

Ringkasan Penelitian

PENGGUNAAN MARKA GENETIK MOLEKULER UNTUK MONITORING BADAK JAWA DAN SUMATRA SERTA PERSIAPAN PEMBENTUKAN POPULASI ALTERNATIFNYA

Dedy Duryadi Solihin, M. Agil, Bambang Purwantara & Cece Sumantri

Badak Jawa (*Rhinoceros sondaicus*) adalah hewan langka diantara spesies badak yang ada di dunia dan jumlahnya hanya tersisa kurang dari 60 ekor yang berada hanya pada satu tempat yaitu di Indonesia, sedangkan di Vietnam yang sebelumnya terdapat Badak jawa tersisa beberapa ekor namun berdasarkan laporan dan publikasi Brook *et al.* (2012) telah punah.

Hasil survey dari “camera trapping” terbaru 2014 di daerah Taman Nasional Ujung Kulon, provinsi Banten mendapatkan badak jawa hanya sekitar 58 ekor saja (Sunarto et al. 2015). Namun demikian, 58 (lima puluh delapan) ekor badak jawa tersebut belum teridentifikasi jenis kelamin dengan tepat dan karakter genetiknya. Identifikasi fingerprint genetik dan jenis kelaminnya sangatlah penting dalam menunjang program monitoring serta konservasinya. Di Indonesia, badak jawa bercula satu populasinya tidak berkembang lagi dan relatif stabil pada jumlah populasi kecil. Masih bertahannya populasi kecil ini dan tidak punah, hal ini berkat usaha keras yang telah dilakukan secara langsung dengan menjaga dan melindungi badak jawa tersebut oleh para penjaga Taman Nasional Ujung Kulon dengan unit organisasi yang solid dan dikenal sebagai “Rhino Protection Units (RPU)” (IRF 2010).

Identifikasi fingerprint genetik dan jenis kelaminnya sangatlah penting dalam menunjang program monitoring serta konservasi badak jawa. Hasil dari penelitian tersebut selanjutnya dapat digunakan sebagai data dasar untuk memilih calon-calon indukan yang akan dijadikan sebagai populasi awal (cikal bakal populasi alternatif atau populasi kedua) bagi pengembangan badak jawa di habitat keduanya di luar Taman Nasional Ujung Kulon (TNUK) yang sedang diteliti untuk ditentukan sebagai tempat penyelamatan hewan ini.

Tujuan dari penelitian ini adalah : a) mengetahui dengan tepat keragaman individu melalui penentuan jenis kelamin, fingerprint genetik dan distribusi spasialnya; b) mengidentifikasi cikal bakal populasi alternatif atau populasi kedua berdasarkan karakteristik genetiknya. Dalam usaha mencapai tujuan tersebut maka dilakukan terlebih dahulu standarisasi dan optimasi marker molekuler yang akan digunakan yaitu memakai DNA asli

badak jawa. Hal ini dilakukan karena selama ini tidak ada spesimen hidup badak jawa di kebun binatang ataupun di tempat penangkaran di seluruh dunia. Material sumber DNA yang ada hanya dari preparat awetan musium (kulit) dimana sulit untuk diekstraksi DNANYA karena sudah diawetkan memakai bahan-bahan yang menyulitkan dalam proses amplifikasi memakai teknik PCR. Untuk itu bahan DNA asli badak jawa dipakai preparat tulang yang mati di Taman Nasional Ujung Kulon (TNUK) pada bulan Mei tahun 2010. Marka molekuler untuk identifikasi jenis kelamin anggota populasi dilakukan memakai sepasang primer spesifik untuk sexing (Peppin et al., 2009) yaitu mengamplifikasi bagian intron gen Zinc Finger Protein (ZFP) yang ada pada khromosom X (ZFX) dan homolognya pada khromosom Y (ZFY). Dalam usaha mendapatkan polimorfisme fragmen ZFP dilakukan dengan cara melabel salah satu primernya yaitu bagian forward (*sense*) memakai penanda fluorescent (*Fluorescence dye*). Marka molekuler yang digunakan untuk karakteristik molekuler individu adalah DNA mitokondria (mengamplifikasi bagian fragmen D-loop yang hipervariabel) dan DNA inti (mengamplifikasi lima loksi mikrosatellite yang spesifik untuk badak jawa yaitu JR-003, JR-006A, JR-009, JR-013-2, dan JR-023).

Material dasar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 14 kotoran dari badak-badak yang tersebar secara acak di Taman Nasional Ujung Kulon (TNUK). Ke-empat belas kotoran badak tersebut diekstraksi memakai QIAamp Stool Mini Kit (QIAGEN), sedangkan sampel Tulang diekstraksi memakai teknik Forensik.

Analisis marka identifikasi sex dan Mikrosatellite memakai Fragmen DNA analisis untuk mengungkapkan polimorfisme ukuran fragmen dan polimorfisme ukuran allelnya. Analisis DNA mitokondria bagian D-loop (*Control Region, CR*) dilakukan dengan mensekuensi hasil PCR (*amplicon*) untuk mendapatkan susunan urutan basa-basa nukleotidanya dan selanjutnya disejajarkan dengan urutan basa-basa nukleotida yang ada di GenBank (NCBI) memakai outgrup dari spesies badak lainnya (Badak Afrika, *Accession No. Y07726*; Badak India, *Accession No.X97336*).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa DNA dari tulang badak Jawa yang mati di TNUK dapat dijadikan sebagai “material standard sumber DNA” badak jawa yang dapat dipakai untuk optimasi, kalibrasi, dan efektivitas dari marka-marka genetik molekuler yang akan digunakan dalam analisis genetik badak jawa dan konservasi genetiknya.

Adanya polimorfisme fragmen spesifik Zinc Finger Protein (ZFP) berukuran ± 99 bp (ZFP-X) sedangkan ZFP-Y berukuran ± 106 bp. Hasil ini memudahkan penentuan jenis

kelamin badak jawa. 7 (tujuh) jantan dan 7(tujuh) betina berhasil diidentifikasi dari 14 sampel tersebut beserta sebaran spasialnya.

Haplotipe dari tulang badak yang mati di TNUK dapat diidentifikasi dengan tepat dengan “marka fragmen D-loop DNA mitokondria” dan termasuk dalam haplotipe 2 dari tiga haplotipe badak jawa yang selama ini telah diketahui ragam kelompoknya dan sangat berbeda dengan kelompok badak Vietnam yang dikenal sebagai sub-spesies dari badak jawa. Perbandingan dengan outgrup yaitu memakai badak Afrika dan badak India menunjukkan konsistensi pengelompokan intra-populasi badak jawa (haplotipe 1,2, & 3) dan inter-populasi dengan badak Vietnam, serta terpisah inter-spesies dengan badak India dan badak Afrika. Pengelompokan filogenetik badak dunia dari hasil ini adalah tidak didasarkan pada jumlah cula (horn) akan tetapi lebih didasarkan pada sebaran geografik karena walaupun sama-sama bercula dua badak sumatera termasuk dalam kelompok (*cluster*) badak Asia, berbeda dengan badak afrika. Namun demikian, hasil analisis fragmen D-loop berasal dari sampel feces badak jawa di TNUK belum berhasil teramplifikasi dengan baik sehingga pengelompokan haplotipenya belum dapat diungkapkan.

Keragaman allelik yang dapat diungkapkan oleh marka mikrosatellite cukup baik yaitu memiliki nilai polimorfisme markernya (PIC) adalah 80% sedangkan nilai heterozigositasnya (Ho) sebesar rata-rata 0,52. Lokus JR-006A dan JR-023 memberikan harapan untuk fingerprint individu karena minimum 4 allel berhasil diidentifikasi. Hal ini memudahkan dalam penentuan genotipe masing-masing individu. Dengan demikian, kombinasi hasil genotipe untuk identifikasi kekerabatan individu dan pengelompokan berdasarkan haplotipenya akan menjadi dasar yang kuat untuk memilih dan memilah calon indukan yang berbeda karakter genetiknya untuk calon populasi kedua yang akan ditranslokasikan ke habitat keduanya di luar TNUK dan secara konservasi genetik keragamannya dapat tetap dipertahankan.

Kata kunci : Sexing secara molekuler, *gen zinc finger protein (ZFP)*, *fingerprint individu*, *D-loop*, *mikrosatellite*, *Rhinoceros sondaicus*

Executive Summary

APPLICATION OF MOLECULAR GENETIC FOR JAVAN & SUMATRAN RHINO MONITORING AND PREPARATION FOR ESTABLISHMENT SECOND POPULATION

Dedy Duryadi Solihin, M. Agil, Bambang Purwantara & Cece Sumantri

The Javan Rhino is the rarest among rhino species numbered only to less than 60 animals surviving in only two known locations: one is in Indonesia that is approximately amounted to 50-60 animals and the other was in Vietnam that has been extinct according to Brook *et al.*, 2012. In Indonesia, Javan rhinos inhabit only in Java's Ujung Kulon National Park (TNUK), where the population appears to have been stabilized, largely because they are physically protected from harming by Rhino Protection Units (RPU)(IRF, 2010).

Current camera trapping surveys estimate a population consists of 58 individuals (unpublished WWF technical report 2014). Rhinos are currently limited to lowland areas in the peninsula. Although the peninsula is thought to have support approximately 100 rhinos in the past, its carrying capacity may have been decreased due to habitat change and degradation. This issue is also similar to Sumatran Rhino population. Sumatran Rhino population is fragmented into several small populations leading to vulnerability. The continuation of this protection, combined with establishing a rhinoceros second population in Indonesia, provides the best possible outlook for the species' survival.

Unfortunately, these 58 individuals of Javan rhino are not genetically identified and sexually determined. Identifying genetic fingerprint and sex of individual are an important component of species monitoring programs and conservation which can improve our understanding on population structure and dynamics, and assist management population. The failed and undevelopment population of the Javan and Sumatran rhinoceros might be caused by inbreeding depression and unsuccessful reproduction. This result could be used as a basis data for choosing some couples of population foundation (parental candidate selection) of second population on the basis of genetic characteristic for developing javan rhino in second habitat outside Ujung Kulon National Park (TNUK).

The objectives of this study were to (1) accurately determine individual variation through sex determination, genetic fingerprinting, and spatial distribution. (2) identify second

population on the basis of genetic characteristic. In order to achieve the objectives, standardization and optimization on molecular markers using original Java Rhino DNA should be applied. These efforts were applied as there was no rhino in the zoo and semi wild preserved areas of the world. DNA source material from museum was difficult to DNA extraction as it has been preserved using buffer which is commonly known as a PCR inhibitor. Therefore DNA material for this study was acquired from dead javan rhino bone of TNUK, it was predictively died on May 2010. Primers used for sex determination molecular markers were specifically designed by Peppin et al. (2009), i.e., intron part of Zinc Finger Protein (ZFP) located in chromosome X (ZFX) and the homolog, Y (ZFY). To acquired ZFP fragment polymorphism, forward primer (sense) was fluorescently labelled using *Fluorescence dye*. Molecular marker applied for individual molecular characteristic was mitochondrial DNA (hypervariable control region Dloop) and nuclear DNA by amplifying five specific microsatellite loci for javan rhino (JR-003, JR-006A, JR-009, JR-013-2, dan JR-023).

Samples used in thus study were 14 rhino faeces distributed randomly at TNUK. Those samples were DNA extracted using QIAmp Stool Mini Kit (Qiagen), while bone sample was extracted using forensic technique.

Sex determination and microsatellite markers using DNA fragment analysis were applied to analyze fragment and allele size polymorphisms. Control region (D-loop) mtDNA was to acquired nucleotide bases and further align with nucleotide of other rhinos of GenBank (NCBI).

Results showed javan rhino bone DNA was ample used as DNA material source for optimization, calibration, and effectivity of molecular genetic markers to analyze javan rhino genetic and its genetic conservation.

Given to ZFP specific fragment polymorphism on 99 bp ZFP-X and 106 bp ZFP-Y, there were seven females and males each identified from 14 individuals, along with its spatial distribution.

Haplotypes of dead javan rhino were able to identify accurately using mt DNA control region D-loop. There were two of three haplotypes of javan rhino that the group variation was known and they were different from vietnamese rhino as the sub species of javan rhino. Outgroup used was african and indian rhinos, they were molecularly separated group. The

result showed javan rhinos were intrapopulation themselves, interpopulation with vietnamese rhino, and interspecies with african and indian rhino. Those groupings were not on the basis of horn but they were of geographic distribution. Fecal javan rhino D-loop control region mtDNA fragment has not been successfully amplified, consequently, haplotype cluster cannot be determined.

Value of polymorphism marker (PIC) of microsatellite was 80% with heterozygosity (Ho) 0.52. Loci JR-006A and JR-023 might give expectation for individual fingerprinting as four alleles were successfully identified. It therefore facilitates individual genotyping determination. Genotyping in identification of individual relationship and cluster based on haplotype will be the basis for parental candidat selection that characters are different from second population candidate. This second population candidate will be translocated into second alternative habitats outside TNUK and the genetic variation may thus be maintained for genetic conservation.

Keywords: Molecular sexing, zinc finger protein (ZFP) gene, individual fingerprint, D-loop, microsatellite, *Rhinoceros sondaicus*