

**ISOLASI DNA DAN AMPLIFIKASI FRAGMEN *D-LOOP*  
MITOKONDRIAL PADA BADAK SUMATERA**  
(*Dicerorhinus sumatrensis*, Fischer 1814).

**Handayani <sup>1)</sup>, Dedi Duryadi <sup>2)</sup>, Hadi Alikodra <sup>3)</sup>**

<sup>1)</sup> Universitas Islam As-Syafi'iyah

<sup>2,3)</sup> Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

*Corresponding Author:* handayani.saintek@gmail.com

Diterima: Agustus 2022

Revisi: Agustus 2022

Disetujui: Agustus 2022

Terbit: September 2022

**ABSTRAK**

Badak sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*, Fischer 1814) merupakan spesies yang masuk dalam kategori terancam punah (*Critically endangered*) dengan indikasi penurunan jumlah populasi  $\geq 80\%$  dalam kurun waktu 10 tahun. Pesatnya kemajuan teknologi saat ini semakin meningkatkan perkembangan teknik molekuler yang dapat digunakan guna memperoleh informasi genetik. Molekul DNA total dan fragmen *D-loop* mitokondrial diperlukan untuk menentukan urutan nukleotida fragmen *D-loop* mitokondrial badak sumatera. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi DNA dan mengamplifikasi fragmen *D-loop* mitokondrial yang dapat dijadikan sebagai sumber informasi genetik badak sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*). Sampel berasal dari SRS TNWK Lampung. Sample yang digunakan adalah darah dari badak sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*). Molekul DNA kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer RHDLF & RHDLR. Hasil penelitian menunjukkan DNA total berhasil diperoleh. Proses amplifikasi menghasilkan fragmen *D-loop* mitokondrial berukuran 677 pb.

**Kata kunci:** badak Sumatera; DNA; Mitokondria; Dloop

**I PENDAHULUAN**

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 spesies badak yang masih ada di dunia hingga saat ini yaitu *Black Rhino*, *White Rhino*, *Indian Rhino*, *Javan Rhino*, dan *Sumatran Rhino*, sedangkan tiga diantaranya (*Javan Rhino*, *Sumatran Rhino*, dan *Black Rhino*) merupakan spesies yang masuk dalam kategori kritis dan terancam punah (*Critically endangered*) dengan indikasi penurunan jumlah populasi  $\geq 80\%$  dalam kurun waktu 10 tahun terakhir dan struktur populasi yang hanya memiliki individu dewasa <50 ekor (IUCN, 2013). Spesies. Populasi badak sumatera menurun akibat kehilangan habitat, perburuan liar (Maharani *et al* 2013), alih fungsi kawasan, perambahan, dan *illegal logging* (Sadjudin *et al* 2013). Suaka Rhino Sumatera (SRS) adalah sebuah areal penangkaran khusus badak sumatera yang berlokasi di Taman Nasional Way Kambas (TNWK) dengan sistem

pengelolaan secara semi *in-situ* (Pusparini *et al* 2015) dalam pengawasan intensif (YABI 2017).

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. Pesatnya kemajuan teknologi saat ini semakin meningkatkan perkembangan teknik molekuler yang dapat digunakan guna memperoleh informasi genetik. Oleh karena itu, perlu dilakukan isolasi dan amplifikasi fragmen *D-loop* mitokondrial untuk memperoleh fragmen *D-loop* yang dapat dijadikan sebagai sumber informasi genetik *Dicerorhinus sumatrensis* diharapkan dapat dijadikan data base dalam usaha manajemen populasi dan konservasinya.

## II STUDI PUSTAKA

### 2.1 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). (van Strein 2002; WWF 2002).

### 2.2 Penyebaran

Populasi badak Sumatera terpecah dalam kelompok populasi yang berbeda dengan sebaran terkonsentrasi pada daerah-daerah tertentu Badak Sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*) pernah menyebar luas di Asia Tenggara, saat ini diperkirakan tinggal sekitar 30 individu di Sumatera dan Kalimantan (Brandt *et al.* 2018). 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 (*Dicerorhinus sumatrensis*) menyebar luas di Asia Tenggara, saat ini diperkirakan tinggal sekitar 30 individu di Sumatera dan Kalimantan (Brandt *et al.* 2018). 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).

Menurut Nicholls (2012), populasi badak Sumatera di alam saat ini diperkirakan hanya sekitar 200-300 individu yang tersebar di Asia Tenggara. Ketidakpastian perkiraan jumlah populasi badak Sumatera ini membutuhkan perhatian lebih (Nardelli, 2014). Penurunan jumlah populasi Badak Sumatera disebabkan oleh kehilangan habitat akibat alih fungsi kawasan hutan, perambahan, *illegal logging* dan perburuan liar (Sadjudin *dkk*, 2013).

### 2.3 DNA mitokondria (D-loop)

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 delesi, atau insersi dan bahkan terjadi pengulangan pada segmen tertentu.

Fragmen DNA mitokondria (mtDNA) dapat digunakan untuk mengetahui variabilitas genetik suatu populasi, karena analisis mtDNA lebih sensitif dibandingkan dengan analisis protein yang sudah banyak dilakukan (Iguchi et al. dalam Suwarminiwati, 2008). 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).

Hasil kajian berbagai pihak telah menetapkan utilitas urutan DNA mitokondria dalam membedakan spesies hewan. Beberapa dekade terakhir genetika molekuler memiliki peran penting membantu, memperjelas, dan menentukan identifikasi spesies terutama yang mempunyai hubungan kekerabatan dekat (*criptic species*). Pendekatan DNA molekuler dalam bidang taksonomi telah digunakan sejak 20 tahun yang lalu dan saat ini telah tersedia akses protokol lebih cepat dan besar (Borisenko et al. 2008).

## III METODE PENELITIAN

### 3.1 Alat dan Bahan

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kit isolasi dan purifikasi DNA Dneasy *Blood and Tissue Kit* dari Qiagen, tabung mikro, tip mikro, *waterbath*, mesin sentrifugasi, vorteks, mesin PCR, mesin elektroforesis horizontal, *UV transluminator*. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah badak sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*, PCR Kit, Taq PCR dari Qiagen, Primer buffer TBE, Buffer TE, *Loading Dye*, *DNA Ladder*, etidium bromida, dan agarose.

### 3.2 Isolasi dan Purifikasi DNA Total *Dicerorhinus sumatrensis*

Proses isolasi dan purifikasi dilakukan dengan menggunakan Kit isolasi dan purifikasi DNA Dneasy *Blood and Tissue Kit* dari Qiagen. Proses diawali dengan pencacahan sampel darah *Dicerorhinus sumatrensis* kemudian sampel ditambahkan 500 µl Buffer ATL, 25 µl Proteinase K, 200 µl etanol absolut untuk melisis sel. Selanjutnya sampel mengalami proses *washing* dengan menambahkan 500 µl Buffer AW 1 dan 500 µl Buffer AW 2. Tahap selanjutnya adalah proses elusi untuk memperoleh DNA total sebagai stok dengan cara menambahkan 100 µl Buffer AE kedalam sampel. Stok DNA total yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu 4°C.

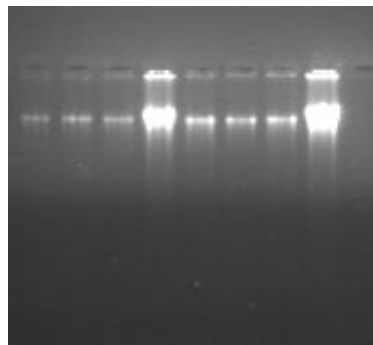
### 3.3 Amplifikasi Fragmen D-loop Mitokondrial dengan Teknik PCR

Molekul DNA total *Dicerorhinus sumatrensis* dibutuhkan sebagai cetakan pada proses PCR. Proses PCR dilakukan dengan menggunakan PCR Kit, Taq PCR dari Qiagen, dan primer. Primer tersebut didesain menggunakan software primer3 ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)). Kedua pasang

primer tersebut yaitu Primer untuk mengamplifikasi D-Loop partial (RHDLF & RHDLR). Proses amplifikasi daerah D-Loop Kondisi PCR yang digunakan adalah : predenaturasi pada suhu 94°C, dilanjutkan dengan siklus utama, yaitu tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 45 detik, tahap penempelan primer (*annealing*) pada suhu 51°C, dan tahap polimerasi (*extension*) pada suhu 72 °C diulang sebanyak 35 siklus. Reaksi PCR diakhiri dengan polimerasi (*final extension*) pada suhu 72 °C.

### 3.4 Hasil

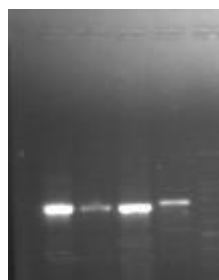
Molekul DNA total diperoleh dari hasil isolasi dan purifikasi DNA *Dicerorhinus sumatrensis* dengan jumlah sampel delapan sampel dari empat individu *Dicerorhinus sumatrensis* yang berasal dari Suaka Rhino Sumatera (SRS) TNWK. DNA total yang diperoleh dipilih untuk dijadikan cetakan untuk proses amplifikasi fragmen *Dloop* DNA mitokondria. Berdasarkan hasil elektroforesis, DNA total sampel memiliki kondisi pita DNA yang tebal (Gambar 1).



Gambar 1. Profil DNA total *Dicerorhinus sumatrensis* diperoleh menggunakan gel agarose 1%

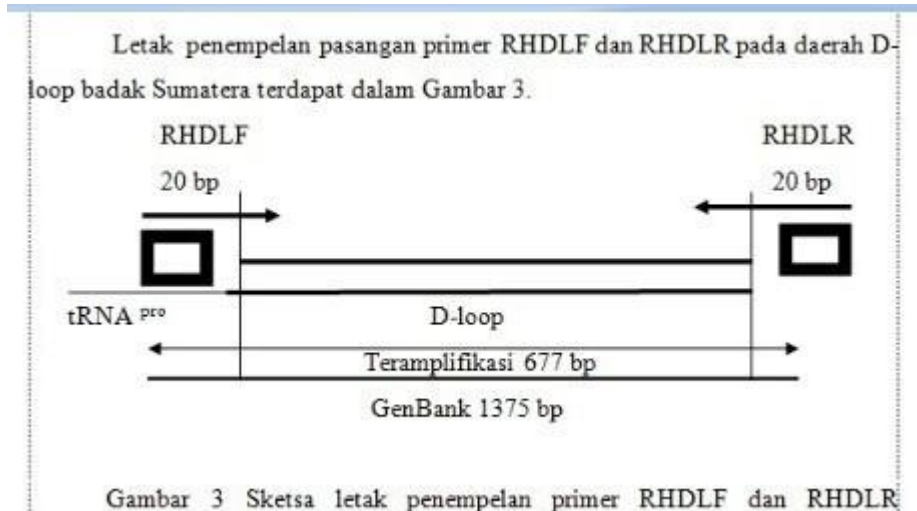
### Fragmen D-loop Mitokondrial *Dicerorhinus sumatrensis*

Proses PCR dilakukan untuk mengamplifikasi fragmen *D-loop* dari DNA mitokondria *Dicerorhinus sumatrensis*. Proses amplifikasi menghasilkan fragmen *D-loop* berukuran 677 pb. Profil hasil amplifikasi disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Profil hasil amplifikasi menggunakan primer RHDLF & RHDLR pada gel agarose 1%

Penempelan pasangan primer RHDLF & RHDLR dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Sketsa letak penempelan primer RHDLF dan RHDLR pada framen *Dloop* mitokondrial *Dicerorhinus sumatrensis*

#### IV PEMBAHASAN

##### 4.1 DNA Total *Dicerorhinus sumatrensis*

Penelitian ini menggunakan empat sampel darah *Dicerorhinus sumatrensis* yang berasal dari SRS TN. Way Kambas Lampung. Hasil DNA totalnya setelah dimigrasikan pada gel agarose 1% disajikan pada Gambar 1. DNA total hasil isolasi tersebut selanjutnya digunakan sebagai DNA cetakan (template) untuk amplifikasi daerah D-loop pada genome mitokondria dari badak Sumatera dengan menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR).

##### 4.2 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 *Dicerorhinus*. Profil DNA hasil amplifikasi menggunakan primer RHDLF dan RHDLR disajikan pada Gambar 2. 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<sup>Pro</sup> 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). Setelah dilakukan sekuensing pada produk PCR dari dua arah yaitu baik primer Forward maupun primer Reverse didapatkan hasil sekuen sepanjang 679 bp. Sekuen ini merupakan setengah bagian dari sekuen utuh D-loop yang berukuran 1375 bp pada *Rhinoceros unicornis* (kode akses NC001779).

## V KESIMPULAN

Molekul DNA total *Dicerorhinus sumatrensis* telah berhasil diperoleh dengan menggunakan DNA Dneasy Blood and Tissue Kit dari Qiagen. Proses amplifikasi menghasilkan fragmen *Dloop* mitokondrial badak Sumatera berukuran 677 pb.

## DAFTAR PUSTAKA

- Atmoko, T., BS. Sitepu, Mukhlisi, SJ. Kustini & R. Setiawan. 2016. *Jenis Tumbuhan Pakan Badak Sumatera (Dicerorhinus sumatrensis harrissoni) di Kalimantan*. Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Konservasi Sumber Daya Alam. Balikpapan, Kalimantan Timur.
- Avise, JC. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Brandt, JR., PJ. van Coeverden de Groot, KE. Witt, PK. Engelbrektsson, KM. Helgen, RS. Malhi, OA. Ryder & AL. Roca. 2018. Genetic structure and diversity among historic and modern population of the Sumatran Rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Journal Heredity* 109(5): 553-565.
- IUCN. 2013. The IUCN red list of threatened species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Pusparini W., Slevert PR., Fuller TK., Randhir TO., and Andayani N. 2015. Rhinos in the Parks: An Island-Wide Survey of the Last Wild Population of Sumatran Rhinoceros. *PLoS ONE Journal* 10(10): 1-16.
- Sadjudin HR., Syamsudin M., dan Ramono WS. 2013. Status Kritis Dua Jenis Badak di Indonesia. *Al-Kaunyah Jurnal Biologi* 6: 73-83.
- WWF (World Wide Fund). 2002. *Asian Rhinos- Spesies Status Report*. WWF.
- YABI (Yayasan Badak Indonesia). 2017. *Tentang kami*. <http://www.badak.or.id/tentangkami>.