

MONITORING POPULASI HIDUPAN LIAR DENGAN DNA DARI FESES

**Oleh: Damaring Tyas Wulandari (tyas@coffee-cat.net)
Selesai ditulis 11 Juni 2006**

Abstrak

Metode pengambilan sampel DNA secara non-invasif dari feses merupakan sebuah metode yang semakin luas digunakan dan diakui. Metode tersebut lebih mudah, sederhana, tidak sedisruptif metode-metode konvensional, dan jumlah sampel yang diperoleh dapat ditingkatkan. Metode itu terutama baik digunakan untuk spesies yang langka, sulit ditemukan, ataupun nokturnal. Analisis DNA feses dapat memberikan informasi mengenai kelimpahan, *range*, paternitas, *kinship*, kekerabatan, ukuran populasi, keberagaman genetik, struktur ataupun substruktur populasi, organisasi sosial, rasio jenis kelamin, pengenalan individu-individu dan jenis kelamin, serta beragam kegunaan lain. Reliabilitas DNA feses sebagai sumber DNA dibuktikan antara lain oleh Bayes dkk. (2000) dan Parsons (2001). Selain keuntungan-keuntungan tersebut, terdapat juga beberapa kelemahan ataupun keterbatasan metode tersebut. Kualitas dan kuantitas DNA yang diperoleh dari feses sering kali rendah, dan kerap kali mengalami degradasi. Sampel juga mungkin terkontaminasi dan mengandung penghambat PCR. Kesalahan juga mungkin melibatkan *polymerase slippage*, *allelic dropout*, dan *false allele*. Akibat dari kesalahan-kesalahan tersebut adalah *overestimation* ataupun *underestimation* serta kesalahan identifikasi. Sejumlah penelitian untuk menemukan pendekatan terbaik untuk mengatasi kelemahan-kelemahan tersebut telah dilakukan, antara lain oleh Buchan dkk. (2005) dan Creel dkk. (2003).

Kata kunci: DNA, estimasi populasi, feses, *genotyping*, *matching approach*, *monitoring* populasi, *multiple tubes*, PCR

I. MANFAAT DAN KEUNTUNGAN PENGAMBILAN SAMPEL DNA SECARA NON-INVASIF DARI FESES

Konservasi dan manajemen hidupan liar memerlukan informasi mengenai berbagai parameter populasi, akan tetapi informasi tersebut seringkali sulit diperoleh bila spesies yang diamati merupakan spesies yang langka, sulit ditemukan, ataupun nokturnal (Creel dkk. 2003; Wilson

**Damaring Tyas Wulandari
6503040019
Pascasarjana Biologi Universitas Indonesia**

dkk. 2003: 658). Sejumlah metode konvensional yang digunakan untuk memperkirakan kelimpahan spesies dan parameter populasi lainnya antara lain adalah pengamatan jejak dan tanda yang ditinggalkan hewan (yang sulit dikaitkan dengan kelimpahan absolut) atau metode menangkap, menandai, dan melepaskan kembali individu-individu hewan. Akan tetapi, metode-metode semacam itu tingkat akurasi tidak selalu sama dan sering kali menyita terlalu banyak waktu, tenaga, serta biaya. Selain itu, penangkapan hewan dan pelacakan dengan bantuan radio (*radio-tracking*) dapat menyebabkan stres bahkan kematian hewan yang sebenarnya telah menghadapi risiko besar dari predasi dan cekaman-cekaman lingkungan lainnya (Creel dkk. 2003: 2003; Piggott dkk. 2000: 67). Oleh karena itu, sebagai alternatif dari metode-metode tersebut, dikembangkanlah cara-cara pengambilan sampel genetika secara non-invasif, misalnya mengumpulkan sampel rambut ataupun feses. Cara-cara pengumpulan semacam itu tidak mengharuskan peneliti menangkap, atau bahkan melihat, hewan sasaran (Wilson dkk. 2003: 659). Keuntungan lain dari pengambilan sampel DNA secara non-invasif, selain lebih mudah, sederhana, dan tidak sedisruptif metode-metode konvensional, adalah bahwa jumlah sampel yang diperoleh dapat ditingkatkan (Parsons 2001: 341).

Feses telah menjadi sumber DNA yang semakin luas digunakan dan diakui (Bayes dkk. 2000: 173). Hal itu dimungkinkan karena feses mengandung sel-sel epitelial yang terus-menerus terlepas dari lapisan usus. Dengan demikian, DNA dalam jumlah kecil bisa diisolasi dari feses dan diperbanyak dengan PCR (Piggott dkk. 2000: 67; Wilson dkk. 2003: 659). Macam-macam informasi yang dapat diperoleh dari *monitoring* populasi menggunakan DNA dari feses adalah mengenai kelimpahan, *range*, paternitas, *kinship*, kekerabatan, ukuran populasi, keberagaman genetik, struktur ataupun substruktur populasi, organisasi sosial, dan rasio jenis kelamin suatu spesies, serta mengenali individu-individu (Archie dkk. 2003: 244; Buchan dkk. 2005: 683; Creel dkk. 2003: 2004, 2008; Oelfke dkk. 2003:

56; Parsons 2001: 343; Piggott dkk. 2000: 68). DNA dari feses juga dapat digunakan untuk menganalisis dan mengkaji risiko yang ditimbulkan akibat cekaman lingkungan atau interaksi spesies dengan spesies lainnya, seperti yang dilakukan oleh Ernest dkk. (2002) yang meneliti pengaruh predasi singa gunung terhadap domba *bighorn*. Contoh lain dari keberhasilan penggunaan feses sebagai sumber DNA adalah sebagaimana yang dilaporkan oleh Ernest dkk. (2000), yang melakukan penelusuran molekular pada singa-singa gunung di daerah Lembah Yosemite, California, Amerika Serikat. Mereka menyimpulkan bahwa analisis DNA feses singa gunung merupakan metode yang praktis dan berguna untuk penelitian hidupan liar. Analisis DNA feses dapat digunakan untuk menentukan lokasi rute jelajah singa gunung dan mengidentifikasi individu-individu menggunakan 12 mikrosatelit. Selain itu, analisis DNA feses juga dapat membedakan antara DNA feses singa gunung dengan mangsanya dan juga dengan *bobcat*, serta menyediakan genotipe mikrosatelit yang dapat dipercaya (*reliable*). Ernest dkk. berharap di masa mendatang metode yang telah mereka rintis akan bisa dikembangkan lebih lanjut untuk menentukan jenis kelamin dan mengestimasi ukuran populasi, baik bagi singa gunung maupun spesies-spesies lainnya.

II. KESULITAN-KESULITAN YANG DIHADAPI DAN PENDEKATAN UNTUK MENGATASINYA

Akan tetapi, selain keuntungan-keuntungan yang telah disebutkan di atas, pengambilan sampel secara non-invasif—dalam hal ini dari feses—memiliki sejumlah kesulitan. Yang pertama adalah bahwa DNA yang diperoleh umumnya memiliki kualitas dan kuantitas rendah (Archie dkk. 2003: 244; Buchan dkk. 2005: 680). Selain itu, degradasi materi genetik feses menjadi salah satu hambatan potensial serius (Wilson dkk. 2003: 660). Kuantitas DNA yang rendah dapat diatasi dengan cara memperbanyak DNA menggunakan PCR (Piggott dkk. 2000: 67) sementara minimalisasi degradasi

materi genetik dapat dilakukan dengan cara mengumpulkan feses segar, atau dengan kata lain sesegera mungkin setelah feses dikeluarkan oleh hewan sasaran (Bayes dkk. 2000: 175; Parsons 2001: 343; Wilson dkk. 2003: 660). Selain itu, pengumpulan feses segar juga dimaksudkan untuk memperkecil kesulitan yang mungkin dihadapi dan menyebabkan kesalahan interpretasi data yang diperoleh akibat ketidakpastian mengenai benar-tidaknya individu sasaran-lah yang menghasilkan feses tersebut, seperti misalnya yang dihadapi oleh Ernest dkk. (2002: 82) yang mencoba menentukan singa gunung-singa gunung mana yang melakukan predasi terhadap domba *bighorn*.

Isolasi DNA dari feses kemudian dapat dilakukan dengan menggunakan Qiagen QIAmp DNA *stool kit* dengan menuruti protokol yang telah disediakan oleh pembuatnya. Protokol itu juga dapat dimodifikasi sesuai keperluan (Archie dkk. 2003: 244; Buchan dkk. 2005: 680; Creel dkk. 2003: 2004).

Beberapa masalah lain yang dihadapi adalah kontaminasi sampel, kemungkinan oleh DNA manusia ataupun dari populasi yang diamati (Buchan dkk. 2005: 682), terutama jika sampel yang dikumpulkan pada awalnya tidak dimaksudkan untuk diperbanyak dengan PCR (Creel dkk. 2003: 2004). DNA feses juga sering kali mengandung penghambat PCR (Creel dkk. 2003: 2003). Kesalahan juga mungkin melibatkan *polymerase slippage* saat amplifikasi (alel-alel yang hanya berbeda satu ulangan dari alel sebenarnya yang dicari), *allelic dropout* (kegagalan mengamplifikasi suatu alel), dan *false allele*, yaitu alel salah yang hanya muncul sekali dan tak pernah atau jarang tereplikasi di sampel yang sama ataupun sampel yang lain (Buchan dkk. 2005: 682; Creel dkk. 2003: 2003; Parsons 2001: 342). Jika sampel yang dikumpulkan cukup intensif, ada kemungkinan setiap individu menyumbangkan satu atau lebih genotipe '*ghost*' yang salah ke dalam kumpulan data. Akibat dari kesalahan-kesalahan tersebut adalah hasil yang diperoleh dapat terlalu tinggi (*overestimation*) ataupun terlalu rendah

(*underestimation*) dari jumlah yang sebenarnya. Kesalahan tunggal dalam genotipe multilokus bahkan dapat menciptakan seekor 'individu gadungan' (*false individual*) dan menyebabkan kesalahan identifikasi (Creel dkk. 2003: 2004).

Buchan dkk. (2005: 681--682) menyarankan penggunaan lokus yang berukuran lebih kecil untuk penelitian *genotyping* dari feses. Lokus yang lebih kecil ternyata lebih tinggi keberhasilan amplifikasinya, dan lokus yang lebih besar memiliki tingkat *allelic dropout* yang secara signifikan lebih tinggi. Setiap kali terjadi peningkatan 100 pasang basa pada ukuran alel, maka keberhasilan amplifikasi berkurang 12--15%. Akan tetapi, ukuran alel tidak selalu dapat menjelaskan variasi dalam hal keberhasilan amplifikasi dan *dropout* dari sampel-sampel yang diperoleh Buchan dkk. Sejumlah lokus yang berukuran lebih besar kinerjanya sama baiknya dengan lokus yang jauh lebih kecil, dan beberapa lokus tetap tinggi tingkat *allelic dropout*-nya meskipun konsentrasi DNA meningkat. Hal itu tampaknya menunjukkan bahwa keberhasilan amplifikasi mungkin dipengaruhi oleh faktor-faktor yang sulit untuk dikuantifikasi, misalnya efisiensi penempelan primer tertentu ataupun struktur-struktur sekunder pada DNA cetakan.

Bayes dkk. (2000) mencoba menguji reliabilitas *typing* mikrosatelit dari DNA feses pada babun savana Afrika (*Papio anubis*). Mereka membandingkan hasil yang diperoleh dari DNA hasil isolasi dari feses dengan yang diperoleh dari darah. Kesimpulan mereka adalah terdapat perbedaan antara darah dan feses dalam hal efisiensi sebagai sumber amplifikasi mikrosatelit, baik dari sisi tingkat keberhasilan amplifikasi awal maupun kasus *allelic dropout*. Akan tetapi, tingkat keberhasilan amplifikasi DNA dari feses cukup tinggi untuk menjustifikasi penggunaan feses sebagai sumber DNA dalam pengelolaan populasi liar. Fidelitas genotipe dari feses mencapai 91% (217 dari 238 genotipe), dan tingkat persamaan antara genotipe dari individu yang sama yang diperoleh dari darah dan feses mencapai 98% (94 dari 96 genotipe). Oleh karena itu, Bayes dkk.

menyimpulkan bahwa feses merupakan sumber yang viabel bagi DNA. Catatan Bayes dkk. tentang penelitian mereka adalah bahwa materi feses dikumpulkan hanya dalam waktu beberapa menit setelah dikeluarkan oleh individu (feses segar), dan semua individu penghasil feses itu dapat diidentifikasi (Bayes dkk. 2000: 175). Hasil perbandingan antara genotipe yang diperoleh dari feses dan yang diperoleh dari jaringan lumba-lumba (*Tursiops truncatus*) oleh Parsons (2001) juga menghasilkan kesimpulan bahwa feses yang diambil sesegera mungkin setelah dikeluarkan merupakan sumber tambahan DNA yang berharga, terutama untuk mempelajari organisasi sosial dan struktur populasi lumba-lumba.

Kesimpulan Bayes dkk. itu mendapat sanggahan dari Creel dkk. (2003) yang melakukan estimasi ukuran populasi serigala Yellowstone (*Canis lupus*). Menurut Creel dkk., sejumlah genotipe yang diperoleh Bayes dkk. tidak dapat dibandingkan karena diampifikasi dari sedikit lokus, dan hal itu menyebabkan terjadinya estimasi berlebih. Bagi Creel dkk., hal itu semakin memperkuat gagasan mereka bahwa data genetik yang cukup bebas-galat (*error-free*) bagi penerapan-penerapan lainnya dapat menimbulkan bias estimasi berlebih dalam sensus genetik.

Beberapa cara yang dapat dilakukan untuk mengurangi estimasi berlebih akibat kesalahan identifikasi sampel-sampel dari individu-individu berbeda antara lain adalah penggunaan jumlah lokus seminimal mungkin dan menyatakan genotipe-genotipe dengan satu atau lebih *mismatch* sebagai satu genotipe yang identik. Akan tetapi, cara yang kedua merupakan metode koreksi yang amat tidak memuaskan. Estimasi berlebih pada sebagian besar kondisi pun tetap terjadi meskipun kedua metode itu digunakan sekaligus untuk mengurangi estimasi berlebih (Creel dkk. 2003: 2007).

Salah satu metode yang semakin luas diterima untuk mengeliminasi galat dari genotipe non-invasif adalah metode '*multiple tubes*'. PCR dilakukan beberapa kali bagi setiap lokus, dan ada dua aturan yang diterapkan dalam metode tersebut. Yang pertama, suatu genotipe homozigot

takkan diterima sampai telah dikonfirmasi sebanyak tujuh kali. Aturan pertama tersebut dimaksudkan untuk meminimalisasi *allelic dropout*, karena heterozigot sering kali secara salah dianggap sebagai homozigot karena salah satu alelnya mengalami *dropout*. Yang kedua, tak ada alel yang diterima sampai telah terdeteksi dua kali (Creel dkk. 2003: 2005). Akan tetapi, meskipun metode *multiple tubes* merupakan metode yang disarankan untuk mengkaji keterulangan PCR dan mengkalkulasi galat *genotyping* non-invasif, metode tersebut memiliki keterbatasan. Keterbatasan jumlah cetakan DNA menyebabkan berkurangnya jumlah lokus yang dapat di-*type* seiring meningkatnya jumlah replikat PCR (Taberlet dkk. 1996, lihat Parsons 2001: 343). Selain itu, *multiplexing* primer PCR untuk memaksimalkan jumlah lokus yang diamplifikasi dalam satu kali reaksi dapat meningkatkan *nonamplification* akibat terbatasnya ketersediaan cetakan DNA (Ernest dkk. 2000, lihat Parsons 2001: 343). Oleh karena itulah, untuk memaksimalkan penggunaan sampel non-invasif sekaligus akurasi genotipe, Parsons (2001: 343) menyatakan bahwa jumlah optimal replikat PCR harus ditentukan agar kedua kriteria tersebut dapat terpenuhi. Variasi kualitas sampel juga memengaruhi efektivitas metode *multiple tubes* dalam mengeliminasi galat akibat tingkat *misprinting* dan *dropout* data (Creel dkk. 2003: 2007).

Cara lain untuk mengurangi galat *genotyping* adalah menghilangkan sampel feses berkualitas rendah dari set data. Penapisan (*screening*) tersebut dapat dilakukan dengan PCR kuantitatif, analisis DNA mitokondria sebelum analisis mikrosatelit, maupun mengenyahkan sampel-sampel dengan proporsi lokus teramplifikasi yang rendah pada PCR pertama. Penapisan memang akan mengurangi galat *genotyping*, tapi hal itu tak menjamin peningkatan estimasi ukuran populasi (Creel dkk. 2003: 2007).

Creel dkk. (2003: 2007--2008) menyarankan sebuah pendekatan lain untuk mengurangi bias estimasi berlebih, yaitu menerima kenyataan bahwa galat *genotyping* tak dapat sepenuhnya dihilangkan dan menganalisis data menggunakan *matching approach*. Jika kita menerima fakta bahwa terdapat

sejumlah galat *genotyping*, maka *mismatch* antara dua sampel pada sebuah lokus merupakan indikasi bahwa kedua sampel tersebut berasal dari individu yang berbeda, atau bahwa keduanya berasal dari individu yang sama akibat galat *genotyping*. Untuk mengetahui kemungkinan mana yang lebih tepat, Creel dkk. menggunakan informasi dari lokus-lokus yang sesuai untuk mengestimasi ukuran populasi. Mereka membandingkan setiap pasangan sampel, mengidentifikasi alel-alel yang cocok, dan menentukan probabilitas memperoleh set pasangan tertentu tersebut secara kebetulan dari dua ekor individu (serigala) berbeda. Jika probabilitas identitas akibat kebetulan (PI) tersebut rendah, maka sampel-sampel tersebut kemungkinan berasal dari individu yang sama, dan salah satu sampel itu tidak akan meningkatkan estimasi ukuran populasi. Kesulitan dari pendekatan tersebut adalah menentukan PI ambang (*threshold PI*) yang sesuai. Creel dkk. menggunakan pendekatan empiris untuk menentukan PI ambang yang mereka gunakan, yaitu menghitung jumlah individu yang berbeda seraya memvariasikan ambang PI dari 10^{-1} sampai 10^{-5} . Bagi setiap PI ambang, mereka membandingkan jumlah individu yang terdeteksi dengan jumlah sampel yang sesungguhnya. Rasio yang diperoleh digunakan untuk menentukan PI ambang yang tepat.

Matching approach secara konseptual tidak memerlukan eliminasi galat sepenuhnya dari genotipe non-invasif untuk menghasilkan estimasi ukuran populasi yang tidak bias. Dengan demikian, Creel dkk. (2003) menyimpulkan bahwa *matching approach* dapat menjadi metode yang akurat dan efisien untuk menerapkan data genetik non-invasif guna mengestimasi populasi.

III. PENUTUP

Feses dapat menjadi sumber DNA yang amat bermanfaat dan viabel dalam konservasi dan manajemen hidupan liar, terutama karena kemudahan

dan sifat non-invasif pengambilan sampelnya. Selain itu, informasi yang dapat diperoleh dari DNA feses berkaitan dengan parameter-parameter populasi amat beragam. Akan tetapi, seperti juga metode-metode lainnya, pengambilan sampel DNA dari feses menghadapi sejumlah kesulitan atau keterbatasan, yang masing-masing dapat diatasi dengan sejumlah pendekatan. Buchan dkk. (2005: 682) mengingatkan bahwa para peneliti yang hendak melakukan *genotyping* dengan menggunakan metode pengambilan sampel dari feses hendaknya berhati-hati untuk tidak mengorbankan baik akurasi maupun efisiensi, terutama jika hendak mengidentifikasi individu-individu spesifik melalui genotipenya (misalnya dalam penelitian mengenai paternitas atau kekerabatan). Buchan dkk. menyarankan agar para peneliti yang hendak menggunakan pengambilan sampel non-invasif melakukan penelitian pilot terlebih dahulu untuk mempelajari ciri-ciri spesifik-lokus dan spesifik-spesies dari genotipe yang hendak mereka teliti. Barulah kemudian para peneliti dapat mengambil keputusan mengenai metode *genotyping* yang harus mereka gunakan untuk mengoptimalkan akurasi dan efisiensi sedemikian rupa agar sesuai dengan tujuan penelitian mereka. Oelfke dkk. (2003: 57) juga mengingatkan bahwa pendekatan manajemen hidupan liar melalui penelitian DNA feses dapat berbeda-beda tergantung sifat-sifat bentang alam dan hidupan liar yang hendak diteliti atau dikelola.

DAFTAR ACUAN

- Archie, E.A., C.J. Moss, & S.C. Alberts. 2003. Characterization of tetranucleotide microsatellite loci in the African savannah elephant (*Loxodonta africana africana*). *Molecular Ecology Notes* **3**: 244--246.
- Bayes, M.K., K.L. Smith, S.C. Alberts, J. Altmann, & M.W. Bruford. 2000. Testing the reliability of microsatellite typing from faecal DNA in the savannah baboon. *Conservation Genetics* **1**: 173--176.
- Buchan, J.C., E.A. Archie, R.C. van Horn, C.J. Moss, & S.C. Alberts. 2005.

- Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. *Molecular Ecology Notes* **5**: 680--683.
- Creel, S., G. Spong, J.L. Sands, J. Rotella, J. Zeigle, L. Joe, K.M. Murphy, & D. Smith. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* **12**: 2003--2009.
- Ernest, H.B., M.C.T. Penedo, B.P. May, M. Syvanen, & W.M. Boyce. 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: Genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology* **9**: 433--441.
- Ernest, H.B., E.S. Rubin, & W.M. Boyce. 2002. Fecal DNA analysis and risk assessment of mountain lion predation of bighorn sheep. *J. Wildl. Manage.* **66** (1): 75--85.
- Oelfke, J., R. Peterson, J. Vucetich, & L. Vucetich. 2003. Wolf handling at Isle Royale: Can we find another approach? *The George Wright FORUM* **20** (3): 50--58.
- Parsons, K.M. 2001. Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces. *Molecular Ecology Notes* **1**: 341--344.
- Piggott, M., A. Taylor, N. Robinson, C. Marks, P. Fisher, I. Mansergh, & P. Temple-Smith. 2000. Monitoring abundance of foxes and cryptic threatened species using microsatellite analysis of faecal pellets. *Inaugural NSW PEST ANIMAL CONFERENCE 2000*: 67--69.
- Wilson, G.J., A.C. Frantz, L.C. Pope, T.J. Roper, T.A. Burke, C.L. Cheeseman, & R.J. Delahay. 2003. Estimation of badger abundance using faecal DNA typing. *Journal of Applied Ecology* **40**: 658--666.