

DIVERSITAS GENETIK BURUNG MALEO (*MACROCEPHALON MALEO*) BERDASARKAN INTRON SATU GEN RHODOPSIN NUKLEUS (RDP1)

I Made Budiarsa^{1*}, I Wayan Tunas Artama², Langkah Sembiring³, Jesmandt Situmorang³

¹Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Tadulako Palu
²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
³Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Burung maleo (*Macrocephalon maleo*) merupakan burung endemik Sulawesi yang jumlah populasinya mengalami penurunan yang tajam, sehingga IUCN menggolongkan burung ini ke dalam *Endangered Species*. Fenomena ini menggambarkan bahwa burung maleo memiliki resiko kepunahan yang tinggi sehingga tindakan penyelamatan perlu dilakukan, yaitu melalui tindakan konservasi. Data dan informasi diversitas genetik merupakan aspek yang sangat penting untuk diketahui karena informasi tersebut dapat digunakan sebagai landasan penentuan tujuan dan arah konservasi. Tujuan penelitian ini adalah mengungkap diversitas genetik burung maleo berdasar sekuen intron satu gen rhodopsin nukleus dalam rangka menyiapkan data molekular/data base untuk membantu konservasi burung maleo dan anggota Megapoda yang lain bagi kepentingan penelitian atau pertimbangan pelestarian satwa langka dimasa yang akan datang. Sampel darah burung diperoleh dari habitat yang berbeda yaitu habitat pantai (*coastal nesting grounds*) dan habitat hutan (*in land nesting grounds*). DNA darah diisolasi dan dipakai sebagai cetakan untuk amplifikasi intron satu gen RDP dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Produk PCR selanjutnya disekuensing untuk mendapatkan sekuen DNA kemudian digunakan sebagai dasar untuk mengungkap diversitas genetik maleo. *Alignment (multiple alignment)* dilakukan dengan menggunakan program *Clustal-X*, identifikasi haplotipe dan diversitas nukleotida dilakukan dengan program MEGA versi 2.1 dan DnaSP versi 3.51. Hasil analisis menunjukkan adanya 7 haplotipe pada 12 daerah variabel dengan nilai diversitas nukleotida antara 0,0037-0,013 dan komposisi basa 29,6% G, 26,9% C, 25,3% T dan 18,2% A.

Kata kunci: *Macrocephalon maleo*, diversitas genetik, RDP1

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Sulawesi merupakan salah satu pulau terpenting kedua bagi konservasi di Indonesia, dengan proporsi endemik tertinggi 62% dari 79 spesies setelah propinsi Irian Jaya dalam jumlah reptilia dan burung endemik (Kinnaird, 1995; Lee *et al.*, 2001). Salah satu burung endemik Sulawesi yang menarik dan memiliki keunikan adalah burung maleo (*Macrocephalon maleo*). Burung ini berbeda dengan jenis burung lainnya yaitu menggunakan panas bumi dan panas matahari untuk mengerami telurnya (Frith, 1956; Jones & Birks, 1992; Jones *et al.*, 1995). Hasil berbagai survei dan kajian tentang keberadaan maleo, satwa ini mengalami penurunan yang sangat drastis. Christy dan Lentey (2001) melaporkan adanya penurunan populasi burung maleo sampai 47- 65% selama 10-15 tahun terakhir. Penurunan jumlah populasi maleo yang sangat drastis, *International Union for Conservation of Nature (IUCN)* menggolongkan burung ini ke dalam *Endangered Species* (Anonim, 2002).

Dari fenomena di atas jenis burung endemik ini memiliki resiko kepunahan yang tinggi sehingga tindakan penyelamatan perlu dilakukan melalui upaya konservasi baik dilakukan secara *in-situ* atau *ex-situ*. Data dan informasi tentang diversitas genetik penting untuk diketahui karena informasi tersebut dapat digunakan sebagai landasan penentuan tujuan dan arah pengembangan konservasi dan sering digunakan sebagai indikator dalam keberhasilan kegiatan konservasi.

Kendalanya informasi tentang diversitas genetik khususnya diversitas genetik burung maleo belum pernah dilaporkan.

Untuk mengatasi kendala tersebut, dilakukan penelitian untuk mengungkap diversitas genetik burung maleo dengan pendekatan molekular. Metode analisis ini mampu menunjukkan keragaman genetik yang tinggi pada tingkat intraspesies, yang tidak terdeteksi metode lain (Ball & Avise, 1992). Pendekatan ini digunakan berdasar pada pemikiran bahwa setiap organisme memiliki perbedaan susunan nukleotida dalam satu spesies (satu populasi) atau antar populasi dan perbedaan tersebut dapat digunakan untuk mempelajari diversitas genetik dan hubungan kekerabatan suatu organisme (Weising *et al.*, 1994). Tujuan penelitian ini adalah mengungkap diversitas genetik burung maleo berdasarkan intron satu gen rhodopsin dan hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai *data base* untuk konservasi burung maleo dan anggota kelompok megapoda tertentu bagi kepentingan penelitian atau pertimbangan pemuliaan karakteristik satwa langka yang dilindungi di masa yang akan datang.

Pada penelitian ini digunakan gen rhodopsin karena gen tersebut bermanfaat untuk banyak taksa burung, ukuran yang sangat menguntungkan (1~1 kb), dan kemudahannya diamplifikasi untuk taksa galliformes. Struktur rhodopsin yang terlestarian (*conserved*) pada kebanyakan vertebrata (Okano *et al.*, 1992). Meskipun beberapa peneliti belakangan ini telah menginformasikan kegunaan filogenetik sejumlah ekson nukleus (Groth & Barrowclough, 1999; Lovette & Bermingham, 2000) urutan basa ini berubah sangat lambat untuk kebanyakan perbandingan di tingkat spesies atau genus. Intron nukleus berpotensi mengisi kekurangan ini, karena berubah relatif lebih cepat dan mudah di amplifikasi (Slade *et al.*, 1994; Prytchitko & Moore, 1997; Fujita *et al.*, 2004).

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan metode yang digunakan pada penelitian sebelumnya (Buchart *et al.*, 1998). Sampel darah burung maleo diperoleh dari 2 habitat yang berbeda masing-masing Tanjung Matop, Bakiriang untuk mewakili habitat pesisir pantai (*coastal nesting grounds*) dan Desa Pakuli, Saluki mewakili habitat hutan (*in land nesting grounds*). Tempat tersebut merupakan lokasi yang penting di kawasan Sulawesi dan diharapkan dapat mewakili *nesting ground* maleo di Sulawesi. Pilihan prioritas di kawasan ini didasarkan pada hasil survei sebelumnya bahwa kawasan ini masih terdapat burung maleo dan merupakan kawasan yang representatif untuk mewakili maleo yang hidup di pantai dan bukan pantai (Buhart *et al.*, 1998).

Isolasi DNA

DNA total darah diisolasi dengan mengikuti protokol *Qiamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen). DNA total hasil isolasi kemudian disimpan pada suhu -20°C. DNA diperiksa kualitasnya dengan dimigrasikan pada gel agarose 1,2 %.

Amplifikasi Intron Satu Gen Rhodopsin dengan Teknik PCR

Amplifikasi DNA mengikuti protokol : PCR Kit (Takara Ex Taq™), DNA total hasil ekstraksi diamplifikasi di dalam 50µl volume reaksi yang terdiri dari 5µl Buffer PCR, 4µl dNTP, 2µl *primer forward*, 2µl *primer reverse*, 0,25µl *Taq Polymerase*, 1 µl sampel DNA dan 35,075µl H₂O menggunakan *Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600*. Primer yang digunakan adalah : RDPI.U1(5'-GTAACAGGGTGCTACATCGA-3')RDPI.L1 (5'-ACAG ACCACCACATATCGTT-3') (Birks & Edwards, 2002).

Sequencing

Purifikasi DNA hasil amplifikasi (produk PCR) menggunakan *QiaQuick PCR Purification Kit* (Qiagen, USA). Produk PCR yang digunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi penentuan urutan nukleotida, menggunakan *ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)* sistem 4 kapiler mengikuti protokol BigDye v.3.1. *Cycle Sequencing Kit*. Primer yang digunakan dalam proses sekuensing gen rhodopsin adalah :U1 (5'-GTAACAGGGTGCTACATCGA-3') L1 (5'-ACAGACCACCACATAT CGTT -3').

Analisis Data

Sekuen DNA yang diperoleh dari masing-masing individu dan sekuen DNA pembanding yang diperoleh dari data bases Internasional (*DNA Data Bank of Japan*, Jepang) digunakan sebagai dasar untuk mengungkap diversitas genetik burung maleo. Data sekuen DNA RDP1 hasil sekuensing dan sekuen DNA yang diperoleh dari data bases Internasional disimpan dalam MS Words dalam bentuk *text file* kemudian diedit dengan program PFE (*Programmer File Editor*). *Alignment (multiple alignment)* dilakukan dengan menggunakan program *Clustal-X*, (Thomson *et al.*, 1997) identifikasi haplotipe dan diversitas nukleotida dilakukan dengan program MEGA versi 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) dan DnaSP versi 3.51 (Rozas and Rozas, 1999)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi optimal dalam amplifikasi gen rhodopsin (RDP1) adalah 5 menit pre-denaturasi pada suhu 95°C, diikuti dengan 35 siklus, 35 detik denaturasi pada suhu 94°C, 30 detik *annealing* pada suhu 52°C selama 30 detik, elongasi pada suhu 72°C diikuti dengan post-elongasi selama 7 menit pada suhu 72°C. Hasil sekuensing gen tersebut menghasilkan fragmen DNA yang panjangnya 807 bp.

Rata-rata frekuensi basa tidak menceng/bias 29,6% G, 26,9% C, 25,3% T dan 18,2% A, atau kaya A-T seperti yang telah dilaporkan untuk intron β -fibrinogen 7 (Prytchiko dan Moore, 1997). Hasil *alignment (multi alignment)* gen rhodopsin nukleus sepanjang 807 bp, teridentifikasi 12 daerah variabel dan 7 haplotipe yaitu haplotipe A,B, C, D, E, F, H (Tabel 1).

Tabel 1. Situs Polimorfik Intron satu gen Rhodopsin Nukleus dibandingkan dengan GenBank dengan nomer akses AF.394649 DDBJ Jepang

Haplotipe	Posisi nukleotida											
	158	213	331	345	395	473	518	576	608	630	644	695
AF.394649	G	G	G	G	G	G	A	C	G	A	T	G
Haplotipe A	.	.	T
Haplotipe B	A	T	.	T	C	.	T	G	.	.	.	C
Haplotipe C	A	A	T
Haplotipe D	A	T	.	.	C
Haplotipe E	A	A	.	.	C
Haplotipe F	A	A	T		C	C	T	G	.	.	G	C
Haplotipe G	T	G	.	.

Sebaran haplotipe burung maleo adalah 3 haplotipe (A,C,E) pada individu sampel asal habitat pantai (Tanjung Matop/Bakiriang) lebih rendah dari haplotipe yang teridentifikasi dari habitat hutan (Pakuli/Sakuli) yaitu 6 haplotipe (A,B,C,D,F,G). Haplotipe A dan C adalah haplotipe yang umum ditemukan pada dua lokasi. Frekuensi haplotipe A dan C pada seluruh sampel dari dua lokasi hutan dan pantai yaitu masing-masing 0,40 dan 0,06 sedangkan frekuensi haplotipe D, F, G adalah 0,06 dan frekuensi haplotipe B dan E 0,13. Diversitas genetik (π) intron satu gen RDP sepanjang 807bp adalah 0,0037- 0,013 dan yang tertinggi diidentifikasi dari habitat maleo asal hutan yaitu 0,013.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah haplotipe dan diversitas nukleotide terbesar terdapat pada lokasi maleo asal hutan (Tabel 2). Hal ini mengindikasikan bahwa daerah ini memungkinkan terjadinya penyebaran burung maleo dari lokasi lain sehingga aliran gen antar populasi terjadi dengan teratur. Populasi-populasi yang secara geografis mengalami aliran gen yang teratur, secara genetik akan memiliki kesamaan dibandingkan dengan populasi yang terpisah secara geografis dan tidak terjadi aliran gen (Keller dan Waller, 2002).

Tabel 2. Jumlah haplotipe, frekuensi haplotipe dan keragaman nukleotida intron satu gen rhodopsin

Sampel	N	Nhap	Frekuensi haplotipe							(π)
			A	B	C	D	E	F	G	
Coaastal nesting grounds	8	3	0,625	•	0,12 5	•	0,25	•	•	0,037
In land nesting grounds	7	6	0,143	0,286	0,14 3	0,143	•	0,14 3	0,14 3	0.013

Kondisi ini berbeda dengan individu sampel asal pantai yang memiliki jumlah haplotipe dan diversitas nukleotide yang rendah, rendahnya diversitas nukleotide dan jumlah haplotipe mengindikasikan tingkat perkawinan silang antar individu yang memiliki haplotipe berbeda sangat rendah sebagai akibat adanya isolasi geografis. Populasi-populasi yang terisolasi secara geografis konsekuensinya dalam jangka waktu tertentu akan memiliki pola genetik yang terpisah (Zhang *et al.*, 2002). Meskipun pada saat ini mekanisme pengaruh diversitas genetik terhadap kemampuan reproduksi individu pada populasi alamiah belum sepenuhnya diketahui, strategi konservasi yang paling aman adalah tetap mempertahankan heterosigositas yang tinggi.

Aplikasi sifat genetik dalam konservasi merupakan ilmu yang masih muda dan masih perlu terus dikembangkan. Langkah awal dalam program konservasi adalah mengidentifikasi unit-unit konservasi, dalam rangka membantu membuat suatu kebijakan pelestarian satwa langka dengan tetap memelihara keragaman genetik yang ada.

KESIMPULAN

Hasil analisis diversitas genetik burung maleo dengan intron satu gen rhodopsin teridentifikasi 7 haplotipe dengan diversitas nukleotida sebesar 0,0037- 0,013.

Saran: perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan penanda molekular yang mempunyai daerah variabel tinggi dan jumlah sampel yang lebih banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2002. *IUCN Red List of Threatened Species*. Downloaded on 22 October 2005
- Ball, R.M. JR & J.C. Avise, 1992. Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian populations and evolutionary significance of subspecies. *Auk*, **109**: 626-636.
- Birks S.M & S.V. Edwards. 2002. A phylogeny of the Megapodes (Aves: Megapodiidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution*. **23**, 408-421
- Buchart, S.H.M, 1998. *The status of maleo in Western Central Sulawesi*. Unpublished Preliminary report
- Christy, M.J., S.M. Lentey, 2001. *Maleo Project-Phase 1 North Sulawesi, Indonesia, Preliminary Field Reconnaissance*, May 2001. WCS technical report for PKA (Indonesian Department of forestry)
- Chun, J. 1999. *Phylogenetic Editor (Phydit)*. Windows Editor
- Fujita, M.K., T.N. Engstrom., D.E. Starkey & H.B. Shaffer. 2004. Turtle phylogeny insights from a novel nuclear intron. *Molecular Phylogenetics and evolution*. **31**, 1031-1040.
- Frith, H.J. 1956. Breeding habits of the family Megapodiidae. *Ibis*. **98**, 620-640

- Groth, J.G. & G.F. Barrowclough, 1999. Basal divergences in birds and the Phylogenetic utility of the nuclear RAG-1 gene. *Molecular. Phylogenetic. Evolution* **5**, 368-382.
- Jones. D., & S. Birks. 1992. Megapodes: Recent ideas on origins adaptations and reproduction. *Trends Ecology. Evolution* **7**, 88-91.
- Jones, D., R.W.R.J. Dekker., C.S. Roselaar. 1995. *The Megapodes* Oxford University Press, Oxford.
- Keller, F.L & M.D. Waller, 2002. Inbreeding Effects in Wild Populations. *Ecology and Evolution*. **17**: 230-241
- Kumar, B., K. Tamura., I.B. Jakobsen., M. Nei. 2001. MEGA2. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Kinnaird, M.F. 1995. *North Sulawesi: a natural history guide*. WCS/Wallaea Development Institute, Jakarta Indonesia.
- Lee, R.J., J. Riley., R. Merrill. 2001. *Biodiversity and Conservation of North Sulawesi, Indonesia* NRM. Jakarta.
- Lovette, I.J., E. Bermingham, 2000. Variation in songbirds: Molecular Evolution, Phylogenetic implications, and comparisons with mitochondrial differentiation. *Molecular. Biology. Evolution*. **17**, 1569-1577.
- Okano, T., D. Kojima., Y. Fukuda., Shichida., T. Yoshizawa. 1992. Primary structures of chicken cone visual pigments : Vertebrate rhodopsins have evolved out of cone visual pigments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 5932-5936.
- Prychitko, T.M & W.S. Moore. 1997. The utility of DNA sequences of an intron from the β -Fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular. Phylogenetic. Evolution*. **8**, 193-204.
- Rozas, J & R. Rozas. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, **15**:174-175
- Sembiring, L. 2002. *Sistematika Molekular*, petunjuk Praktikum. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta.
- Slade, R.W., C.Moritz; A. Heidemen. 1994. Multiple nuclear gene phylogenies : Application to pinnipeds and comparison with a mitochondrial DNA gene phylogeny. *Molecular Biology. Evolution* **11**, 341-356.
- Takao, M., A. Yasiu., F. Tokunaga. 1988. Isolation and sequence determination of the chicken rhodopsin gene. *Vision Res*. **28**, 471-480.
- Thomson, J.D., T.J.Gibson., F. Flewiak., F. Jeanmougin., D.G.Higgins. 1997. The ClustalX Windows Interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic acid*.
- Weising, K., H. Nybon., K. Wolf., W. Meyer. 1994. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press. Florida, USA.
- Zang *et al.*, 2002. Genetic Diversity and Conservation of Endangered Animal Species. *Pure. Appl. Chem* **74**: 575-584.