

Kajian Marka Genetik Gen RDP1 pada Burung Gosong Filipina (*Megapodius cumingii*) asal Pulau Kabetan Kabupaten Tolitoli Sulawesi Tengah

Akram, I Made Budiarsa*, Samsurizal M Suleman & I Nengah Kundera

Program Studi Pendidikan Biologi, Universitas Tadulako, Indonesia

Received: 11 November 2024; Accepted: 15 Desember 2024; Published: 20 Desember 2024

ABSTRAK

Burung gosong Filipina (*Megapodius cumingii*) merupakan anggota dari famili megapodiidae yang saat ini dikelompokkan dalam status *least concern*. Jumlah populasi yang terbatas dan ancaman kepunahan membuat burung ini perlu mendapatkan perhatian khusus. Untuk mendukung tindakan konservasi, diperlukan informasi genetik satwa di habitat alami. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeskripsikan karakter genetik burung gosong Filipina berdasarkan gen RDP1. Sampel darah diperoleh dari Pulau Kabetan, isolasi DNA genom menggunakan protokol Qiaamp DNA Blood Mini Kit, amplifikasi menggunakan protokol Takara Ex Taq dan sekuensing mengikuti protokol BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit instrument AB1 PRISM 3100 Avant Genetic Analyzers. Alignment menggunakan clustal W yang ada pada MEGA 10. Hasil penelitian menunjukkan kondisi optimal amplifikasi terjadi pada suhu pre-denaturasi 950 C selama 5 menit, denaturasi di suhu 940C selama 35 detik, annealing di suhu 520C, ekstensi di suhu 720C selama 30 detik dan final ekstensi di suhu 720 C selama 7 menit. Komposisi basa kaya pasangan G-C dengan frekuensi T(U) 25,5%, C 25,6 %, A 19,3%, dan G 29,7 %. Analisis mutasi genetik menunjukkan terjadi mutasi transversasi pada basa ke 569.

Kata kunci: Gosong Filipina, Intron, Megapodius, RDP1

Study of Genetic Markers of RDP1 Gene in Philippine Scrubfowl Birds (*Megapodius cumingii*) from Kabetan Island Tolitoli Regency Central Sulawesi

ABSTRACT

The Philippine Scrubfowl bird (*Megapodius cumingii*) is a member of the megapodiidae family which is currently classified as least concern. The limited population and the threat of extinction make this bird need special attention. To support conservation actions, genetic information on animals in their natural habitat is needed. The purpose of this study is to describe the genetic characteristics of Philippine Scrubfowl bird based on the RDP1 gene. Blood samples were obtained from Kabetan Island, genomic DNA isolation using the Qiaamp DNA Blood Mini Kit protocol, amplification using the Takara Ex Taq protocol and sequencing following the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit protocol instrument AB1 PRISM 3100 Avant Genetic Analyzers. Alignment uses the clustal W that is present in MEGA 10. The results showed that the optimal conditions of amplification occurred at a pre-denaturation temperature of 950 C for 5 minutes, denaturation at a temperature of 940C for 35 seconds, annealing at a temperature of 520C, extension at 720C for 30 seconds and final extension at a temperature of 720 C for 7 minutes. The rich base composition of the G-C pair with a frequency of T(U) 25.5%, C 25.6%, A 19.3%, and G 29.7%. Analysis of genetic mutation showed that there was a transversion mutation at base 569.

Keywords: Philippine Scrubfowl, Intron, Megapodius, RDP1

Copyright © 2024 Akram, I Made Budiarsa, Samsurizal M Suleman & I Nengah Kundera

OPEN ACCESS 

Corresponding author: *I Made Budiarsa Program Studi Pendidikan Biologi, Universitas Tadulako, Indonesia. Email: budiarsa.bio@gmail.com

PENDAHULUAN

Burung gosong Filipina (*Megapodius cumingi*) merupakan jenis burung yang menggunakan panas lingkungan untuk mengerami telurnya (Jones dan Birks, 1992; Roselaar, 1995; Sinclair et al 2002). Menurut Harris et al (2014) dan IUCN (2016), burung ini memiliki populasi terbatas yang penyebarannya meliputi Malaysia, Filipina dan Indonesia. Salah satu wilayah penyebarannya yang ada di Indonesia adalah di Pulau Kabetan Kabupaten Tolitoli Provinsi Sulawesi Tengah.

Penyesuaian diri yang khas dan strategi inkubasi yang unik membuat karakter genetik burung ini sangat menarik untuk dikaji. Karakter genetik merupakan kunci untuk memahami mekanisme evolusi dan proses biologis organisme sehingga dibutuhkan dalam konservasi fauna (Geffen et al 2007). Untuk melengkapi data ini, penggunaan gen nukleus sebagai marka genetik merupakan salah satu pilihan yang tepat (Kimball et al 2008). Gen nukleus mengandung informasi yang diwariskan dari induk jantan dan betina sehingga memiliki keunggulan dalam analisis tentang genetika populasi (Zhang dan Hewitt, 2003).

Intron telah digunakan sebagai marka genetik dan dipadukan bersama gen mitokondria dalam analisis filogenetik (Harris et al 2014; Johansson et al 2018). Intron memiliki beberapa keunggulan yaitu terdapat dalam genom nukleus dengan jumlah yang melimpah, ukuran yang memudahkan, lebih efisien untuk diamplifikasi menggunakan PCR dan memiliki kecepatan evolusi yang lebih tinggi dibandingkan ekson (Prychiko dan Moore 1997; Birks dan Edwards 2002; Chojnowsky et al 2008). Tingkat evolusi intron dapat diketahui dari pola perubahan struktur basa akibat adanya mutasi (Johnson dan Clayton, 2000). Pola ini sangat penting untuk diketahui karena menyediakan informasi yang mumpuni untuk karakterisasi spesies (Prychiko dan Moore, 2000; Lynch, 2002).

Sekuen intron satu gen rhodopsin (RDP1) adalah salah satu gen yang telah digunakan sebagai marka molekuler khususnya pada megapoda (Birks dan Edwards, 2002; Budiarsa et al 2009; Budiarsa 2011; Harris et al 2014;). Kurangnya homoplasia dan substitusi bias serta laju heterogenitas seluruh situs ditemui di gen ini

(Birks dan Edwards, 2002). Signal yang dimiliki oleh gen RDP1 cukup kuat untuk mengungkap karakter genetik megapoda di Indonesia (Budiarsa, 2009; Budiarsa 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan karakter genetik burung gosong Filipina yang meliputi kondisi amplifikasi, komposisi basa dan keragaman genetik menggunakan gen RDP1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat melengkapi data yang sudah ada dan dapat dijadikan landasan dalam tindakan konservasi.

METODE

Pengambilan sampel

Sampel darah diperoleh dari Habitat alami burung gosong Filipina yaitu di Pulau Kabetan Kabupaten Tolitoli Provinsi Sulawesi Tengah. Untuk menjaga kualitasnya sampel darah disimpan dalam kotak es selama proses di lapangan.

Isolasi DNA

Isolasi DNA Genom menggunakan protokol *Qiaamp DNA Blood Mini Kit* dan hasil akhir adalah DNA template. DNA template kemudian di visualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,2% untuk melihat kualitasnya.

Ampifikasi

Amplifikasi bertujuan untuk mereplikasi sekuen gen target menggunakan PCR dan hasil akhirnya adalah ampikon. Dalam penelitian ini protokol yang digunakan adalah PCR Kit (*Takara Ex Taq TM*). Penggunaan primer sangat penting agar gen target tereplikasi secara sempurna. Olehnya itu khusus untuk gen RDP1 digunakan primer dari Birks dan Edwards, (2002) yaitu RDP1.U1 (*forward*) (5-GTAACAGGGTGCTACATGA-3 dan R P1 L1 (*reverse*) (5-ACAGACACCACATA TCGTT-3. Untuk melihat kualitas ampikon, visualisasi dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,2%

Sekuensing

Purifikasi dilakukan agar diperoleh ampikon murni dan protokol yang digunakan adalah *Qiaquick PCR Purification Kit*. Setelah itu dilakukan Sekuensing untuk menerjemahkan urutan basa agar dapat dianalisis. Sekuensing

menggunakan protokol *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* dengan instrument *ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzers*.

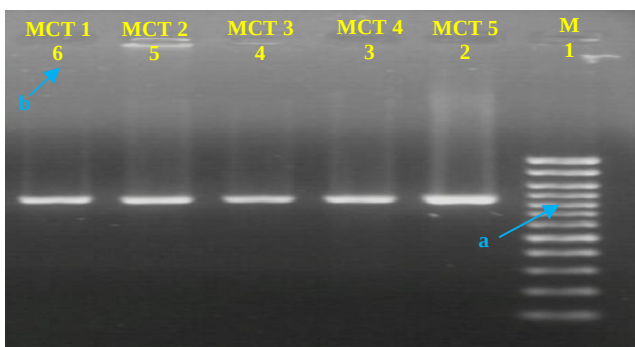
Analisis Data Hasil Sekuensing

Sekuen dianalisis menggunakan software MEGA 10 (Kumar et al., 2018) dengan alignment Clustal W. Digunakan Sekuen gen RDP1 burung gosong Filipina dari Harris et al (2014) sebagai pembandingan yang diperoleh di *GenBank* NCBI. kode akses sekuen pembandingan ini adalah UWBM 91271 dan berasal dari Cagar Alam Tangkoko Dua Saudara Sulawesi Utara.

HASIL

Kondisi Amplifikasi gen RDP1

Kondisi amplifikasi optimal gen RDP1 adalah *pre* denaturasi selama 5 menit pada suhu 95⁰ C, denaturasi selama 35 detik pada suhu 94⁰C, *annealing* selama 30 detik pada suhu 52⁰C, ekstensi selama 30 detik pada suhu 72⁰C dan final ekstensi selama 7 menit pada suhu 72⁰ C. Semua proses dilakukan sebanyak 35 siklus. Visualisasi ampikon gen RDP1 hasil elektroforesis gel agarosa 1,2% memperlihatkan pembentukan pita tunggal yang padat di kisaran 800 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Visualisasi ampikon gen RDP1. Ket: a: Lajur 1 (M) marker 800 bp (Promega), b: lajur 6 (MCT1) *Megapodius cumingi* kabetan.

Komposisi basa gen RDP1

Gen RDP1 burung gosong Filipina asal Pulau Kabetan memiliki Panjang 758 bp. Frekuensi basa adalah A 19,3%, T 25,5%, G 29,7% dan C 25,6% yang kaya dengan pasangan G-C.

Mutasi gen RDP1

Hasil alignment menunjukkan terjadinya terjadi mutasi transversi pada basa ke 569 yang dapat dilihat pada gambar 2.

```

555555555 555555555 555555555 555555555 444444444 444444444 444444444 444444444
666666666 777777777 888888888 999999999 000000001 111111112 222222223 333333334
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#Megapodius_cumingii_Kabetan CAGCCTGGGGG TACACATGCG ACCGAGAGAA TGGCTCTTCA TGGCTTCCGCG CTGACAGCG CCGTGGGCTT TGGTGGGCTC
#Megapodius_cumingii_UWBM_91271 .....A.....

```

Gambar 2. Hasil alignment gen RDP1 burung gosong Filipina asal pulau Kabetan dan sekuen pambanding dari NCBI

PEMBAHASAN

Kondisi Amplifikasi gen RDP1

Visualisasi elektroforesis gen RDP1 burung gosong Filipina mengindikasikan bahwa amplifikasi berada pada kondisi yang optimal. Kondisi amplifikasi sangat dipengaruhi oleh suhu yang digunakan dalam proses annealing. Suhu yang optimal akan membuat primer melekat pada nukleotida yang tepat sehingga DNA template akan teramplifikasi dalam jumlah banyak dan memiliki spesifitas yang tinggi (Fatchiyah, 2011; Lorenz, 2012). Penggunaan suhu 52⁰ C pada proses annealing membuktikan bahwa suhu tersebut adalah suhu yang optimal sehingga menghasilkan ampikon dengan kualitas yang sangat baik. Keberhasilan proses annealing juga menjadi indikator bahwa reagen yang di gunakan memiliki komposisi dan konsentrasi yang sangat tepat.

Hasil amplifikasi penelitian ini sesuai dengan penelitian dari Budiarsa (2011), dan Budiarsa dkk. (2009), yaitu amplifikasi gen RDP1 pada megapoda dengan suhu annealing sebesar 52⁰ C dan panjang sekuen di kisaran 800 bp pada visualisasi hasil elektroforesis. Namun hasil ini berbeda dengan penggunaan suhu annealing dalam penelitian Birks & Edwards (2002), yang menggunakan suhu sebesar 55⁰ C. Uniknya semua proses amplifikasi yang dilakukan di masing masing penelitian yang menggunakan suhu annealing berbeda menghasilkan panjang sekuen dengan kualitas yang sama baiknya yaitu tetap beradadalam kisaran 800 bp. Fakta ini dapat terjadi disebabkan dari nilai melting temperature (*T_m*) yang berbeda beda pada masing masing DNA template sampel. Suhu annealing yang paling baik biasanya 5⁰ C dibawah *T_m* dan dapat dioptimasi berdasarkan standar tersebut (Lorenz, 2012). Nilai *T_m* sangat dipengaruhi oleh komponen buffer, konsentrasi primer dan DNA

template yang digunakan (Fatchiyah, 2011). Oleh karena itu nilai suhu optimum yang sedikit berbeda untuk sampel dimasing-masing penelitian dapat menghasilkan amplikon dengan kualitas yang sama baiknya.

Komposisi basa gen RDP1

Data komposisi basa gen RDP1 burung gosong Filipina asal Pulau Kabetan menunjukkan bahwa gen ini memiliki Panjang 758 bp dengan frekuensi basa G+C yang lebih tinggi dibandingkan dengan basa A+T dan kaya akan basa guanin. Ini sama dengan hasil yang diperoleh oleh Harris et al. (2014) Budiarsa (2011), Budiarsa et al. (2009) serta Birks dan Edwards (2002) untuk RDP1 megapoda. Meski demikian, proporsi basa pada masing masing spesies tetap memiliki nilai frekuensi spesifik yang bervariasi. Gen dengan frekuensi basa G+C yang tinggi cenderung lebih stabil dan memiliki nilai densitas apung yang lebih tinggi dibandingkan gen yang memiliki frekuensi basa A+T yang tinggi karena pasangan basa G+C memiliki ikatan hidrogen rangkap tiga sedangkan pasangan basa A+T hanya rangkap dua (Nelson, 2021). Lebih lanjut menurut Nelson (2021), pasangan basa G+C juga memiliki suhu denaturasi dan titik lebur yang lebih tinggi dibanding pasangan A+T karena membutuhkan lebih banyak energi untuk menguraikannya.

Mutasi gen RDP1

Dari hasil analisis mutasi genetik, hanya satu situs spesifik yang mengalami mutasi yaitu basa ke 569 dan mengindikasikan bahwa burung gosong Filipina asal pulau kabetan identik dengan data burung gosong Filipina dari Sulawesi Utara. Tidak ditemukannya mutasi pada situs lain, dapat disebabkan karena jumlah sampel sangat terbatas. Penelitian sebelumnya yaitu Birks dan Edwards (2002) melaporkan adanya mutasi indel, transisi dan transversi pada gen ini. lebih lanjut Budiarsa (2011) juga menemukan indel pada gen RDP1 megapoda indonesia. Mutasi yang terjadi pada gen menjadi kunci dalam analisis filogenetik megapoda terutama untuk konstruksi *gen tree* hingga *species tree* (Harris et al 2014). Untuk memperoleh data yang maksimal dan komprehensif diperlukan penelitian lanjutan dengan melibatkan jumlah individu dan populasi di masing masing wilayah penyebaran burung ini

serta penggunaan lebih banyak marka genetik agar semakin banyak data yang akurat dan dapat digunakan sebagai landasan untuk tindakan konservasi.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Kondisi amplifikasi yang optimal untuk gen RDP1 burung gosong Filipina asal pulau kabetan adalah *pre* denaturasi selama 5 menit di suhu 95⁰ C, denaturasi selama 35 detik di suhu 94⁰C, *annealing* selama 30 detik di suhu 52⁰C, ekstensi selama 30 detik di suhu 72⁰C dan final ekstensi selama 7 menit pada suhu 72⁰ C.
2. Komposisi basa gen RDP1 burung gosong Filipina asal pulau Kabetan adalah A 19,3%, T 25,5%, G 29,7% dan C 25,6% yang kaya pasangan G-C.
3. Analisis mutasi genetik menunjukkan terjadi mutasi transversi pada basa ke 569

DAFTAR PUSTAKA

- IUCN (2016). Megapodius cumingii. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22678588A92780215. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22678588A92780215.en>.
- Birks SM, Edwards SV. 2002. A phylogeny of the Megapodes (Aves: Megapodiidae) based on nuclear & mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetic & Evolution. 23: 408-421.
- Budiarsa IM, Artama IWT, Sembiring L, Situmorang J. 2009. Diversitas Genetik Burung Maleo (*Macrocephalon maleo*) berdasarkan Intron Satu gen Rhodopsin Nukleus (RDP1). Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA. Jogjakarta.
- Budiarsa IM. (2011). Inseri dan Delesi Intron Satu Gen Rhodopsin (RDP1) Nukleus Kelompok Burung Megapoda (Aves megapodiidae) Indonesia Jurnal Biologi Edukasi 3: 1-6.

- Chojnowski JL, Kimball RT, Braun EL. (2008). Introns Outperform Exons in Analyses of Basal Avian Phylogeny Using Clathrin Heavy Chain Genes. *Gene* 410: 89-96.
- Fatchiyah, Arumingtyas EL, Widyarti S, Rahayu S. (2011). *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Geffen E, Luikart G, Waples RS. (2007). Impacts of modern molecular genetic techniques on conservation biology. *Key topics in conservation biology*. 46-63.
- Harris RB, Birks MS, Leache AD. (2014). Incubator birds: biogeographical origins & evolution of underground nesting in megapodes (Galliformes: Megapodiidae). *Journal of Biogeography*. 41: 2045-2056.
- Johhansen US, Irestedt M, Qu Y, Erickson PGP. (2018). Phylogenetic relationships of rollers (Coraciidae) based on complete mitochondrial genomes and fifteen nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 126: 17-22.
- Johnson KP, Clayton DH. (2000). Nuclear and Mitochondrial Genes Contain Similar Phylogenetic Signal for Pigeons and Doves (Aves: Columbiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14: 141-151.
- Jones D, Birks S. (1992). Megapodes: Recent Ideas on Origins Adaptations & Reproduction. *Tree*. 7: 88-91.
- Kimball RT, Braun EL, Barker FK, Rauri CKB, Braun MJ, Chojnowski JL, Hackett SJ, Han KL, Harsman J, Heimer TV, Holznagel W, Huddleston CJ, Marks B.D, Kathleen JM, Moore WS, Reddy S, Sheldon FH, Smith JV, Witt CC, Yuri T. (2008). A well-tested set of primers to amplify regions spread across the avian genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 50: 654-660.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Lynch M. (2002). Intron evolution as a population-genetic process. *PNAS*. 99: 6118-61123.
- Lorenz TC. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting & Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 63: 1-15.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. & Lehninger, A.L., 2021. *Lehninger principles of biochemistry*, New York: WH Freeman.
- Prychitko TM, Moore, WS. (1997). The Utility of DNA Sequences of an Intron from the β -Fibrinogen Gene in Phylogenetic Analysis of Woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics & Evolution*. 8: 193-204.
- Roselaar CS. (1994). Systematic notes on Megapodiidae (Aves: Galliformes) including the description of five new subspecies. *Bulletin Zoologisch Museum*. 14: 19-36.
- Sinclair JR, Brian TGO, Kinnaird MF. (2002). The Selection of Incubation Sites by The Philliphine Megapode, *Megapodius cumingii* in North Sulawesi Indonesia. *Emu*. 102: 151-158.
- Zhang DX, Hewitt GM. (2003). Nuclear DNA analysis in genetic studies of populations; practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 12: 563-584.