

Identifikasi Keragaman Genetik Gen 12S Ribosom RNA Sebagai Penanda Genetik untuk Penentuan Spesies Kuskus

(IDENTIFICATION OF GENETIC DIVERSITY 12SRRNA GENES AS GENETIC MARKER
FOR DETERMINING SPECIES CUSCUS)

Rini Widayanti¹, Hery Wijayanto²,
Woro Danur Wendo², Rony Marsyal Kunda³

¹Bagian Biokimia, ²Bagian Anatomi,
³Mahasiswa program Doktor, Program Studi Sain Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jln. Fauna no. 2 Karangmalang, Yogyakarta
E-mail: riniwida@yahoo.co.uk, Hp. 085878931444

Abstrak

Kuskus merupakan mammalia berkantung (*marsupial*), masuk dalam famili Phalangeridae, yang persebarannya terbatas di Indonesia bagian timur (Sulawesi, Maluku, dan Papua), Australia dan Papua New Guinea. Satwa tersebut saat ini mulai langka populasinya, sehingga diperlukan usaha untuk mempertahankan keberadaannya dengan melakukan konservasi secara *in situ* maupun *ex situ*. Namun mengenai data dari satwa tersebut baik secara morfologi maupun secara genetik masih sangat kurang sehingga perlu dikaji lebih dalam lagi mengenai karakter morfologi dan molekuler. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan sekuen nukleotida dan penanda genetik pada gen 12SrRNA dengan metode sekuensing DNA dari masing-masing spesies yang ada di ke tiga pulau tersebut. Sebanyak 17 sampel diperoleh dari beberapa habitat asal kuskus yaitu Sulawesi (dua ekor), Maluku (tujuh ekor), dan Papua (delapan ekor). Sampel kemudian diisolasi DNA totalnya, diamplifikasi dengan teknik PCR. Amplikon (produk PCR) kemudian dimurnikan dengan kolom kromatografi dan selanjutnya disekuensing untuk menentukan sekuen gen 12S rRNA mt-DNA. Potensi sekuen DNA sebagai penanda genetik kuskus dibuktikan dengan menganalisis keragaman genetik antar spesies menggunakan program MEGA versi 6. Hasil PCR didapatkan amplikon sebesar 958 pasang basa (pb), hasil sekuensing didapatkan 896 nukleotida, dan terdapat 105 situs nukleotida yang berbeda. Filogram berdasar sekuen nukleotida gen 12SrRNA kuskus asal Sulawesi adalah *Ailurops ursinus*, sedangkan kuskus asal Papua dan Maluku adalah spesies *Phalanger sp.* dan *Spilocuscus maculatus*. Terdapat 13 situs nukleotida yang dapat digunakan sebagai penanda genetik antara *Phalanger* asal Papua dan Maluku, serta tiga situs nukleotida sebagai penanda genetik antara *Spilocuscus* asal Papua dan Maluku.

Kata-kata kunci : kuskus, sekuensing, nukleotida, gen 12SrRNA

ABSTRACT

Cuscus is marsupial's animal (Phalangeridae) which has limited spread in eastern Indonesia (Sulawesi, Maluku, Papua), Australia and Papua New Guinea. The *ex-situ* and *in-situ* conservation of cuscus under captivating condition is an alternative solution to protect cuscus from extinction. This study aimed to determine nucleotide sequence and genetic markers on 12Sr RNA gene with sequencing method of each species on three islands. Whole genome DNA was extracted from 17 samples of cuscus obtained from different habitats, Sulawesi (2 individual), Maluku (7 individual), and Papua (8 individual) according to the protocol of Qiamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), and then it was used as template for amplification of 12Sr RNA gene by using PCR. PCR product were then purified using column chromatography and were used as template for sequencing reaction. Result sequencing of 12Sr RNA gene were analyzed using MEGA program version 6. PCR product gives a result nucleotida of 958 bp according to database genebank, sequencing product gives result nucleotida of 896 bp and found of 105 different nucleotide sites. Filogram based on nucleotide sequences 12SrRNA gene from Sulawesi cuscus is *Ailurops ursinus* whereas the cuscus from Papua and Maluku is *Phalanger sp.* and *Spilocuscus maculatus* species. Thirteen nucleotida sites were found, sites no 67 (A/G), 89 (G/C), 137 (T/C), 285 (G/A), 468 (T/C), 595 (T/C), 598 (T/C), 647 (T/C), 654 (G/A), 665 (T/C), 769 (C/T), 874 (C/T), and 876 (A/G) which can be used as genetic marker between *Phalanger* genera from Papua and Maluku, and three nucleotida sites (sites no 127 (G/A), 481 (C/T), and 885 (T/C) can be used as genetic marker between *Spilocuscus* genera from Papua and Maluku.

Keywords: possum, sequencing, nucleotide, 12SrRNA gene

PENDAHULUAN

Kuskus merupakan mammalia berkantung (*marsupial*), *nocturnal*, memiliki ekor *prehensile*, masuk dalam famili Phalangeridae, yang persebarannya terbatas di Indonesia bagian timur (Sulawesi, Maluku, dan Papua), Australia dan Papua New Guinea (Menzies, 1991; Petocz, 1994; Flannery, 1995). Dari enam genus kuskus yakni *Ailurops*, *Phalanger*, *Spilocuscus*, *Strigoscuscus*, *Wyulda*, dan *Trichosurus*, empat genus terdapat di Indonesia yakni *Ailurops*, *Phalanger*, *Spilocuscus*, dan *Strigoscuscus*. Setidaknya ada 23 spesies kuskus yang tersebar di tiga pulau tersebut. Di Papua, ditemukan dua genus yaitu *Phalanger* (kuskus tidak bertotol) dan *Spilocuscus* (kuskus bertotol); di Maluku ditemukan dua genus yaitu *Phalanger* dan *Spilocuscus* yang dapat ditemukan di Maluku Utara, Pulau Halmahera, Pulau Bacan, dan Pulau Morotai yang terlihat pada wilayah dengan ketinggian 100 m di atas permukaan laut; dan di Sulawesi ditemukan genus *Spilocuscus* dan *Ailurops*, yang merupakan satwa endemis Sulawesi. Kuskus di Sulawesi ditemukan di daerah Sulawesi Utara, Pulau Sangihe dan Talaud. Menurut Petocz (1994), berdasar morfologi ditemukan lima spesies kuskus di Papua yaitu: *Phalanger gymnotis* (kuskus kelabu), *Spilocuscus maculatus* (kuskus bertotol biasa), *P. orientalis* (kuskus timur), *S. rufoniger* (kuskus totol hitam), dan *P. vestitus* (kuskus rambut sutera). Menurut Menzies (1991), ada juga *S. papuensis* (*Waigeo cuscus*, kuskus pulau Waigeo) yang merupakan spesies endemik di Pulau Waigeo, Kabupaten Raja Ampat, Propinsi Papua Barat, serta menurut Aplin dan Helgen (2008) ada *S. wilsoni* (kuskus totol Pulau Biak) yang merupakan kuskus endemik di Pulau Biak dan Supiori, Propinsi Papua.

Menurut Fatem dan Sawen (2007), kuskus merupakan salah satu jenis satwa endemik di Papua yang secara hukum dilindungi pemerintah melalui SK. Menteri Pertanian No. 247/KPTS/UM4/1979. Perlindungan terhadap hewan langka meliputi lima jenis Kuskus yaitu *P. orientalis* (kuskus coklat biasa/kuskus timur), *P. gymnotis* (kuskus kelabu), *P. rufoniger* (kuskus totol hitam), *P. vestitus* (kuskus rambut sutera), dan *S. maculatus* (kuskus bertotol biasa). Selain itu yang terancam punah juga jenis *P. urinus* (kuskus putih) yang banyak hidup di hutan belantara Papua. Hal ini akibat perburuan liar secara tak terkendali untuk

diperjualbelikan dengan harga relatif mahal. Spesies kuskus menurut Latinis (1996) yang ada di Maluku adalah *S. maculatus* dan *P. orientalis*. Kuskus yang ada di Sulawesi adalah *Strigoscuscus celebensis* (kuskus kerdil) dan *Ailurops ursinus* (kuskus beruang). Masih kurangnya informasi ilmiah tentang keragaman dan penyebaran jenis kuskus di daerah asal, tingkat perdagangan spesies ini yang meningkat serta adanya konflik pengelolaan hutan, maka diperlukan berbagai upaya dasar untuk menyediakan data dan informasi guna kebijaksanaan konservasi spesies dan ekosistemnya.

Penelitian yang telah dilakukan terhadap spesies kuskus di Indonesia masih terbatas pada morfologi, persebaran dan perburuan, bahkan sampai saat ini menurut Fatem dan Sawen (2007), di Papua masih belum diketahui dengan pasti dimana saja persebaran spesies kuskus yang terdapat di Papua.

Penelitian molekuler yang telah dilakukan yaitu menggunakan genom mitokondria adalah untuk membandingkan pada tingkat famili. Pada penelitian ini akan dilakukan antar spesies kuskus yang ada di Maluku, Papua, dan Sulawesi dengan menggunakan DNA mitokondria pada gen 12SrRNA. Menurut Widayanti et al. (2006), sekuen gen *Cytochrome b*, gen *ATPase* sub-unit 8 (Widayanti, 2010), gen *Cytochrome Oxidase* sub-unit 2 (Widayanti, 2010), gen *Cytochrome Oxidase* sub-unit 1 (Baaka dan Widayanti, 2012), dan gen NADH dehidrogenase subunit 6 (Widayanti et al., 2012) karena keragaman di dalam gen tersebut yang cukup besar, maka dapat digunakan sebagai penanda genetik *Tarsius* sp. asal Sumatra, Kalimantan, Sulawesi Utara dan Sulawesi Tengah. Penelitian ini menggunakan teknik sekuensing sehingga diharapkan dapat menganalisis semua urutan nukleotida dari ketiga gen-gen tersebut, apakah terdapat keragaman di dalamnya yang selanjutnya dapat digunakan sebagai penanda genetik masing-masing spesies kuskus yang diteliti.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan sekuen nukleotida dan keragaman genetik pada gen 12SrRNA mitokondria pada kuskus asal Maluku, Papua, dan Sulawesi. Adanya keragaman nukleotida dari masing-masing spesies kuskus dapat digunakan sebagai penanda genetik dan dapat mengetahui filogenetiknya, serta untuk melengkapi data molekuler yang masih sangat kurang. Target dari penelitian ini adalah mendapatkan sekuen

dari gen 12SrRNA di dalam DNA mitokodria yang bersifat unik sehingga dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk identifikasi masing-masing spesies.

Kemanfaatan dan keberlanjutan dari penelitian ini diharapkan sebagai informasi dasar dalam rangka pengambilan kebijakan terutama dalam bidang konservasi, khususnya untuk satwa endemik; pengembangan ilmu pengetahuan khususnya untuk identifikasi satwa secara genetika molekuler; dan sebagai informasi tentang keragaman biologi dari satwa liar khususnya kuskus yang ada di Indonesia. Harapannya dengan didapatkan penanda genetik akan membantu usaha konservasi, terutama untuk satwa yang sudah kehilangan habitatnya, karena konservasi harus dilakukan di luar habitatnya (*ex-situ*) serta dapat diterapkan untuk satwa langka lainnya yang terancam punah sehingga kekayaan hayati di Indonesia akan terjaga kelestariannya.

METODE PENELITIAN

Koleksi sampel

Sebanyak 17 sampel kuskus diambil dari habitat aslinya, yaitu Sulawesi dua ekor (Gorontalo), Papua tujuh ekor (tiga ekor dari Nabire; satu ekor dari pulau Moor; dua ekor dari Wanggar, Nabire; satu ekor dari Topo, Nabire; dan satu ekor dari Yaro, Nabire), dan Maluku tujuh ekor (dua ekor dari Desa Kariu, Pulau Haruku; satu ekor dari Kepulauan Manipa; satu ekor dari Desa Soya, Kota Ambon; dua ekor dari Desa Allang, Kabupaten Maluku Tengah; dan satu ekor dari Desa Larika).

Isolasi DNA Total

DNA total diekstraksi dari biopsi jaringan. Isolasi dan purifikasi DNA menggunakan DNA *isolation kit* (Qiagen). DNA hasil isolasi dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarosa 1% dengan menggunakan buffer 1xTBE dalam piranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar *ultra violet* (λ = 260nm) setelah gel diwarnai dengan *bioatlas* (Genaid). DNA hasil

isolasi kemudian disimpan pada suhu minus 20°C sebelum digunakan untuk tahap berikutnya.

Desain Primer

Primer didisain menggunakan Program primer 3 output (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primr3.cgi/results_from-primer3) berdasar data sekuen genom mitokondria *Phalanger vestitus* (Nomor akses AB241057.1) dan *Trichosurus vulpecula* (Nomor akses AF357238). Urutan basa primer untuk amplifikasi gen 12SrRNA dari sampel kuskus disajikan pada Tabel 1.

Amplifikasi Gen 12SrRNA dengan PCR

Amplifikasi DNA dengan PCR pada penelitian ini menggunakan mesin PCR (Infinigen). Amplifikasi gen 12SrRNA dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama lima menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik untuk denaturasi, 44°C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72°C selama satu menit untuk pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri *post elongasi* lima menit pada 72°C. Produk PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarosa 1% dengan menggunakan buffer 1xTBE dalam piranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA). Penanda DNA dengan ukuran 1000 pb (*1st base*) digunakan sebagai penunjuk bobot molekul. Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV (λ = 260nm) setelah gel diwarnai dengan *Bioatlas* (Genaid).

Sekuensing DNA

Produk PCR selanjutnya dipergunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi sekuensing DNA. Masing-masing sampel dilakukan dua reaksi sekuensing yaitu menggunakan *primer forward* dan *primer reverse*.

Analisis Data

Penjajaran berganda sekuen nukleotida gen 12SrRNA dianalisis dengan bantuan perangkat lunak Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

Tabel 1. Urutan basa primer untuk mengamplifikasi gen 12S ribosom RNA kuskus.

Target	F / R	Urutan basa	Jumlah basa	Tm (°C)
12SrRNA (958 bp)	F	5' ACTGAAAATGCTTAGATGG 3'	20	50,27
	R	5' TGTTACGACTTTTCTCCTC 3'	20	50,17

Analisis hasil dengan bantuan perangkat lunak MEGA versi 6. Jarak genetik dianalisis dengan metode Kimura dua parameter (Kumar *et al.*, 2001). Pohon filogenetik dianalisis berdasarkan sekuen nukleotida dengan metode *Neighbor joining* dengan nilai *bootstrap* 1000 kali. Spesies yang digunakan sebagai pembanding diambil dari data *Genbank* antara lain *P. vestitus* (Nomor akses AB241057.1), *T. vulpecula* (AF357238.1), *P. gymnotis* (AF108218.1), *P. orientalis* (U33496.1), *P. rufoniger* (AF108221.1), *P. maculatus* (AF108222.1), *Strigocuscus celebensis* (KJ868161.1), *Airulops ursinus* (KJ868096.1), *T. caninus* (KJ868163.1), *T. vulpecula* (AF357238.1), *Dorcopsulus vanheumi* (KJ868113.1), *Setonix brachyurus* (KJ868156.1), *Macropus agilis* (AF027986.2), *Lagorchestes hirsutus* (AF027996.2), *Wallabia bicolor* (KJ868164.1), dan *Thylogale stigmatica* (AF027991.2).

HASIL DAN PEMBAHASAN

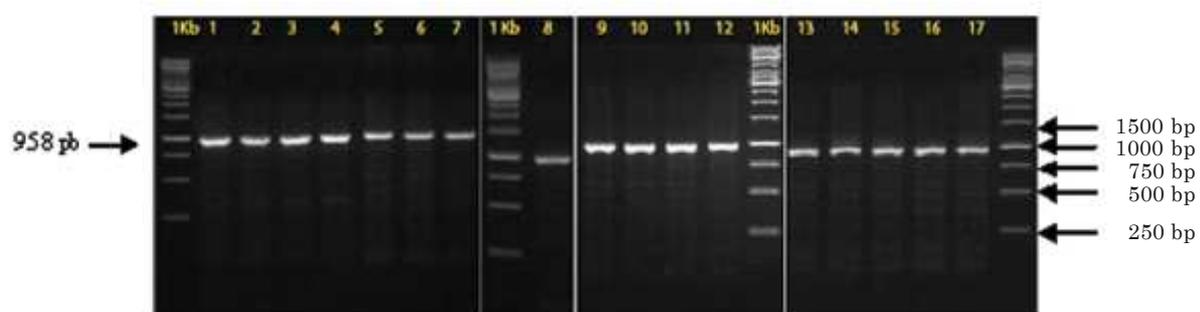
Pada 17 sampel DNA yang telah diisolasi selanjutnya dilakukan amplifikasi gen 12SrRNA dengan teknik PCR dan menghasilkan amplicon sebesar 958 pb. Produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 1 % dengan DNA ladder 1 kb (*1st base*) (Gambar 1).

Produk PCR sebesar 958 pb diperoleh setelah primer yg digunakan dalam PCR dilakukan *alignment* dengan perangkat lunak *primer BLAST* yang ada dalam situs http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome terhadap sekuen genom mitokondria *P. vestitus* (Nomor akses AB241057.1). Primer *forward* terletak pada sekuen gen tRNA^{Phe} pada situs ke-29 dan primer *reverse* terletak pada gen 12SrRNA pada situs ke-986 dari genom mitokondria, dengan

panjang produk PCR 958 pb (49 pb gen tRNA^{Phe}, 2 pb *spacer*, dan 907 pb gen 12SrRNA).

Hasil penjajaran berganda dari sekuen nukleotida kuskus yang diteliti diperoleh 896 nukleotida (nt) yang dapat untuk analisis berikutnya. Dari 896 nukleotida terdapat 105 situs yang berbeda, dan perbedaan jumlah nukleotida dari masing-masing kuskus hasil penelitian dan kuskus pembanding dari *GenBank* disajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 terlihat bahwa perbedaan nukleotida berkisar dari nol (0) sampai dengan 72 nukleotida di antara kuskus penelitian, dan sampai 76 apabila dibandingkan dengan kuskus dari *Genbank*. Tidak adanya perbedaan nukleotida antar individu menunjukkan bahwa tidak ada keragaman di dalam sekuen nukleotidanya, yaitu antara sampel Gorontalo 1 dan Gorontalo 2, serta antara kuskus putih dan kuskus coklat asal P. Ambon dan P. Haruku (0 nt). Adanya perbedaan nukleotida yang kecil (0–1 nt) antara kuskus totol asal Nabire; kuskus kelabu garis hitam asal Nabire (0-2 nt); serta kuskus kelabu, kuskus totol asal Ambon, P. Ambon, dan kepulauan Manipa (0-3 nt), menunjukkan bahwa kuskus tersebut adalah spesies yang sama, walaupun ada perbedaan warna dan pola dari permukaan tubuhnya. Pohon filogenetik yang dibuat menggunakan metode *Neighbor joining* dengan *bootstrap* 1000 kali selanjutnya digunakan untuk melihat posisi atau kekerabatan kuskus hasil penelitian dengan pembanding *Phalangeridae* dari *GenBank*. Pohon filogenetik kuskus berdasar sekuen nukleotida gen 12SrRNA disajikan pada Gambar 2.

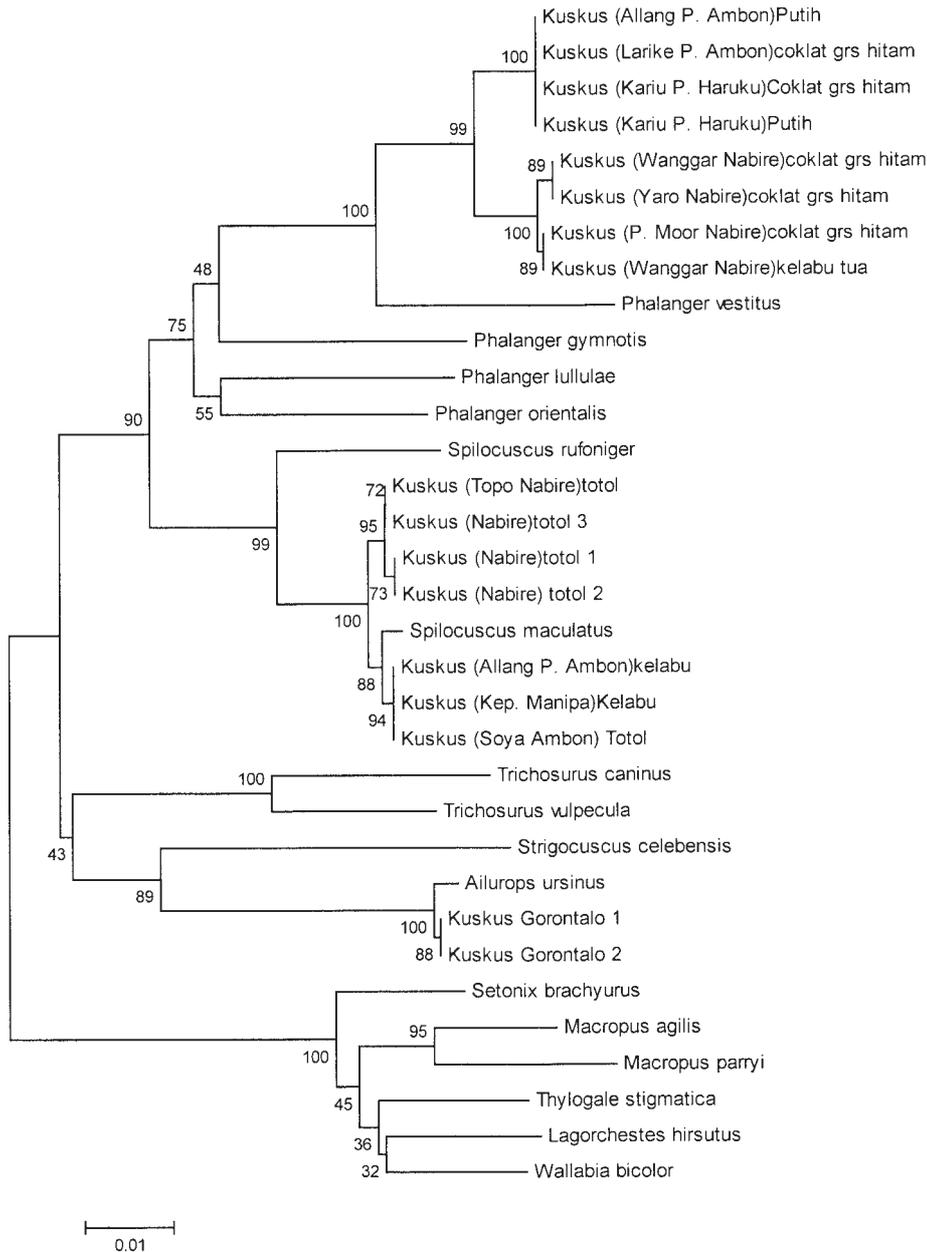
Pada Gambar 2 terlihat bahwa dari semua kuskus yang dibandingkan terbentuk dua percabangan. Percabangan ke-1 adalah kelompok *Phalanger* dan kelompok *Spilocuscus*, sedangkan percabangan ke-2 adalah kelompok



Gambar 1. Hasil PCR gen 12SrRNA kuskus pada gel agarose 1%
Keterangan: 1Kb: DNA ladder 1000 pb; 1-17: produk PCR sampel kuskus

Tabel 1. Matriks perbedaan nukleotida (896 nt) sekuen gen 12SrRNA kuskus hasil penelitian dan kuskus pembanding (*Genbank*)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 Kuskus_Gorontalo_1																					
2 Kuskus_Gorontalo_2	0																				
3 Ailurops_ursinus	5	5																			
4 Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	67	67	68																		
5 Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	67	67	68	0																	
6 Kuskus_(Allang_P._Ambon)Putih	67	67	68	0	0																
7 Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	67	67	68	0	0	0															
8 Kuskus_(Wanggar_Nabire)kelabu grs hitam	67	67	66	15	15	15	15														
9 Kuskus_(Yaro_Nabire) kelabu grs hitam	67	67	66	15	15	15	15	0													
10 Kuskus_(P.Moor_Nabire) kelabu grs hitam	66	66	67	13	13	13	13	2	2												
11 Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tua	66	66	67	13	13	13	13	2	2	0											
12 Phalanger_vestitus	75	75	76	38	38	38	38	40	40	38	38										
13 Kuskus_(Allang_P._Ambon) Kelabu	73	73	76	66	66	66	66	68	68	67	67	74									
14 Kuskus_(Soya_Ambon)_Totol	73	73	76	66	66	66	66	68	68	67	67	74	0								
15 Kuskus_(Kep._Manipa)Kelabu	73	73	76	66	66	66	66	68	68	67	67	74	0	0							
16 Phalanger_maculatus	74	74	77	67	67	67	67	67	67	66	66	74	3	3	3						
17 Kuskus_(Topo_Nabire) total	72	72	75	67	67	67	67	67	67	66	66	73	4	4	4	5					
18 Kuskus_(Nabire) total_1	73	73	75	68	68	68	68	67	67	67	67	74	5	5	5	6	1				
19 Kuskus_(Nabire)_total_2	73	73	75	68	68	68	68	67	67	67	67	74	5	5	5	6	1	0			
20 Kuskus_(Nabire) total_3	72	72	75	67	67	67	67	67	67	66	66	73	4	4	4	5	0	1	1		
21 Phalanger_rufoniger	75	75	76	70	70	70	70	69	69	68	68	73	28	28	28	29	26	27	27	26	



Gambar 2. Filogram berdasar sekuen nukleotida gen 12SrRNA (896 nt) kuskus asal Papua, Maluku, Sulawesi, dan beberapa kuskus pembanding (*GenBank*)

Trichosurus, *Strigoscuscus*, dan *Ailurops*. Pada penelitian ini semua sampel kuskus asal Papua dan Maluku berada di percabangan ke-1, dan kuskus asal Sulawesi berada pada percabangan ke-2. Hasil ini sesuai dengan pendapat Fatem dan Sawen (2007) dan Latinis (1996), bahwa genus kuskus yang ada di Papua dan Maluku adalah *Phalanger* dan *Spilocuscus*, sedangkan genus *Ailurops* dan *Strigoscuscus* adalah endemik di Sulawesi.

Oleh karena masih terbatasnya data pembanding dari *Genbank*, sehingga data yang

disajikan belum dapat memberi petunjuk spesies yang pasti dari sebagian kuskus yang berasal dari Maluku dan Papua. Pada percabangan ke-1 terlihat bahwa terdapat subcabang yang membagi kelompok *Phalanger* dan kelompok *Spilocuscus*. Pada kelompok *Phalanger* tampak bahwa kuskus asal Papua maupun Maluku keduanya paling dekat kekerabatannya dengan *P. vestitus*. Namun, ada kemungkinan bahwa keduanya bukan merupakan *P. vestitus* apabila dilihat perbedaan nukleotidanya yang cukup besar yaitu antara 38-40 nukleotida (Tabel 1).

#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	CAAGTTTCCG	CTGTCCGGTG	AGAATGCCCT	AAAAGTTACC	CTAAAATGAA	[100]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	[100]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon) Putih	[100]
#Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	[100]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) coklat_garis_hitam	A.....	G.....G.....	[100]
#Kuskus_(Yaro_Nabire) coklat_garis_hitam	A.....	G.....G.....	[100]
#Kuskus_(P._Moor_Nabire) coklat_garis_hitam	A.....G.....	[100]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tua	A.....G.....	[100]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	CAGGAGCAGG	CATCAGGCAC	ACTTAAAGTA	GCCCACTACG	CCTTGCTTAA	[150]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	[150]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon) Putih	[150]
#Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	[150]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) coklat_garis_hitam	T.....	[150]
#Kuskus_(Yaro_Nabire) coklat_garis_hitam	T.....	[150]
#Kuskus_(P._Moor_Nabire) coklat_garis_hitam	T.....	[150]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tua	T.....	[150]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	CCGCGGTACAT	ACGATTGACC	CAAATTAACA	GAAAACCGGC	GTAAAATGTG	[300]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	[300]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon) Putih	[300]
#Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	[300]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) coklat_garis_hitam	G.....	[300]
#Kuskus_(Yaro_Nabire) coklat_garis_hitam	G.....	[300]
#Kuskus_(P._Moor_Nabire) coklat_garis_hitam	G.....	[300]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tua	G.....	[300]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	CATAAACCAA	GATAGCTCAA	ACAACAAAAC	TATCCGCCAG	AGAACTACTA	[500]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	[500]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon) Putih	[500]
#Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	[500]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) coklat_garis_hitam	T.....	[500]
#Kuskus_(Yaro_Nabire) coklat_garis_hitam	T.....	[500]
#Kuskus_(P._Moor_Nabire) coklat_garis_hitam	T.....	[500]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tua	T.....	[500]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	GGAGCCTGTT	CTATAATCGA	TAAACCCCGA	TAAACCTCAC	CTATCCTTGC	[600]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	[600]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon) Putih	[600]
#Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	[600]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) coklat_garis_hitam	T..C..	[600]
#Kuskus_(Yaro_Nabire) coklat_garis_hitam	T..C..	[600]
#Kuskus_(P._Moor_Nabire) coklat_garis_hitam	T..C..	[600]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tua	T..C..	[600]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	CAATACAGCC	TATATACCGC	CATCGTCAGC	CTACCCACACA	GGGTGACAAA	[650]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	[650]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon) Putih	[650]
#Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	[650]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) coklat_garis_hitam	T...	[650]
#Kuskus_(Yaro_Nabire) coklat_garis_hitam	T...	[650]
#Kuskus_(P._Moor_Nabire) coklat_garis_hitam	T...	[650]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tua	T...	[650]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	GTAAGCAAAA	TAATCAACCA	TAAAAACGTT	AGGTCAAGGT	GTAGCATATG	[700]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	[700]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon) Putih	[700]
#Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	[700]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) coklat_garis_hitam	G.....	T.....	[700]
#Kuskus_(Yaro_Nabire) coklat_garis_hitam	G.....	T.....	[700]
#Kuskus_(P._Moor_Nabire) coklat_garis_hitam	G.....	T.....	[700]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tua	G.....	T.....	[700]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	CTTATGAAAT	CAAGATACCG	AAGGAGGATT	TAGTAGTAAA	TTAAGAATAG	[800]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	[800]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon) Putih	[800]
#Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	[800]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) coklat_garis_hitam	C.....	[800]
#Kuskus_(Yaro_Nabire) coklat_garis_hitam	C.....	[800]
#Kuskus_(P._Moor_Nabire) coklat_garis_hitam	C.....	[800]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tua	C.....	[800]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Putih	TCCTCAATTA	CCATCGAACA	ATAACTAATA	AAATCTAAAC	-----	[896]
#Kuskus_(Kariu_P._Haruku) Coklat	-----	[896]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon) Putih	-----	[896]
#Kuskus_(Larike_P._Ambon) coklat	-----	[896]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) coklat_garis_hitam	T..C.A.....	-----	[896]
#Kuskus_(Yaro_Nabire) coklat_garis_hitam	T..C.A.....	-----	[896]
#Kuskus_(P._Moor_Nabire) coklat_garis_hitamC.A.....	-----	[896]
#Kuskus_(Wanggar_Nabire) kelabu_tuaC.A.....	-----	[896]

Gambar 3. Hasil penjarangan berganda sekuen nukleotida gen 12SrRNA kuskus kelompok *Phalanger* asal papua dan Maluku dan situs unik yang dapat digunakan sebagai penanda genetik. Keterangan: kolom warna kuning: situs unik sebagai penanda genetik.

#Kuskus_(Topo_Nabire)total	CAGGAGCAGG	CATCAGGCAC	ACTTCAGGTA	GCCCATTACG	CCTTGCTTAA	[150]
#Kuskus_(Nabire)total_1	[150]
#Kuskus_(Nabire)total_2	[150]
#Kuskus_(Nabire)total_3	[150]
#Kuskus_(Kep._Manipa)KelabuA.....	[150]
#Kuskus_(Soya_Ambon)_TotalA.....	[150]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon)KelabuA.....	[150]
#Kuskus_(Topo_Nabire)total	CCCTAAACCG	AGATAATTAA	TTTAACGAAA	CTATTGCGCA	GAGAACTACT	[500]
#Kuskus_(Nabire)total_1	[500]
#Kuskus_(Nabire)total_2	[500]
#Kuskus_(Nabire)total_3	[500]
#Kuskus_(Kep._Manipa)KelabuT.....	[500]
#Kuskus_(Soya_Ambon)_TotalT.....	[500]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon)KelabuT.....	[500]
#Kuskus_(Topo_Nabire)total	CCCTCCTCAAT	TACATCCAAT	CATATAACTA	ATAATATACA	AAC---	[896]
#Kuskus_(Nabire)total_1A.....---	[896]
#Kuskus_(Nabire)total_2A.....---	[896]
#Kuskus_(Nabire)total_3---	[896]
#Kuskus_(Kep._Manipa)KelabuC.....---	[896]
#Kuskus_(Soya_Ambon)_TotalC.....---	[896]
#Kuskus_(Allang_P._Ambon)KelabuC.....---	[896]

Gambar 4. Hasil penjajaran berganda sekuen nukleotida gen 12SrRNA kuskus kelompok *Spilocuscus* asal Papua dan Maluku dan situs unik yang dapat digunakan sebagai penanda genetik.

Keterangan: kolom warna kuning: situs unik sebagai penanda genetik.

Demikian juga di antara *Phalanger* asal Papua dan Maluku, keduanya berada dalam subcabang yang berbeda, hal ini kemungkinan berbeda spesies, subspecies, atau spesies sama namun mempunyai keunikan di dalam sekuen gen 12SrRNA sehingga keduanya berada dalam subcabang yang berbeda.

Pada kelompok *Spilocuscus*, kuskus asal Papua dan asal Maluku juga terpisah ke dalam subcabang yang berbeda. Hal ini kemungkinan sama dengan kelompok *Phalanger*, bahwa keduanya merupakan spesies, subspecies yang berbeda, atau spesies yang sama namun memiliki keunikan di dalam sekuen nukleotidanya sehingga mereka berada dalam subcabang yang berbeda. Pada kelompok *Spilocuscus* terlihat bahwa kelompok *Spilocuscus* asal Maluku berada dalam cabang yang sama dengan *S. maculatus*, menunjukkan bahwa *Spilocuscus* asal Maluku adalah *S. maculatus*, dan *Spilocuscus* asal Papua juga *S. maculatus* karena jika dilihat pada Tabel 1, perbedaan nukleotida ke-2 kelompok tersebut hanya berkisar 4-6 nukleotida.

Hasil penjajaran berganda antara kuskus kelompok *Phalanger* asal Papua dan Maluku, serta kuskus kelompok *Spilocuscus* asal Papua dan Maluku masing-masing ditemukan sekuen nukleotida unik sebanyak berturut-turut 13 situs dan tiga situs, sehingga perbedaan pada situs tersebut dapat digunakan alat untuk identifikasi asal kuskus apakah dari Papua atau

dari Maluku. Letak situs yang beragam tersebut disajikan pada Gambar 3 dan 4.

Ketiga belas situs nukleotida yang dapat digunakan sebagai penanda genetik antara *Phalanger* asal Papua dan Maluku adalah situs ke-67(A/G), ke-89(G/C), ke-137(T/C), ke-285(G/A), ke-468(T/C), ke-595(T/C), ke-598, ke-647(T/C), ke-654(G/A), ke-665(T/C), ke-769(C/T), ke-874(C/T), dan ke-876(A/G). Tiga situs yang dapat digunakan sebagai penanda genetik antara *S. maculatus* asal Papua dan Maluku adalah situs ke-127(G/A), ke-481(C/T), dan ke-885(T/C).

SIMPULAN

Keragaman sekuen nukleotida gen 12SrRNA pada kuskus dapat sebagai penanda genetik untuk kuskus asal Sulawesi, Papua, dan Maluku. Kuskus asal Sulawesi adalah *A. ursinus*, kuskus asal Papua dan Maluku adalah *S. maculatus* dan *Phalanger* sp. Terdapat 13 situs nukleotida yaitu situs ke-67(A/G), ke-89(G/C), ke-137(T/C), ke-285(G/A), ke-468(T/C), ke-595(T/C), ke-598, ke-647(T/C), ke-654(G/A), ke-665(T/C), ke-769(C/T), ke-874(C/T), dan ke-876(A/G) yang dapat digunakan sebagai penanda genetik antara *Phalanger* asal Papua dan Maluku, serta tiga situs nukleotida {situs ke-127(G/A), ke-481(C/T), dan ke-885(T/C)} dapat digunakan sebagai penanda genetik antara *Spilocuscus* asal Papua dan Maluku.

SARAN

Penelitian lanjutan pada gen lain dari DNA mitokondria dan menambah sampel kuskus dari habitat lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dikti melalui Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun 2014, Nomor: LPPM-UGM/366/LIT/2014 tanggal 3 Maret 2014 yang telah memberi dukungan dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aplin K, Helgen K. 2008. *Spilocuscus wilsoni*. In: IUCN 2008. IUCN Red List of Threatened Species.
- Fatem S, Sawen D. 2007. Jenis Kuskus di Pantai Utara Manokwari Papua. *Biodiversitas* 8(2): 233-237.
- Flannery TF. 1995. Mammals Of New Guinea. Australian Museum. *Revised and Updated Edition*.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. *Molecular evolutionary genetics analysis version 2.0*. Pennsylvania State Univ.: Inst of Molecular Evolutionary genetics.
- Latinis K. 1996. Hunting The Cuscus in Western Seram: The Role of The Phalanger in Subsistence Economies in Central Maluku. *Cakalele* 7: 17-32.
- Menzies JL. 1991. *A Handbook Of New Guinea Marsupials & Monotremes*. Kristen Pres Inc Madang Papua New Guinea.
- Petocz RG. 1994. *Mamalia Darat Irian Jaya*. Jakarta. Grafiti Pers.
- Ruedas LA, Morales JC. 2005. Evolutionary relationships among genera of phalangeridae (Metatheria: Diprotodontia) inferred from mitochondrial DNA. *Journal of Mammalogy* 86(2): 353-365.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, Position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680.
- Widayanti R, Solihin DD, Sajuthi D, Perwitasari D. 2006. Kajian Penanda Genetik Gen *Cytochrome B* pada *Tarsius* sp. *J Sain Vet* 24(1): 1-8.
- Widayanti R, Solihin DD. 2007. Kajian Penanda Genetik *Tarsius bancanus* dan *Tarsius spectrum* dengan sekuen *D-Loop* Parsial DNA Mitokondria. *Biota* 12(3): 170-176.
- Widayanti R, Handayani NS.H, Budiarsa IM. 2010. Kajian molekular *Tarsius* sp. pada gen penyandi *Cytochrome Oxidase* sub-unit 2 (*COX2*) mitokondria. *Biota* 15(1): 98-106.
- Widayanti R. 2010. Kajian molekular *Tarsius* sp. pada gen penyandi *ATP syntethase* sub-unit 8 (*ATP8*) mitokondria. *Media Kedokteran Hewan* 26 (3): 174-182.
- Widayanti R, Handayani NSH. 2012. Kajian keragaman genetik gen penyandi penyandi *ATP syntethase* sub-unit 6 (*ATP6*) mitokondria pada *Tarsius* sp.: Upaya Konservasi *Tarsius* sp. *J Veteriner* 13 (4): 358-370.
- Widayanti R, Susmiati T, Artama WT. 2013. Kajian keragaman genetik gen *NADH dehydrogenase* Subunit 6 (ND6) pada monyet hantu (*Tarsius* sp.). *J Veteriner* 14(2):239-249.