanya perbedaan intraspecies secara filogeografi.

TINJAUAN PUSTAKA

Badak Sumatera *Dicerorhinus sumatrensis*

Klasifikasi

Termasuk dalam kelas Mamalia,
Ordo Mesaxonia, Sub Ordo Perissodactyla,
Famili Rhinocerotidae, Genus Dicerorhinus,
Spesies *Dicerorhinus sumatrensis* Fischer, 1814.



Gambar 1 *Dicerorhinus sumatrensis*

Badak sumatera merupakan anggota famili Rhinocerotidae. Famili ini terdiri dari empat genus yaitu Rhinoceros (bercula satu), Dicerorhinus (bercula dua), Diceros (bercula dua) dan Ceratotherium (bercula dua). Rhinoceros terdiri dari dua species sedangkan Dicerorhinus, Diceros dan Ceratotherium terdiri dari satu spesies (Xu & Arnason 1996). Berdasarkan ukurannya maka kelima spesies tersebut termasuk dalam mamalia darat yang berukuran besar. Species dari genus Rhinoceros terdapat hanya di Asia yaitu badak jawa (*Rhinoceros sundicus*) di Ujung Kulon Jawa Barat, sedangkan Badak India (*Rhinoceros unicornis*.) terdapat di India terutama di daerah Assam. Genus Diceros dan Ceratotherium terdapat di Afrika (*Diceros bicornis*) dan (*Ceratotherium simum*). Sedangkan genus Dicerorhinus satu spesies (*Dicerorhinus sumatrensis*) berada di Asia. Badak bercula dua di Asia memiliki tiga subspecies dengan sebaran geografis yang berbeda, yaitu *Dicerorhinus sumatrensis sumatrensis* di Sumatera-Indonesia, Semenanjung Malaysia, dan Thailand; *Dicerorhinus sumatrensis harrisoni*

ditemukan di Kalimantan, sedangkan *Dicerorhinus sumatrensis lasiotis* ditemukan di Myanmar (Foose & van Strein 1997) (Tabel 1).

Tabel 1 Ciri dari tiga sub spesies badak Sumatera (Foose & Strein 1997)

	<i>D.s. sumatrensis</i>	<i>D.s. harrisoni</i>	<i>D.s. lasiotis</i>
1. Penyebaran	Sumatera, dan semenanjung Malaysia	Kalimantan (Borneo), Sabah dan Sarawak	Myanmar, Burma, India, dan Banglades
2. Populasi	+ 275 ekor	+ 25 ekor	Sudah punah

Ketiga spesies badak Asia dahulu tersebar luas di selatan dan tenggara Asia. Jumlah mereka cukup melimpah pada pertengahan abad ke-19. Spesies-spesies badak Asia kini menjadi mamalia paling langka dan kehidupannya terancam di dunia. Usaha konservasi terhadap badak India cukup berhasil, sedangkan badak Jawa dan Sumatera kini berada dalam ancaman kepunahan (Foose & van Strein 1997; WWF 2002).

Badak Sumatera umumnya ditemukan di daerah berbukit-bukit yang dekat dengan air. Spesies tersebut menempati hutan hujan tropis dan hutan lumut pegunungan, tetapi juga menyukai daerah pinggiran hutan dan hutan sekunder (van Strein 1985). Badak Sumatera dapat hidup pada kisaran rentang habitat yang luas, mulai dari rawa-rawa dataran rendah hingga hutan pegunungan. Saat ini, badak sumatera di temukan di dataran tinggi karena hutan dataran rendah sudah berkurang. Dahulu, spesies ini menyebar luas mulai dari daerah dataran rendah hingga dataran tinggi, dan bahkan dapat berenang di laut untuk mencapai pesisir pulau (van Strein 1985).

Morfologi

Badak sumatera memiliki struktur tubuh gelap dengan warna kulit coklat kemerahan dan tertutup rambut, sehingga seringkali disebut *hairy rhinoceros*. Badak sumatera adalah satu-satunya badak Asia yang memiliki dua cula, meskipun cula posterior lebih tereduksi dan terkadang tidak nampak pada badak betina. Panjang dari cula anterior umumnya 25 cm dengan cula posterior berukuran lebih kecil baik pada jantan maupun betina. Badak sumatera merupakan badak terkecil dengan tinggi badan 0,9- 1,5 m dan panjangnya kurang lebih 2,9 m. Berat badannya hanya sekitar 600-800 kg, sedangkan spesies lainnya memiliki berat

badan dapat mencapai 2 ton (Gambar 2). (Nowak 1991; van Strein 2002; WWF 2002).



Keterangan: 1. Badak Jawa; 2. Badak Sumatera; 3. Badak Hitam Afrika; 4. Badak Putih Afrika; 5. Badak India

Gambar 2 Lima spesies badak di dunia (Nowak 1991; WWF 2002).

Umumnya, badak jawa memiliki ukuran lebar kaki lebih dari 25 cm sedangkan badak Sumatera antara 20-22 cm. Kaki depan dan kaki belakang badak Sumatera memiliki jumlah jari yang ganjil yaitu tiga buah sebagai ciri utama dari ordo *Perissodactyla*. Aktifitas badak Sumatera di lapangan sedikit mirip dengan tapir yang juga anggota ordo *Perissodactyla*. Akan tetapi, Lekagul & McNeely (1977) mengatakan bahwa telapak kaki tapir biasanya berukuran lebih kecil yaitu sekitar 14-17 cm dan tampak lebih runcing. Adapun karakter morfologi dari kelima spesies badak dunia dapat dilihat pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2 Morfologi lima spesies badak di dunia (van Strein 1985; WWF 2002).

Deskripsi	<i>R.sundaicus</i>	<i>D.sumatrensis</i>	<i>D.bicornis</i>	<i>C.simum</i>	<i>R.unicornis</i>
Cula (m)	0,25	0,25 – 0,79	0,5 – 1,3	0,55 – 1,2	0,2 – 0,6
Berat (Kg)	900 – 2300	600 – 950	800 – 1350	1800 – 2700	1800 – 2700
Tinggi (m)	1,5 – 1,7	1 – 1,5	1,4 – 1,7	1,5 – 1,8	1,72 – 2
Panjang (m)	2 – 4	2 – 3	3 – 3,8	3,8 – 5	3 – 3,8
Usia (Tahun)	30 – 40	30 – 45	30 – 40	40 – 50	40 – 50

Ekologi

Van Strein (1985) menyatakan bahwa sifat badak sumatera yang soliter menyebabkan terjadinya hidup bersama antara badak jantan dan betina hanya di musim kawin saja, akan tetapi antara induk betina dan anaknya tetap hidup bersama. Lekagul & McNelly (1977) menyatakan bahwa terkadang beberapa individu bersama-sama mendatangi tempat berkubang atau menggaram. Tingkah

laku badak sumatera yang paling menonjol adalah dalam hal berkomunikasi secara tidak langsung antar sesama melalui suara-suara yang keluar dari hidung atau mulut dan mengeluarkan feces serta urine sebagai batas dan pengenalan wilayah jelajahnya. Beberapa aktivitas penandaan daerah jelajah pada badak sumatera menurut van Strein (1985) antara lain berupa: a) gundukan tanah dari kaisan kaki; b) patahan sapling, dan c) semprotan urin pada daun atau batang tumbuhan.

Semua spesies badak memerlukan berkubang, begitu juga dengan badak Sumatera. Berkubang bertujuan mempertahankan temperatur tubuhnya dan melindungi diri dari berbagai macam parasit (Hubback 1983). Badak sumatera berkubang paling sedikit satu kali dalam sehari pada siang hari atau menjelang pagi hari. Kubangan berbentuk oval dengan diameter 2- 3 meter dan untuk menambahkan lumpur pada kubangannya dilakukan dengan menggali atau menggosokkan cula pada dinding tanah di dekat kubangan (van Strien 1985).

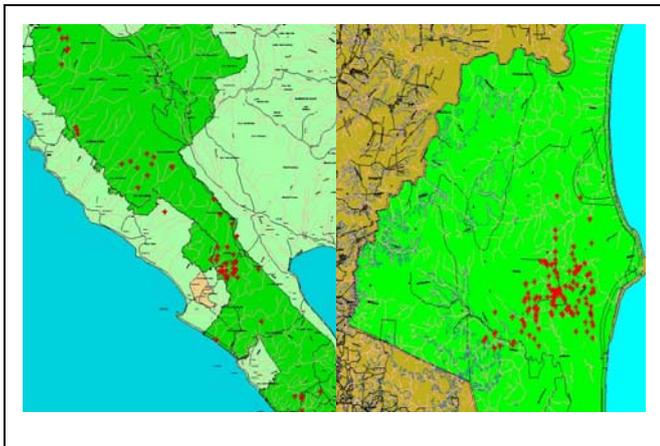
Setiap individu badak memiliki daerah jelajah permanen yang di dalamnya terdapat tempat penggaraman berupa sungai, selain itu untuk memenuhi mineral yang dibutuhkan tubuhnya badak sering menjilati tanah (van Strein 1985). Daerah jelajah badak jantan dewasa rata-rata sejauh 30 km dan daerah jelajah betina lebih kecil yaitu mencapai hanya 20 km, tetapi terpisah satu individu dengan individu lainnya. Oleh karena itu, badak Sumatera betina bersifat teritorial dan saling menghindari satu sama lain. Badak betina yang memiliki anak daerah jelajahnya lebih kecil namun tidak se-eksklusif badak betina tanpa anak (van Strein 1985). Dewasa jantan dan betina secara teratur menandai wilayah mereka dengan goresan, tegakan muda yang patah, feses dan urin (Nowak 1991; WWF 2002).

Penelitian Strein di Sumatera Utara menunjukkan bahwa kelahiran badak Sumatera sebagian besar terjadi pada bulan Oktober hingga Mei, yaitu periode dengan curah hujan yang tinggi. Proses perkembangbiakan badak Sumatera adalah yang lambat dengan keturunan yang dihasilkannya pun sangat terbatas. Badak Sumatera memiliki periode masa mengandung (*gestation period*)-nya selama 15-18 bulan dengan 1 anak per kelahiran. Badak Sumatera mulai bereproduksi pada usia 7-8 tahun dengan jarak 3-4 tahun antar periode anakan atau masa sapih (Nowak 1991).

Penyebaran

Populasi badak Sumatera terpecah dalam kelompok populasi yang berbeda dengan sebaran terkonsentrasi pada daerah-daerah tertentu saja. Populasi yang ada di Sumatera terdapat di daerah Taman Nasional (TN) Gunung Leuser, TN Kerinci Seblat (TNKS), Aceh Utara (Gunung Abong-abong dan Lesten Lukup), TN Bukit Barisan Selatan (TNBBS) dan TN Way Kambas (TNWK). Sebaran populasi di Kalimantan pernah dilaporkan terdapat di TN Kayan Mentarang dan Cagar Alam Ulu Sembakung, tetapi jumlahnya sampai saat ini belum di ketahui dengan pasti (Dirjen PHPA Dephut RI & YMR 1994). Adapun peta sebaran Badak Sumatera di TNWK dan TNBBS dapat dilihat pada gambar 3 berikut ini.

Keadaan Populasi pada tahun 2004 diketahui populasi badak Sumatera terdapat di TN Way kambas Lampung hanya berjumlah 15-25 ekor, sedangkan TNBB Selatan 60-80 ekor, dan TNKS 2-3 ekor, dan hasil survey terbaru pada tahun 2005 populasi badak Sumatera berdasarkan data jejak (*footprint*) yang dilaporkan hanya tinggal 20 - 27 ekor (Isnan *et al.* 2005)



YABI (Yayasan Badak Indonesia 2005)

Gambar 3 Peta penyebaran badak Sumatera di TNWK dan TNBBS

Genetika Konservasi

Masalah genetik akhir-akhir ini banyak mendapat perhatian dalam hubungannya dengan masalah konservasi. Tolak ukur keberhasilan kegiatan konservasi dapat dilihat dari keanekaragaman genetik yang tinggi, sehingga keberadaan organisme secara alami dapat dipertahankan dalam kurun waktu yang panjang sehingga kepunahannya dapat dihindari. Dengan demikian faktor keragaman genetik menjadi indikator kunci yang utama (Soule 1983).

Menurut Frankham *et al.* (2002) genetika konservasi merupakan salah satu dari aplikasi ilmu genetika yang bertujuan mempertahankan spesies sebagai entitas dinamis yang memiliki kemampuan untuk mengatasi perubahan lingkungan, dengan ruang lingkupnya mencakup manajemen genetika populasi berukuran kecil, pemecahan masalah ketidakpastian taksonomi, penentuan unit manajemen intraspesifik, dan penggunaan analisis genetik dalam kegiatan forensik maupun dalam kajian biologi spesifik.

Populasi kecil lebih rentan pada sejumlah efek genetik yang merugikan, misalnya berkurangnya kemampuan berevolusi, mudah terjadinya hanyutan gen (*genetic drift*), meningkatnya terjadinya silang dalam (*inbreeding*) dan meningkatnya peluang menuju kepunahan (Ellstred *et al.* 1993)

Tekanan Silang Dalam (*Inbreeding Depression*)

Pada populasi alami dimana jumlah populasinya cukup besar maka terdapat mekanisme yang berfungsi mengurangi terjadinya silang dalam yaitu individu-individu tersebut tidak akan kawin dengan kerabat dekat dan memilih pasangannya dari keluarga yang lain. Kadang-kadang mekanisme pencegahan silang dalam ini gagal berfungsi dengan baik pada populasi yang terlalu kecil.

Perkawinan antara induk – anak, saudara kandung dan sepupu, mendorong terjadinya tekanan silang dalam. Akibat dari banyak terjadinya silang dalam ini selain menurunnya keragaman genetik dalam populasinya maka dapat pula berupa kesulitan untuk menghasilkan keturunan, atau keturunan yang muncul biasanya lemah atau mandul (Christine *et al.*1983). Selain itu karena banyak terjadi monomorfik pada gen-gen tertentu maka populasinya menunjukkan kerentanan yang relatif tinggi terhadap stress lingkungan. Penjelasan yang mungkin dapat diterima mengenai akibat negatif dari terjadinya tekanan silang dalam adalah bahwa proses ini dapat memunculkan alel-alel yang merugikan (*deleterious*) yang diwarisi dari kedua induknya (Charleswor 1987).

Tekanan Silang Luar (*Out breeding Depression*)

Di alam, individu-individu dari spesies yang berbeda jarang melakukan perkawinan karena adanya barrier reproduksi. Beberapa mekanisme seperti

perilaku, fisiologis, dan morfologis telah menyebabkan perkawinan hanya cenderung terjadi antara anggota spesies yang sama. Namun demikian, apabila suatu spesies menjadi langka atau habitatnya menjadi rusak, akan muncul perilaku silang luar yaitu perkawinan terjadi dengan individu-individu yang hubungan kekerabatannya relatif jauh atau pada spesies yang telah mengalami divergensi dari spesies awal. Hal seperti ini memberikan akibat terjadinya tekanan silang luar (*Out-breeding depression*).

Tekanan silang luar juga dapat terjadi antar sub spesies yang berbeda, spesies yang kekerabatannya relatif dekat, atau individu-individu yang tidak berhasil menemukan pasangan dari spesies kerabatnya. Hasil dari keadaan ini adalah keturunan yang muncul seringkali lemah dan steril. Dalam program penangkaran usaha menghindari tekanan silang luar dilakukan dengan mencegah sosialisasi antar individu yang mempunyai penyebaran alami terlalu berjauhan.

Struktur DNA Mitokondria

Pada umumnya material DNA yang digunakan dalam analisa genetik berasal dari DNA inti, tetapi sumber DNA untuk organisme eukariot dapat pula diperoleh dari organel-organel sitoplasmik. Salah satu organel yang dapat menjadi sumber bahan genetik adalah mitokondria (Duryadi 1994). Ukuran genome mitokondria hewan relatif kecil dibandingkan dengan mitokondria dan khloroplast tanaman yaitu berukuran kurang dari 40 Kb.

Analisis DNA mitokondria telah digunakan secara luas dalam mempelajari evolusi, struktur populasi, aliran gen, hibridisasi, biogeografi dan filogeni suatu spesies hewan (Moritz *et al.* 1987). Di samping itu, hal yang mendukung penggunaan mtDNA sebagai penanda genetik salah satunya adalah karena mtDNA terdapat dalam *copy* yang tinggi, sehingga memudahkan dalam pengisolasian dan purifikasi untuk berbagai keperluan analisa genomnya (Duryadi 1994). Selain itu, laju evolusinya tinggi (yaitu 10x lebih cepat dibandingkan pada DNA inti), diturunkan secara maternal (*maternal inheritance*) dan mempunyai jumlah *copy* tinggi. Basa-basa dari gen mitokondria ini dapat di buat copynya dalam jumlah besar dengan mengamplifikasinya melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

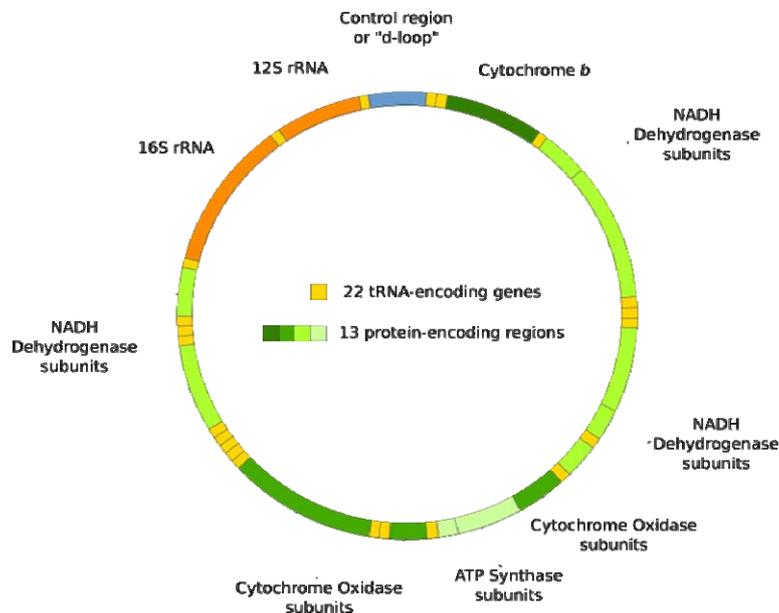
Kajian komperatif daerah non koding dari DNA mitokondria (D-loop) dari famili *Rhinocerotidae* telah dilakukan secara mendalam yaitu bagian dari segmennya telah diketahui terbagi menjadi tiga bagian utama yaitu *central conserved region*, *left peripheral domain*, dan *right peripheral domain*. Kedua *peripheral domain* tersebut mengapit *central conserved regional*. Daerah *peripheral domain* diketahui sebagai daerah yang sangat bervariasi (*hypervariable*) karena cepat bermutasi, terjadinya deleksi, atau insersi dan bahkan terjadi pengulangan pada segmen tertentu. Oleh karena perubahan urutan nukleotida di *peripheral domain* yang tinggi, maka D-Loop digunakan secara luas dalam kajian populasi dan evolusi genetik pada mamalia (Douzery & Randi 1997). Sedangkan di *central conserved region* menunjukkan urutan nukleotida antar spesies dengan tingkat kesamaan yang tinggi sehingga daerah ini bersifat konserve (Brown *et al.* 1986).

Beberapa peneliti telah menggunakan genom mtDNA untuk analisis keragaman antar spesies maupun intra spesies terutama pada daerah non coding (CR) yaitu daerah yang mengandung D-loop. Diantara peneliti tersebut adalah Morales *et al.* (1994) Morales *et al.* (1997), Xu *et al.* (1996), Fernando *et al.* (2006), O'Ryan *et al.* (1993). Penanda ini telah menunjukkan kemampuannya dalam membedakan keragaman antar spesies maupun intra spesies.

Sekitar 99% dari material genetik organisme eukariot terdapat dalam inti dan sisanya 1% terdapat di dalam mitokondria. Mitokondria adalah organel di sitoplasma tempat berlangsungnya respirasi. DNA mitokondria mengandung sejumlah gen penting untuk respirasi dan fungsi lainnya. Secara fisik mtDNA ini terpisah dari DNA lainnya, sehingga relatif lebih mudah untuk mengisolasinya (berukuran relatif kecil yaitu hanya 16.000-20.000 pasang basa) dibandingkan jika harus mengisolasi milyaran nukleotida dari genom inti (Wallace 1982).

DNA mitokondria berbentuk sirkuler berutas ganda. Setiap mtDNA memberi kode untuk terbentuknya 2 RNA ribosom, 22 RNA transfer dan 13 polipeptida (beberapa belum diketahui fungsinya). Posisi pada mtDNA telah terpetakan, yang terdiri dari daerah 12SrRNA, 16SrRNA, ND1, ND2, CO I, CO II, ATP, CO III, ND3, ND4, ND5, ND6, Cyt b dan D-loop (*displacement loop*)

yang terkait dalam proses replikasi (Brown *et al.* 1979). Adapun genom mitokondria mamalia dapat dilihat pada gambar 4 berikut ini.



Gambar 4 Genom mitokondria mamalia

(<http://www.mitomap.org/MITOMAP/mitomapgenome>)

Posisi yang berbeda dari masing-masing gen-gen mitokondria tersebut ternyata memiliki laju evolusi dengan kecepatan yang berbeda pula, yaitu ada yang bersifat relatif konserve (laju perubahannya kecil) seperti 16S rRNA dan 12S rRNA, lajunya sedang (cytokrom b) dan lajunya cepat (CO I & D-Loop).

Daerah D-loop atau dikenal juga dengan nama "daerah kontrol" (*control region*) yaitu tempat yang mengatur replikasi dan transkripsi mtDNA yaitu awal dari replikasi rantai berat (Ho) (Foran *et al.* 1988). Daerah ini telah dibuktikan merupakan bagian yang paling bervariasi pada genom mitokondria. Laju mutasi pada daerah ini diperkirakan lima kali lebih cepat dibandingkan dengan bagian lain pada genom mitokondria ((Douzery & Randi 1997). Mamalia mempunyai D-Loop terletak antara tRNA^{PRO} dan tRNA^{Phe} (Foran *et al.* 1988). Daerah ini terdiri dari 3 bagian yaitu : a) bagian kanan D-Loop (region I) yang mengandung Promotor Rantai Berat (HSP) dan Promotor Rantai Ringan. Pada bagian ini juga terdapat daerah Sekuen Conserve Bloks (CSB 1-3) serta repeat tandem; b) bagian tengah yang merupakan Daerah Central Conserve (CCR) berfungsi pada

pengaturan dari replikasi (Saccone *et al.* 1991). Diluar CCR masih pada bagian tengah ini terdapat tiga Conserve Sekuen Bloks (CSB 1-3) pada ujung tiga dari rantai ringan yang berlokasi antara promotor rantai ringan (L- Strand) dan rantai berat (H-strand). CSB ini diasosiasikan sebagai inisiasi dari replikasi rantai berat.; c) bagian kiri D-Loop yang terdiri dari daerah *termination associated sequence* (TAS) dan bagian lain berupa beberapa dari daerah repeat tendem yang terletak dekat dengan tRna^{Pro} (Saccone *et al.* 1991). Panjang fragment sekuensi yang terkecil berukuran 20 bp (Cunningham & Meghen 2001).

Analisis pada daerah CR (D-loop) digunakan untuk melihat keragaman antar subspecies ataupun antar populasi (Brown 1985). Daerah yang mengandung D-Loop ini diketahui amat cepat berkembang dari bagian mtDNA lainnya. Hal ini karena terjadinya akumulasi substitusi basa, proses insersi dan delesi yang lajunya amat cepat bila dibandingkan dengan DNA inti (Foran *et al.* 1988). Pada manusia diketahui laju substitusi daerah tersebut kira-kira 2,8 – 5 kali lebih tinggi dari pada laju daerah genom Mt lainnya (Taylor *et al.* 2001). D-loop cocok digunakan untuk mendeteksi perbedaan sekuen nukleotida pada hewan vertebrata (Aquadro & Greenberg 1982). Analisis mtDNA pada D-loop juga telah digunakan untuk menduga keragaman genetik dan struktur populasi pada hewan avertebrata (Brown *et al.* 1988).

Cytochrome c oxidase (CO I) merupakan enzim mitokondria, terdiri atas Cytochrome c oxidase I, II dan III (Michel *et al.* 1998). CO I dapat digunakan sebagai DNA barcoding (Moritz & Cicero 2004) telah digunakan diantaranya pada jenis burung di Amerika utara dan jenis burung yang telah di barcoding tersebut dilaporkan berjumlah (260- 667 spesies). CO I merupakan gen kandidat sebagai DNA barcoding karena memiliki konsentrasi sekuens asam amino yang tinggi dan besar kemampuan pada primer yang digunakan. Menurut (Hebert *et al.* (2003) CO I merupakan resolusi dalam mengetahui keanekaragaman pada semua jenis hewan. Hal ini menunjukkan bahwa gen CO I cukup variable diantara spesies yang dapat digunakan sebagai marker dalam menentukan filogeni dan studi populasi. Selain itu gen CO I mutasinya lebih besar di bandingkan dengan 12S dan 16S (Hebert *et al.* 2003).

Polymerase Chain reaction (PCR)

Langkah awal untuk menganalisis DNA adalah memecah genom DNA menjadi fragmen-fragmen spesifik yang berukuran lebih kecil. Secara alami DNA dan protein merupakan suatu molekul polimer yang keberadaannya selalu terkait dengan RNA. Sedangkan dalam menganalisis DNA kualitasnya (kemurniannya) sangat menentukan untuk proses analisis selanjutnya. DNA murni dengan jumlah memadai dapat diperoleh dengan cara mengisolasi DNA memakai prosedur tertentu yang telah dijamin hasilnya baik, kemudian mengamplifikasinya memakai mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Isolasi DNA adalah proses pemisahan fragmen DNA target dari material sel yang diekstraksi, sedangkan amplifikasi DNA adalah proses perbanyakan atau sintesis sekuen DNA target dari total genom DNA. Metode PCR adalah pengganti dari penggunaan cloning untuk memperoleh jumlah purifikasi yang lebih tinggi dari bagian spesifik pada DNA genom.

Teknik PCR merupakan teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* yang digunakan untuk mensintesa sekuen DNA tertentu secara enzimatik dengan menggunakan dua primer oligonukleotida yang menghibridisasi untai DNA yang berlawanan dan mengikat daerah target DNA. Primer-primer yang digunakan untuk inisiasi proses PCR adalah sekuen pendek (kira-kira 20-30 basa nukleotida) yang menunjukkan kesamaan sekuen tinggi (khususnya pada ujung 3' & 5') pada daerah flanking (mengikat) target sekuen.

Proses PCR dimulai dengan pemisahan utas ganda DNA menjadi utas tunggal dengan cara pemanasan pada suhu 94°C – 95°C (tahap denaturasi), kemudian dilanjutkan dengan pelekatan primer pada tiap untai DNA utas tunggal yang bertindak sebagai template/cetakan (tahap annealing), selanjutnya masuk pada tahapan pemanjangan utas DNA (tahap elongasi) dimana prosesnya dibutuhkan bahan pembangun basa nukleotida berupa dNTP (dATP, dGTP, dCTP dan dTTP) dan enzim polymerase untuk mensintesa pembuatan DNA utas lain yang merupakan komplemen dari DNA cetakannya. Reaksi ini baru dapat dimulai jika ada primer dengan urutan basa yang spesifik sebagai titik awal pemanjangan yang mengikat target gen/fragmen yang ingin direplikasi. Tahapan tersebut diulang dengan jumlah siklus tertentu (minimal 25x) dari proses Denaturasi-Annealing-

Elongasi. Menurut Saiki *et al.* (1988), reaksi PCR terdiri dari tiga tahap siklus yaitu tahap 1. yang merupakan tahap temperature tinggi untuk denaturasi DNA (kira-kira 95⁰C); tahap ke-2 yang merupakan tahap temperatur rendah (kira-kira 50⁰C) untuk penempelan primer pada template DNA; dan tahap ke-3 yang merupakan tahap intermediate yaitu kira-kira (72⁰C) dimana Taq Polymerase membangun sekuen diantara primer. Jumlah target akan meningkat hampir ekponensial karena set template baru dihasilkan setiap siklus, siklus biasanya diulang 34 - 45 kali. Ada beberapa yang harus diperhatikan dalam proses amplifikasi dengan PCR seperti konsentrasi DNA, panjang primer, komposisi basa primer, dan temperature hibridisasi primer (kondisi PCR), agar pita-pita yang diperoleh utuh dan baik (Wilhelm *et al.* 2003).

PCR mampu menghasilkan karakter data DNA yang spesifik dan akurat pada berbagai penelitian ekologi molekuler, evolusi, biosistematik, biologi populasi dari berbagai spesies. Produk PCR dapat disekuensi memakai mesin pensekuen secara otomatis seperti ABI System 377 atau ALP Express II sehingga datanya dapat dianalisis memakai berbagai program yang tersedia untuk keperluan studi seperti tersebut diatas.

Peranan Konservasi Genetik

Dicerorhinus sumatrensis merupakan salah satu satwa endemik Sumatera, oleh karena itu keberadaan satwa ini harus dipertahankan dan berarti bahwa biodiversitasnya harus tetap terjaga dan terpelihara. Mempertahankan keanekaragaman genetik dalam suatu populasi merupakan salah satu cara dari manajemen populasi spesies yang terancam, dan keragaman turut menentukan keberhasilan populasi untuk dapat beradaptasi kedalam lingkungan yang berubah-ubah. Individu dengan alel tertentu atau kombinasi alel mungkin memiliki sifat-sifat yang sesuai yang diperlukan untuk bertahan dan berkembang biak didalam kondisi yang baru.

Keanekaragaman yang dimiliki dalam suatu populasi inilah yang berpengaruh pada kemampuan adaptasi dalam menghadapi perubahan lingkungan secara terus menerus. Selain itu berkurangnya populasi suatu spesies juga dipengaruhi oleh terfragmentasinya suatu habitat yang akan mendorong terjadinya

penurunan genetika dalam populasi. Hal ini disebabkan oleh faktor *gen flow* (putusnya aliran gen), *inbreeding* dan meningkatnya *genetic drift* antar populasi (Frankham *et al.* 2002).

Usaha konservasi dalam melindungi keberadaan badak Sumatera terus dilakukan, konservasi spesies langka menjadi penting bukan hanya jumlah populasi dan kemampuan berkembangnya yang terbatas. Satwa-satwa tersebut memiliki daya dukung terhadap kelangsungan hidup di alam. Oleh karena itu, konservasi terhadap keanekaragaman hayati menjadi penting sebab fungsi-fungsi mereka di alam tidak dapat tergantikan dan saling berkaitan. Selain itu upaya konservasi badak Sumatera secara genetik perlu dilakukan segera, agar informasi plasma nutfah bagi kepentingan jangka panjang dan mendasar dapat diketahui, sehingga usaha konservasi hewan ini dapat dilakukan terarah.

Perkembangan teknik molekuler seperti penemuan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) yang mampu mengamplifikasi untai DNA hingga mencapai konsentrasi tertentu, penggunaan untai DNA sebagai marker dalam proses PCR, penemuan lokus mikrosatelit dan penemuan metode sekuensing DNA telah menyebabkan ilmu genetika molekuler mempunyai pengaruh yang sangat besar dalam studi biologi suatu populasi.

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, termasuk mampu beradaptasi terhadap penyakit-penyakit yang ada di alam. Sebagai contoh, suatu populasi dengan keragaman genetik yang rendah dapat kita umpamakan sebagai suatu kelompok individu yang saling bersaudara satu sama lain. Sehingga dalam jangka panjang, perkawinan yang terjadi di dalam kelompok tersebut akan merupakan perkawinan antar saudara (*inbreeding*). Kejadian *inbreeding* ini akan menyebabkan penurunan kualitas reproduksi dan menyebabkan suatu individu menjadi sensitif terhadap patogen. Dengan mengetahui status genetik suatu populasi, kita dapat merancang program konservasi untuk menghindari kepunahan suatu spesies.

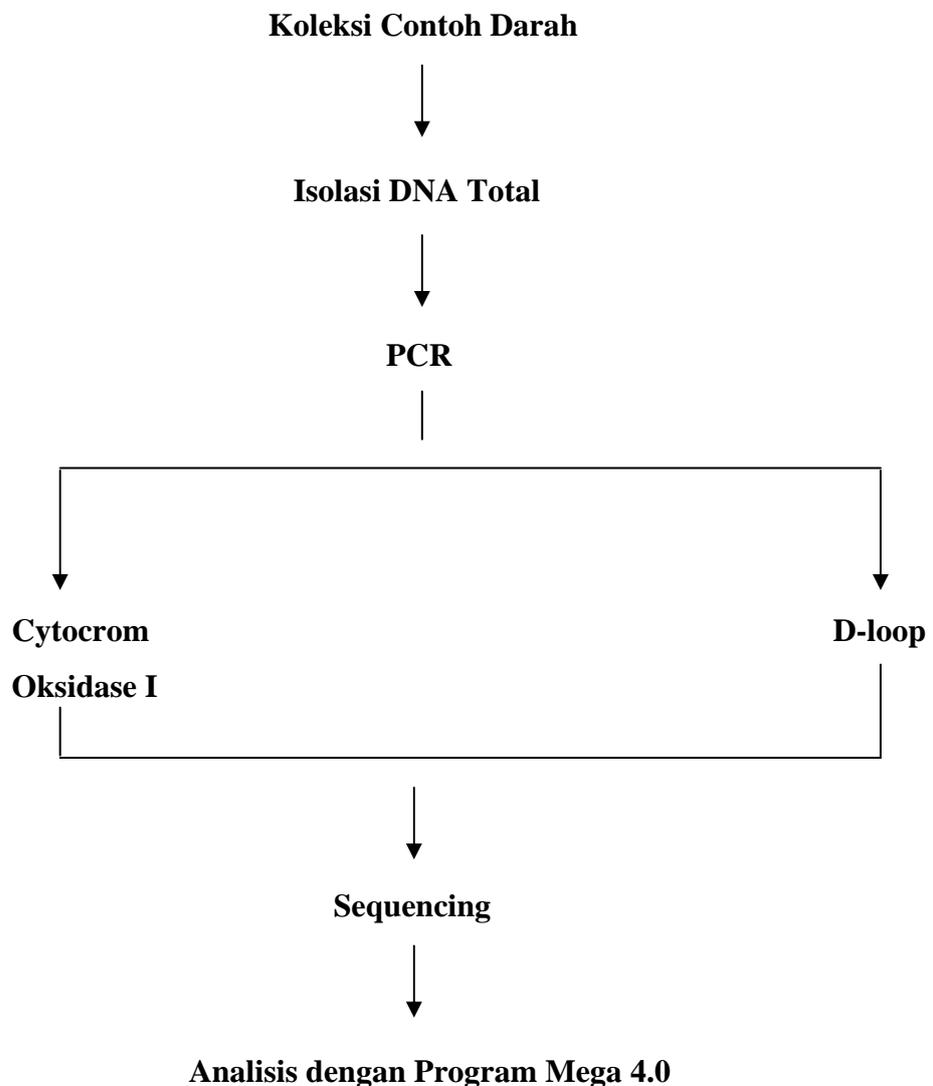
BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati & Bioteknologi (PPSHB), LPPM, Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini telah dilakukan sejak Maret 2007 sampai dengan Maret 2008.

Tahapan Penelitian

Tahapan dari penelitian ini dilakukan sesuai dengan prosedur di bawah ini:



Koleksi Contoh Darah

Sample darah berasal dari SRS (Suaka Rhino Sumatera) TN Way Kambas (Lampiran 1). Sample berupa darah dari 2 ekor badak sumatera berjenis kelamin betina (Rosa berasal dari TN. Bukit Barisan Selatan/TNBBS & Bina berasal dari Bengkulu) dan 2 ekor badak jantan asli indonesia tetapi telah lama ditangkarkan di kebun binatang Inggris (Los Angeles Zoo) dan Amerika (Cincinnati Zoo) yaitu (Torgamba berasal dari Riau & Andalas kedua induknya berasal dari Bengkulu) (Lampiran 2). Darah diambil dengan menggunakan disposable syringe 10 ml pada daerah *vena auricularis* (bagian telinga) dari masing-masing individu badak, kemudian darah dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diisi alkohol absolut sebanyak 10 ml, dan di beri label menurut masing-masing sampel individu. Tabung yang telah berisi darah ini dikocok dan kemudian disimpan rapi untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium.

Isolasi DNA Total

Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode Duryadi (2005). Darah badak Sumatera yang disimpan dalam alkohol absolut diambil dan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml (eppendorf tube), dicuci dengan Tris-EDTA konsentrasi rendah (*low TE*) dengan disentrifugasi 3000 rpm selama dua menit kemudian diulang sebanyak 3 kali dengan tujuan untuk menghilangkan kandungan alkohol yang terdapat di dalam sampel darah badak Sumatera (Duryadi 2005). Kemudian ditambahkan *lysis buffer* (0,32 M Sucrose, 1% (v/v) Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-Hcl pH 7,4) 1 kali volume (500 µl), dikocok homogen. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 6500 rpm dengan eppendorf centrifuge selama 1 menit. Selanjutnya supernatan dibuang, endapan ditambah washing buffer (75 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0) 1 kali volume 200 µl dan dikocok homogen. Setelah itu larutan ditambah dengan digestion buffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris Hcl pH 9.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 1% (v/v) SDS (Sodium Dodecyl- Sulphate), 0.1 mg/ml RNase, 0.5 mg/ml Proteinase K) sebanyak 500 µl dan dikocok homogen. Sample diinkubasi dalam inkubator pada suhu 55⁰C selama semalam (16 jam). Purifikasi DNA Total mengikuti Duryadi (2005). Suspensi setelah diinkubasi pada suhu 55⁰C ditambah fenol sebanyak 500 µl, dicampur rata

kemudian disentrifugasi 13.000 rpm selama 3 menit. Fase air di bagian atas yang mengandung DNA dipindahkan ke tabung baru, kemudian ditambah kloroform isoamil alkohol (CIAA) sebanyak 500 µl, dan dicampur rata. Fase atas dipisahkan dengan sentrifugasi 13.000 rpm selama 3 menit. Cairan bagian atas dipindahkan ke dalam tabung baru, ditambah etanol absolut 2x volume. Gumpalan DNA diendapkan dengan sentrifugasi 13.000 rpm selama 5 menit. Endapan DNA dicuci menggunakan etanol 70 % sampai terendam, kemudian sentrifugasi 13.000 rpm selama 3 menit. DNA yang diperoleh dikeringkan pada suhu ruang. DNA dilarutkan dalam larutan TE (10 mM Tris-HCL; 1 Mm edta, pH 8,0), kemudian diinkubasi pada pemanas air pada suhu 37⁰C selama 15 menit. Sampel DNA disimpan pada suhu -20⁰C. DNA dilihat kualitasnya dengan dimigrasikan pada gel agarosa 1,2% dengan menggunakan buffer 1xTBE (89mM Tris, 89mM asam borat dan 2mM EDTA,pH 8,0). Pengamatan dilakukan dengan bantuan UV (300 nM) setelah gel diwarnai dengan ethidium bromide (0,5 g/ml).

Amplifikasi CO I dan D-loop DNA Mt

Amplifikasi CO I dan D-loop DNA Mt menggunakan pasangan *primer* hasil desain sendiri berdasarkan data runutan badak India (*Rhinoceros unicornis*) dengan kode akses (NC001779). Primer tersebut didesain menggunakan software primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Kedua pasang primer tersebut yaitu Primer untuk mengamplifikasi sekuen CO I partial (RHCOIF & RHCOIR) dan D-Loop partsial (RHDLF & RHDLR).

Proses amplifikasi CO I dan daerah D-Loop menggunakan mesin GeneAmp^R PCR system 2400 (Perkin Elmer). Kondisi PCR yang digunakan adalah : predenaturasi pada suhu 94⁰C, dilanjutkan dengan siklus utama, yaitu tahap denaturasi pada suhu 94⁰C selama 45 detik, tahap penempelan primer (*annealing*) pada suhu 51⁰C, dan tahap polimerasi (*extension*) pada suhu 72 ⁰C diulang sebanyak 35 siklus. Reaksi PCR diakhiri dengan polimerasi (*final exstension*) pada suhu 72 ⁰C. Dan proses amplifikasi CO I sama kondisinya dengan daerah D-loop hanya yang berbeda tahap penempelan primer (*annealing*) pada suhu 58⁰C.

Adapun reaksi PCR untuk tiap campuran baik pada daerah D-loop dan CO I adalah 50 µl dengan komposisi air 34,25µl, 5 µl buffer PCR, MgCl 2,5 µl, 1 µl dNTP mix, primer RHLDF atau RHCOIF, primer RHLDR atau RHCOIR, 5 µl DNA templete dan 0,25 µl Taq DNA polymerase (Promega).

Sekuencing Fragmen COI dan D-Loop Parsial

Peruntan DNA hasil PCR di lakukan di PT. CHAROEN POKPCHAND INDONESIA.

Analisis Data

Data-data polimorphisme panjang fragmen dianalisis dengan menggunakan program MEGA versi 4.0 Beta Release (Moleculer Evolutionary Genetic Analysis) (Tamura *et al.* 2007). Sebagai spesies pembanding digunakan badak putih Afrika (*Ceratorium simum*) kode akses (NC001808), badak hitam Afrika (*Diceros bicornis*) kode akses (NC388287), badak India (*Rhinoceros unicornis*) kode akses (NC001779). Analisis filogeni menggunakan perangkat lunak MEGA versi 4.0 dengan metode bootstrapped Neighbor-Joining (NJ) memakai 1000 kali pengulangan. Hasil analisis program MEGA tersebut akan diperoleh matriks jarak genetik berdasarkan persamaan basa nukleotida.

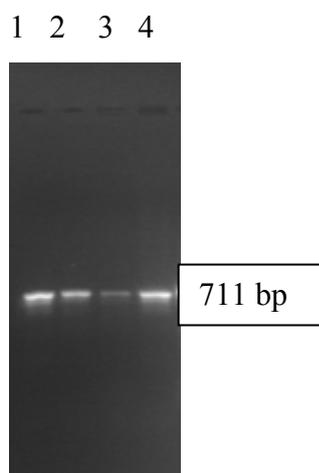
HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA Total

Penelitian ini menggunakan empat sampel darah dari *Dicerorhinus sumatrensis* yang berasal dari SRS TN. Way Kambas Lampung. Hasil purifikasi DNA totalnya setelah dimigrasikan pada gel agarose 1.2 % disajikan pada Gambar 5. DNA total hasil isolasi tersebut selanjutnya digunakan sebagai DNA

mengamplifikasi pada gen CO I badak Sumatera

Daerah CO I menghasilkan fragmen DNA berukuran 711 bp pada semua contoh *Dicerorinus*. Hasil amplifikasi pasangan *primer* tersebut terdapat dalam Gambar 7.



Keterangan: No 1. Torgamba; No.2. Andalas; No.3. Rosa; No. 4. Bina.
Gambar 7 Hasil amplifikasi daerah CO I dengan menggunakan pasangan *Primer* RHCOIF dan RHCOIR setelah dimigrasikan dalam gel agarose 1.2 % pada tegangan 90 volt selama 45 menit

Keberhasilan amplifikasi gen CO I sangat ditentukan oleh kondisi penempelan primer pada DNA genom selain faktor-faktor bahan pereaksi PCR dan mesin PCR yang digunakan.

Sekuensi CO I Parsial dan Keragaman Runutan Nukleotida

Setelah dilakukan sekuensing pada produk PCR dari dua arah yaitu baik primer Forward maupun primer Reverse didapatkan hasil sekuen sepanjang 711 bp. Sekuen ini baru merupakan bagian sekuen utuh dari CO I yang berukuran 1544 bp pada badak India, *Rhinoceros unicornis* (kode acces NC001779) dan sekuen tersebut terletak pada posisi ke-22 (5371 urutan sekuen utuh mitokondria *R.unicornis*) sampai dengan posisi basa ke- 772 (6081 urutan sekuen utuh mitokondria *R.unicornis*). Namun setelah dilakukan pensejajaran dengan badak India (kode acces NC001779) dan badak putih Afrika (kode acces NC0018081), menunjukkan situs beragam. Adapun perbedaan susunan nukleotida yang terdapat antara keempat badak Sumatera dengan outgroupnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 Perbedaan susunan basa Nukleotida badak India, badak putih Afrika, dari GenBank dan empat individu badak Sumatera hasil penelitian ini (n=716)

	<i>R. unicornis</i>	<i>C. simum</i>	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina
<i>R. unicornis</i>	-					
<i>C. simum</i>	103	-				
Torgamba	99	100	-			
Andalas	99	100	12	-		
Rosa	95	93	10	10	-	
Bina	100	101	5	10	11	-

Tabel 4 menunjukkan perbedaan basa nukleotida diantara keempat individu badak Sumatera dengan badak India adalah berkisar 95 – 100 nukleotida sedangkan dengan badak putih Afrika 93 – 101 nukleotida. Akan tetapi diantara keempat badak Sumatera sendiri perbedaan hanya 5 – 11 nukleotida. Rosa (♀) memiliki beda nukleotida 10 dengan Torgamba (♂), dan dengan Andalas (♂) memiliki perbedaan 10 nukleotida. Antara Rosa (♀) dengan Bina (♀) terdapat perbedaan 11 Nukleotida, sedangkan antara Torgamba (♂) dengan Andalas (♂) berbeda 10 nukleotida. Hanya antara Torgamba (♂) dengan Bina (♀) perbedaannya relatif kecil yaitu hanya 5 nukleotida.

Berdasarkan ukuran runutan CO I parsial sepanjang 716 bp pada badak Sumatera, badak India dan badak Afrika, maka didapatkan situs-situs spesifik khususnya pada badak Sumatera sebesar 67% (Lampiran 6). Hasil ini menunjukkan bahwa badak Sumatera memiliki situs-situs yang tidak dimiliki badak India dan badak Afrika sehingga badak Sumatera mempunyai ciri khusus.

Jarak Genetik badak Sumatera dan Outgrupnya badak India dan Afrika

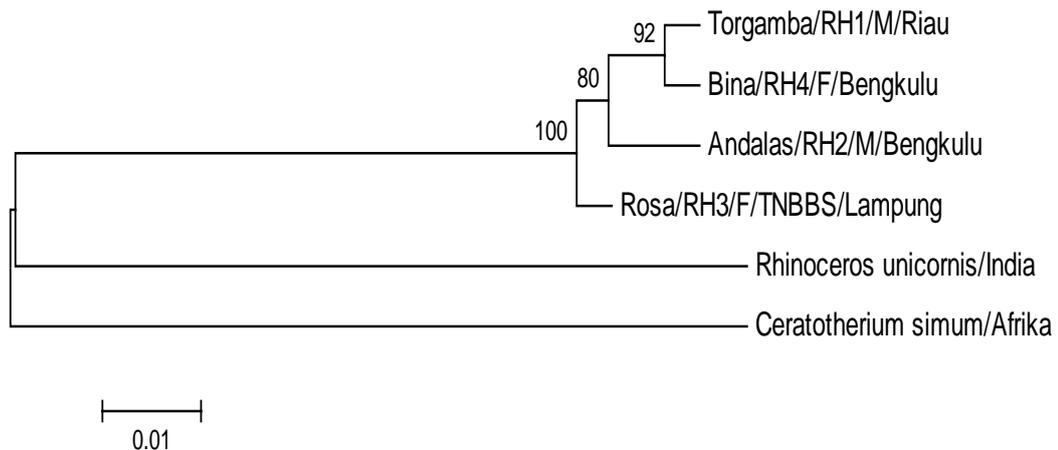
Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar individu badak Sumatera dan spesies badak lain. Melalui penggunaan analisis perhitungan *Pairwis Distance* dengan *P-distance* dapat ditunjukkan matriks perbedaan genetik antara badak Sumatera dan badak outgroup (badak India dan badak putih Afrika) yang datanya diambil dari GenBank. Tabel 5 menunjukkan hasil jarak genetik berdasarkan perbedaan sekuen COI.

Tabel 5 Jarak genetik berdasarkan metode *Pairwis Distance* dengan *p-distance* pada badak India dan badak putih Afrika GenBank dan empat individu badak Sumatera hasil penelitian ini (n=716)

	<i>R. unicornis</i>	<i>C. simum</i>	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina
<i>R. unicornis</i>	-					
<i>C. simum</i>	0.147	-				
Torgamba	0.142	0.143	-			
Andalas	0.142	0.143	0.017	-		
Rosa	0.136	0.133	0.14	0.014	-	
Bina	1.142	0.144	0.007	0.014	0.016	

Hasil perhitungan berdasarkan daerah CO I parsial menunjukkan nilai jarak genetik berkisar antara (0,016) sampai (0,147). Dari tabel diatas terlihat bahwa keempat badak Sumatera memiliki jarak genetik relatif besar bila dibandingkan dengan outgrupnya. Adapun dendogramnya dapat dilihat pada Gambar 8.

Hubungan Kekerabatan Badak Sumatera Berdasarkan Sekuen CO I

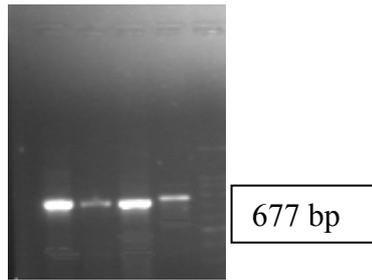


Gambar 8 Dendrogram Neighbor-Joining dengan pengolahan bootstrap 1000 ulangan dari nukleotida daerah CO I parsial badak Sumatera, badak India dan badak putih Afrika (berukuran 716 nt)

Dari gambar 8 terlihat bahwa badak putih Afrika berbeda kelompok dengan badak Asia. Di dalam kelompok badak Asia terlihat bahwa badak India sama satu kelompok dengan badak Sumatera (Indonesia) walaupun memiliki perbedaan jumlah cula. Dan di dalam badak Sumatera (Indonesia) sendiri terjadi keragaman. Torgamba terlihat satu kluster dengan Bina, namun Andalus dan Rosa terlihat jauh kekerabatannya baik dengan Torgamba maupun Bina.

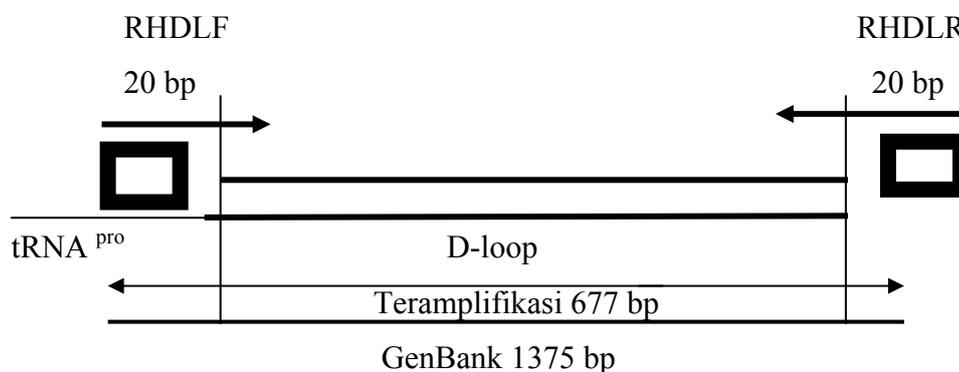
Amplifikasi D-loop DNA Mt

Amplifikasi daerah *D-Loop* partial pada badak Sumatera menggunakan primer RHDLF dan RHDLR menghasilkan fragmen DNA berukuran 677 bp pada semua contoh *Dicerorinus*. Profil DNA hasil amplifikasi menggunakan primer RHDLF dan RHDLR disajikan pada Gambar 9.



Keterangan: No 1. Torgamba; No.2. Andalas; No.3. Rosa;No. 4. Bina
 Gambar 9 Hasil amplifikasi daerah D-loop dengan menggunakan pasangan primer RHDLF dan RHDLR setelah dimigrasikan dalam gel agarosa 1.2 % pada tegangan 90 volt selama 45 menit

Berdasarkan runutan genom utuh DNA mitokondria *Rhinoceros unicornis* (Badak India) dengan kode akses (NC001779) dari GenBank. Produk PCR hasil amplifikasi pasangan primer RHDLF menempel pada gen tRNA^{Pro} pada posisi ke-25 sampai dengan 44 (15412-1531) dan primer RHDLR menempel pada fragmen daerah D-loop bagian tengah terletak pada posisi basa ke 665 (16119-16138) (Lampiran 4). Ilustrasi letak penempelan pasangan primer RHDLF dan RHDLR pada daerah D-loop badak Sumatera terdapat dalam Gambar 10.



Gambar 10 Sketsa letak penempelan primer RHDLF dan RHDLR untuk mengamplifikasi pada daerah D-loop badak Sumatera

Sekuensi Daerah D-loop Parsial dan Keragaman Runutan nukleotida

Setelah dilakukan sekuensing pada produk PCR dari dua arah yaitu baik primer Forward maupun primer Reverse didapatkan hasil sekuen sepanjang 721 bp (sekuen standarnya adalah sekuen *Rhinoceros unicornis* dengan kode akses NC001779). Sekuen ini terdiri dari sekuen tRNA^{Pro} sepanjang 42 bp dan bagian awal D-Loop sepanjang 679 bp. Sekuen ini merupakan setengah bagian dari

sekuen utuh D-loop yang berukuran 1375 bp pada *Rhinoceros unicornis* (kode acces NC001779). Adapun perbedaan susunan nukleotida yang terdapat antara keempat badak Sumatera dengan outgroupnya dapat dilihat pada Tabel 6 dan sekuen utuhnya pada Lampiran 3.

Tabel 6 Perbedaan susunan basa Nukleotida empat individu badak Sumatera hasil penelitian ini dengan standar nukleotida badak India dari GenBank (679 nukleotida)

	<i>R. unicornis</i>	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina
<i>R. unicornis</i>	-				
Torgamba	104	-			
Andalas	110	38	-		
Rosa	105	5	38	-	
Bina	111	102	103	103	-

Tabel 6 menunjukkan perbedaan basa nukleotida antara empat individu badak Sumatera dengan badak India adalah berkisar 104 – 111 nukleotida. Akan tetapi diantara keempat badak Sumatera sendiri perbedaannya terkecil adalah 5 nukleotida (antara Rosa vs Torgamba) dan Bina(♀) dengan ketiga badak lainnya yaitu Andalas(♂), Rosa (♀), dan Torgamba (♂) dengan jumlah perbedaan masing-masing sebesar 103, 103, dan 102 nukleotida. Antara Rosa (♀) dengan Bina (♀) terdapat perbedaan 103 Nukleotida, sedangkan antara Torgamba (♂) dengan Andalas berbeda 38 nukleotida. Hanya antara Torgamba (♂) dengan Bina perbedaannya relatif besar yaitu hanya 102 nukleotida, sedangkan dengan Andalas (♂) berbeda 103 nukleotida. Perbedaan antara Rosa (♀) dengan Andalas (♂) adalah sebesar 38 nukleotida, sedangkan Torgamba (♂) dengan Andalas (♂) 38 nukleotida. Tabel 7 menunjukkan perbedaan basa nukleotida antara empat individu badak Sumatera dengan badak India dengan badak Afrika adalah berkisar 103 – 128 nukleotida. Berdasarkan ukuran runutan D-loop parsial sepanjang 679 bp pada badak Sumatera, badak India dan badak putih Afrika dan badak hitam Afrika, maka didapatkan situs-situs spesifik khususnya pada badak Sumatera sebesar 77% (Lampiran 7).

Tabel 7 Perbedaan susunan basa Nukleotida empat individu badak Sumatera hasil penelitian ini dengan standar nukleotida badak India dari GenBank (679)

	<i>R. unicornis</i>	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina	<i>C. simum</i>	<i>D. bicornis</i>
<i>R. unicornis</i>	-						
Torgamba	97	-					
Andalas	101	32	-				
Rosa	97	2	32	-			
Bina	106	98	98	98	-		
<i>C. simum</i>	109	104	106	103	120	-	
<i>D. bicornis</i>	119	104	119	114	128	74	-

Jarak Genetik Badak Sumatera dan Outgrupnya badak India dan Afrika

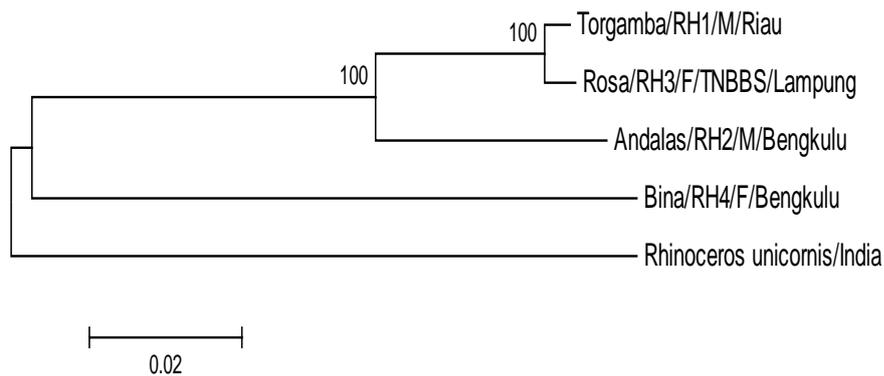
Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar badak Asia yaitu empat individu badak Sumatera dan satu individu badak India melalui penggunaan analisis perhitungan *Pairwis Distance dengan nilai p-distance*. Matrik perbedaan jarak genetik dari kelima badak tersebut dapat dilihat pada tabel 8 dan dendogramnya dapat dilihat pada Gambar 11.

Tabel 8 Jarak genetik berdasarkan metode *Pairwis Distance dengan P-distance* pada empat individu badak Sumatera dengan badak India dan badak putih Afrika (n = 679)

	<i>R. unicornis</i>	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina
<i>R. unicornis</i>	-				
Torgamba	0.154	-			
Andalas	0.162	0.056	-		
Rosa	0.155	0.007	0.056	-	
Bina	0.164	0.151	0.152	0.152	-

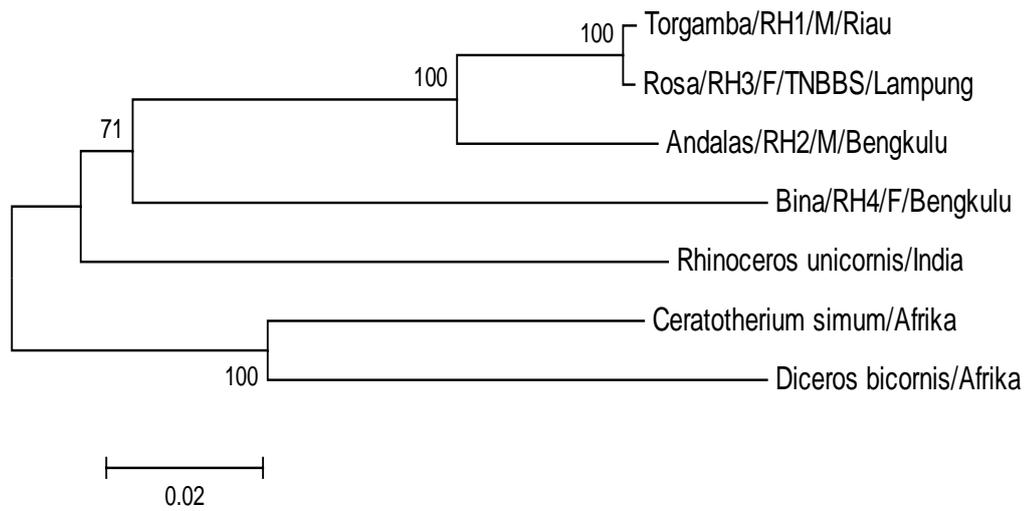
Jarak genetik menunjukkan Individu badak Sumatera Bina berbeda sebesar 0.151 – 0.152 dengan ketiga individu lainnya sedangkan Rosa memiliki jarak genetik yang sangat dekat dengan Torgamba sebesar 0.007 namun dengan Andalas sangat jauh sebesar 0.056.

Hubungan Kekerabatan Berdasarkan Sekuen D-loop DNA Mt



Gambar 11 Dendrogram D-Loop berdasarkan p-distance dengan Neighbor-Joining menggunakan pengolahan bootstrap 1000 ulangan (679 nukleotida)

Dari dendrogram pada Gambar 11 tersebut terlihat bahwa pola D-loop sama dengan COI yaitu badak India satu kluster dengan badak Sumatera walaupun memiliki cula yang berbeda, dan kelompok badak Sumatera sendiri terjadi keragaman. Torgamba menunjukkan satu kluster dengan Rosa, hal ini perlu mendapat perhatian di dalam proses reproduksinya bahwa Torgamba tidak boleh kawin dengan Rosa karena memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat yaitu sebesar 100, jika hal ini terjadi maka akan terjadi *inbreeding*. Sedangkan Andalas terlihat jauh hubungannya baik dengan Rosa ataupun Bina, hal ini adalah kesempatan yang sangat baik di dalam proses reproduksinya bahwa Andalas boleh kawin dengan kedua badak betina tersebut. Dendrogram ini tidak berubah ketika ditambahkan dengan 2 spesies badak Afrika (*Ceratotherium simum* dan *Diceros bicornis*) yaitu badak Asia terpisah dengan badak Afrika. Akan tetapi antara badak Sumatera dan badak India walaupun berbeda dalam jumlah cula tetapi masuk dalam satu kelompok/kluster terdapat pada Gambar 12.



Gambar 12 Dendogram D-Loop berdasarkan p-distance Dengan Neighbor Joining menggunakan pengolahan bootstrap 1000 ulangan (679 nukleotida).

PEMBAHASAN UMUM

Badak di dunia termasuk dalam satu famili yaitu Rhinocerotidae. Namun demikian genusnya terbagi menjadi empat (Xu & Arnason 1996) yaitu 1) Rhinoceros yang terdiri dari *Rhinoceros sondaicus* terdapat di Ujung Kulon, Jawa Barat (Indonesia) dan *Rhinoceros unicornis* terdapat di Assam (India); 2) Dicerorhinus yang terdiri dari *Dicerorhinus sumatrensis* ada di Sumatera (Indonesia); 3) Diceros terdiri dari *Diceros bicornis* terdapat di Kenya, Tanzania, Cameroon, Afrika selatan, Namibia dan Zimbabwe (Afrika) dan; 4) Ceratotherium yang terdiri dari *Ceratotherium simum* terdapat di dua daerah bagian Africa: 1) Chad selatan, Sudan bagian barat, Zaire bagian timur, dan Uganda bagian barat; 2) Angola bagian tenggara, bagian Mozambique, Zimbabwe, Botswana, Namibia timur, dan Taman Nasional Afrika. Berdasarkan karakteristik sekuen gen CO I, walaupun baru parsial 716 bp didapatkan bahwa badak Asia terpisah dengan badak Afrika. Karakteristik jumlah cula tidak memisahkan Afrika dengan Asia karena baik di Afrika maupun di Asia badak bercula dua dapat ditemukan. Namun pada badak bercula satu hanya terdapat di Asia dan tidak terdapat di Afrika. Dari data COI, badak bercula satu Asia dan badak bercula dua Asia masuk dalam satu kelompok (Cluster). Walaupun sama-sama bercula dua, badak Sumatera terpisah dari badak bercula dua Afrika. Dengan demikian pengelompokan dan penamaan genus berdasarkan jumlah cula tidak tepat lagi secara genetik. Pada badak Afrika penamaan genusnya tidak didasarkan atas jumlah cula namun untuk membedakannya dilakukan berdasarkan warna kulit yaitu berkulit putih (*Ceratotherium*) dan berkulit hitam (*Diceros*).

Menurut John Edward Gray (1868) bahwa genus *Ceratotherium* merupakan turunan dari kata *greek* Cerato yang artinya *keras pada culanya* (horn) dan *therion* = "beast" artinya liar. Sedangkan *Simum* merupakan turunan dari kata Greek *simus* yang memiliki arti "flat nosed". Dengan demikian perbedaan badak Afrika selain warna kulit juga berdasarkan cula dan bentuk hidung. Hasil yang didapatkan terlihat nyata bahwa badak Sumatera sangat berbeda secara genetik dengan badak Afrika yang sama-sama memiliki dua cula, dan badak Sumatera lebih dekat dengan badak Jawa dan badak India yang hanya memiliki satu cula.

Hal ini menunjukkan perbedaan jumlah cula tidak mempengaruhi hubungan kekerabatan, namun kedekatannya lebih didasarkan pada sebaran geografinya. Sebaran geografi badak Sumatera dilaporkan sampai ke daerah India yang merupakan habitat *Rhinoceros unicornis*. Menurut Penny (1987); Foose & van Strein (1997); dan WWF (2002), badak Sumatera mempunyai daerah penyebaran yang luas yaitu meliputi daerah Bengal (India), Burma, Pegunungan Thailand, Kamboja, Vietnam, Laos dan Malaysia. Menurut (Groves 1983) dalam hipotesanya menyatakan bahwa perbedaan tersebut terjadi karena adanya pemisahan geografi ("*geographic split*") adanya perbedaan tersebut tidak berhubungan dengan jumlah cularnya.

Berdasarkan dendogram dari daerah D-loop parsial pengelompokan badak Sumatera, badak India dan badak putih Afrika polanya hampir sama dengan hasil pada COI, yaitu badak Asia terpisah dengan jelas dengan badak Afrika. Akan tetapi antara badak Sumatera dan badak India walaupun berbeda dalam jumlah cularnya tetap masuk dalam satu kelompok. Apabila ada data genetik sekuen COI dan D-Loop badak Jawa maka hasilnya akan lebih menarik lagi.

Pada pengelompokan badak Sumatera sendiri menunjukkan terjadi keragaman berdasarkan data D-loop. Torgamba menunjukkan satu kluster dengan Rosa, walaupun secara geografis letak sebaran keduanya cukup jauh yaitu Torgamba berasal dari Riau sedangkan Rosa berasal dari TN. Bukit Barisan Selatan dan lebih dekat letak sebarannya dengan Bina dan Andalas yang berasal dari Bengkulu. Namun hal ini dapat terjadi mungkin saja jutaan tahun lalu antar populasi badak di Sumatera belum terfragmentasi sehingga kemungkinan masih dapat saling bertemu walaupun letaknya jauh dan masih dapat saling berhubungan.

Baik COI dan D-Loop pemisahan antar spesies konsisten terjadi yaitu badak Asia terpisah dengan badak Afrika. Namun pada pengelompokan individu diantara badak Sumatera tidak sama.

Dari hasil marka genetik yang digunakan pada spesies lain baik mamalia dan burung (Douzery & Randi 1997; Aquardo & Greenberg 1982; Brown *et al.* 1982; Quinn & Wilson 1993) marka genetik D-Loop terbukti sangat cocok membedakan antar individu dalam spesies yang sama. Hal ini dapat terjadi karena

pada daerah D-loop ini diketahui amat cepat berkembang dari bagian mtDNA lainnya. Terjadinya akumulasi substitusi basa, proses insersi dan delesi pada daerah ini lajunya amat cepat bila dibandingkan dengan daerah lain pada genom mitokondria apalagi dengan DNA inti (Brown *et al* 1982). Lebih khusus lagi pada daerah D-loop menurut Douzery & Randi (1997) terutama pada region I yaitu daerah dekat t-RNA prolin hingga sepertiga dari bagian total D-loop merupakan daerah hyper variabel. Daerah inilah yang pada penelitian ini kami sekuen kandungan nukleotidanya. Oleh karena itu kami memilih untuk mengelompokkan individu badak sumatera hasil marka D-Loop kami jadikan sebagai acuan untuk menilai hubungan kekerabatan yang jelas diantara keempatnya bukan berdasarkan marka CO I.. Walaupun dengan marka CO I ini juga terjadi pemisahan namun kami anggap kurang representatif karena umumnya marka ini sangat baik untuk pemisahan antar spesies.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Berdasarkan dendogram daerah CO I parsial pengelompokan badak Sumatera dengan badak India terlihat satu kluster/kelompok sedangkan badak Afrika berbeda.
2. Berdasarkan dendogram dari daerah D-loop parsial pengelompokan badak Sumatera dengan badak India, badak putih Afrika dan badak hitam Afrika memiliki pola yang sama dengan hasil pada CO I.
3. Dari hasil penelitian ini terjadi perbedaan hasil pemisahan individu antara marka genetik CO I dan D-loop DNA mitokondria namun marka genetik yang lebih akurat digunakan dalam membedakan antar individu dalam satu spesies adalah D-loop. Namun keduanya dapat digunakan secara akurat untuk pemisahan antar spesies yang berbeda.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan pada gen *cytochrome-b* mtDNA dalam penentuan keragaman genetik spesies badak Sumatera.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan bagian lain selain darah dalam menganalisis DNA badak Sumatera.
3. Perlu dilakukan mendesain ulang primer gen CO I dan D-loop mtDNA untuk mendapatkan hasil target sequencing yang lebih panjang.

DAFTAR PUSTAKA

- Alikodra HS. 2002. *Pengelolaan satwaliar jilid 1*. Departemen Pendidikan dan kebudayaan Direktorat Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- Aquardo CF, Greenberg BD. 1982. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *J Genetics*. 103: 287-312.
- Brown WM, George M, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *J Genetics*. 76 (4):1967-1971.
- Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC. 1982. Mitochondrial DNS sequences primates: Tempo and Mode of Evolution. *J Mol Evol*. 18:225-239.
- Brown WM. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J Mol Biol*. 28 (2): 503-511.
- Brown, Dowling ET, Moritz C, WM .1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18:269-292.
- Brown WM, Hixson JE, Foran RD. 1988. Comparisons of ape and human sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and D-loop DNA synthesis. *J Nucleic Acids Research*. 18(3):1-20.
- Charleswort D, Charleswort B. 1987. inbreeding depression and its evolutionary consequence. *Annual review of Ecology and Systematics*. 18: 237-268.
- Christine MS, Cox S.M, Chambers B, Macbryde L, Thomas. 1983. *Genetics and conservation*. Benjamin/cummings publishing. California.
- Clayton DA. 1984. transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu Rev Biochem*. 53: 574-594.
- Corneli PS, Ward HR. 2000. Mitochondrial Genes and Mammalian Phylogenies: Increasing the Reliability of Branch Length Estimation. *J Molecular Biology and Evolution*. 17: 224-234.
- Cunningham, Meghen MC. 2001 .Biological identification systems: genetic markers. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*. 20 (2): 491-499.
- Douzery E, Randi E. 1997. The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *J Molecular Biology and Evolution*. 14: 1154-1166.

- Duryadi D. 1994. peran DNA mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. *J Hayati* 1(1):1-4.
- Duryadi D. 1997. *Isolasi dan purifikasi mitochondrian (mtDNA)*. Laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSH) Institut Pertanian Bogor, 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.
- Ehrlich RP, Dobkin DS, Wheye D. 1988. A land-bridge island perspective on mammalian extinctions in western North American parks. *Nature*.325:430 – 432.
- Ellstrand NC *et al.* 1993. Population genetic consequences of small population Size; implications for plant conservation. Annual review of ecology and systematics.
- Eric *et al.* Comparisons of mitochondrial DNA in Black and White rhinoceroses.1993. *J Conservation Biology* 74 (2): 342-346.
- Faber JE, Stepien CA. 1998. Tandemly Repeated Sequences in the Mitochondrial DNA Control Region and Phylogeography. *J Molekuler pylogenetics and evolution* 10(3):10–32.
- Fernando P, Polet G, Foad N, Linda. 2006. Genetic diversity, phylogeny and conservation of the Javan rhinoceros (*Rhinoceros sondaicus*). *Journal Conservation Genetik*. 7: 439-448.
- Frankham RJD *et al.* 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Foose TJ. 2005. *INTERNATIONAL STUDBOOK for SUMATRAN RHINO (Dicerorhinus sumatrensis)*. International Rhino Foundation (IRF).
- Foose, van Strein NJ. 1997. *Asian rhinos-status survey and conservation action plan*. IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge.
- Foran DR, Hixson JE, BrownWM. 1988. Comparisons of ape and hum sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and D-loop DN synthesis. *J Nucleic Acids*. 16: 13-19.
- Groves CP. (1983). Phylogeny of the living species of rhinoceros. *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* 21: 293–313.

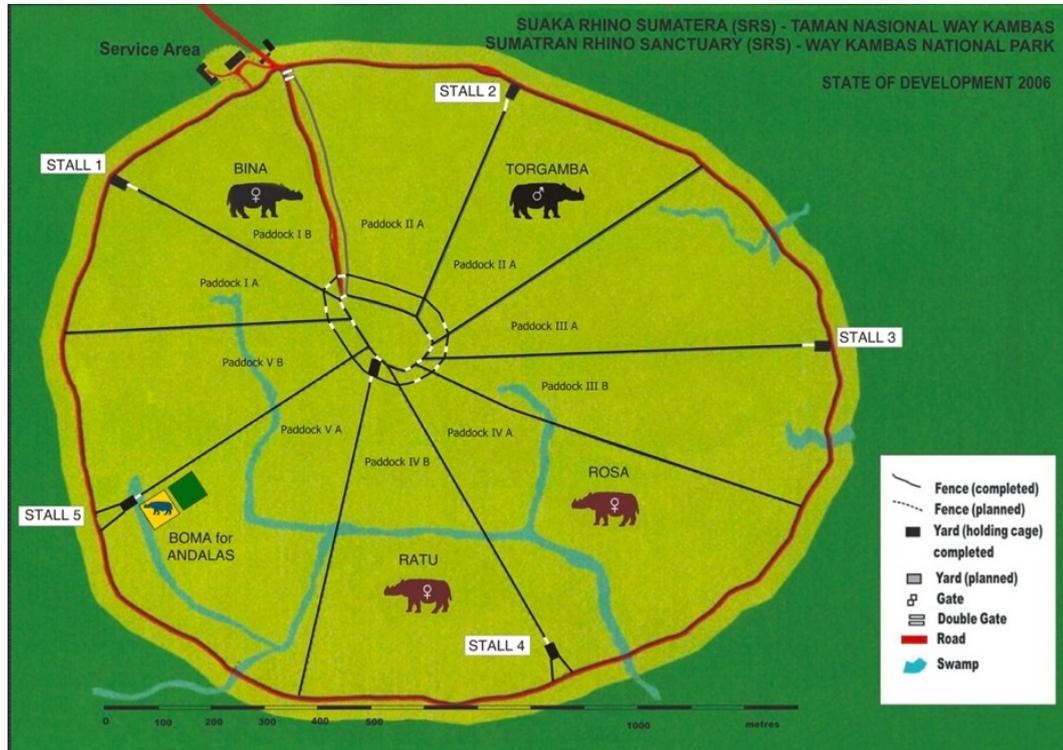
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *J Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)*. 270:313–321.
- Hubback. 1939. The Asiatic Two-Horned Rhinoceros. *Journal of Mammalogy*. 20(1): 1-20.
- Ishida N et al. 1994. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *J Anim Genetics*. 25: 215-221.
- Isnain W, Subrata DD, Van strein NJ. 2005. Indonesian rhino Conservation Programme (IRCP) 2004 Annual report and summary of relevant data. Pusat Konservasi Badak Indonesia. Bogor.
- IUCN. 1996. *The IUCN red list of threatened animals*, IUCN, Gland, Switzerland.
- Jama M, Zhang Y, Aman RA, Ryder OA. 1993. Sequence of the mitochondrial control region, tRNAT, tRNAPro and tRNAPhe genes from the black rhinoceros, *Diceros bicornis*. *J Nucleic Acids* 21: 18-28.
- Jorde JB, Bamshad M, Rogers AR. 1998. Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution. *BioEssays*. 20: 126–136.
- Kim CB, Shashikant CS, Sumiyama K, Wang WCH, Amemiya CT, Ruddle FH. . 2003. Phylogenetic analysis of the mammalian *Hoxc8* non-coding region. *Journal of Structural and Functional Genomics*. 3: 195–199.
- Kumar S, Tamura K, Dudley J, Nei M. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. 2007. *J Mol Biol Evol*. 24(8): 1596-1599.
- Lekagul B, McNelly. 1977. *Mammals of Thailand*. Sahakarnbhat Co. Bangkok.
- Li WH, Li CT. 2002. Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene sequences. *J Mol. Evol.* 41: 952-957.
- Michel H, Behr J, Harrenga A, Kannt A. 1998. Cytochrome c oxidase: Structure and Spectroscopy. 1998. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:329–56.
- Miller HC, Ambert DM. 2003. An evaluation of methods of blood preservation for RT-PCR from endangered species. *J Conservation Genetics*. 4: 651-654.
- Mirol PM, García PF, Dulout FN. 2002. Mitochondrial variability in the D-loop of four equine breeds shown by PCR-SSCP analysis. *J Genetics and Molecular Biology*. 25(1): 25-28.
- Morales JC, Melnick DJ. (1994). Molecular Systematics of the living rhinoceros. *Mol. Phyl. Evol.* 3: 128–134.

- Morales JC, Andau, Supriatna, Zainuddin, Melnick DJ. 1997. Mitochondrial DNA Variability and Conservation Genetics of the Sumatran Rhinoceros. *J Conservation Biology*. 11: 539-543.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM. 1987: Evolution of animal mitochondrial DNA relevance for population biology and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* . 18: 269-291.
- Moritz C, Cicero C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *journal.pbio*. 2: 1528-1531.
- Nasri MA. 2008. Karakteristik genetik sapi Aceh menggunakan analisis keragaman fenotipik, daerah D-loop DNA Mitokondria dan DNA mikrosatelit. [Disertasi]. Bogor. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Nowak RM. 1991. *Walker's mammals of the world*. University Pers. Baltimore & London.
- O’Ryan C, Harley HE. 1993. Comparisons of mitochondrial DNA in black and white rhinoceroses. *Journal of Mammalogy* 74: 343-346.
- O’Ryan C, Flamand JRB, Harley HE. 1994. Mitochondrial DNA variation in black rhinoceros (*Diceros bicornis*): conservation management implications. *Conservation Biology*. 8: 495-500.
- Penny M. 1987. *Rhino Endangered Spesies*. Christopher Helm London. London.
- Primack. 1998. *Biologi Konservasi*. Yayasan Obor. Indonesia
- Quinn TW, Wilson AC. 1993. Sequence Evolution In and Arounds the Mitochondrial Control region in Birds. *J Mol Evol* 37: 417-425
- Rachio L, Joel B. 1998. Reproduction and Population Density. Trade Offs for The Conservation of Rhino in situ. *Animal Conservation*. 1: 101-1061.
- Romi IM. 2007. Evaluasi performa kuda pacu Indonesia dan variasi sekuen DNA Mitokondria kuda (*Equus caballus*) [Tesis]. Bogor. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Saccone C, Pesole G, Sbisà E. 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: Structure–function model and evolutionary pattern. *J. Mol. Evol.* 33: 83–91.
- Shabalina SA, Spiridonov NA. 2004. The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. *J Genome Biol.* 5(4): 105-111.

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *J Science*. 239:487-491.
- Swart MKJ, Ferguson JWH, Du Toit R, and Flamand JRB. 1994. Substantial Genetic Variation in Southern African Black Rhinoceros (*Diceros bicomis*) *The Journal of Heredity*. 85(4):261-266.
- Soule ME. 1983. *Genetics and conservation*. Benjamin/cummings publishing. California.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Advance Access published May 7. Oxford University Press. Mol Bio 10. 1093/molbev/msm092.
- Taylor RW, Taylor GA, Durham SE, Turnbull DM. 2001. the termination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations. *J Nucleic Acids*. 29: 21-31.
- Tougaard C, Delefosse T, Catherine, Montgelard C. 2001. Phylogenetic Relationships of the Five Extant Rhinoceros Species (Rhinocerotidae, Perissodactyla) Based on Mitochondrial Cytochrome *b* and 12S rRNA Genes. *J Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19:34-44..
- Van Strien NJ. 1985. *The Sumatran Rhinoceros Dicerorhinus sumatrensis (Fiscer, 1814) in The Gunung Leuser National Park, Sumatera, Indonesia, Its Distribution, Ekology and Conservation*. Privately Publisher.
- Wallace. 1982. Structure and Evolution of Organelle Genomes. *J Mikrobiologi*. 46(2):208-240 .
- Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M. 2003. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *J Nucleic Acids*. 31:319-327
- WWF (World Wide Fund). 2002. *Asian Rhinos- Spesies Status Report*. WWF.
- Widarteti. 1999. Kekerabatan kukang (*Nycticebus coucang*) di Indonesia dengan menggunakan penanda control region DNA Mitokondria (mtDNA) melalui PCR [Tesis]. Bogor. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Xu X, Janke A, Arnason U. 1997. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Greater Indian Rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*, and the Phylogenetic Relationship Among Carnivora, Perissodactyla, and Artiodactyla (+ Cetacea). *Mol. Biol. Evol* 13 (9):1167-1173.

- Xu X, Gullberg A, Arnason. 1996. The Complete Mitochondrial DNA (mtDNA) of the Donkey and mtDNA Comparisons Among Four Closely Related Mammalian Species-Pairs. *J Mol Evol* . 43:438–446.
- Xu X, Arnason U. 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of the white Rhinoceros, *Ceratotherium simum*, and comparison with the the mtDNA Sequence of the Indian Rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*. *J Moleculer Phylogenetics and Evol* . 7(2): 189-194.
- Yayasan Mitra Rhino. 1998. *Program Konservasi badak Sumatera*. Laporan Tahunan Bidang Survey dan Patroli Rhino Protection Unit (RPU) Taman Nasional Way Kambas periode Desember 1996 - Desember1998.
- Yang DY, Speller CF. 2006. Co-amplification of cytochrome *b* and D-loop mtDNA fragments for the identification of degraded DNA samples. *J Molecular Ecology*. 6: 605-608.
- Zein MSA. 1998. Karakteristik morfologi, genetika dan nilai normal darah rusa Jawa (*Cervus timorensis timorensis*) [Tesis]. Bogor. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Lampiran 1 Lokasi pengambilan sample empat badak Sumatera di Suaka Rhino Sumatera (SRS) TN Way Kambas Lampung



Sumber: Suaka Rhino Sumatera (SRS)

Lampiran 2 Profil sample darah empat badak Sumatera untuk analisis gen CO I dan daerah D-loop DNA Mt

Data Badak di SRS



Nama: TORGAMBA

1. Jenis Kelamin : Jantan
2. Ditangkap di Riau pada 25 Nov 1985
3. Dikirim ke Port Lympne Zoo Park, Inggris pada 5 April 1986
4. Kembali ke Way Kambas, 8 Jan 1998
5. Perkiraan umur 27 tahun.
6. Berat badan: \pm 680 kg.



Nama: BINA

1. Jenis kelamin: Betina
2. Ditangkap di Bengkulu pada 17 Mey 1991
3. Dikirm ke Taman Safari Bogor pada 2 Sept 1991
4. Dikirim ke Way Kambas pada 8 Jan 1998
5. Perkiraan umur 22 tahun.
6. Berat badan: \pm 700 kg.

**Nama: ROSA**

1. Jenis Kelamin: Betina
2. Diselamatkan dari sekitar kawasan di luar TNBBS setelah selama hampir dua tahun sering keluar hutan TNBBS, pada 20 November 2005
3. Perkiraan umur: \pm 5 tahun.
4. Berat badan: \pm 590 kg.

**Nama: ANDALAS**

1. Jenis Kelamin: jantan
2. Ditranslokasi dari Kebun Binatang Los Angeles pada 20 Februari 2007. Andalus adalah anak badak Sumatra pertama yang lahir di kebun binatang Cincinnati Zoo dari induk badak jantan bernama Ipuh dan betina bernama Emi yang berasal dari Bengkulu.
3. Perkiraan umur: 6 tahun.
4. Berat badan: \pm 750 kg.

Lampiran 3 Lokasi penempelan primer RHCOIF dan RHCOIR pada sekuen basa nukleotida gen COI parsial badak Sumatera

Sekuen COI (5351..6895)

Pasangan primer RHCOIF dan RHCOIR



```

5341 cactttacct atgttcatta accgctgatt attttcaacc aaccacaaag acattggcac
5401 tctataacct ttatttggcg cctgagctgg aatagtagga accgacctaa gccttcta
5461 tcgocccgaa ttaggtcagc cgggacctt actaggtgat gatcaaatc acaatgtag
5521 cgtgactgcc catgcattcg taataatfff ctttatggtt atgcccatta taattggagg
5581 attcggaaac tgattgggtc cattaataat tggagcacct gacatagcat ttccccgaat
5641 aaataatata agcttctgac tcttaccacc atcatttctt cttctgcttg catcatcaat
5701 agttgaagcc ggtgcccggaa caggctggac tgtctaccct cccctagccg gcaatctagc
5761 ccatgcagga gcttctgttg acctaacctt cttttcccta cacctagcag ggatctcctc
5821 aatfffftagg gccatcaact ttatcactac gattattaat ataaaaccac cagccatac
5881 ccagtaccag acacctctat tcgtatgatc cgtcctaatt acagcagtgc tactattatt
5941 agcactccca gtccctagcag caggaattac tatattacta acagaccgta acctaaacac
6001 caccttcttc gaccggcgag ggggaggtga ccctatccta taccaacatc tcttctgatt
6061 ctttgggtcac cccgaagtct acattctgat cctaccaggc tttgggataa tctcacacat
6121 tgttacatat tactcaggaa aaaaagagcc atttggttat ataggaatag tatgagctat
6181 aatatccatc ggattcttag ggttcattgt atgagcccac cacatattta cagttggaat
6241 agacgttgac acacgagcat actttacatc tgccactata attattgcta ttcccacagg
6301 cgtaaaagta tttagctgat tagccacctt tcacggaggg aatatcaaat gatcgccagc
6361 catgctatga gccctaggct ttatcttctt attcacagta ggaggcttaa ctggaattgt
6421 cctagctaac tcgtcactag atattgtact tcacgacaca tactatgtag tagcacactt
6481 ccaactatga ttatctatgg gagcagtatt tgctatcata ggaggattcg tccactgatt
6541 ccccttattc tcaggataca cactcaacca aacctgagca aaaattcact ttacaatcat
6601 attcgtgggg gtcaatataa ccttcttccc acaacatttt cttgggtctat caggaatacc
6661 tcgocgttac tcagattacc cagatgcata cacaacatga aataccattt catctatggg
6721 atccctcatc tcgctcacag cagtaatact catagtgttc atagtttgag aagcatttgc
6781 atccaaacga gaagtctcaa cagtagaact aacctctttt aacctagaat gactgcatgg
6841 atgccccctt ccaatcataa cattcgaaga gcctgtgtat gtgaatttaa agtaagaaag
6901 gaaggaatcg aacccccctt gactggtttc aagccaatat cataacctct atgtcttctt

```

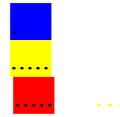
Keterangan: Primer RHCOIF menempel pada posisi basa ke 22 sampai dengan 57 gen CO I (5371 - 5397) dan primer RHCOIR menempel pada posisi basa ke-746 sampai 772 CO I (6066 -6091)

Lampiran 4 Lokasi penempelan primer RHDLF dan RHDLR pada sekuen basa nukleotida daerah D-loop parsial badak Sumatera

Sekuen tRNA Pro (15388 - 15453)

Sekuen D-loop (15454 – 16193)

Pasangan primer RHDLF dan RHDLR



```

15361 aggagaacac taccctcccc gagactttca aggaagaagc cctaacttca ccatcaacac
15421 ccaaagctga aattctactt aaactattcc ttgaacactc ctctcttaaa ccacaaacc
15421 ccaaagctga aattctactt aaactattcc ttgaacactc ctctcttaaa ccacaaacc
15481 ccaactatgt aacatgccag tattagtgac tcctatatgt ctcatacata atatattaca
15541 tcacactatg gttatgtaca tctgtcatta aattgtttgc cccatgcata taagcatgta
15601 cattatatta ttgatcttac ataagacatt aggtcattaa taagacataa gcattaagca
15661 cagtgtatga atatcctcga cccaagcgat gttgattaat attgcatagt acatacagtc
15721 attgatcgta cataccccat tcaagtcaaa tcatttccag tcaacatgcg tatcataacc
15781 aatagtccgt accgcttaat cagcaagccg cgggaaatca tcaaccctct cacccaatgc
15841 cctcgttctc gctccgggcc catgaactgt gggggtttct atgtctgaaa ctatacctgg
15901 catctggttc ttacttcagg accatctcac ctaaaatcgc ccactctttc cccttaata
15961 agacatctcg atggactaat gactaatcag cccatgatca cacataactg tgggtgcatg
16021 catttggtat tttttatatt ttgggatgac tatgactcag ctatggcctt cagaggcctt
16081 aacacaggca agcaaattgt agctggactt aaattgaacg ttattcctcc gcatatccaa
16141 ccatatggtg ttattcagtc aatggaatcg ggacatacac atacacgtac gcacacatgt
  
```

Keterangan: Primer RHDLF menempel pada posisi basa ke 25 sampai dengan 44 gentRNA Pro (15412 - 15430) dan primer RHDLR menempel pada posisi basa ke-665 sampai 684 dengan D-loop (16119 - 16138)

Lampiran 5 Komposisi bahan pereaksi yang digunakan untuk isolasi DNA dari sample darah

No	Nama Pelarut	Nama Bahan	Satuan Bahan
1.	Lysis buffer	Sukrosa Tritn X-100 MgCl ₂ Tris-Hcl	0.32 M 1%w/v 5 mM pH 7,4
2.	Digestion buffer	Nacl Tris-Hcl pH 9.0 EDTA pH 8.0 SDS Proteinase K RNase	200 mM 50 mM 100 mM 1%mg/ml 0.5 mg/ml 0.1 mg/ml
3.	Rinse buffer	NaCl EDTA	75 mM 50 mM
4.	Larutan fenol	Fenol kristal dipanaskan Hydroxyquinoline phenol Tris pH 8,0 Tris pH 8,0 Tris HCl	 1% dari berat fenol 0,5 M 0,1 M 0,1 M+0,2 % betamecaptoetahanol
5.	Larutan CIAA	Kloroform (CHCl ₃) Iso Amyl Alcohol Iso Amyl Alkohol	24 bagian 1 bagian
6.	TE 1x buffer	EDTA pH 8,0 RNase Tris-HCL Ph 8,0	1mM 20 ug/ml 10 mM
7.	TBE 10x buffer untuk 1000 ml	Tris-base Boric acid EDTA pH 8,0	108 g 55 g 40 ul
8.	Alkohol absolut Alkohol 40%		

Lampiran 8 Situs-situs spesifik badak Sumatera berdasarkan sekuen CO I

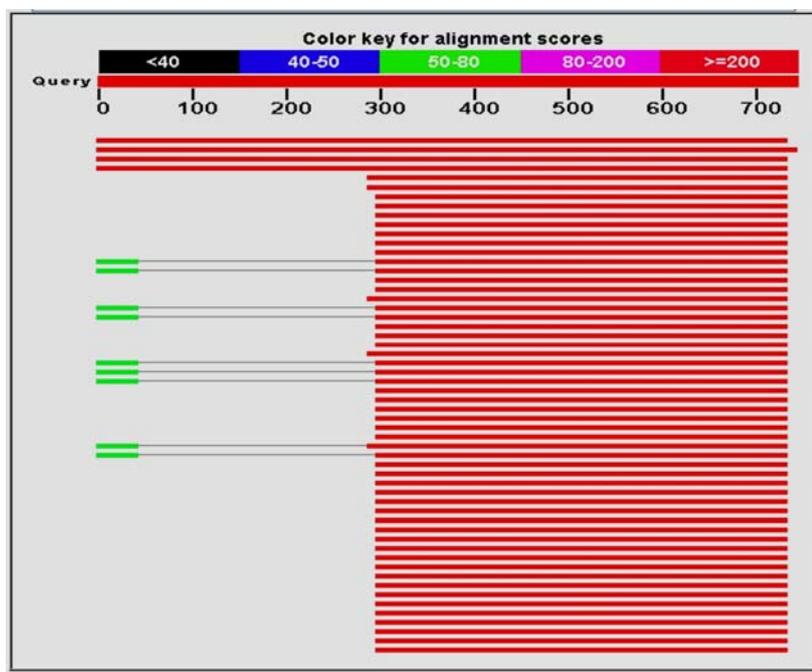
Posisi	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina	India	Afrika
10 (31)	C	C	A	A	delesi(-)	delesi(-)
17(38)	A	A	A	A	delesi(-)	delesi(-)
18(39)	C	C	C	C	delesi(-)	delesi(-)
19(40)	A	A	A	A	delesi(-)	delesi(-)
22(43)	G	A	A	G	A	A
36(57)	G	T	T	G	T	T
31(55)	C	C	C	C	C	T
37(58)	A	C	C	A	A	C
38(59)	A	T	T	A	T	T
39(60)	G	G	A	G	A	A
40(61)	G	T	T	G	C	C
41(62)	G	T	C	G	C	C
42(63)	T	G	T	T	T	T
43(64)	A	G	A	T	A	A
44(65)	G	G	C	C	T	C
46(67)	G	A	G	G	A	A
49(70)	T	G	T	T	T	T
55(76)	A	A	A	A	C	C
58(79)	G	G	G	G	A	A
61(82)	C	C	A	C	T	T
64(85)	A	G	T	T	delesi(-)	delesi(-)
77(98)	T	T	T	T	C	C
81(102)	T	T	T	T	C	C
89 (110)	C	C	C	C	T	T
101 (123)	T	T	T	T	C	T
105(127)	C	C	C	C	T	C
116(138)	T	T	T	T	C	T
120(141)	A	T	T	A	delesi(-)	delesi(-)
123 (144)	T	T	T	T	C	C
127(148)	T	T	T	T	C	C
150 (156)	C	C	C	C	T	T
174(171)	T	T	T	T	C	C
181(177)	A	A	A	A	C	C
177(195)	T	T	T	T	C	C
189(198)	G	G	G	G	A	A
195(210)	C	C	C	C	T	T
198 (213)	A	A	A	A	C	C
207(273)	A	A	A	A	G	G
213(276)	G	G	G	G	A	A
216(288)	C	C	C	C	T	T
238(300)	C	C	C	C	T	T
240(319)	C	C	C	C	T	A
246(321)	C	C	C	C	T	T
252(339)	C	C	C	C	T	A
318(342)	A	A	A	A	G	G
327(348)	C	C	C	C	A	T

339(360)	A	A	A	A	T	T
345(366)	T	T	T	T	C	C
360(381)	T	T	T	T	C	C
384(384)	A	A	A	A	G	G
391(387)	T	T	T	T	C	C
399(420)	T	C	T	C	T	T
420(441)	G	G	G	G	A	A
433(454)	T	T	T	T	C	C
439(460)	T	T	T	T	C	C
450(471)	C	C	C	C	G	G
456(477)	G	G	G	G	A	A
510(531)	T	T	T	T	C	C
531(552)	T	T	T	T	G	G
532(553)	T	T	T	T	C	C
571(592)	T	T	T	T	C	C
579(600)	G	G	G	G	A	T
588(609)	G	G	G	G	C	C
591(612)	C	T	A	A	delesi(-)	delesi(-)
601(622)	A	A	A	A	G	G
602(623)	A	C	G	T	delesi(-)	delesi(-)
612(633)	T	A	T	A	delesi(-)	delesi(-)
624(645)	A	T	A	T	delesi(-)	delesi(-)
649(670)	A	G	T	A	delesi(-)	delesi(-)
662(477)	G	G	G	G	A	A
671(692)	T	T	T	A	delesi(-)	delesi(-)
678(481)	C	C	C	C	T	T
681(702)	A	C	A	T	delesi(-)	delesi(-)

Lampiran 9 Situs-situs spesifik badak Sumatera berdasarkan sekuen D-loop DNA Mt

Posisi	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina	Badak India	Badak Putih Afrika	Badak Hitam Afrika
2 (52)	T	C	T	C	C	T	T
3(53)	T	T	T	T	T	A	A
6(57)	C	A	C	C	C	C	C
17(69)	T	T	T	T	C	T	C
21(72)	C	C	C	C	T	C	A
30(72)	T	C	T	C	C	delesi(-)	T
31(73)	G	G	G	G	G	A	C
40(81)	A	G	A	T	G	T	C
41(82)	T	C	T	C	T	C	A
42(83)	A	G	A	A	G	A	C
43(84)	A	T	A	C	A	C	T
44(100)	C	C	C	C	C	T	T
46(106)	C	C	C	T	C	C	C
49 (105)	A	G	A	C	A	T	T
51(117)	T	T	T	T	T	C	A
52(118)	A	A	A	A	G	A	A
56(122)	T	T	T	T	C	G	T
64(130)	G	G	G	G	A	C	C
74(140)	A	A	A	A	T	A	T
81(147)	C	C	C	G	T	T	C
82(148)	C	C	C	C	T	C	G
84(150)	C	C	C	C	T	G	T
138(204)	A	A	A	A	T	T	A
140(206)	C	C	C	C	T	T	C
148(214)	T	T	T	C	C	A	T
165(231)	T	T	T	T	G	A	T
175(253)	G	G	G	G	A	G	A
176(254)	A	A	A	T	G	A	G
182(300)	G	G	G	G	A	A	A
184(302)	A	A	A	A	C	C	T
197(315)	A	A	A	A	A	G	C
198(316)	C	C	C	C	T	C	A
209(327)	A	A	A	A	T	A	T
210(328)	T	T	T	T	C	T	A
211(329)	A	A	A	A	G	A	T
213(331)	A	A	A	A	C	C	C
220(338)	A	A	A	A	G	C	T
248(366)	A	A	A	A	G	A	T
250(368)	T	T	T	T	C	T	A
271(389)	C	C	C	C	T	C	C
288(406)	T	T	T	T	C	C	A
300(421)	A	A	A	A	G	G	T
314(435)	G	G	G	G	A	A	T
315(436)	T	T	T	T	G	T	T

316(437)	A	A	A	A	T	T	C
317(438)	T	T	T	T	C	C	C
320(441)	G	G	G	G	C	G	C
357(478)	T	T	T	T	C	T	C
358(479)	C	C	C	C	T	C	C
362(483)	T	T	T	T	C	T	C
395(516)	A	A	A	A	C	A	T
410(531)	G	G	G	G	T	G	A
412(533)	C	C	C	C	T	C	C
449(570)	G	G	G	G	A	G	C
470(591)	T	T	T	T	C	T	A
601(722)	A	A	A	A	G	A	A
661(782)	T	T	T	T	A	T	A

Lampiran 10 Hasil *blast* sekuens badak Sumatera pada situs NCBI

- [AF142096.1](#) Ceratotherium simum nuclear cytb, tRNA-Thr and tRNA-Pro pseudogenes, mitochondrial control region, and tRNA-Phe pseudogene, complete sequence; and 12S ribosomal RNA pseudogene, partial sequence
- [X97336.1](#) Rhinoceros unicornis complete mitochondrial genome
- [Y07726.1](#) Ceratotherium simum complete mitochondrial DNA sequence
- [L22010.1](#) Diceros bicornis mitochondrion transfer RNA-Phe and transfer RNA-Pro genes
- [AF220920.1](#) Equus burchelli isolate Grant's zebra 3 mitochondrial control region
- [AF220917.1](#) Equus burchelli isolate Grant's zebra 6 mitochondrial control region
- [AY246270.1](#) Equus caballus haplotype tb5 mitochondrial D-loop, complete sequence
- [AY246266.1](#) Equus caballus haplotype tb6 mitochondrial D-loop, complete sequence
- [AY246224.1](#) Equus caballus haplotype ex1 mitochondrial D-loop, complete sequence
- [AY246221.1](#) Equus caballus haplotype ex3 mitochondrial D-loop, complete sequence
- [AY246218.1](#) Equus caballus haplotype cl2 mitochondrial D-loop, complete sequence

- [AY246214.1](#) Equus caballus haplotype cl6 mitochondrial D-loop, complete sequence
- [AY246198.1](#) Equus caballus haplotype cs6 mitochondrial D-loop, complete sequence
- [DQ327946.1](#) Equus caballus haplotype ID71 D-loop, partial sequence; mitochondrial
- [DQ327916.1](#) Equus caballus haplotype ID29 D-loop, partial sequence; mitochondrial
- [DQ297634.1](#) Equus caballus voucher LIMGB 0013 D-loop, complete sequence; mitochondrial
- [AF354440.1](#) Equus caballus haplotype 16 mitochondrial D-loop, complete sequence
- [AF220929.1](#) Equus grevyi isolate Grevy's zebra 3 mitochondrial control region
- [AF014413.2](#) Equus caballus Mongolian horse#1 tRNA-Thr gene, partial sequence, tRNA-Pro gene, complete sequence, tRNA-Phe gene, partial sequence, mitochondrial genes for mitochondrial RNA, and D-loop, complete sequence
- [AF014405.1](#) Equus caballus Cheju horse#1 tRNA-Thr gene, partial sequence, tRNA-Pro gene, complete sequence, tRNA-Phe gene, partial sequence, mitochondrial genes for mitochondrial RNA, and D-loop, complete sequence

EF597513.1	Equus caballus breed Naqu mitochondrion, complete genome	497	574	65%	2e-137	97%
AY246236.1	Equus caballus haplotype hf6 mitochondrial D-loop, complete sequence	497	497	59%	2e-137	87%
AY246220.1	Equus caballus haplotype ex2 mitochondrial D-loop, complete sequence	497	497	59%	2e-137	87%
AY246184.1	Equus caballus haplotype ar5 mitochondrial D-loop, complete sequence	497	497	59%	2e-137	87%
AF220938.1	Equus asinus isolate SWA 1 mitochondrial control region	497	497	57%	2e-137	88%
AF220935.1	Equus hemionus isolate kulan 3 mitochondrial control region	497	497	57%	2e-137	87%
AF220934.1	Equus hemionus isolate kulan 1 mitochondrial control region	497	497	57%	2e-137	87%
AF220930.1	Equus grevyi isolate Grevy's zebra 1 mitochondrial control region	497	497	59%	2e-137	87%
AF220928.1	Equus grevyi isolate Grevy's zebra 2 mitochondrial control region	497	497	59%	2e-137	87%
AY914323.1	Equus quagga voucher South African Museum #35575 control region, partial sequence; mitochondrial	497	497	59%	2e-137	87%
AY914321.1	Equus quagga voucher Darmstadt Museum #HLMD-M-719 control region, partial sequence; mitochondrial	497	497	57%	2e-137	87%
AY914320.1	Equus quagga voucher Vienna Museum #710 control region, partial sequence; mitochondrial	497	497	57%	2e-137	87%
AY914319.1	Equus quagga voucher Munich Museum #A.M.541 control region, partial sequence; mitochondrial	497	497	57%	2e-137	87%
AY914318.1	Equus quagga voucher Peabody Museum #1623 control region, partial sequence; mitochondrial	497	497	57%	2e-137	87%
DQ327918.1	Equus caballus haplotype ID33 D-loop, partial sequence; mitochondrial	497	574	65%	2e-137	97%
DQ327910.1	Equus caballus haplotype ID21 D-loop, partial sequence; mitochondrial	497	574	65%	2e-137	97%
DQ327900.1	Equus caballus haplotype ID10 D-loop, partial sequence; mitochondrial	497	574	65%	2e-137	97%
DQ297638.1	Equus caballus voucher LIMGB 0017 D-loop, complete sequence; mitochondrial	497	497	59%	2e-137	87%
DQ297637.1	Equus caballus voucher LIMGB 0016 D-loop, complete sequence; mitochondrial	497	497	59%	2e-137	87%
AF354432.1	Equus caballus haplotype 8 mitochondrial D-loop, complete sequence	497	497	59%	2e-137	87%
DQ327949.1	Equus caballus haplotype ID74 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327943.1	Equus caballus haplotype ID68 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327939.1	Equus caballus haplotype ID64 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327937.1	Equus caballus haplotype ID62 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327932.1	Equus caballus haplotype ID56 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327931.1	Equus caballus haplotype ID54 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327923.1	Equus caballus haplotype ID40 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327922.1	Equus caballus haplotype ID39 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327917.1	Equus caballus haplotype ID32 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327915.1	Equus caballus haplotype ID26 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327914.1	Equus caballus haplotype ID25 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327913.1	Equus caballus haplotype ID24 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327912.1	Equus caballus haplotype ID23 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%
DQ327911.1	Equus caballus haplotype ID22 D-loop, partial sequence; mitochondrial	496	572	64%	8e-137	97%

Lampiran 11 Situs-situs spesifik badak Sumatera berdasarkan sekuen CO

I

Posisi	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina	India	Afrika
10 (31)	C	C	A	A	delesi(-)	delesi(-)
17(38)	A	A	A	A	delesi(-)	delesi(-)
18(39)	C	C	C	C	delesi(-)	delesi(-)
19(40)	A	A	A	A	delesi(-)	delesi(-)
22(43)	G	A	A	G	A	A
36(57)	G	T	T	G	T	T
31(55)	C	C	C	C	C	T
37(58)	A	C	C	A	A	C
38(59)	A	T	T	A	T	T
39(60)	G	G	A	G	A	A
40(61)	G	T	T	G	C	C
41(62)	G	T	C	G	C	C
42(63)	T	G	T	T	T	T
43(64)	A	G	A	T	A	A
44(65)	G	G	C	C	T	C
46(67)	G	A	G	G	A	A
49(70)	T	G	T	T	T	T
55(76)	A	A	A	A	C	C
58(79)	G	G	G	G	A	A
61(82)	C	C	A	C	T	T
64(85)	A	G	T	T	delesi(-)	delesi(-)
77(98)	T	T	T	T	C	C
81(102)	T	T	T	T	C	C
89 (110)	C	C	C	C	T	T
101 (123)	T	T	T	T	C	T
105(127)	C	C	C	C	T	C
116(138)	T	T	T	T	C	T
120(141)	A	T	T	A	delesi(-)	delesi(-)
123 (144)	T	T	T	T	C	C
127(148)	T	T	T	T	C	C
150 (156)	C	C	C	C	T	T
174(171)	T	T	T	T	C	C
181(177)	A	A	A	A	C	C
177(195)	T	T	T	T	C	C
189(198)	G	G	G	G	A	A
195(210)	C	C	C	C	T	T
198 (213)	A	A	A	A	C	C
207(273)	A	A	A	A	G	G
213(276)	G	G	G	G	A	A
216(288)	C	C	C	C	T	T

238(300)	C	C	C	C	T	T
240(319)	C	C	C	C	T	A
246(321)	C	C	C	C	T	T
252(339)	C	C	C	C	T	A
318(342)	A	A	A	A	G	G
327(348)	C	C	C	C	A	T
339(360)	A	A	A	A	T	T
345(366)	T	T	T	T	C	C
360(381)	T	T	T	T	C	C
384(384)	A	A	A	A	G	G
391(387)	T	T	T	T	C	C
399(420)	T	C	T	C	T	T
420(441)	G	G	G	G	A	A
433(454)	T	T	T	T	C	C
439(460)	T	T	T	T	C	C
450(471)	C	C	C	C	G	G
456(477)	G	G	G	G	A	A
510(531)	T	T	T	T	C	C
531(552)	T	T	T	T	G	G
532(553)	T	T	T	T	C	C
571(592)	T	T	T	T	C	C
579(600)	G	G	G	G	A	T
588(609)	G	G	G	G	C	C
591(612)	C	T	A	A	delesi(-)	delesi(-)
601(622)	A	A	A	A	G	G
602(623)	A	C	G	T	delesi(-)	delesi(-)
612(633)	T	A	T	A	delesi(-)	delesi(-)
624(645)	A	T	A	T	delesi(-)	delesi(-)
649(670)	A	G	T	A	delesi(-)	delesi(-)
662(477)	G	G	G	G	A	A
671(692)	T	T	T	A	delesi(-)	delesi(-)
678(481)	C	C	C	C	T	T
681(702)	A	C	A	T	delesi(-)	delesi(-)

Lampiran Situs-situs spesifik badak Sumatera berdasarkan sekuen

D-loop

DNA Mt

Posisi	Torgamba	Andalas	Rosa	Bina	Badak India	Badak Putih Afrika	Badak Hitam Afrika
2 (52)	T	C	T	C	C	T	T
3(53)	T	T	T	T	T	A	A
6(57)	C	A	C	C	C	C	C
17(69)	T	T	T	T	C	T	C
21(72)	C	C	C	C	T	C	A
30(72)	T	C	T	C	C	delesi(-)	T
31(73)	G	G	G	G	G	A	C
40(81)	A	G	A	T	G	T	C
41(82)	T	C	T	C	T	C	A
42(83)	A	G	A	A	G	A	C
43(84)	A	T	A	C	A	C	T
44(100)	C	C	C	C	C	T	T
46(106)	C	C	C	T	C	C	C
49 (105)	A	G	A	C	A	T	T
51(117)	T	T	T	T	T	C	A
52(118)	A	A	A	A	G	A	A
56(122)	T	T	T	T	C	G	T
64(130)	G	G	G	G	A	C	C
74(140)	A	A	A	A	T	A	T
81(147)	C	C	C	G	T	T	C
82(148)	C	C	C	C	T	C	G
84(150)	C	C	C	C	T	G	T
138(204)	A	A	A	A	T	T	A
140(206)	C	C	C	C	T	T	C
148(214)	T	T	T	C	C	A	T
165(231)	T	T	T	T	G	A	T
175(253)	G	G	G	G	A	G	A
176(254)	A	A	A	T	G	A	G
182(300)	G	G	G	G	A	A	A
184(302)	A	A	A	A	C	C	T
197(315)	A	A	A	A	A	G	C
198(316)	C	C	C	C	T	C	A
209(327)	A	A	A	A	T	A	T
210(328)	T	T	T	T	C	T	A
211(329)	A	A	A	A	G	A	T
213(331)	A	A	A	A	C	C	C
220(338)	A	A	A	A	G	C	T
248(366)	A	A	A	A	G	A	T
250(368)	T	T	T	T	C	T	A
271(389)	C	C	C	C	T	C	C

288(406)	T	T	T	T	C	C	A
300(421)	A	A	A	A	G	G	T
314(435)	G	G	G	G	A	A	T
315(436)	T	T	T	T	G	T	T
316(437)	A	A	A	A	T	T	C
317(438)	T	T	T	T	C	C	C
320(441)	G	G	G	G	C	G	C
357(478)	T	T	T	T	C	T	C
358(479)	C	C	C	C	T	C	C
362(483)	T	T	T	T	C	T	C
395(516)	A	A	A	A	C	A	T
410(531)	G	G	G	G	T	G	A
412(533)	C	C	C	C	T	C	C
449(570)	G	G	G	G	A	G	C
470(591)	T	T	T	T	C	T	A
601(722)	A	A	A	A	G	A	A
661(782)	T	T	T	T	A	T	A