

## Amplification of The GAPDH Gene from The Urine eDNA of Sumatran Rhino in Sumatran Rhino Sanctuary, Way Kambas National Park

Priyambodo<sup>1\*</sup>, Chicka R.P. Putri<sup>1</sup>, Elly L. Rustiati<sup>1</sup>, Yeyen Kurniawati<sup>1</sup>, Danisworo Zulkarnain<sup>1</sup>, Dian N. Pratiwi<sup>2</sup>, Zulfi Arsan<sup>3</sup>, Giyono<sup>3</sup>, Ganis Mustikawati<sup>3</sup>, Vindo R. Pertiwi<sup>3</sup>, Sukatmoko<sup>4</sup>, Eko A. Srihanto<sup>5</sup>, Enny Saswiyanti<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia;

<sup>2</sup>Program Studi Magister Ilmu Lingkungan, Pascasarjana, Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia;

<sup>3</sup>Suaka Rhino Sumatera, Yayasan Badak Indonesia, Taman Nasional Way Kambas, Lampung Timur, Indonesia;

<sup>4</sup>Balai Taman Nasional Way Kambas, Lampung Timur, Indonesia;

<sup>5</sup>Balai Veteriner Lampung, Bandar Lampung, Indonesia;

### Article History

Received : March 16<sup>th</sup>, 2023

Revised : April 24<sup>th</sup>, 2023

Accepted : May 20<sup>th</sup>, 2023

\*Corresponding Author:

**Priyambodo,**

Program Studi Biologi,  
Fakultas Matematika dan Ilmu  
Pengetahuan Alam, Universitas  
Lampung, Bandar Lampung,  
Indonesia;

Email:

[priyambodo@fmipa.unila.ac.id](mailto:priyambodo@fmipa.unila.ac.id)

**Abstract:** Profiling the genetic character of each individual sumatran rhino is important in order to maintain individual viability and genetic variability of Sumatran rhinos. Non-invasive sampling is needed to minimize the disturbance of individual sumatran rhinos, this is due to the solitary character of sumatran rhinos and tend to be afraid to interact with humans. Until now, non-invasive sampling of sumatran rhinos in Way Kambas National Park (WKNP) has only been done through the source of the puddle. This study aims to amplify the GAPDH gene from sumatran rhino environmental DNA (eDNA) sourced from urine. Urine sampling was carried out on four of the eight sumatran rhino individuals in WKNP. DNA extraction of four sumatran rhino urine samples was carried out with reference to the DNeasy® Blood & tissue kit extraction protocol. Amplification of eDNA extraction results was carried out by polymerase chain reaction (PCR) using GAPDH primers. Visualization of extraction and amplification results from four individual sumatran rhinos at TNWK was tested qualitatively with 1% agarose gel electrophoresis. Electrophoresis results showed positive results after amplification of four individual sumatran rhino urine samples at sizes between 100-200bp. This study successfully amplified the GAPDH gene from four sumatran rhino individuals in WKNP based on qualitative tests. In further conservation efforts, it is necessary to explore eDNA extraction from other potential sources.

**Keywords:** eDNA, GAPDH gene, Sumatran rhino.

### Pendahuluan

Taman Nasional Way Kambas (TNWK) merupakan salah satu dari dua taman nasional yang berada di Provinsi Lampung dan terletak di Kecamatan Labuhan Ratu, Kabupaten Lampung Timur yang telah ditetapkan sebagai ASEAN *Heritage Parks* pada 27 Juli 2016 (Balai TNWK, 2018). Kawasan TNWK memiliki potensi sumber daya alam baik flora maupun fauna dan merupakan habitat bagi

satwa endemik khas sumatera meliputi gajah sumatera (*Elephas maximus sumatranus*), harimau sumatera (*Panthera tigris sumatrae*), tapir (*Tapirus indicus*), beruang madu (*Helarctos malayanus*) dan badak sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*) (Balai TNWK, 2017).

Secara khusus, pemerintah membangun Suaka Rhino Sumatera (SRS) di TNWK sebagai upaya pelestarian badak sumatera secara semi-insitu di bawah pengelolaan

Yayasan Badak Indonesia (YABI) (Priyambodo *et al.*, 2022). Anggara & Setiawan (2019) meneliti daya dukung SRS terhadap upaya pelestarian badak sumatera di TNWK dari berbagai hal, termasuk potensi tumbuhan pakan, analisis palatabilitas, ketersediaan air, dan perlindungan habitat.

Badak sumatera mempunyai karakter individualis yang cenderung soliter (Awaliah *et al.*, 2019). Hal ini berimplikasi pada laju reproduksi badak sumatera yang rendah. Berbagai upaya telah dilaksanakan oleh pemerintah dalam rangka peningkatan jumlah individu badak sumatera di SRS. Upaya yang dilakukan oleh pemerintah dengan bekerja sama dengan berbagai pihak ini telah berhasil ditandai dengan lahirnya badak sumatera Andatu pada tahun 2012, badak sumatera Delilah pada tahun 2016, dan anak dari badak sumatera Rosa dan badak sumatera Andatu pada tahun 2022 (Anugrah, 2022), sehingga saat ini, terdapat delapan individu badak sumatera yang menghuni SRS TNWK.

Upaya penambahan jumlah individu badak sumatera di SRS TNWK yang merupakan bagian dari upaya konservasi massif yang dilakukan oleh kolaborasi berbagai pihak telah mulai menampakkan hasil. Di sisi lain, upaya penambahan jumlah individu badak sumatera dengan cara mengawinkan dengan kerabat dekat individu badak sumatera mempunyai risiko akan turunnya keragaman genetik pada populasi yang ada (Leroy, 2014). Oleh karena itu, perlu dilakukan *profiling* karakter genetik masing-masing individu badak sumatera dalam rangka menjaga viabilitas individu dan variabilitas genetik dari badak sumatera.

Tantangan karakterisasi profil genetik badak sumatera selain merupakan hewan yang dilindungi karena berstatus kritis, juga karena perilaku yang soliter dan cenderung takut untuk berinteraksi dengan manusia. Hal ini menyebabkan perlu dilakukan pengambilan sampel secara noninvasif untuk meminimalisasi terganggunya individu badak sumatera. Hasil penelitian Priyambodo *et al.*, (2022) telah berhasil melakukan pengambilan sampel DNA dari lingkungan pada kubangan aktif dan pasif badak sumatera di SRS TNWK. Namun belum melakukannya pada sumber *environmental DNA* (eDNA) lain.

Urine dapat menjadi sumber eDNA karena merupakan cairan sisa metabolisme hasil ekskresi ginjal, dan dimungkinkan mengandung sel darah merah, sel darah putih, dan sel epitel. Saat urinasi dapat ditemukan sel epitel yang berasal dari kandung kemih (Hidayati & Tahrir, 2016; Yudianto dan Sisipitasari, 2016). *Profiling eDNA* dilaksanakan dengan mengamplifikasi gen penyandi Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) pada individu badak sumatera dari sampel urine. Gen GAPDH akan diekspresikan menjadi salah satu enzim glikolitik yang telah dikenal sebagai *housekeeping gene* dan telah digunakan secara luas dalam penelitian protein, mRNA, dan DNA (Zhang *et al.*, 2015).

## Bahan dan Metode

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi urine dari empat individu badak sumatera di SRS TNWK, kit ekstraksi DNA dari QIAGEN seri *DNeasy® Blood & Tissue Kit*, *MyTaq™ HS Red Mix (Bioline)*, *nuclease-free water*, *forward* dan *reverse primer GAPDH*, *agarose*, *tris-acetate EDTA (TAE)*, dan pewarna *SYBR Safe*. Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tabung mikro, tip mikro, tabung *vacutainer* 10 ml, *micro-pipet*, alat vortex, *Laminar Air Flow*, *set alat elektroforesis horizontal*, dan *UV transluminator*.

### Pengambilan sampel

Penelitian dilaksanakan secara eksploratif dan dianalisis secara deskriptif. Pengambilan sampel dilaksanakan setelah penerbitan surat izin Keputusan Direktur Jendral Konservasi Sumber Daya Alam dan Ekosistem Nomor 257/KSDAE/SET/KSA.2/6/2018 dan Surat Izin Masuk Kawasan Konservasi (SIMAKSI) dari Balai TNWK Nomor SI. 220/BTNWK-1/2020. Pengambilan sampel urine dilakukan pada empat dari delapan individu badak sumatera di SRS TNWK.

Penentuan empat individu dilaksanakan dengan *purposive sampling* untuk mewakili sebaran usia individu badak sumatera. Pengambilan urine didampingi oleh *keeper* masing-masing individu badak sumatera (badak sumatera Andatu, Rosa, Bina, Delilah) yang

dibantu oleh tim medis YABI TNWK. Pengambilan sampel urine dilakukan dengan koleksi urine badak sumatera di dalam kandung perawatan sebanyak 7 ml urine badak sumatera, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* 10 ml. Seluruh sampel urine badak sumatera yang telah dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* 10 ml disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

### Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA sampel urine empat individu badak sumatera dilakukan dengan mengacu pada protokol ekstraksi *DNeasy® Blood & Tissue Kit* nomor katalog 69504 dari QIAGEN yang terdiri atas tiga tahap utama, yaitu lisis, ekstraksi, dan elusi.

### Amplifikasi DNA

Penggandaan hasil ekstraksi DNA dilaksanakan dengan reaksi *polymerase chain reactin* (PCR) menggunakan primer GAPDH melalui proses *master mix* dan amplifikasi. Pembuatan *master mix* dicampurkan larutan yaitu *MyTaq™ HS Red Mix (Bioline)* nomor katalog BIO-25047, sebanyak 11 µl *nuclease-free water* dengan 2 µL, primer *forward* 3' TCACCAGGGCTGCTTTTAAC 5' dan primer *reverse* 5' TTGATTTTGGAGGGATCTCG 3' masing-masing sebanyak 2 µl. Larutan *master mix* yang telah homogen ditambahkan DNA *template* sebanyak 3 µL.

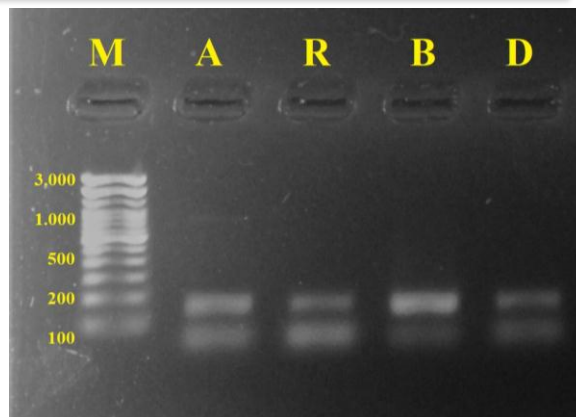
### Visualisasi Hasil Amplifikasi

Visualisasi hasil ekstraksi dan amplifikasi dari empat individu badak sumatera di SRS TNWK diuji secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa 1% dalam *buffer* TAE dengan pewarna *SYBR Safe*.

## Hasil dan Pembahasan

### Hasil amplifikasi

Hasil elektroforesis menunjukkan hasil positif setelah dilakukannya amplifikasi pada empat sampel urine individu badak Sumatera. Hasil uji elektroforesis atas empat amplikon eDNA sampel dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Hasil uji elektroforesis atas empat amplikon eDNA sampel (M: marker, A: Andatu, R: Rosa, B: Bina, D: Delilah)

### Pembahasan

Hasil penelitian menemukan delapan individu badak yang mendiami SRS TNWK, yaitu Andalas. Andatu, Bina, Delilah, Harapan, Ratu, Rosa, dan satu individu yang dilahirkan dari pasangan Andatu dan Rosa pada tahun 2022 (Puspa, 2022). Pada penelitian ini diambil empat sampel dari delapan individu badak sumatera di SRS TNWK (50% dari total anggota populasi). Pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling* agar mewakili semua rentang usia individu dan jenis kelamin badak sumatera. Empat individu yang menjadi sampel dalam penelitian ini adalah Andatu, Rosa, Bina, dan Delilah.

Andatu merupakan individu badak sumatera yang lahir dengan adanya campur tangan manusia. Andatu lahir pada 23 Juni 2012, yang merupakan badak sumatera jantan pertama yang lahir di habitat in-situ dalam 124 tahun terakhir di Asia (Rahmad, 2017). Rosa merupakan badak sumatera betina yang diperkirakan lahir pada tahun 2000 yang dipindahkan ke SRS TNWK sejak 25 November 2005 (Puspa, 2022). Bina merupakan badak sumatera betina yang berasal dari Bengkulu yang diperkirakan lahir pada 1979 dan merupakan individu paling tua di SRS TNWK (YABI, 2022). Delilah merupakan badak sumatera betina yang lahir di SRS TNWK pada 12 Mei 2016 hasil perkawinan dari Ratu dan Andalas (Nilam, 2019).

Pengambilan sampel dilakukan pada masing-masing *paddock* individu badak sumatera di SRS TNWK. Proses pengambilan sampel melibatkan *keeper* dan tim medis YABI di SRS TNWK. Pengambilan sampel dilaksanakan sebisa mungkin tidak mengganggu aktivitas badak sumatera, sehingga prinsip pengambilan sampel

secara non-invasif dapat terjaga. Metode non-invasif sangat disarankan dalam melakukan identifikasi keberadaan satwa terutama di habitat alaminya, tanpa harus menyentuh atau bertemu langsung dengan satwa. Hal ini sejalan dengan upaya konservasi genetik badak sumatera yang sumber DNA-nya bersumber pada sumber materi genetik satwa yang tertinggal pada lingkungannya yaitu jejak kaki, kotoran, bekas pakan, dan urine (Pusparini, 2006).

Berdasarkan hasil elektroforesis atas amplicon gen GAPDH dari empat individu badak sumatera (Gambar 1) menunjukkan hasil positif. Nampak amplicon gen GAPDH dari empat individu badak sumatera yang diambil eDNA-nya (Andatu, Rosa, Bina, dan Delilah) menunjukkan DNA pada ukuran antara 100-200bp. Hal ini selaras dengan hasil penelitian rentang ukuran gen GAPDH pada mamalia lain. Ukuran GAPDH tikus jantan adalah 114bp (Salehi *et al.*, 2017), sedangkan ukuran gen GAPDH pada kambing (*Capra hircus*) adalah 200bp (Tirumurugan *et al.*, 2010). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) merupakan gen yang sering digunakan dalam proses penandaan individu, baik hewan maupun tumbuhan. Pada hewan, GAPDH berperan sebagai enzim glikolitik dalam mengkatalis konversi molekul glyceraldehide 3-phosphate to 1,3-diphosphoglycerate (Yogalingam, 2013).

GAPDH juga berperan penting dalam menginduksi eliminasi mitokondria saat terjadi stress oksidasi (Qvit, 2016). Keberhasilan amplifikasi gen GAPDH ini dapat dijadikan acuan dalam pelaksanaan pengambilan sampel dengan menggunakan metode non-invasif selanjutnya. Hasil uji kualitas atas amplifikasi eDNA urine badak sumatera dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan badak sumatera di lokasi tersebut tanpa harus bertemu langsung dengan satwa. Penelitian ini dilakukan untuk mendukung Rencana Aksi Darurat (RAD) badak sumatera di TNWK. Hal ini sejalan dengan pernyataan Nagarajan *et al.* (2022) yang menyatakan bahwa metode deteksi Berdasarkan eDNA merupakan upaya komplemen untuk melengkapi biomonitoring secara tradisional dalam bidang ekosistem, baik terrestrial dan akuatik.

## Kesimpulan

Berdasarkan uraian di atas, dapat disimpulkan bahwa gen GAPDH dari empat

individu badak sumatera di SRS TNWK telah berhasil didapatkan berdasarkan uji kualitatif. Hal ini dapat dijadikan landasan untuk melengkapi data dalam rangka upaya konservasi badak sumatera.

## Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih terutama ditujukan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Lampung atas Hibah Penelitian yang telah diberikan dengan Nomor Kontrak Surat Perjanjian Kontrak No. 1481/UN226.21/PN/2020. Selain itu, ucapan terima kasih disampaikan juga kepada Balai Taman Nasional Way Kambas, Yayasan Badak Indonesia, dan Balai Veteriner Lampung atas kerja sama dalam pelaksanaan penelitian.

## Referensi

- Anggara, H. & Setiawan, A. (2019). Dinamika Daya Dukung Habitat Badak Sumatera (*Dicerorhinus sumatrensis*) di Areal Pengembangan Suaka Rhino Sumatera Taman Nasional Way Kambas. *Jurnal Sylva Lestari Volume 7 Nomor 1*: 62 – 70. DOI: <https://doi.org/10.23960/jsl1762-70>
- Anugrah, D. (2022). Badak Sumatera Kembali Lahir di TN Way Kambas. Retrieved Februari 16, 2023, from Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan. Interactwebsite:
- Awaliah, A.T.S., Dewi, B.S., Winarno, G.D., Harianto, S.P., Koike, S., & Tokita, N. (2019). Daily behavior Sumatran Rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*) in Sumatran Rhino sanctuary Way Kambas National Park. IOP Conf. Rahmad, R. Series: Earth and Environmental Science 399 (2019) 012102. DOI:10.1088/1755-1315/399/1/012102.
- Balai Taman Nasional Way Kambas. (2017). *Buku Sekilas Informasi Taman Nasional Way Kambas*. Lampung: Balai Taman Nasional Way Kambas.
- Balai Taman Nasional Way Kambas. (2018). *Rencana Pengelolaan Kolaboratif TNWK*. Lampung: Balai Taman Nasional Way Kambas.



- Hidayati, & A, Tahrir. (2016). *Uji Kualitatif dan Kuantitatif Hasil Isolasi DNA dari Darah, Feces dan Urine Pada Ternak Sapi, Kerbau dan Kambing*. UIN Sultan Syarif Kasim Riau. Pekanbaru.
- Leroy, G. (2014). Inbreeding Depression in Livestock Species: Review Andmeta-Analysis. *Stichting International Foundation for Animal Genetics*, 45, 618–628. doi: 10.1111/age.12178618.
- Nagarajan, R.P., Bedwell, M., & Holmes, A.E. (2022). Environmental DNA Methods for Ecological Monitoring and Biodiversity Assessment in Estuaries. *Estuaries and Coasts*, 45, 2254–2273. <https://doi.org/10.1007/s12237-022-01080-y>
- Nilam, A. (2019). *Badak Sumatera Delilah Ulang Tahun Ke-3*. <https://badak.or.id/badak-sumatera-delilah-ulang-tahun-ke-3/>. (Accessed on March, 4, 2023)
- Priyambodo, Rustiati, E.L., Kurniawati, Y., Putri, C.R., Zulkarnain, D., Arsan, Z., Giyono, Widiawati, A.E., Sukatmoko, & Srihanto, E.A. (2022). Exploring environmental DNA for barcoding analysis of Sumatran rhino in Way Kambas National Park. *AIP Conference Proceedings* 2563, 040013 (2022).
- Puspa, A. (2022). Badak Sumatera Kembali Lahir di Taman Nasional Way Kambas. <https://mediaindonesia.com/humaniora/481367/badak-sumatera-kembali-lahir-di-taman-nasional-way-kambas>. (Accessed on February, 14, 2023)
- Qvit N, Joshi AU, Cunningham AD, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Protein-Protein Interaction Inhibitor Reveals a Non-catalytic Role for GAPDH Oligomerization in Cell Death. *J Biol Chem*, 24; 291(26):13608-21. DOI: 10.1074/jbc.M115.711630.
- Rahmad, R. (2017). Andatu dan Delilah, Badak Sumatera yang Kian Mencuri Perhatian di Way Kambas. <https://www.mongabay.co.id/2017/10/22/andatu-dan-delilah-badak-sumatera-yang-kian-mencuri-perhatian-di-way-kambas/>. (Accessed on February, 14, 2023)
- Salehi, I., Saidijam, M., Vahidinia, A.A., Sohrabi, M., & As, S. S. (2017). High Fat Diet-Induced Neurotoxicity Alters Following vitamin E and C Administration in Hippocampus of Male Rats. *Gene Cell Tissue*. DOI: <http://dx.doi.org/10.5812/gct.58383>
- Tirumurugan, K.G., Dhanasekaran, S., Raj, G.D., Raja, A., Kumanan, K., & Ramaswamy, V. (2010). Differential expression of toll-like receptor mRNA I selected tissues of goat (*Capra hircus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* Vol. 11 (2010) pp. 296-301. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2010.00783.x
- Yayasan Badak Indonesia (YABI). (2022). 8 Badak Sumatera di SRS Way Kambas. <https://badak.or.id/sumatran-rhino-sanctuary-srs/>. (Accessed on February, 22, 2023)
- Yogalingam, G., Hwang S., Ferreira J. C., & Mochly-Rosen D. (2013). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) phosphorylation by protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) inhibits mitochondria elimination by lysosomal-like structures following ischemia and reoxygenation-induced injury. *J. Biol. Chem.* 288, 18947–18960
- Yudianto, A. & Sispitasari, Y. E. (2016). Isolasi DNA dari Bercak Urine Manusia sebagai Bahan Alternatif Pemeriksaan Identifikasi Personal. *Media Pharmaceutica Indonesiana Volume 1 Nomor 1*.
- Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ, Zhou GJ, Zhang GJ, & Cui YK. (2015). Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med*, 12(1):10-22. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.0019.