

FRAGMENTASI mtDNA MAMBRUK CRISTATA DAN VICTORIA OLEH BEBERAPA ENZIM RESTRIKSI

(Fragmentation of mtDNA of Goura cristata and victoria by some Restriction Enzymes)

Agust Kilmaskossu¹

¹Jurusan Biologi-FMIPA

Universitas Negeri Papua Manokwari-Papua Barat

ABSTRACT

The difference between Goura cristata and Goura Victoria could be distinguished by comparison of the morphology characters than the internal factors. Internal factors such as genetics characters are required in certain cases to distinguish the bird species. Therefore, a study on the mtDNA of the birds has been done. Three restriction enzymes have been used to produce fragmentation of mtDNA of the birds and analysis the differences between them. One of the three enzymes, RsaI, shows a difference in the fragment mtDNA; and could be used as a marker in differentiation of bird species especially in the Goura species.

Keywords: *Fragmentation of mtDNA, Goura cristata, Goura victoria, Enzyme Restriction, HaeIII, HpaII, RsaI*

PENDAHULUAN

Keanekaragaman hayati dapat dikelompokkan ke dalam tiga tingkatan yang berbeda, yaitu: keanekaragaman hayati pada tingkat genetik, spesies, dan komunitas. Keanekaragaman pada tingkat genetik dapat mempengaruhi keanekaragaman pada tingkat spesies. Keanekaragaman genetik dalam suatu spesies juga dipengaruhi oleh perilaku reproduksi individu-individu di dalam populasi (Primack, 1993).

Keanekaragaman genetik dalam suatu populasi dapat terjadi karena individu-individu dalam populasi tersebut memiliki gen-gen yang berbeda. Bentuk-bentuk gen dengan perbedaan tersebut dinyatakan sebagai alel yang dapat terbentuk melalui mutasi. Berbagai alel akan memproduksi bentuk-bentuk protein yang berbeda dalam struktur dan fungsi yang selanjutnya mempengaruhi fisiologi dan perkembangan suatu organisme. Keanekaragaman genetik juga memungkinkan suatu spesies beradaptasi dengan lingkungannya melalui suatu proses yang disebut sebagai seleksi alam. Keanekaragaman genetik juga

memungkinkan para ilmuwan untuk memuliabiakan tanaman atau hewan tertentu yang sesuai untuk keperluan manusia.

Pengkajian terhadap genom suatu organisme telah menghasilkan kemajuan pesat dalam perkembangan dan pemanfaatan organisme untuk kesejahteraan manusia. Selain itu informasi genetik merupakan salah satu dasar yang dapat digunakan oleh para ahli untuk mempelajari proses evolusi yang terjadi pada suatu organisme hidup. Informasi genetik dan morfologi sering juga digunakan sebagai indikator kunci dalam menetapkan strategi konservasi suatu spesies.

Pada umumnya materi DNA yang digunakan dalam analisis keragaman genetik berasal dari inti dan organel sitoplasma suatu organisme. Salah satu organel sitoplasma adalah mitokondria yang telah sering digunakan dalam mempelajari evolusi hewan (Moritz dkk., 1987), terutama pada hewan vertebrata (Desjardins dan Morais, 1990). Adanya susunan gen dan kodon-kodon asam amino yang konservatif memudahkan untuk meluruskan sekuensi atau membuat homologi di antara spesies yang diteliti. DNA mitokondria (mtDNA) banyak digunakan dalam studi filogeni karena walaupun

mengalami evolusi yang relatif cepat namun banyak bagian dari sekuen tersebut tidak berubah atau dikonservasikan seperti gen-gen penyandi protein, pertukaran asam amino yang tetap stabil, dan kejadian insersi dan delesi yang masih terlihat; selain itu ukurannya relatif kecil sekitar 16 “kilobase pairs” (kbp), terdapat dalam jumlah salinan yang banyak dan diturunkan secara maternal tanpa mengalami rekombinasi (Brown, 1991; Desjardins dan Morais, 1990). Oleh karena itu analisis mtDNA dapat memberi petunjuk tentang aliran gen, hibridisasi, biogeografi, filogeni (Moritz dkk., 1987), hubungan evolusi di antara individu, struktur populasi dan spesies (Irwin dkk., 1991), studi keragaman genetik dan biologi populasi (Brown, 1991). Umumnya mtDNA hewan terdiri atas daerah penyandi (sejumlah 37 gen meliputi 13 gen penyandi protein, 22 gen penyandi tRNA dan dua gen penyandi rRNA) dan daerah bukan penyandi yang dikenal sebagai “displacement loop region” (daerah D-loop) (Desjardins dan Morais, 1990).

Gen cytochrom b merupakan salah satu gen penyandi protein yang terdapat dalam genom mitochondria dan berperan dalam sistem oksidase fosforilase (Irwin dkk., 1991). Pada mtDNA ayam gen ini terletak antara gen ND6 dan ND5 (Desjardins dan Morais, 1990). Sekuen dari gen tersebut digunakan secara luas dalam mempelajari filogenetik molekuler (Edward dkk., 1990). Molekul DNA dapat diurai ke dalam komponen dasar penyusunnya menggunakan enzim nuklease. Enzim nuklease yang khusus memotong untai ganda DNA disebut enzim restriksi yang mempunyai urutan nukleotida tertentu. Enzim restriksi dapat dibedakan menjadi tiga tipe yang mempunyai spesifisitas tertentu.

Keragaman genetik pada hewan dapat dipelajari melalui analisis langsung terhadap ciri morfologi (morfometri), biokimia atau penggunaan penanda tertentu. Salah satu analisis pada tingkat molekuler yang dapat digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada burung adalah melalui penggunaan penanda PCR-RFLP pada daerah cytochrom-b (cyt. b) mtDNA. Misalnya Edwards dan Wilson (1990) menganalisis evolusi mtDNA dan variasi ukuran genom burung penyanyi dari genus Pomatostomus di Australia. Birt dkk. (1992) menganalisis variasi sekuen nukleotida dari 12 spesies “parrot” dan seekor “rock dove”. Kornegay dkk. (1993)

menganalisis variasi cytochrom b dari sembilan spesies “galliform” dan seekor “muscovy duck”. Quin dan Wilson (1993) melakukan kloning dan sekuen terhadap 3,4 kbp mtDNA “snow goose” dan menemukan bahwa gen ND5 diikuti oleh gen-gen cytochrom b, tRNA^{Thr}, dan srRNA. Avise dkk. (1994) menganalisis sekuen cytochrom b burung Hoatzin *Ophistocomus hoatzin* dan membandingkannya terhadap sembilan spesies Cuculiformes dan Galliformes.

Informasi genetik pada burung mambruk belum diungkapkan untuk digunakan sebagai karakter genetik yang dapat digunakan untuk membedakan spesies burung tersebut. Sehubungan dengan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengkaji keanekaragaman fragmen mtDNA burung mambruk *cristata* dan *viktoria* yang dipotong dengan menggunakan tiga enzim restriksi.

METODE PENELITIAN

Analisis DNA

Untuk menganalisis mtDNA mambruk digunakan darah yang diambil dari pembuluh vena sayap (vena ulnaris) dari sembilan ekor burung, terdiri atas dua ekor mambruk polos (*G. cristata*) dan tujuh ekor mambruk raja (*G. victoria*). Dari masing-masing ekor diambil sebanyak 1 – 2,5 ml darah yang diisap ke dalam siring (alat suntik) yang sebelumnya telah diisi dengan larutan antikoagulan 10% EDTA (Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid). DNA mudah terpecah oleh pelepasan DNAase (enzim pemecah DNA) setelah pengambilan sampel darah. Penggunaan EDTA akan mengikat ion besi divalen sehingga menghambat aktivitas DNAase. Sampel darah kemudian disimpan dalam “freezer” sampai membeku kemudian dibawa menggunakan termos ke Laboratorium Zoologi FMIPA IPB untuk dianalisis lebih lanjut. Isolasi dan purifikasi DNA total dari darah mambruk yang telah dipreservasi dilakukan menurut Duryadi (1997). Selanjutnya mtDNA hasil isolasi diamplifikasi dengan mesin PCR “Hybaid Omn-E Thermal cycler” menggunakan dua pasang primer, yaitu: (1) Primer MI01 (5’-CAAATCCTCACA GGCCTATTCCTAGC-3’) dan MI02 (5’-TAGG CGAATAGGAAATATCATTCGG GTTTGAT-3’) yang dirancang oleh Kocher dkk. (1989). Primer MI01 dan MI02 dirancang dari sekuen nukleotida gen cyt b sapi, manusia, tikus, dan ayam (Chikuni dkk., 1996), (2) Primer BM1

(5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCT CAGCATGATGAAA-3') dan BM2 (5'-AAACTGCA GCCCCTCAG AATGATATTTGTCCTCA-3').

Komposisi reaksi PCR untuk tiap campuran adalah 6,1 ul air destilata, 1 ul penyangga PCR, 0,6 ul MgCl₂, 1,2 ul dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), primer MI01 dan MI02 masing-masing 0,5 ul dan 0,1 Taq Polymerase dengan volume akhir reaksi 10 ul. Reaksi amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus terdiri atas tahap denaturasi DNA cetakan pada 94 °C selama satu menit, "anealing" (penempelan primer) pada 60 °C selama satu menit dan elongasi (perpanjangan) pada 72 °C selama satu menit.

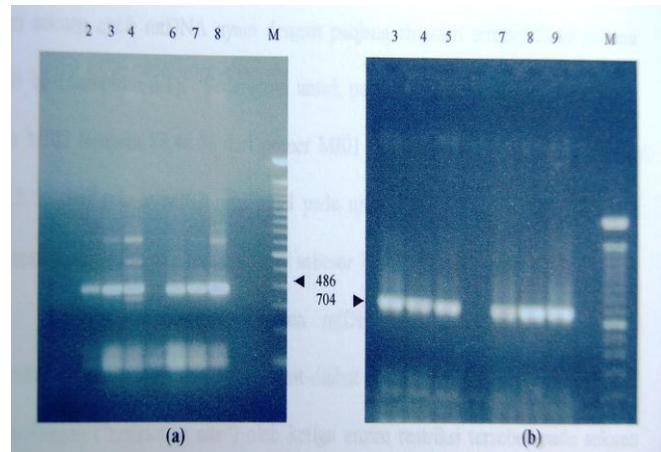
Hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis selama 40 menit pada 2% gel agarose dalam 1 x TBE (Tris, Boric acid, EDTA) dengan pH 8,0 serta etidium bromide 0,5 ug/ml sebagai pewarna. Hasil pemetaan dievaluasi menggunakan perangkat kamera UV.

Analisis keragaman genetik dilakukan dengan memotong fragmen DNA hasil amplifikasi dengan enzim restriksi. Enzim restriksi yang digunakan sebanyak tiga macam, yaitu HaeIII (GG CC), HpaII (C CGG), dan RsaI (GT AC). Sebagai pembandingan ukuran fragmen digunakan penanda (marker) Ready-Load 100 bp DNA Ladder. Hasil pemotongan kemudian dipotret menggunakan kamera polaroid untuk selanjutnya dianalisis keragaman pitanya. Analisis keragaman pita dilakukan secara kualitatif dengan membandingkan hasil pemotongan terhadap penanda (marker).

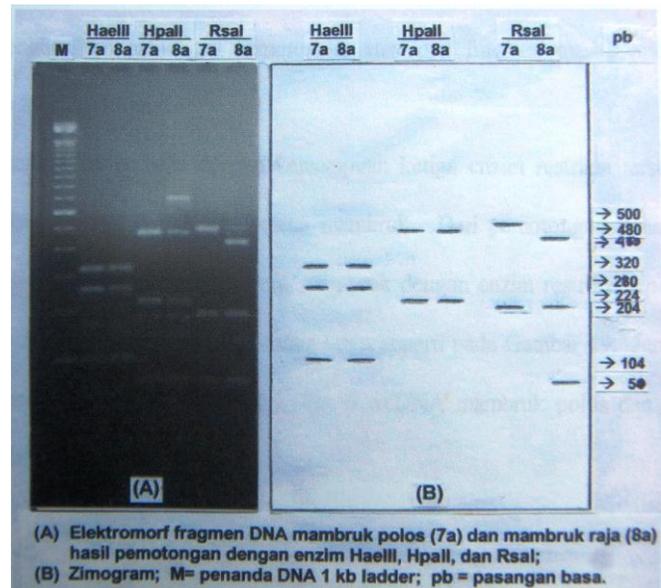
HASIL PENELITIAN

Pengamatan terhadap profil pita menunjukkan bahwa kedua pasang primer yang digunakan mampu mengamplifikasi DNA dari sampel darah mambruk. Primer BM1 dan BM2 menghasilkan fragmen DNA teramplifikasi sepanjang 486 bp sedangkan primer MI01 dan MI02 menghasilkan fragmen DNA teramplifikasi sepanjang 704 bp (Gambar 1). Fragmen DNA yang panjang akan memberikan informasi keragaman yang lebih banyak atau bervariasi.

Dari pemotongan terhadap sembilan sampel cyt. b mtDNA burung mambruk dengan enzim restriksi HaeIII, HpaII, dan RsaI menghasilkan fragmentasi DNA seperti pada Gambar 2.



Gambar 1. Fragmen DNA Total mambruk polos dan raja yang teramplifikasi menggunakan (a) primer BM1 dan BM2, dan (b) primer MI01 dan MI02. Angka 2, 3, 4, 6, 8 dan 9 adalah sampel DNA mambruk raja; Angka 5 dan 7 adalah sampel DNA mambruk polos; M = marker (penanda DNA).



Gambar 2. Elektromorf dan Zimogram fragmen mtDNA mambruk polos dan mambruk raja

Jumlah dan ukuran fragmen hasil pemotongan cyt. b mtDNA mambruk polos dan raja disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemotongan mtDNA burung mambruk polos dan mambruk raja dengan enzim restriksi HaeIII, HpaII, dan RsaI

No.	Enzim restriksi	Jumlah Fragmen pada a. Mambruk polos b. Mambruk raja	Ukuran Fragmen
1	<i>Hae III</i>	a. 3 (tiga) b. 3 (tiga)	320; 280; 104 320; 280; 104
2	<i>Hpa II</i>	a. 2 (dua) b. 2 (dua)	480; 224 480; 224
3	<i>RsaI</i>	a. 2 (dua) b. 3 (tiga)	500; 204 450; 200; 54

Pemotongan menggunakan HaeIII dan HpaII terhadap cyt. b mtDNA mambruk polos dan raja menghasilkan potongan fragmen yang monomorf. Artinya jumlah dan ukuran fragmen mtDNA dari kedua spesies mambruk tersebut sama. Sebaliknya penggunaan RsaI menghasilkan potongan fragmen yang polimorf. Artinya jumlah dan ukuran fragmen mtDNA dari kedua spesies mambruk tersebut berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa haplotipe yang ditemukan dapat merupakan penciri bagi kelompok atau spesies mambruk yang diteliti. Atas dasar tersebut disimpulkan bahwa RsaI dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk mengkaji DNA mambruk polos dan raja.

PEMBAHASAN

Primer MI01 dan MI02 memberikan hasil amplifikasi cyt. b mtDNA mambruk polos dan raja yang lebih baik dibanding primer BM1 dan BM2. Walaupun sekuens cyt. b mtDNA burung mambruk tak dapat ditampilkan disini (karena belum ada pustakanya) namun dari penelitian Kilmaskossu (2001) diilustrasikan bahwa primer MI01 dan MI02 dapat menelusuri dan mengamplifikasi sekuen tersebut dengan baik.

Fragmentasi mtDNA mambruk polos hasil pemotongan dengan ketiga enzim restriksi ternyata berbeda dengan gambaran hasil pemotongan enzim tersebut pada mtDNA ayam (Kilmaskossu, 2001). Keadaan tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara sekuen basa pada mtDNA mambruk dan ayam, ini menunjukkan bahwa hewan-hewan tersebut jenisnya berbeda. Berg dan Singer (1992) menyatakan bahwa DNA dari spesies berkerabat dekat akan memperlihatkan komposisi basa yang sama sedangkan DNA dari

spesies yang berbeda secara jelas memiliki komposisi basa yang berbeda pula.

Sebaliknya, fragmentasi mtDNA mambruk polos dan raja juga memperlihatkan perbedaan bila pemotongan dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi RsaI. Hasil pemotongan dengan enzim restriksi RsaI memperlihatkan bahwa keragaman pita pada mambruk raja lebih tinggi dari pada mambruk polos. Ini menunjukkan bahwa telah terjadi substitusi pasangan basa pada mtDNA mambruk raja. Shields dan Helmychosky (1988) menyatakan bahwa mutasi dalam mtDNA akan menyebabkan perubahan dalam ukuran fragmen. Mutasi tersebut disebabkan oleh substitusi pasangan basa (bp) dan bukan karena mutasi berukuran kecil (small length mutation). Menurut Sugiri (1988), substitusi pasangan basa ialah suatu keadaan dimana suatu basa diganti oleh basa lainnya. Dalam hal ini dapat terjadi dua macam substitusi, yaitu: substitusi transisi dan substitusi transvers. Substitusi transisi lebih umum terjadi, disini satu purin (Adenin atau Guanin) diganti oleh purin lainnya atau satu pirimidin (Sitosin atau Timin) diganti oleh pirimidin lainnya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pola pita mtDNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi tertentu dapat digunakan sebagai ciri genetik untuk membedakan spesies burung mambruk.

Perlu dilakukan penelitian terhadap mtDNA mambruk selatan (*Goura scheepmakeri*) untuk mendapat gambaran yang lebih lengkap tentang pola pita ketiga spesies mambruk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini merupakan bagian dari penelitian magister ketika penulis melaksanakan studi pasca sarjana (S2) pada IPB Bogor antara tahun 1998 – 2001 yang disponsori EIUDP CIDA. Oleh karena itu ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. Nawangsari Sugiri, Dr. Ir. Ani Mardastuti, dan Dr. Dewi M. Prawiradilaga yang telah membimbing penulis dalam penelitian dan penulisan tesis. Ucapan terima kasih disampaikan juga kepada Dr. Dedi Duryadi Solihin, DEA. yang telah memberikan ijin dan panduan dalam penggunaan laboratorium Biomolekuler Hewan FMIPA IPB di Tajur dan Darmaga, serta Pak Heri

dan rekan Ani Aryani yang banyak membantu dalam pekerjaan analisis molekuler di laboratorium tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Avise, J.C., W.S. Nelson and C.G. Sibley. 1994. Why One-Kilobase Sequences from Mitochondrial DNA Fail to Solve The Hoatzin Phylogenetic Enigma. *Mol.Phyl. & Evol.* Vol. 3, 2: 175-184.
- Birt, T.P., V.L. Friesen, J.M. Green, W.A. Montevecchi and W.S. Davidson. 1992. Cytochrome-b Sequence Variation Among Parrots. *Hereditas* 117: 67-72.
- Brown, T.A. 1991. *Molecular Biology*. Bios Scientific Publishers Limited. Oxford, USA. 322p.
- Chikuni, K., N. Minaka and H. Ikenaga. 1996. Molecular Phylogeny of Some Passeriformes, Based on Cytochrome-b Sequences. *J.Yamashina Inst.Ornithol.*, 28: 1-8.
- Desjardins, P. and R. Morais. 1990. Sequence and Gene Organization of The Chicken Mitochondrial Genome. *J.Mol.Biol.* 212: 599-634.
- Duryadi, D. 1997. *Isolasi dan Purifikasi DNA Mitochondrion (mtDNA)*. Laboratorium Zoologi FMIPA IPB, Tajur, Bogor.
- Edwards, S.V. and A.C. Wilson. 1990. Phylogenetically Informative Length Polymorphism and Sequence Variability in Mitochondrial DNA of Australian Songbirds (*Pomatostomus*). *Genetics* 126: 659-711.
- Irwin, M., T.D. Kocher and A.C. Wilson. 1991. Evolution of The Cytochrome-b Gene of Mammals. *J.Mol.Evol.* 32: 128-144.
- Kilmaskossu, A. 2001. *Ekologi Persarangan, Musim Perkembangbiakan, dan Kajian Awal Keragaman Morfogenetik Mambruk Polos Goura cristata*.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Paabo, F.X. Villablanca, and A.C. Wilson. 1989. Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing With Conserved Primers. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 86: 6196-6200.
- Kornegay, J.R., T.D. Kocher, L.A. Williams and A.C. Wilson. 1993. Pathways of Lisozyme Evolution Inferred from The Sequence of Cytochrome-b in Birds. *J.Mol.Evol.* 37: 367-379.
- Moritz, C., T.E. Dowling and W.M. Brown. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Ann.Rev.Ecol.Syst.* 18: 269-292.
- Primack, R.B. 1993. *Essentials of Conservation Biology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachussets, USA.
- Quinn, T.W. and A.C. Wilson. 1993. Sequence Evolution in and around The Mitochondrial Control Regions in Birds. *J.Mol.Evol.* 37: 417-425.
- Shields, G.F. and K.M. Helmychowsky. 1988. Mitochondrial DNA of Birds. In: R.F. Johnston (ed.) *Current Ornithology*. Vol. 5. Plenum Press. New York.
- Sugiri, N. 1988. *Hakiki Evolusi*. Pusat Antar Universitas IPB – Lembaga Sumberdaya Informasi IPB, Bogor.