

KAJIAN KARAKTERISTIK GENETIK RUSA TIMOR (*Cervus timorensis timorensis* Blainville, 1822)

Study on Characteristic of Genetic of the Timor Deer (*Cervus timorensis timorensis*)

M Syamsul Arifin Zein¹, Bambang Surjobroto², Dedy D Solihin²& Siti N Prijono¹

1. Puslitbang Biologi - LIPI
2. FMIPA - Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

*A study on characteristic of genetic of the Timor deer (*Cervus timorensis timorensis*) was conducted during the periode of June - November 1997. Twenty four blood samples from Timor, Semau, Pantar, and Alor Island, Nusa Tenggara Timur Province were examined for this study. Restriction site analysis of part of ribosomeRNA mitochondrial DNA (447 bp), using restriction endonucleasis HaeIII and MboI showed that there were two haplotype variation.*

Kata kunci : Cervus timorensis timorensis. Frogmen ribosomeRNA, Restriction site analysis.

PENDAHULUAN

Cervus timorensis timorensis, merupakan salah satu subspecies rusa timor yang berada di Propinsi Nusa Tenggara Timur. Diskripsi dilakukan oleh Blainville pada tahun 1822 (Schroder, 1976). Daerah sebaran rusa ini meliputi pulau Timor, Roti, Semau, Alor, Kambing, Pantar, dan pulau Rusa (Bemmel, 1949). Saat ini populasi dilaporkan cenderung menurun karena kegiatan perburuan liar dan rusaknya habitat, oleh karena itu keberhasilan mempertahankan populasi rusa ini sangat tergantung dari pengelolaan daerah konservasi (Sutrisno, 1993).

Rusa memiliki potensi yang sangat besar sebagai sumber protein hewani alternatif. Namun demikian, informasi mengenai aspek biologi masih kurang. Oleh karena itu perlu dikaji lebih jauh mengenai berbagai aspek biologi seperti identifikasi dan inventarisasi karakteristik genetik DNA mitokondria rusa timor yang penyebarannya sangat luas di Indonesia. Karena analisis DNA mitokondria adalah cara yang akurat dalam mempelajari keragaman genetik dan biologi populasi (Avise dan Lansman, 1983). Selain itu, analisis DNA mitokondria merupakan alat yang kuat dalam mempelajari evolusi hewan dan banyak digunakan untuk mengenali

struktur populasi, aliran gen, hibridisasi, biogeografi, dan pilogeni (Moritz *et al.* 1992). Ini disebabkan DNA mitokondria yang berbentuk sirkuler berutas ganda, diturunkan langsung secara maternal (Hutchison *et al.* 1974)

Penelitian ini merupakan kajian genom rusa timor (*C. t. timorensis*) dengan metoda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) terhadap fragmen DNA mitokondria yang mengkode ribosoma RNA. Hedges dan Maxson (1993) dan Hay *et al.* (1995) mengkaji variasi situs restriksi fragmen tersebut untuk menjelaskan filogeni amphibia. Sedangkan Suzuki *et al.* (1994) menggunakan ribosoma RNA dari DNA inti untuk menjelaskan filogeni pada *Homo sapiens*. Analisis fragmen tersebut pada rusa belum pernah dilakukan. Diharapkan observasi polimorfisme situs restriksi dari fragmen ini dapat memberikan gambaran variasi genetik rusa timor.

BAHAN DAN CARA KERJA

Rusa timor (*Cervus timorensis timorensis*)

Spesimen yang digunakan adalah sampel darah dari 24 ekor rusa timor dari pulau Timor, Semau, Alor, dan Pantar (Gambar 1) berasal dari

rusa peliharaan masyarakat dan tempat penangkaran rusa milik instansi pemerintah (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah sampel untuk analisis genetik, n = 24

| No. Asal sampel | Jumlah |
|-----------------|--------|
| 1. Pulau Timor | 14 |
| 2. Pulau Semau | 1 |
| 3. Pulau Pantar | 2 |
| 4. Pulau Alor | 7 |

Pengambilan darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada bulan Juni dan November 1997. Rusa ditangkap dengan pembiusan ileum Xylazil-20 (Troy Laboratories Pty, Limited) berisi Xylazine 20 mg/ml. Dosis yang digunakan adalah 3 mg/kg berat badan rusa. Pengambilan darah dilakukan dari vena jugularis dengan menggunakan alat suntik 10 ml. yang telah dibasahi heparin sebagai anti koagulan. Plasma, eritrosit, dan sel darah putih (buffy coat) dipisahkan secara sentrifugasi di lapangan, kemudian sel darah putih yang mempunyai inti disimpan di dalam bok es dan dipindahkan ke dalam freezer setelah sampai di kota Kupang. Setelah pekerjaan lapangan selesai (3 minggu), sampel dibawa ke Bogor dengan bok es melalui angkutan udara.

Isolasi dan purifikasi DNA

Teknik isolasi dan purifikasi DNA total dilakukan berdasarkan prosedur yang dikemukakan oleh Sambrook *et al.* (1989). Sampel DNA total diisolasi dari sel darah putih (buffy coat) yang telah dipisahkan dengan teknik sentrifugasi. Tahap pengerjaannya adalah sebagai berikut:

Sel darah putih yang mengandung inti (buffy coat) dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 10 ml, kemudian ditambah larutan penyangga pelisis A (0,2 % NaCMmM EDTA) sebanyak empat kali volume sampel, dikocok dan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 15 menit, kemudian hemolisis dibuang. Tahap ini dilakukan sebanyak dua kali. Tahap berikutnya ditambahkan larutan pencuci B (0,9 % NaCl-imM EDTA) sebanyak empat kali volume larutan dan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan STE (Salted Tris-EDTA). Tahap berikutnya ditambahkan lagi larutan STE 2 ml, 10 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 200 ul dan enzim proteinase K (5 mg/ml) sebanyak 40 ul. Campuran

ini kemudian di inkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam. Selanjutnya ditambahkan 5 M NaCl 1/10 volume, CIAA (Chloroform-isoamilalkohol) 1/2 volume dan phenol 1/2 volume larutan, dan dilanjutkan dengan proses tilting dalam suhu kamar selama 2 jam. Setelah itu dilakukan sentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit untuk membuang phenol. Proses berikutnya adalah dialisis terhadap TE (Tris-EDTA) sekitar 12 jam. Hasil dialisis dipindahkan ke dalam tabung sentrifus dan di-tambahkan enzim RNase sebanyak 20 ul dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan enzim proteinase K sebanyak 50 ul dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam, Proses berikutnya ditambahkan 5 M NaCl 1/10 volume, CIAA (Chloroform-isoamilalkohol) 1/2 volume, dan phenol 1/2 volume larutan, dilanjutkan dengan tilting pada suhu kamar selama 2 jam; kemudian disentrifugasi masing-masing untuk membuang phenol dengan kecepatan 7000 rpm, selama 10 menit.

Proses terakhir adalah dilakukan dialisis terhadap TE (Tris-EDTA) sekitar 12 jam dan dilakukan 2 kali. DNA total yang dihasilkan diperiksa kualitasnya dan dihitung konsentrasinya. Kemudian DNA total dipindahkan ke dalam botol penyimpanan, ditambah beberapa tetes kloroform untuk menghindari tumbuhnya jamur pada penyimpanan jangka panjang dan disimpan pada suhu 4 °C.

Pengkajian karakteristik DNA mitokondria

Pada penelitian ini digunakan metoda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) untuk menganalisis genom mitokondria yang di amplifikasi dengan PCR (Polymerase Chain Reaction). Fragmen ribosoma RNA dari DNA mitokondria digunakan sebagai target dalam mengkaji karakteristik genetik. Amplifikasi fragmen tersebut, menggunakan primer Ribo D Ribo Komi yang dibuat Prof. Kominami berdasarkan hasil sekuen dari DNA mitokondria manusia, dengan susunan pasangan basa sebagai berikut:

- No: 189
5" Biotin ATCTAGTAGCTGGTCCCTC 3"
- No: 261
5" GGAACCTTCTCCACTTCGG 3"

Pengamatan dilakukan terhadap kondisi (Polymerase Chain Reaction) yang optimal untuk mengamplifikasi fragmen ribosoma RNA dari DNA

mitokondria. Adapun campuran reaksi PCR dibuat sebanyak 25 ul dengan komposisi : 5 ul DNA sampel (5 ug/ml); 2,5 ul 10x buffer (Boeringer Vannhem); 2 ul 2,5 mM MgCl₂ (Perkin Elmer); 2 ul 2.5 mM dNTP (Boringer Mannhem); 1 ul Primer 25 c mol/ul; 2,5 ul DMSO, dan 1 ul (1 unit) Tag Gold Polymerase buatan Perkin Elmer (Surjobroto, komunikasi pribadi).

Analisis keragaman genetik dilakukan dengan memotong fragmen ribosoma RNA dengan enzim restriksi. Enzim restriksi yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari pemotong 4 basa .ffaelll dan *Mbo*l; pemotong 6 basa *Bgl*tt, *Bam*H, *Hpa*l dan *Sac* I. Migrasi fragmen DNA dilakukan dengan menggunakan metoda PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) dengan konsentrasi 5% (Davis *et al.* 1986) dan divisualisasi dengan silver staining. Sedangkan sebagai pembanding besamya fragmen digunakan 100 bp molecular weight marker (Boringer Mannhem),

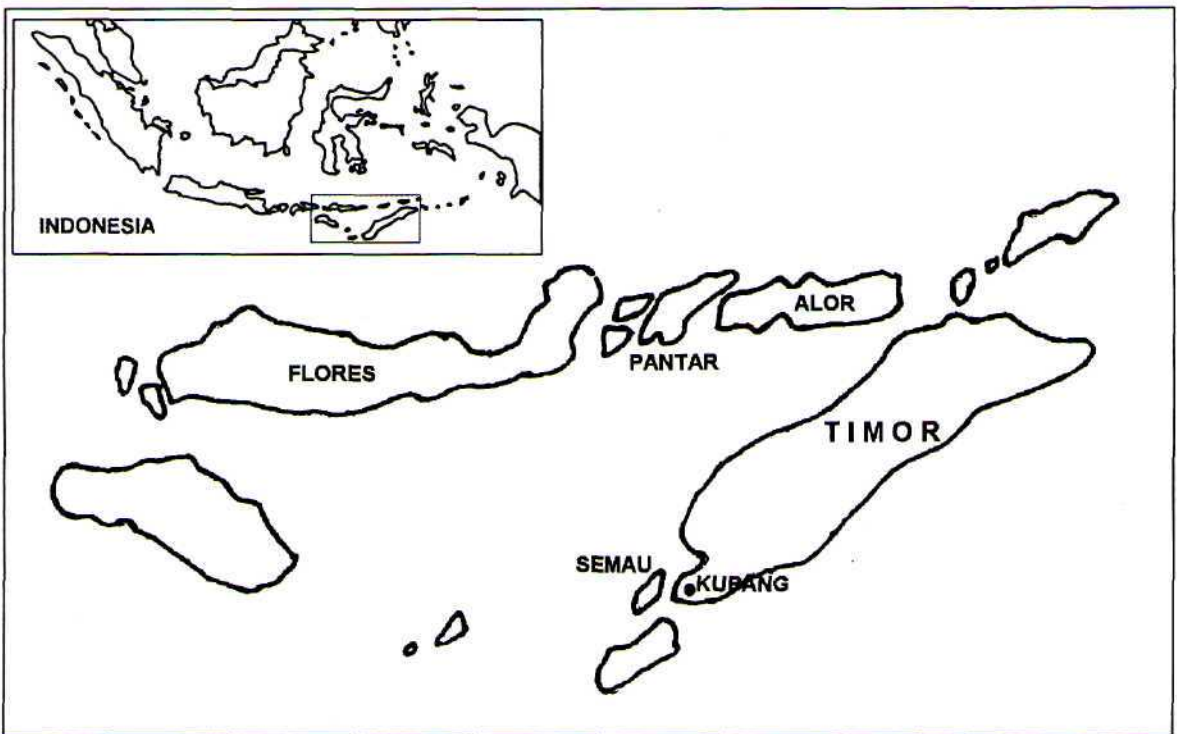
Pembakuan kondisi PCR

Amplifikasi fragmen target menggunakan primer Ribo D Ribo Komi dengan kondisi PCR yang optimal memberikan hasil yang baik, Kondisi optimal tersebut adalah sebagai berikut: denaturasi pada temperatur 94 °C selama 45 detik, hibridisasi primer pada temperatur 52 °C selama 45 detik, dan elongasi hasil hibridisasi pada temperatur 72 °C selama 1 menit 20 detik. Siklus amplifikasi yang digunakan adalah 35 siklus pada mesin Takara PCR Thermal Cycler MP.

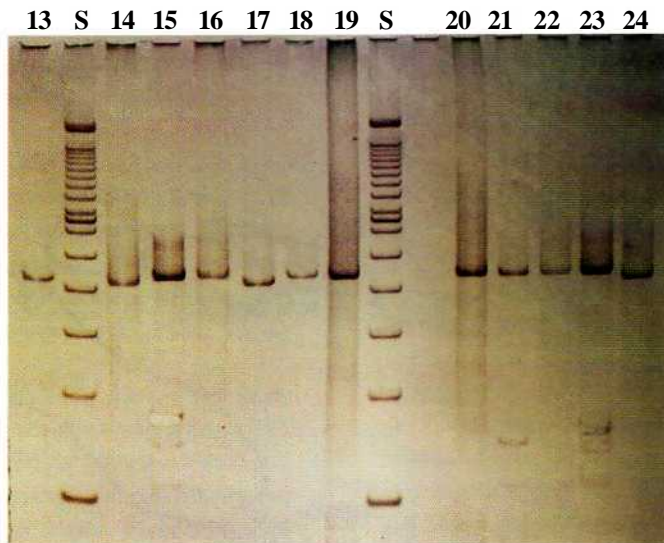
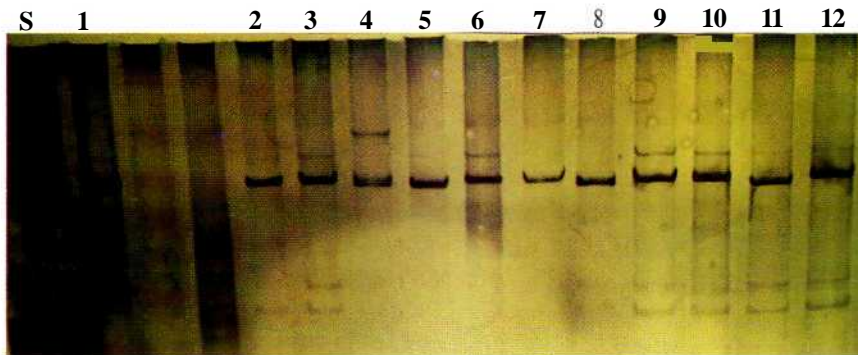
HASIL

Fragmen Ribosoma RNA

Hasil fragmen ribosoma RNA dari DNA mitokondria dengan menggunakan primer Ribo D Ribo Komi teramplifikasi sekitar 447 pasangan basa, dapat dilihat pada Gambar 2. Sedangkan hasil pemotongan fragmen tersebut dengan beberapa enzim restriksi dapat dilihat pada Tabel 2,



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel darah di NTT



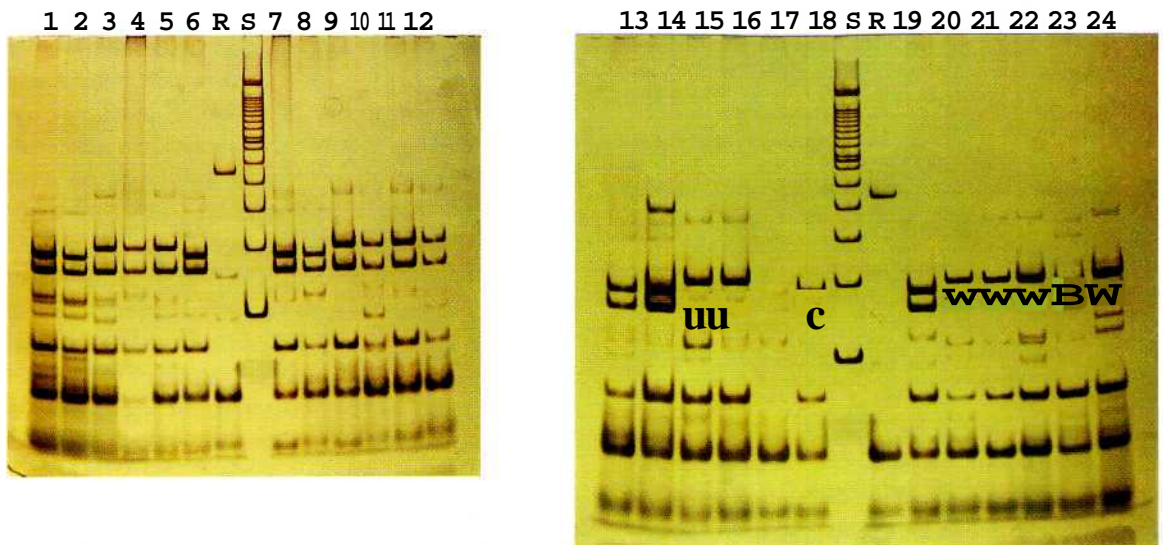
Gambar 2. Migrasi fragmen ribosoma RNA dari DNA mitokondria (447 bp) pada 5 % PAGE (Polyacrilamide Gel Electrophoresis); S = Standard (100 bp molecular weight marker); 1-24 nomorsampel.

Tabel 2. Hasil pemotongan fragmen ribosoma RNA dengan enzim restriksi

| No | Enzim restriksi | Jumlah fragmen | Ukuran fragmen (bp) |
|----|-------------------------------------|----------------|---------------------|
| 1. | <i>Hae</i> III (GG ^A CC) | 3 | 200; 174; 73 |
| | | 4 | 178; 174; 73; 22 |
| 2. | <i>Mbo</i> I (^A GATC) | 3 | 336; 88; 23 |
| | | 4 | 224; 112; 88; 23 |
| 3. | <i>Bgl</i> II(A ^A GATCT) | 2 | 251; 196 |
| 4. | <i>Bam</i> VI(G ^A GATCC) | 1 | 447 |
| 5. | <i>Sac</i> I (GAGCT ^A C) | 1 | 447 |
| 6. | <i>Hpa</i> I (GTT ^A AC) | 1 | 44 |

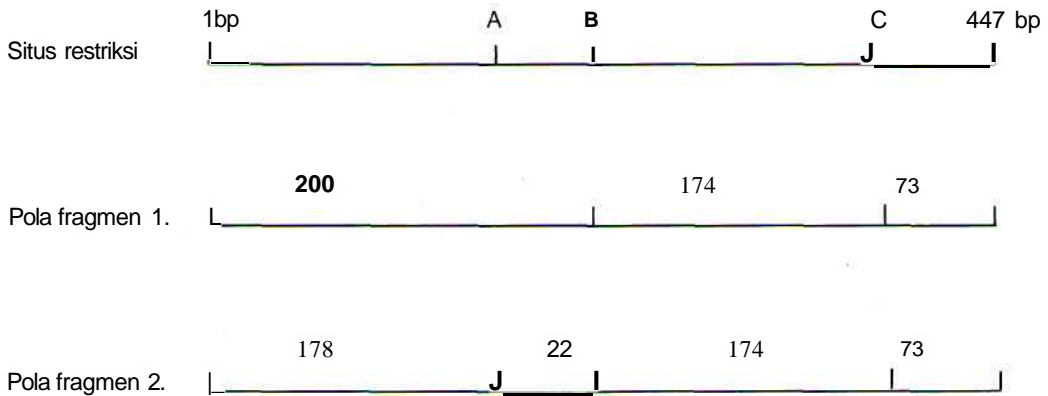
Pemotongan dengan enzim restriksi *Hae*III dan *Mbo*I menghasilkan tiga dan dua situs restriksi (Lampiran), Enzim *Bgl*II hanya dapat mendeteksi satu situs restriksi. Sedangkan enzim restriksi *Som*HI, *Sac*I,

dan *Hpa*I tidak menunjukkan adanya situs restriksi. Salah satu contoh hasil pemotongan fragmen ribosoma RNA dengan enzim restriksi *Hae*III dapat dilihat pada Gambar 3.

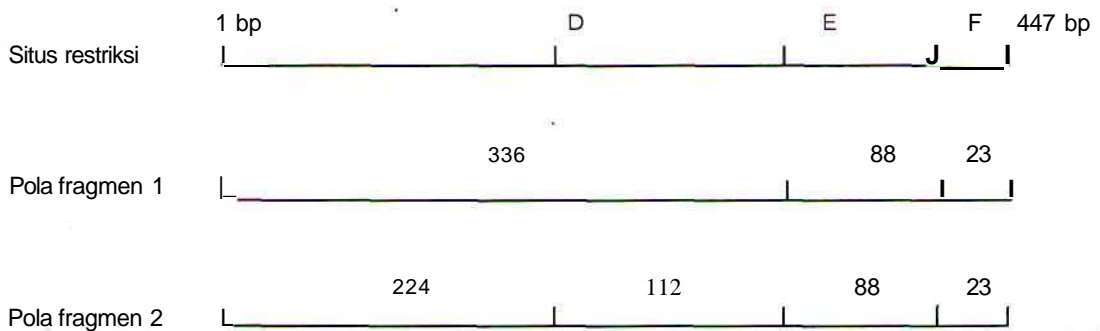


Gambar 3. Migrasi hasil pemotongan fragmen ribosoma RNA dengan enzim restriksi *Hae*III pada 5 % PAGE (Polyacrilamide Gel Electrophoresis); S = Standard (100 bp molecular weight marker); 1-24 nomor sampel; R = Ribosoma RNA dari DNA mitokondria.

Sedangkan hasil pemetaan fragmen ribosoma RNA dan situs restriksi dengan enzim *Hae*III dan enzim *Mbo*I dapat dilihat pada Gambar 4 dan 5.



Gambar 4. Peta besarnya fragmen ribosoma RNA dan situs restriksi enzim *Hae*I



Gambar-5. Peta besarnya fragmen ribosoma RNA dan situs restriksi enzim *Mbo*I

Dari hasil pemetaan fragmen ribosoma RNA dengan enzim restriksi *Hae*III dan *Mbo*I dapat diketahui adanya dua haplotipe. Variasi haplotipe dari fragmen

ribosoma RNA pada berbagai sampel yang berasal dari pulau Timor, Semau, Alor, dan Pantar dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Haplotipe fragmen ribosoma RNA rusa jawa (*Cervus timorensis timorensis*) Pada masing-masing populasi

| Haplotipe | Asal rusa jawa | | | |
|-----------|----------------|-------|------|--------|
| | Timor | Semau | Alor | Pantar |
| 1. | 4 | 0 | 5 | 2 |
| 2. | 10 | 1 | 2 | 0 |

Keterangan : n = 24

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan darah sebagai sumber isolasi DNA. Ekstraksi dan purifikasi DNA total dilakukan dari sel yang mempunyai inti yaitu sel aarah putih (buffy coat) yang dipisahkan secara sentrifugasi dari 10 ml darah rusa. Teknik ini dapat -renghemat pemakaian bahan ekstraksi DNA dan aapat lebih banyak menghasilkan DNA dibanding-kan dengan ekstraksi terhadap darah total (whole blood).

Fragmen ribosoma RNA dari DNA mitokondria yang menjadi target dalam penelitian ini, dapat diamplifikasi dengan melakukan pembakuan terhadap kondisi PCR (Polymerase Chain Reaction), terutama pada proses hibridisasi primer. Jika temperatur saat hibridisasi primer terlalu rendah akan timbul "band non target", sedangkan jika temperatur terlalu tinggi tidak teramplifikasi. Volume kecil dalam reaksi PCR (25 - 50 ul) banyak dilakukan untuk menghemat bahan kimia dengan konsentrasi primer sebesar 25 - 100 pmol. Sedangkan waktu PCR untuk meminimalkan amplifikasi diluar sasaran, adalah waktu denaturasi dan hibridisasi sekitar 30 detik, sedangkan waktu yang diperlukan untuk elongasi adalah 1 - 2 menit per kilobase fragmen sasaran (McPherson *et al.* 1991).

Pada penelitian ini menggunakan waktu denaturasi dan hibridisasi sedikit lebih lama yaitu 45 detik, demikian pula tahap elongasi pada fragmen target 400 - 500 bp digunakan 1 menit 20 detik. Masalah yang dihadapi adalah timbulnya fragmen diluar target, yaitu terjadi pada 3 sampel. Hal ini diatasi dengan jalan melakukan isolasi "band target". Caranya adalah mengambil "band target" hasil elektroforesis dari gel akrilamid dengan menggunakan mata skapel steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, dihancurkan dengan penggerus kecil, dan ditambah 100 ul air destilasi steril. Setelah itu disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit, Supernatan yang jernih diambil sebanyak 10 ul dan dilakukan proses PCR (Polymerase Chain Reaction) kembali dengan 25 ul bahan reaksi (Surjobroto, komunikasi pribadi). Cara ini mudah dan sederhana, namun harus dilakukan hati-hati untuk menghindari kontaminasi.

Hasil pemotongan fragmen ribosoma RNA dari DNA mitokondria dengan menggunakan enzim restriksi *Hae*III dan *Mbo*I pada rusa Timor (*C.t. timorensis*) menunjukkan adanya variasi situs restriksi yaitu terdapat dua haplotipe. Hal ini ke-

mungkinan telah terjadi mutasi pada situs restriksi tersebut. Haplotipe 1 terdapat di pulau Timor, Alor, dan Pantar, sedangkan haplotipe 2 terdapat di pulau Timor, Semau, dan Pantar.

KESIMPULAN

Variasi genetik pada fragmen ribosoma RNA dari DNA mitokondria ini menarik untuk dievaluasi lebih jauh, mengingat rusa ini menyebar hampir di sebagian besar kepulauan nusantara. Pemotongan fragmen ribosoma RNA dari DNA mitokondria dengan enzim restriksi *Hae*III dan *Mbo*I diketahui terdapat dua haplotipe. Haplotipe 1 terdapat di pulau Timor, Alor, dan Pantar. Sedangkan haplotipe 2 terdapat di pulau Timor, Semau, dan Alor.

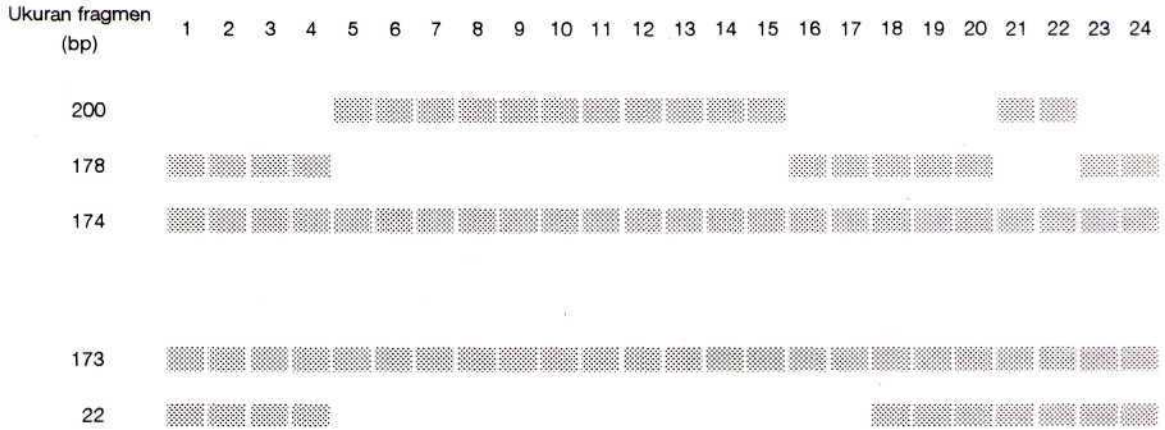
UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Penelitian, Pengembangan dan Pendayagunaan Biota Darat, Puslitbang Biologi - LIPI. Selain itu sangat besar bantuan yang diberikan oleh sdr. Achmad Farajallah dari Laboratorium Zoologi FMIPA IPB dalam analisis DNA. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada sdr. Ibnu Maryanto, A. Saim dan Yusuf dalam membantu pengambilan sampel di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

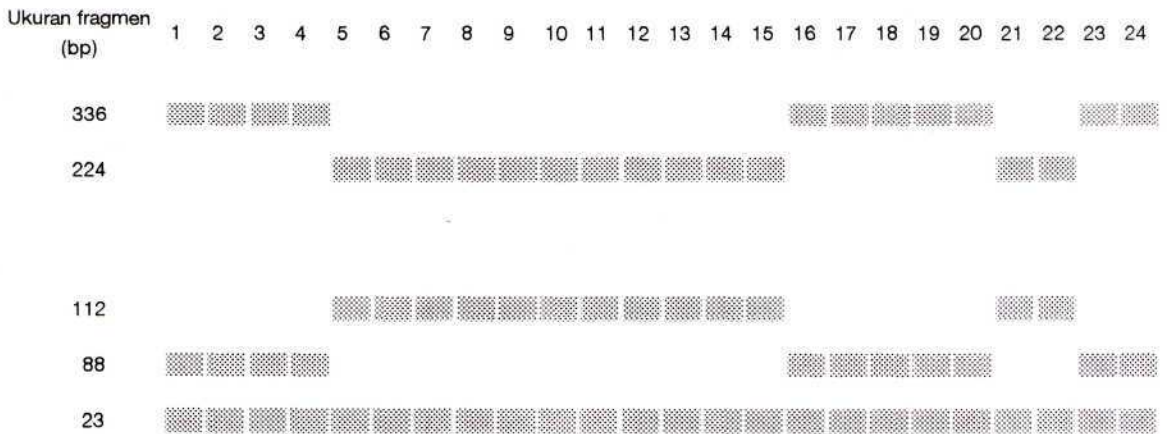
- Avise JC and RA Lansman. 1983.** Polymorphism of Mitochondrial DNA in Population of Higher Animals. In : *Evolution of Genes and Proteins*. M. Nei and R.K. Koehn (ed.). Sinauer Associates INC, Publishers. Sunderland, Massachusetts, P. 147-164.
- Bemmel ACV. 1949.** Revision of The Rusine Deer in The Indo-Australiaan Archipelago. *Treubia* 20, 191.
- Davis LG, MD Dibner, JF Battey. 1986.** Basic Methodes in Moleculer Biology. Elsevier Science Publishing Inc. New York, Amsterdam, London. 388p.
- Hay JM, I Ruvinsky, SB Hedges, and LR Maxson. 1995.** Phylogenetic Relationships of Amphibian Families Inferred From DNA Sequences of Mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA genes. *Mol, Biol EvoU* 2(5), 928-937.
- Hutchison CA, III JE Newbold, SS Porter, and MH Edgell 1974.** Maternal Inheritance of Mammalian Mitochondrial DNA. *Nature* 251,536-538.
- McPherson MJ, P Quirke and GR Taylor. 1991.** *PCR a Practical Approach*. IRL Press. Oxford. 253 p.

- Moritz C, TE Dowling, and WM Brown. 1992.** Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance For Population Biology and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18, 268-92.
- Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989.** *Molecular, Cloning a Laboratory Manual*. Second ed. Cold spring laboratory press.
- Steven CG, SLD Mackay, CS Madsen, PJ Laipis, WW Hauswirth. 1993.** Transcribed Heteroplasmic Repeated Sequences in The Porcine Mitochondria DNA . D-Loop region. *J. Mol. Evol*, 37, 36-47.
- Sutrisno E 1993.** Population Ecology of The Javan Deer (*Cervus limorensis* in Menipo Island, East Nusa Tenggara. Indonesia. *Thesis*. University of the Philippines. Los Banos. 95 p.
- Suzuki H, Y Kawamoto, O Takenaka, I Munechika, H Hori and S Sakurai. 1994.** Phylogenetic Relationships Among *Homo sapiens* and Related Species Based on Restriction Site Variation in rDNA Spacer. *Biochemical genetics*. Vol. 32, Nos. 7/8.
- Walker D, V J Burke, I Barak, and JC Avise. 1995.** A comparison of MtDNA Restriction Sites vs Control Region Sequences in Phylogeographic Assessment of The Musk Turtle (*Sternotherus minor*) *Moleculer Ecology*, 4, 365-373.



Keterangan : 1 - 14 = Rusa timor dari pulau Timor
 15 = Rusa timor dari pulau Semau
 16 - 22 = Rusa timor dari pulau Alor
 23 - 24 = Rusa timor dari pulau Pantar

B. Diagram hasil pemotongan fragmen ribosoma RNA dari DNA Mitokondria enzim restriksi *Mbol*



Keterangan : 1 - 14 = Rusa timor berasal dari pulau Timor
 15 = Rusa timor berasal dari pulau Semau
 16 - 22 = Rusa timor berasal dari pulau Alor
 23 - 24 = Rusa timor berasal dari pulau Pantar