

KARAKTERISTIK MARKA GENETIK DAERAH D-LOOP BAGIAN HVS-I SEBAGAI ACUAN KONSERVASI GENETIK HARIMAU SUMATERA

Ulfi Faizah

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya

Abstrak

Harimau Sumatera (*Panthera tigris sumatrae*) saat ini jumlahnya semakin menurun dan keberadaannya terancam punah. Oleh karena itu harus dilakukan usaha konservasi termasuk juga konservasi genetiknya. Daerah *Displacement loop* (D-loop) pada DNA mitokondria (mtDNA) yang telah banyak digunakan untuk mempelajari keragaman genetik dan hubungan kekerabatan berbagai sub spesies. Tujuan dari penelitian ini adalah (1) Untuk menganalisis keragaman genetik berdasarkan marka genetik daerah D-loop bagian HVS-I pada Harimau Sumatera; dan (2) Untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar individu Harimau Sumatera dan antar subspecies Harimau Sumatera dengan subspecies harimau lainnya di dunia. Metode penelitian yang dilakukan adalah amplifikasi dengan metode PCR pada daerah D-loop bagian HVS-I menggunakan primer UF-03 dan UF-04 (produk PCR sebesar 567 pb). Selanjutnya dilakukan proses sekuensing dan data hasil sekuensing dianalisis menggunakan program MEGA IV dengan menggunakan data dari Genbank sebagai pembandingan. Rekonstruksi filogeni menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dengan 1000 kali pengulangan. Hasil dari penelitian ini berdasarkan analisis keragaman genetik berdasarkan marka genetik daerah D-loop bagian HVS-I pada Harimau Sumatera diperoleh 15 situs basa nukleotida spesifik (situs basa nukleotida ke 24 (G), 74 (A), 76 (A), 136 (C), 138 (C), 179 (C), 212 (A), 302 (G), 318 (T), 395 (C), 406 (G), 417 (A), 430 (A), 484 (G), 488 (G)). Sedangkan berdasarkan rekonstruksi filogeni menggunakan marka genetik daerah D-loop bagian HVS-I diketahui bahwa hubungan kekerabatan antar individu Harimau Sumatera dalam penelitian ini adalah Harimau Sumatera asal Jambi dekat dengan harimau Sumatera asal Riau dibandingkan dengan Harimau Sumatera asal Medan. Sedangkan hubungan kekerabatan subspecies Harimau Sumatera dengan subspecies harimau lainnya adalah Harimau Sumatera paling dekat dengan Harimau India dan paling jauh dengan Harimau China Selatan. Kesimpulan dari penelitian ini adalah marka genetik D-loop bagian HVS-I cocok digunakan untuk membedakan antar subspecies dan antar individu dalam suatu kelompok Harimau Sumatera.

Kata kunci: Harimau Sumatera, D-loop, konservasi genetik

PENDAHULUAN

Berdasarkan perbedaan daerah penyebaran dan morfologinya, di dunia terdapat sembilan subspecies harimau. Tiga subspecies di antaranya hanya terdapat di Indonesia (endemik) yaitu Harimau Jawa (*Panthera tigris sondaica*), Harimau Bali (*P. t. balica*) dan Harimau Sumatera (*P. t. Sumatrae*). Saat ini tiga subspecies harimau di dunia telah dinyatakan punah di alam termasuk dua subspecies yang terdapat di Indonesia yaitu Harimau Bali (punah pada tahun 1930-an) dan Harimau Jawa (punah pada tahun 1980-an) (Franklin *et al.* 1999). Oleh karena itu sekarang Harimau Sumatera merupakan satu-satunya subspecies harimau yang masih bertahan hidup di Indonesia.

Dahulu Harimau Sumatera ditemukan hampir di seluruh Pulau Sumatera, tetapi saat ini Dirjen Perlindungan Hutan dan Pelestarian Alam (PHPA) memperkirakan sekitar 400 Harimau Sumatera hidup di lima Taman Nasional (TN) yang ada di Sumatera sedangkan 100 ekor yang lain berada di daerah yang tidak terlindungi (STT 2007). Dikarenakan jumlahnya yang semakin menurun, IUCN (2006) mengategorikan Harimau Sumatera dalam status “*critically endangered*”

atau satwa langka yang kritis yaitu kategori tertinggi dari ancaman kepunahan. Sedangkan CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) memasukkan Harimau Sumatera ke dalam Appendix: 1, artinya kategori hewan yang sangat dilarang untuk diperdagangkan baik pada tingkat nasional maupun internasional (Inskipp 2005).

Berkembangnya pemanfaatan lahan dan pembangunan di daerah Sumatera menyebabkan berubahnya keragaman ekosistem yang ada sehingga menyebabkan populasi Harimau Sumatera yang tersisa semakin terpencar-pencar dan terisolir di beberapa habitat. Adanya pemecahan habitat tersebut mengakibatkan penyebaran gen antar populasi terganggu. Semakin turunnya jumlah populasi Harimau Sumatera juga menyebabkan menurunnya keragaman genetik populasi pada populasi dengan jumlah individu di bawah populasi efektifnya (N_e).

Memahami dan mempertahankan keragaman genetik suatu populasi sangat penting dalam konservasi karena keragaman genetik yang tinggi akan sangat membantu suatu populasi beradaptasi terhadap perubahan-perubahan yang terjadi di lingkungan sekitarnya. Dengan mengetahui status genetik suatu populasi, dapat dirancang suatu program konservasi untuk menghindari kepunahan dan membantu pengembangan rencana pengelolaan kelangsungan hidupnya (Damayanti 2007).

Pengkajian keragaman genetik melalui penandaan molekuler menggunakan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) baik pada DNA inti dan DNA mitokondria (mtDNA) akan didapatkan hasil yang dapat mengungkapkan perbedaan dengan lebih teliti dalam membedakan intra dan interspesies yang menyangkut tentang struktur, komposisi, dan organisasi genom pada tingkat DNA (Duryadi 1994).

Di dalam genom mitokondria terdapat fragmen-fragmen penyandi protein dan yang bukan penyandi protein. Fragmen bukan penyandi protein di dalam mitokondria yang sering dipakai dalam mengkaji keragaman genetik dan hubungan kekerabatan di antara spesies adalah daerah D-loop (*Displacement loop*). Daerah D-loop menarik untuk dikaji karena dua dari ketiga domainnya yaitu HVS-I (*Hypervariable Segments I*) dan HVS-II memiliki mutasi yang tinggi sehingga perubahan runutan basa-basa nukleotidanya terjadi tidak saja pada tingkatan interspesies tetapi juga pada tingkatan intraspesies (Widayanti 2006).

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana karakteristik marka genetik daerah D-loop bagian HVS-I pada Harimau Sumatera yang dapat digunakan sebagai acuan dalam konservasi genetik?

Tujuan dari penelitian yaitu: 1) Untuk menganalisis keragaman genetik berdasarkan marka genetik daerah D-loop bagian HVS-I pada Harimau Sumatera; dan 2) Untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar individu Harimau Sumatera dan antar subspecies Harimau Sumatera dengan subspecies harimau lainnya di dunia.

Manfaat penelitian ini adalah dengan diketahuinya karakteristik marka genetik daerah D-loop bagian HVS-I pada Harimau Sumatera maka langkah-langkah dalam konservasi genetik akan lebih terarah sehingga identifikasi kemurnian genetik dan merunut hubungan kekerabatan atau asal usulnya akan sangat akurat. Hubungan kekerabatan antar individu Harimau Sumatera dan hubungan kekerabatan subspecies Harimau Sumatera dengan subspecies harimau lainnya dapat dilacak dengan mudah.

METODE PENELITIAN

Bahan penelitian berupa DNA Harimau Sumatera yang berasal dari darah tiga ekor Harimau Sumatera dari Taman Safari Indonesia, Cisarua-Bogor. Ke tiga ekor Harimau Sumatera tersebut merupakan hasil tangkapan langsung dari habitatnya yang berasal dari tiga daerah berbeda di Sumatera yaitu Medan, Riau, dan Jambi.

Pengambilan sampel darah Harimau Sumatera dilakukan dengan dua cara yaitu (1) Harimau dibius total kemudian diambil darahnya dari *vena savena* (paha kaki belakang); (2) Harimau ditempatkan di kandang jepit kemudian diambil darahnya dari *vena coccygea* (ekor). Selanjutnya darah dimasukkan ke dalam tabung falcon yang sudah berisi alkohol absolut dengan volume 9 ml. Setelah itu dikocok sampai darah dan alkohol tercampur merata/homogen selama ± 2 menit. Tabung falcon tempat sampel diberi label menurut masing-masing sampel individu. Kemudian sampel disimpan pada suhu ruangan untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium.

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi fenol (Duryadi 1997, 2005). Amplifikasi dengan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada daerah D-loop bagian HVS-I menggunakan primer UF-03 ((F) 5' TAGCCCCACCATCAGCACCCAAAGC 3') dan UF-04 ((R) 5' AATGGCCCCGAGCGAGAAGAGGTA 3'). Larutan pereaksi pada penelitian ini menggunakan Go Tag[®] PCR *Core Systems* dari Promega. Total campuran untuk tiap reaksi PCR adalah 50 µl dengan komposisi PCR untuk mengamplifikasi daerah D-loop parsial seperti pada Tabel 1.

Tabel 1 Komposisi PCR untuk mengamplifikasi daerah D-loop parsial

Komposisi	D-loop parsial
DNA <i>template</i>	3 µl
Primer Forward (20 pmol/ µl)	1,5 µl
Primer Reverse (20 pmol/ µl)	1,5 µl
dNTP (10mM)	1 µl
5x buffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
5 unit Taq (5u/ µl)	0,25 µl
ddH ₂ O	34,75 µl

Proses PCR pada penelitian ini menggunakan mesin *GeneAmp^(R) PCR system 2400* (Perkin-Elmer). Kondisi PCR untuk mengamplifikasi daerah target penelitian terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2 Kondisi PCR untuk mengamplifikasi daerah D-loop parsial

Kondisi	D-loop parsial
Predenaturasi	95°C / 5 menit
Denaturasi	94°C / 45 detik
Annealing	52°C / 1 menit
Extension	72°C / 1 menit
Final ekstension	72°C / 7 menit
Siklus	35 x
Volume	50 µl

Proses sekuensing dilakukan di PT. Charoen Pokphand Indonesia Tbk. Data hasil pembacaan sekuen dianalisis dengan menggunakan program MEGA IV (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis IV*) (Tamura *et al.* 2007). Hasil analisis basa nukleotida berupa matriks perbandingan perbedaan jumlah (*number of differences*). Analisis filogeni menggunakan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* dengan 1000 kali pengulangan. *Multiple alignment* menggunakan data sekuen harimau dari *GenBank* sebagai pembandingan (Tabel 3).

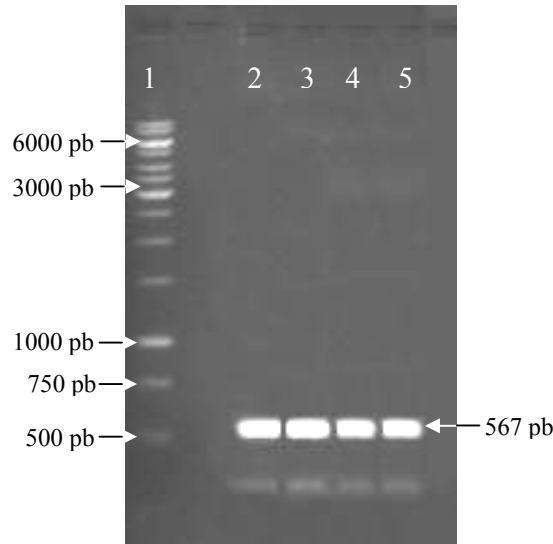
Tabel 3 Data sekuen subspecies harimau pembandingan untuk daerah D-loop bagian HVS-I

No.	Kode Akses	Kode Sampel	Nama Spesies	Asal	Panjang Sekuen (pb)	Pustaka
1	EF551003	Pt. alt	<i>P. t. altaica</i>	Siberia	16990	<i>GenBank</i> (www.ncbi.nlm.nih.gov)
2	AY452113	Pt. alt1	<i>P. t. altaica</i>	Siberia	555	Zhang <i>et al.</i> 2006
3	AY452115	Pt. alt2	<i>P. t. altaica</i>	Siberia	553	Zhang <i>et al.</i> 2006
4	AY452112	Pt. amoy1	<i>P. t. amoyensis</i>	China Selatan	530	Zhang <i>et al.</i> 2006
5	AY452119	Pt. amoy2	<i>P. t. amoyensis</i>	China Selatan	530	Zhang <i>et al.</i> 2006
6	AY452114	Pt. tig1	<i>P. t. tigris</i>	India	554	Zhang <i>et al.</i> 2006
7	AY452116	Pt. tig2	<i>P. t. tigris</i>	India	553	Zhang <i>et al.</i> 2006

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Daerah D-Loop Bagian HVS-I

Amplifikasi daerah D-loop bagian HVS-I dengan primer UF-03 dan UF-04 pada ke tiga sampel Harimau Sumatera (HS1d, HS2d, HS3d) memperlihatkan ke tiga individu tersebut menghasilkan produk PCR berukuran 567 pb (Gambar 1).



Keterangan: No. 1: DNA penanda 1 kb (Fermentas), No. 2-4: DNA hasil amplifikasi

menggunakan pasangan primer UF-03 dan UF-04

Gambar 1 Hasil amplifikasi daerah D-loop bagian HVS-I (menggunakan pasangan primer UF-03 dan UF-04)

Keragaman Runutan Basa-Basa Nukleotida dan Marka Genetik yang Spesifik pada Daerah D-loop Bagian HVS-I

Mempertahankan keragaman genetik suatu populasi sangat penting dalam konservasi karena keragaman genetik yang tinggi akan sangat membantu suatu populasi beradaptasi terhadap perubahan-perubahan yang terjadi di lingkungan sekitarnya, termasuk mampu beradaptasi terhadap perubahan habitat karena proses *global warming* dan munculnya penyakit-penyakit yang ada di alam. Hal-hal tersebut dapat mempengaruhi dinamika populasi. Suatu populasi dengan keragaman genetik yang rendah merupakan hasil dari berbagai proses yang panjang. Proses tersebut menurut Frankham *et al.* (2002) disebabkan oleh beberapa hal yaitu berkurangnya jumlah populasi karena adanya *bottle neck*, terjadinya fragmentasi suatu habitat akibat isolasi geografi (adanya lautan, hutan, pegunungan dan gurun pasir) yang mendorong putusnya aliran gen (*gen flow*), dan meningkatnya *genetic drift*. Selain itu dapat pula berasal dari populasi kecil yang diduga masih saling berkerabat dekat satu sama lainnya sehingga dalam jangka panjang, perkawinan yang terjadi di dalam kelompok tersebut akan merupakan perkawinan antar kerabat (*inbreeding*). Kejadian *inbreeding* ini akan menyebabkan *deficit* heterozigot dan penurunan kualitas reproduksi. Selanjutnya akan menyebabkan suatu individu menjadi sensitif terhadap penyakit tertentu. Dengan mengetahui status genetik suatu populasi, maka dapat dirancang suatu program konservasi untuk menghindari kepunahan yang cepat dari suatu spesies (Rhymer 1999, Damayanti 2007).

Produk PCR bagian parsial D-loop harimau Sumatera yang disekuon berada di daerah HVS-I (*Hypervariable Segments I*). Menurut Zhang *et al.* (2006), Luo *et al.* (2004), dan Wilkinson-Herborts *et al.* (1996) diketahui bahwa daerah HVS-I pada D-loop mitokondria mempunyai variasi basa-basa nukleotida yang tinggi, sehingga sangat cocok untuk membedakan perbedaan antar individu baik dalam satu keluarga maupun antar keluarga.

Analisis keragaman basa-basa nukleotida di daerah D-loop bagian HVS-I dilakukan dengan menambahkan data dari *GenBank* untuk *multiple alignment*. Basa nukleotida yang dibandingkan sepanjang 514 pb. Hasil *multiple alignment* tersebut didapat keragaman situs

nukleotida sebanyak 155 buah situs. Hal ini membuktikan bahwa daerah D-loop bagian HVS-I memang merupakan daerah dengan basa nukleotida yang sangat variatif. Data hipervariabel pada daerah ini sesuai dengan hasil para peneliti lain yaitu Fumagalli *et al.* (1996) pada tupai, Casane *et al.* (1997) pada lagomorpha, Randi *et al.* (1997) pada domba (*Capreolus pygargus* dan *C. capreolus*), Savolaenini *et al.* (2000) pada anjing domestik dan serigala, Uphyrkina *et al.* (2002) pada *Far Eastern* Leopard, Zhang *et al.* (2006) pada harimau secara umum (tiga subspecies). Hal ini dikarenakan daerah D-loop parsial terutama daerah HVS-I dan HVS-II merupakan daerah yang sangat bervariasi pada berbagai makhluk hidup (Wilkinson-Herborts *et al.* 1996). Brown (1980) menyatakan bahwa daerah D-Loop bersifat hipervariabel karena memiliki laju evolusi tertinggi yang disebabkan proses substitusi, insersi, dan delesi (indel) berlangsung cepat dan dapat mencapai 5-10 kali lebih cepat dibandingkan dengan DNA inti.

Selain itu, variasi yang ada juga terkait dengan sebaran geografik yang spesifik yaitu ada basa-basa nukleotida yang dimiliki hanya oleh subspecies harimau tertentu. Dari hasil penelitian ini didapat ciri spesifik untuk menandai kelompok Harimau Sumatera. Harimau Sumatera mempunyai 15 situs basa nukleotida yang spesifik di daerah HVS-I pada D-loop dibandingkan dengan subspecies harimau yang lain yaitu pada situs basa situs basa nukleotida ke 24 (G), 74 (A), 76 (A), 136 (C), 138 (C), 179 (C), 212 (A), 302 (G), 318 (T), 395 (C), 406 (G), 417 (A), 430 (A), 484 (G), 488 (G)) (Tabel 4). Situs-situs tersebut terdiri dari 7 insersi, 6 transversi, 1 transisi dan 1 kombinasi transisi dan insersi pada subspecies lainnya. Situs-situs spesifik tersebut dapat digunakan sebagai marka genetik dalam mengidentifikasi kemurnian genetik dari Harimau Sumatera apabila akan melakukan usaha konservasi genetiknya.

Tabel 4 Lima belas situs basa nukleotida yang spesifik untuk Harimau Sumatera di daerah D-loop bagian HVS-I (514 pb)

No. Situs nukleotida	HS1d/ Medan	HS2d/ Riau	HS3d/ Jambi	Pt. alt	Pt. alt1	Pt. alt2	Pt. amoy1	Pt. amoy2	Pt. tig1	Pt. tig2	Jenis mutasi
24	G	G	G	-	-	-	-	-	-	-	Insersi
74	A	A	A	T	T	T	T	T	T	T	Tv
76	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	Insersi
136	C	C	C	A	A	A	G	G	A	A	Tv
138	C	C	C	A	A	A	A	A	A	A	Tv
179	C	C	C	T	T	T	-	-	T	T	Ti, Insersi
212	A	A	A	T	T	T	T	T	T	T	Tv
302	G	G	G	T	T	T	T	T	T	T	Tv
318	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	Insersi
395	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	Insersi
406	G	G	G	-	-	-	-	-	-	-	Insersi
417	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	Insersi
430	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	Insersi
484	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	Ti
488	G	G	G	T	T	T	T	T	T	T	Tv

Keterangan: Nomor nukleotida sekuen acuan dan sekuen hasil penelitian sama
Ti (Transisi), Tv (Transversi), (-) (Insersi)

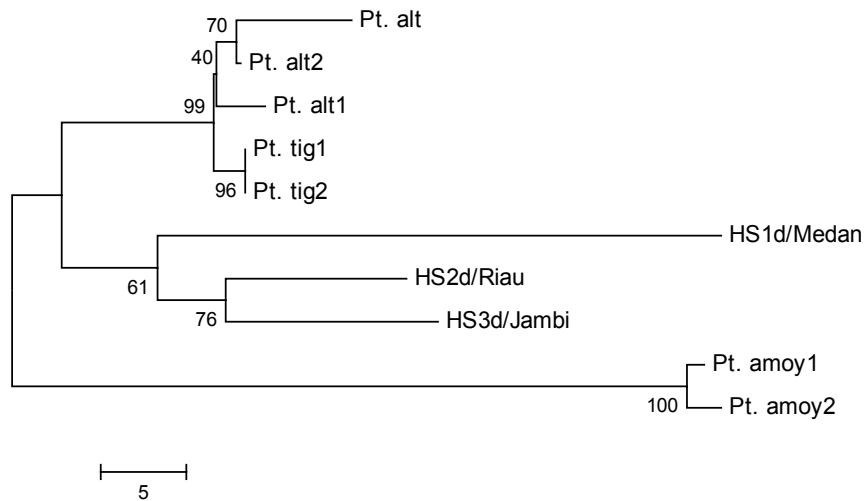
Hubungan Kekerbatan Harimau Sumatera Berdasarkan Runutan Basa Nukleotida pada Daerah D-loop Bagian HVS-I

Hubungan kekerabatan antara sampel Harimau Sumatera dalam penelitian ini dengan subspecies harimau lain yang ada di dunia dengan data dari *GenBank* maka berdasarkan matrik jumlah rata-rata dari perbedaan nukleotida (Tabel 5) maka Harimau Sumatera memiliki perbedaan nukleotida terkecil dengan *P. t. tigris*, sedangkan yang terbesar adalah dengan *P. t. amoyensis*.

Tabel 5 Matrik perbedaan jumlah basa-basa nukleotida di daerah D-loop bagian HVS-I (514 pb) beberapa subspecies harimau

Sampel	Pt. alt	Pt. amoy	Pt. tig	Pt. Sum
Pt. alt (n=3)				
Pt. amoy (n=2)	57			
Pt. tig (n=2)	6	55		
Pt. sum (n=3)	59	74	37	

Rekonstruksi pohon filogeni untuk mengetahui pengelompokan dan hubungan kekerabatan antara individu Harimau Sumatera berdasarkan perbedaan nukleotida daerah D-loop pada HVS-1 terdapat pada Gambar 2.



Gambar 2 Filogeni berdasarkan perbedaan nukleotida daerah D-loop pada HVS-1

Dari Gambar 2 terlihat bahwa pohon filogeni yang terbentuk terbagi menjadi empat kluster yang terdiri dari kluster *P. t. altaica*, *P. t. tigris*, *P. t. sumatrae* dan *P. t. amoyensis*. Hubungan kekerabatan subspecies Harimau Sumatera dengan subspecies harimau lainnya adalah Harimau Sumatera (*P. t. sumatrae*) paling dekat dengan Harimau India (*P. t. tigris*) dan paling jauh dengan Harimau China Selatan (*P. t. amoyensis*). Hasil rekonstruksi filogeni yang dilakukan pada penelitian ini membuktikan bahwa marka genetik D-loop bagian HVS-I menunjukkan bahwa Harimau Sumatera masuk ke dalam kluster atau kelompok tersendiri, terpisah dari kluster subspecies harimau lainnya. Jadi ke penanda genetik ini dapat digunakan untuk membedakan berbagai jenis harimau pada tingkat subspecies.

Sedangkan pada kluster *P. t. sumatrae* terlihat bahwa individu HS3d (Jambi) dekat dengan individu HS2d (Riau) dibandingkan dengan individu HS1d (Medan). Penanda genetik D-loop bagian HVS-I hasilnya juga dapat digunakan untuk membedakan hubungan antar individu, karena D-loop mempunyai keragaman genetik yang tinggi (bersifat hipervariabel, ada 155 situs) Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang telah dikerjakan oleh para peneliti seperti Douzery & Randi (1997) mempelajari populasi dan evolusi genetik mammalia, Tamura (2000) mempelajari evolusi pada manusia. Mereka menyatakan bahwa D-loop ini sangat cocok untuk membedakan individu dalam spesies yang sama. Apabila hasil *marka genetik* tersebut diterapkan pada kasus Harimau Sumatera yang digunakan sebagai sampel pada penelitian ini maka hubungan kekerabatan antar individu Harimau Sumatera ini adalah Harimau Sumatera asal Jambi dekat dengan harimau Sumatera asal Riau dibandingkan dengan Harimau Sumatera asal Medan.

SIMPULAN

1. Berdasarkan analisis marka genetik daerah D-loop bagian HVS-I pada Harimau Sumatera diperoleh 15 situs basa nukleotida spesifik yaitu situs basa nukleotida ke 24 (G), 74 (A), 76 (A), 136 (C), 138 (C), 179 (C), 212 (A), 302 (G), 318 (T), 395 (C), 406 (G), 417 (A), 430 (A), 484 (G), 488 (G). Harimau sedangkan marka genetik D-loop bagian HVS-I cocok digunakan untuk membedakan antar subspecies dan antar individu dalam suatu kelompok Harimau Sumatera.
2. Berdasarkan rekonstruksi filogeni menggunakan marka genetik daerah D-loop bagian HVS-I diketahui bahwa hubungan kekerabatan antar individu Harimau Sumatera dalam penelitian ini adalah Harimau Sumatera asal Jambi dekat dengan harimau Sumatera asal Riau dibandingkan dengan Harimau Sumatera asal Medan. Sedangkan hubungan kekerabatan subspecies Harimau Sumatera dengan subspecies harimau lainnya adalah Harimau Sumatera (*P. t. sumatrae*) paling dekat dengan Harimau India (*P. t. tigris*) dan paling jauh dengan Harimau China Selatan (*P. t. amoyensis*).

SARAN DAN REKOMENDASI

1. Dalam penelitian selanjutnya sebaiknya jumlah sampel Harimau Sumatera yang digunakan diperbanyak sehingga dapat memperoleh hasil yang lebih signifikan.
2. Dalam penelitian selanjutnya sebaiknya asal wilayah sampel Harimau Sumatera yang digunakan diperluas sehingga akan diperoleh informasi yang lengkap.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown WM. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (6): 3605-3609.
- Casane D, Dennebouy N, de Rochabeau H, Mounolou JC, Monnerot M. 1997. Nonneutral evolution of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of Lagomorphs. *Mol Biol Evol* 14:779-789.
- Damayanti CS. 2007. *Peranan Studi Genetik dalam Kegiatan Konservasi*. <http://vetopia.wordpress.com/2007/11/02/peranan-studi-genetik-dalam-kegiatan-konservasi> [14 Agustus 2008].
- Douzery E, Randi E. 1997. The mitochondrial control region of Cervidae: Evolutionary patterns and phylogenetic content. *J Mol Biol and Evol* 14: 11154-11166.
- Duryadi D. 1994. Peranan DNA mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. *Hayati* 1 (1): 1-4.
- _____. 1997. *Isolasi dan Purifikasi Mitochondrian (mtDNA)*. Laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSH) Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- _____. 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, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

- Franklin *et al.* 1999. Harimau Terakhir Indonesia: Alasan untuk Bersikap Optimis. Di dalam: Seidensticker J, Christie S, Jackson P, editor. *Menunggang Harimau: Pelestarian harimau di lingkungan yang didominasi manusia*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Hlm 135-136.
- Fumagalli L, Taberlet P, Favre L, Hausser J. 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Mol Biol Evol* 13: 31-46.
- Inskipp, T. & Gillett, H J. (Eds.) 2005. *Checklist of CITES Species and Annotated CITES Appendices and Reservations*. <http://www.cites.org/eng/resources/species.html> [30 Maret 2007].
- [IUCN] International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2006. *2006 IUCN Red List of Threatened Species*. <http://www.iucn.org/themes/ssc/redlist2006/redlist2006.htm> [30 Maret 2007].
- Luo SJ *et al.* 2004. Phylogeography and genetic ancestry of tiger (*Panthera tigris*). *PloS Biology* 2 (12): 0442.
- Randi E, Pierpaoli M, Danilkin A. 1997. Mitochondrial DNA polymorphism in population of Siberian and European Roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*). *Heredity* 80: 249-437.
- Rhymer J. 1999. Series 2: *Impacts of Genetic Engineering on Society Biotechnology*. White Paper Series. University of Maine.
- Savolainen P, Arvestad L, Lunderberg J. 2000. mtDNA tandem repeats in domestic dogs and wolves: Mutation mechanism studied by analysis of the sequence of imperfect repeats. *J Mol Evol* 12: 474-488.
- [STT] The Sumatran Tiger Trust. 2007. *Sumatran Tiger*. <http://www.tigertrust.info/theSumaterantiger.htm>. [16 Maret 2007].
- Tamura K. 2000. On the estimation of the rate of nucleotide for the control region of human mitochondrial DNA. *Gene* 259:189-197.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- Uphyrkina O *et al.* 2002. Conservation genetics of the far eastern leopard (*Panthera pardus orientalis*). *The Journal of Heredity* 5:93.
- Widayanti R. 2006. Kajian Penanda Genetik Gen Cytochrome B dan Daerah D-loop pada *Tarsius* sp. [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Wilkinson-Herbots HM, Richards MB, Forster p, Sykes BC. 1996. Site 73 in hypervariable region II of the human mitokondria genome and the origin of European population. *Ann Hum Genet* 60: 499-508.
- Zhang W. *et al.* 2006. Highly conserved D-loop-like nuclear mitochondrial sequences (Numts) in tiger (*Panthera tigris*). *Journal of Genetics*, 85:107-116.