



JARAK GENETIK DAN KEKERABATAN TIGA JENIS BADAK DI DUNIA BERDASARKAN ANALISIS MtDNA

Handayani^{1*}, Dedi Duryadi², Hadi Alikodra³

¹ Universitas Islam As-Syafi'iyah

^{2,3} Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

Diterima: 31 Oktober 2020 Direvisi: 08 Januari 2021 Diterbitkan : 10 Januari 2021

ABSTRACT

The family Rhinocerotidae is distinct and well defined, but systematic relationships among the four genera evaluated on the basis of geographical distribution of the different genera. The purpose of the research is to find out the genetic distance of rhinos in the world. Samples of Sumatran rhinoceros (Indonesia) are from SRS (Sumatran Rhino Sanctuary) Way Kambas National Park, while for Indian rhinoceros and white African rhinos. Amplification of cytochrome oxidase 1 (CO1) genes in mitochondrial DNA (mtDNA) uses a specific primer for COI. The two primary pairs are Primer to amplify the partial CO1 sequence (RHCO1F & RHCO1R). CO1 amplification process PCR conditions used are: predenaturation at 94°C, followed by the main cycle denaturation stage at 94°C for 45 seconds, primary annealing stage (annealing) at 58°C. analyzed provides genetic distance ranging from (0.016) to (0.147) for each species. Analysis of 711 bp of rhino DNA sequences can be shown in the form of a matrix of genetic differences. The genetic distance of the white African rhinoceros (*Ceratium simum*) with the Sumatran torgamba rhinoceros is (0.142), while with the Indian rhinoceros (0.147) and the genetic distance between the Sumatran rhinos themselves there is a difference that the Sumatran rhino Bina differs by (0.136-0.147) with the other three individuals, while Torgamba has a genetic distance with Rosa of (0.014) but with a very close genetic distance (0.007), and Andalas (0.017), while the genetic distance is close to Bina (0.014) with Rosa (0.014).

Keywords: Rhinocerotidae, Genetic Distance, Cytochrome Oxidase 1 (CO1)

PENDAHULUAN

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 tersebar di Pulau Sumatera dan Kalimantan (Borneo).

Informasi terakhir di Kalimantan dijumpai di Kutai Barat (Propinsi Kalimantan Timur) oleh tim WWF Indonesia. Hal ini memberi harapan baru upaya konservasi badak Sumatera yang dapat dilakukan di masa depan (Atmoko et al. 2016). Pada 28 November 2018 berhasil diselamatkan satu ekor Badak Sumatera berjenis kelamin betina pada tempat yang sama di Kabupaten Kutai Barat, Provinsi Kalimantan Timur (Press rilist Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan RI

*Correspondence Address

E-mail: handayani.saintek@gmail.com

Nomor: 663/HUMAS/PP/HMS.3/11/2018). Seperti diketahui Badak Sumatera masuk dalam katagori *Critically Endangered species* (IUCN Red List, 2008) di Sumatera dan Kalimantan.

Menurut Kurniawanto (2007) kekhawatiran ini muncul berkaitan dengan adanya beberapa faktor yang mengancam kelestarian satwa ini. Faktor-faktor tersebut antara lain seperti adanya perburuan liar, perusakan habitat, penyempitan maupun fragmentasi landscape dalam habitat satwa ini. Selain faktor-faktor itu, kekhawatiran ini juga diperkuat oleh karakter dari karakter perkembangbiakan badak sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*) itu sendiri. Spesies ini terkenal sebagai “*slow breeders*” atau perkembangbiakannya lambat, padahal di sisi lain badak sumatera termasuk satwa besar yang membutuhkan daerah jelajah dan pergerakan yang luas. Kebutuhan aktivitas untuk menjelajah areal yang luas ini sering beresiko bagi keguguran janin yang dikandung satwa betina yang sedang hamil. Penelitian keragaman genetik dari populasi Badak Sumatera merupakan langkah penting yang harus dilakukan, maka langkah konservasinya lebih terarah.

Menurut Alikodra (2002) populasi satwa liar dapat berkembang stabil ataupun menurun sesuai dengan kondisi perubahan komponen lingkungannya. Selain faktor diatas terancamnya populasi badak juga

SP. 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 Jawa dan badak Sumatera sudah sangat terancam punah. Tumpuan terakhir bagi keduanya untuk dapat bertahan hidup di habitat alaminya hanya di Indonesia. Pada 2007, populasi badak Jawa di Vietnam yang tersisa hanya sekitar 3-7 individu, namun pada tahun 2012 sudah dinyatakan punah (Ministry of Forestry the Republic of Indonesia, 2007).

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 (*cryptic 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).

Teknik DNA molekuler ini diketahui dapat digunakan sebagai alat bantu identifikasi jenis melalui urutan sekuen barkode DNA dari gen CO1 (*Cytochrome c oxidase subunit-1*) DNA mitokondria (Hebert et al. 2003). Gen CO1 diketahui memiliki variasi dalam spesies (intraspesies) rendah, tetapi mempunyai variasi antar taksa

(interspecies) tinggi (Ward et al. 2005; Hajibabaei et al. 2006). Gen CO1 diketahui memiliki variasi dalam spesies (intraspecies) rendah, tetapi mempunyai variasi antar taksa (interspecies) tinggi (Ward et al. 2005; Hajibabaei et al. 2006). Amplifikasi fragmen gen CO1 menggunakan primer standard DNA *barcode* yang dikembangkan Ivanova et al. (2006) yang sudah banyak digunakan untuk identifikasi spesies mamalia.

METODE PENELITIAN

Sample penelitian badak sumatera (Indonesia) berasal dari SRS (Suaka Rhino Sumatera) Taman Nasional Way Kambas, sample berupa darah diambil pada bulan desember 2008, sampel darah terdiri atas 4 ekor badak sumatera yang berasal dari daerah yang berbeda yaitu (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) Darah diambil dengan menggunakan disposable syringe 10 ml 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 dan kemudian disimpan rapi untuk

selanjutnya dibawa ke laboratorium, untuk badak India dan badak Afrika putih sampel berupa Sequence data runutan badak India (*Rhinoceros unicornis*) dengan kode akses (NC001779), *Ceratotherium simum* (badak putih Afrika) akses kode akses (NC001808). Ekstraksi DNA Untuk sampel darah, ekstraksi menggunakan Qiagen Kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, 2013).

Amplifikasi gen cytochrome oxidase 1 (CO1) pada mitokondrial DNA (mtDNA) menggunakan primer spesifik khusus CO1 yang dirancang berdasarkan sekuen 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 CO1 partial (RHCOIF & RHCOIR). Proses amplifikasi CO1 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 58⁰C, dan tahap polimerasi (*extension*) pada suhu 72 ⁰C diulang sebanyak 35 siklus. Reaksi PCR diakhiri dengan polimerasi (*final extension*) pada suhu 72 ⁰C. Dan proses amplifikasi CO1 tahap penempelan primer (*annealing*) pada suhu 58⁰C. Reaksi PCR untuk tiap campuran baik pada daerah D-loop dan CO1

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).

Analisis data-data polimorfisme panjang fragmen dianalisis dengan menggunakan program MEGA versi 6.0 Beta Release (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Tamura et al. 2007). Sampel badak putih Afrika (*Ceratorium simum*) sequence dengan 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 6.0 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

Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar individu badak Sumatera dan spesies badak lain menggunakan *Pairwise Distance* dengan model *Kimura Two Parameter* dianalisa memberikan jarak genetik berkisar antara (0,016) sampai (0,147) untuk masing-masing spesies. Hasil analisis sekuen DNA badak sepanjang 711 bp dapat ditunjukkan

berupa matriks perbedaan genetik antara badak Sumatera dan badak India serta badak putih Afrika yang datanya diambil dari GenBank.

Jarak genetik badak Afrika putih (*Ceratorium simum*) dengan badak sumatera torgamba adalah (0,142), sedangkan dengan badak india (0,147) dan jarak genetik diantara badak sumatera sendiri terjadi perbedaan yaitu badak Sumatera Bina berbeda sebesar (0.136-0.147) dengan ketiga individu lainnya, sedangkan Torgamba memiliki jarak genetik dengan Rosa sebesar (0.014) namun dengan bina jarak genetik yang sangat dekat (0.007), dan Andalas (0.017), sedangkan jarak genetik andalas dengan Bina (0.014) dengan Rosa (0.014).

Hasil perhitungan berdasarkan daerah CO1 menunjukkan bahwa perbedaan jumlah cula tidak mempengaruhi hubungan kekerabatan antara badak sumatera (Indonesia) dengan badak India hubungan kekerabatan ini lebih didasarkan pada sebaran geografinya. Sebaran geografi badak Sumatera dilaporkan sampai ke daerah India yang merupakan habitat *Rhinoceros unicornis*. Menurut WWF (2002), badak Sumatera mempunyai daerah penyebaran yang luas yaitu meliputi daerah Bengal (India), Burma, Pegunungan Thailand, Kamboja, Vietnam, Laos dan Malaysia.

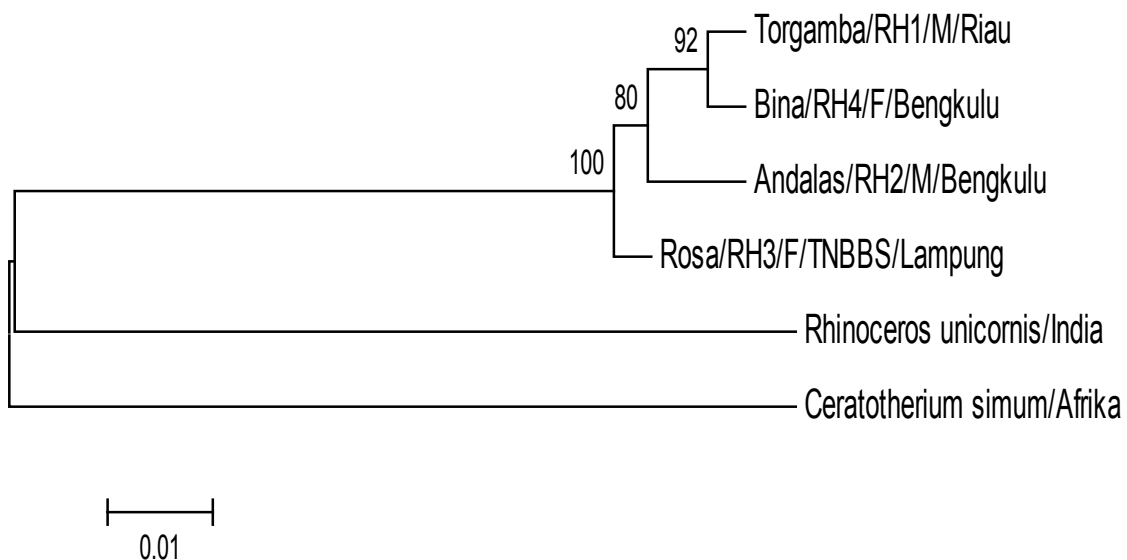
Variasi genetik telah terbukti terkait langsung dengan daya hidup suatu populasi hidupan liar. Beberapa bukti yang

berhubungan dengan penurunan keragaman daya tahan terhadap penyakit. Namun genetik berakibat pada penurunan demikian pola ini tetap ditemukan kemampuan bertahan hidup dan performa pengecualian pada hidupan liar di alam individu seperti keberhasilan reproduksi atau (Frankham et al. 2010).

Tabel 1. Jarak genetiik pada badak India dan badak putih Afrika GenBank dan empat individu badak Sumatera

	<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	0.014	0.014	-	
Bina	0.142	0.144	0.007	0.014	0.016	

Hubungan Kekerabatan Badak Sumatera Berdasarkan Sekuen CO1



Gambar 1. Dendrogram Neighbor-Joining dengan badak Sumatera, badak India dan badak putih Afrika

Oleh sebab itu pengetahuan secara komprehensif tentang keragaman genetik spesies dalam atau antar populasi merupakan langkah penting untuk merancang rencana yang bertujuan menjaga keragaman genetik pada generasi selanjutnya (Li et al. 2008).

Berdasarkan dendogram terlihat 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 (Gambar 1).

Dari gambar 1 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 Andalas dan Rosa terlihat jauh kekerabatannya baik dengan Torgamba maupun Bina.

Torgamba menunjukkan satu kluster 92% dengan Bina, hal ini perlu mendapat perhatian di dalam proses reproduksinya bahwa Torgamba tidak boleh kawin dengan Bina karena memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat yaitu sebesar 92% jika hal ini terjadi maka akan terjadi *inbreeding*. Sedangkan Andalas terlihat jauh hubungan kekerabatannya 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. Dendogram 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 cularnya tetapi masuk dalam satu kelompok/kluster.

Dari data CO1, 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.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil sequence CO1 menunjukkan bahwa jarak genetik berkisar antara (0,016) sampai (0,147) untuk masing-masing spesies. Hasil analisis sekuen DNA badak sepanjang 711 bp dapat ditunjukkan berupa matriks perbedaan genetik antara badak Sumatera dan badak India serta badak putih Afrika yang datanya diambil dari GenBank. Jarak genetik badak Afrika putih (*Ceratotherium simum*) dengan badak Sumatera

torgamba adalah (0,142), sedangkan dengan badak india (0,147) dan jarak genetik diantara badak sumatera sendiri terjadi perbedaan yaitu badak Sumatera Bina berbeda sebesar (0.136-0.147) dengan ketiga individu lainnya, sedangkan Torgamba memiliki jarak genetik dengan Rosa sebesar (0.014) namun dengan bina jarak genetik yang sangat dekat (0.007), dan Andalas (0.017), sedangkan jarak genetik andalas dengan Bina (0.014) dengan Rosa (0.014).

Dari data CO1, 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 bahwa perbedaan tersebut terjadi karena adanya pemisahan geografi perbedaan tersebut tidak berhubungan dengan jumlah cularnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Alikodra HS. 2002. *Pengelolaan satwaliar jilid 1*. Departemen Pendidikan dan kebudayaan Direktorat Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- 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.
- Awise, 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.
- Borisenko, AV., BK. Lim, NV. Ivanova, RH. Hanner & PDN. Hebert. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: afield study in Suriname. *Molecular Ecology Resources* 8:471-479.
- Cunningham, Meghan MC. 2001 .Biological identification systems: genetic markers. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 20 (2): 491-499.
- 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. .
- Frankham, R., JD. Ballou, DA. Briscoe. 2010. *Introduction to Conservation*

- Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Foose, T.J. & Strien van. N. (Editors). 1997. Asian Rhinos Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland, and Cambridge, UK. 112+v pp.
- Hebert, PDN., A. Cywinska, SL. Ball & JR. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences, Series B*. 270: 313–322.
- Hajibabaei M., DH. Janzen, JM. Burns, W. Hallwachs & PDN. Hebert. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings National Academy of Sciences*. USA. 103(4) 968-971.
- Ivanova, NV., JR. deWaard, PDN. Hebert. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high quality DNA. *Molecular ecology Notes*. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.0147x. 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.
- Isnan 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.
- Li, JY., H. Chen, XY. Lan, XJ. Kong & LJ. Min. 2008. Genetic diversity of five Chinese goat breeds assessed by microsatellite marker. *Czech Journal Animal Sciences* 53(8):315-319).
- Scott C., T. Foose, JC. Morales, P. Fernando, DJ. Melnick, PT. Boag, JA. Davila & PJ. Van Coeverder De Groot. 2004. Optimization of novel polymorphic microsatellites in the endangered sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Molecular Ecology Notes* 4:194-196.
- Steiner, CC., ML. Houch & OA Ryder. 2018. Genetic variation of complete mitochondrial genome sequences of the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Conservation Genetic* 19:397-408.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- 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.

Ward, RD., TS. Zemlak, BH. Innes, PR. Last & PDN. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Sciences*. 360:1847-1857.

WWF (World Wide Fund). 2002. *Asian Rhinos- Spesies Status Report*. WWF.

Zein, MSA. & YS. Fitriana. 2012. Teknik Molekuler untuk Identifikasi Spesies Ordo Cetartiodactyla Menggunakan Barcoding DNA. *Zoo Indonesia* 21(2):1-8.

