



ANALISIS SEKUENS SEBAGIAN GEN *Cytochrom b (cyt b)* AYAM HUTAN MERAH (*Gallus sp.*) MINAHASA

Zeth M. Pandi, Jantje W. Ngangi, dan Rantje L. Worang
Biologi FMIPA Universitas Negeri Manado
Email: zethxcv@gmail.com

ABSTRAK. Ayam (*Gallus sp.*) adalah jenis unggas yang memiliki sebaran genetik yang luas. Berdasarkan observasi yang dilakukan di beberapa wilayah kabupaten Minahasa, hampir setiap keluarga membiakan ayam. Pemuliaan suatu spesies dapat berakibat punahnya beberapa jenis sifat genetik yang dianggap hal yang tidak dibutuhkan. Padahal, sumber genetik utama dari seluruh varietas ayam berasal dari varietas ayam hutan yang hanya dapat ditemukan di hutan yang tersebar di seluruh wilayah Indonesia. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Oktober 2016. Pekerjaan laboratorium dilaksanakan di laboratorium Biologi FMIPA Unima dan laboratorium *FirstBase* Malaysia. Sampel merupakan jaringan otot dada ayam liar di wilayah Minahasa. Sekuens sebagian gen *cyt b* sampel menunjukkan profil yang spesifik. Berdasarkan sebagian gen *cyt b* ayam hutan merah Minahasa berkerabat dekat dengan *Gallus gallus* (FM205718.1; FM205716.1; DQ512917.1) dan terpisah dengan kelompok subspecies lainnya. Hasil penyelarasan mengungkapkan ada 3 situs polimorfik. Posisi situs polimorfik adalah nomor 216, 291 dan 294. Pada situs nomor 216 basa A→G, situs nomor 291 basa A→G, dan situs nomor 294 basa A→C, mengalami substitusi transvers. Substitusi teramati terletak pada basa protein ketiga pada kodon.

Kata kunci: *Cytochrom b (cyt b)*, Varietas, Laboratorium *FirstBase*, Polimorfik, Transversi, Basa Protein, Kodon

ABSTRACT. Chickens (*Gallus sp.*) is a sort of bird that has widely genetic distributions. Based on observation that was been done in some territories of Minahasa district, almost each family rearing chickens. Breeding certain species can causing some kind of genetic characters that considered as useless thing to be extinct. Besides, primary genetic source of all chicken varieties originated from fowl varieties that only can be found in forest that was spread on Indonesian territories. This research was been held at maret until october 2016. Laboratory assignment was been held at FMIPA Unima's biology laboratory and *FirstBase* laboratory, Malaysia. Sample are chest muscle tissue of fowl in Minahasa's territories. Sequences a part of sample's *cyt b* gene shows specific profile. based on a part of *cyt b* gene, Minahasan red fowl has closely related with *Gallus gallus* (FM205718.1; FM205716.1; DQ512917.1) and separated with other subspecies group. Alignment result revealed there is 3 polymorphic sites. Position of polymorphic sites is number 216th, 291th and 294th. At site number 216th base A→G, site number 291th base A→G, and site number 294th base A→C, have transversion substituted. Observed substitutions located on third protein base in codon.

Keywords: *Cytochrom b (cyt b)*, variety, *FirstBase* laboratory, Polymorphic, Transversion, Protein Base, Codon.

PENDAHULUAN

Ayam (*Gallus sp.*) adalah jenis unggas yang memiliki sebaran genetik yang luas. Hal ini dapat diamati lewat telah ditemukannya beragam jenis varietas ayam yang teridentifikasi. Berdasarkan observasi yang dilakukan oleh peneliti di beberapa wilayah kabupaten minahasa hampir setiap keluarga membudidayakan ayam. Selain itu, pembudidayaan ayam dilakukan tidak hanya untuk memenuhi kebutuhan protein, tetapi lebih menyangkut hobi dan budaya lokal. Pemuliaan keragaman varietas ayam juga semakin berkembang disebabkan kebutuhan masyarakat yang tidak hanya memanfaatkan ayam untuk diambil dagingnya. Pengembangan keragaman genetik untuk mendapatkan varietas ayam terbaik semakin marak dilakukan baik dalam skala industri maupun dilakukan secara konvensional.

Pengembangan dan pemuliaan varietas tidak selamanya berdampak positif. Pemuliaan suatu spesies dapat berakibat punahnya beberapa jenis sifat genetik yang dianggap tidak dibutuhkan. Padahal, sumber genetik utama dari seluruh varietas ayam berasal dari jenis varietas ayam hutan yang hanya dapat ditemukan di habitat hutan yang tersebar diseluruh wilayah Indonesia.

Susunan genetik ayam domestik diketahui berasal dari ayam hutan merah tersebar di Asia tenggara yaitu: Sumatera, Jawa sampai ke Bali, Sulawesi, Filipina, Malaysia, India, Pakistan, Thailand. Teori ini diperkuat dengan temuan arkeologis di lembah Indus, Hebei China, yang diperkirakan hidup seja 5400 BC (West dan Zhou, 1988), hasil penelitian molekuler berupa sekuens *region control* mitokondria (Fumihito *et al.* 1996) dan data mikrosatelit DNA dari berbagai jenis ayam yang ada.

Lokasi geografis Minahasa secara umum merupakan daerah daratan tinggi dengan area hutan yang masih dominan. Populasi ayam hutan merah terus mengalami terus menurun akibat terus diburu oleh masyarakat sekitar maupun termangsa oleh predator alami. Saat

ini, populasi beberapa spesies liar yang berada di wilayah Sulawesi terancam punah dari habitatnya. Sebagian besar dari spesies ini merupakan spesies hewan endemik.

Karakteristik dan keragaman populasi perlu untuk diketahui dengan pasti agar upaya melakukan konservasi akan menjadi optimal. Informasi mengenai keragaman dan kekerabatan suatu populasi dapat diperoleh dan diidentifikasi berdasarkan beberapa faktor yaitu variasi morfologis, tingkah laku dan variasi genetik dari spesies-spesies yang ada. Sumber kode genetik yang digunakan untuk melaksanakan kajian identifikasi keragaman genetik gen DNA mitokondria (mtDNA) (Avice *et al.*, 1979, Brown *et al.*, 1982).

Hasil analisis sekuens gen-gen mtDNA digunakan sebagai dasar untuk pendalaman kajian genetika lainnya, yaitu: a) konservasi gen, berupa manajemen dan identifikasi keragaman genetik, dan b) ekologi gen, berupa penggunaan variasi mtDNA sebagai pedoman untuk kajian demografi dari populasi. Konservasi gen dilakukan berdasarkan informasi filogenetik dan sangat relevan untuk perencanaan riset jangka panjang, sedangkan ekologi gen memanfaatkan frekuensi alel menyediakan informasi untuk manajemen populasi dalam jangka pendek. Perpaduan kajian variasi gen inti dan beberapa penerapan kajian mtDNA dapat menjadi kombinasi metode yang baik guna menentukan strategi penyelamatan satwa baik dalam jangka pendek maupun jangka panjang.

METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret sampai Oktober 2016. Pekerjaan laboratorium akan dilaksanakan di laboratorium molekuler jurusan Biologi FMIPA Unima. Sekuensing gen target dikerjakan oleh laboratorium *FirstBase* Malaysia.

Rancangan

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif sekuensing gen *cytochrom b* (*cyt b*) ayam hutan merah (*Gallus sp.*) Minahasa.

Prosedur Pengambilan sampel

Sampel akan dikumpulkan dari sayatan jaringan otot bagian dada beberapa spesimen ayam liar di Minahasa. Sampel yang diperoleh diberi perlakuan dengan larutan alkohol 95%, dan setiap 4 jam larutan alkohol yang digunakan untuk merendam diganti baru.

Ekstraksi DNA

DNA total diekstraksi menggunakan *innuPREPDNA micro Kit*. Prosedur kerja mengikuti protokol dalam manual kit. Tahapan isolasi DNA total ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Tahapan isolasi DNA standar dalam protokol kit

Tahapan	Protokol pada Kit
Ukuran Sampel	Maksimal 5 mg
Lysis	200 µl TLS dan 20 µl PK vortex 5 detik inkubasi 50°C:30 menit sentrifuge 10.000 x g (12.000 rpm):1 menit
Binding DNA to spin filter	200 µl TBS vortex 15 detik sentrifuge 10.000 x g (12.000 rpm)
Washing	400 µl HS 10.000 x g (12.000 rpm):30 detik 750 µl MS sentrifuge 10.000 x g (12.000 rpm):30 detik
Remove Ethanol	Sentrifuse dengan kec. maksimal: 2 menit
Elution	50 – 100 µl <i>elution buffer</i> inkubasi 1 menit sentrifuge 6.000 x g (8.000 rpm)

Amplifikasi gen target

Amplifikasi gen target dalam PCR menggunakan beberapa pasang primer.

Primer yang akan disiapkan untuk tiap gen target adalah Primer umum untuk gen *cyt b*: L 14841-H15149.

Preparasi komponen dan kondisi PCR untuk mengamplifikasi gen target mengikuti cara seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2. dan Tabel 3. Amplifikasi DNA target dilakukan sebanyak 35 kali.

Tabel 2. Komponen reaksi PCR

Komponen PCR	Konsentrasi	Volume
DNA template	-	2 µL
ddH ₂ O	-	34 µL
PCR Mix	5 X	10 µL
MgCl ₂	1.5 Mm	1.5 µL
dNTPs	20 Mm	1.5 µL
Primer <i>forward</i> (L)	10 pmol µL ⁻¹	2 µL
Primer <i>reverse</i> (H)	10 pmol µL ⁻¹	2 µL
Tag DNA polymerase	4 – 6 U µL ⁻¹	2 µL

Tabel 3. Kondisi reaksi PCR

Banyak siklus	Durasi (menit)	Temperatur °C	Tahap
35	2	95	Denaturasi awal
	0.5	95	Denaturasi
	0.5	52	Annealing
	0.5	72	Elongasi
	1	72	Pasca elongasi

Sekuensing gen target

Amplikon-amplikon gen-gen target akan disequensing di laboratorium FirstBase Malaysia. Pengukuran masing-masing amplikon mtDNA melalui *Gene Quant Pro*, yaitu suatu alat pengukuran konsentrasi DNA yang menggunakan *spectrophotometer* absorban ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Penyelarasan sekuens

Sekuens homolog masing-masing sekuens gen target akan disejajarkan menggunakan program Clustal-W. Potongan sekuens gen target diselaraskan dengan potongan sekuens-sekuens yang berpadanan

dengan sekuens beberapa aksesori *Gallus sp.* yang diambil dari GenBank.

Analisis karakter sekuens

Analisis karakter profil masing-masing sekuens gen target menggunakan piranti lunak MEGA 5.2. Analisis karakter profil sekuens masing-masing gen target meliputi pemeriksaan pola dan laju substitusi, pergantian (*replacement*) asam amino, jarak genetik dan rekonstruksi pohon filogenetik.

HASIL DAN PEMBAHASAN
Pengukuran amplikon mtDNA

Hasil pengukuran masing-masing amplikon mtDNA melalui *Gene Quant Pro*, yaitu suatu alat pengukuran konsentrasi DNA yang menggunakan *spectrophotometer* absorban ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengukuran amplikon gen *cyt b*

Spesimen	Sampel	Rasio $\lambda_{260}/\lambda_{280}$	Konsentrasi
Ayam hutan merah (AH1)	1	1,807	75,8
Ayam hutan merah (AH1)	2	1,877	101
Ayam hutan merah (AH2)	1	1,880	135
Ayam hutan merah (AH2)	2	1,822	87,4

Sekuensing

Panjang sekuens gen target yang teramplifikasi adalah 312 nt. Sekuens sebagian gen *cyt b* secara lengkap tidak disertakan. Proporsi basa-basa sekuens target ditunjukkan pada Tabel 4.2. Proporsi basa-basa secara berturut-turut dimulai dari yang paling besar adalah C=35,3%, A=24,7%, T=23,4% dan G=16,7%. Basa-basa pada sekuens semua sampel gen target tidak menunjukkan kejadian substitusi, dengan demikian gen target tersebut 100% identik.

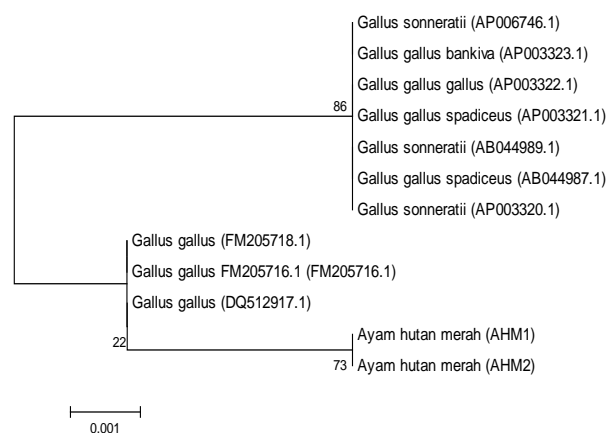
Penyelarasan rangkap sekuens

Potongan sekuens gen target dengan panjang 312nt yang teramati dari 1143nt

keseluruhan gen *cyt b* ayam. Potongan sekuens gen target diselaraskan dengan potongan sekuens-sekuens yang berpadanan dengan sekuens beberapa aksesori *Gallus sp.* yang diambil dari GenBank. Hasil penyelarasan ditunjukkan pada Tabel 4.3. Posisi situs yang polimorfik tersebut adalah nomor 216, 291 dan 294. Pada situs nomor 216 basa A→G, mengalami substitusi transvers. Situs nomor 291 basa A→G, mengalami substitusi transvers. Situs nomor 294 basa A→C, mengalami substitusi transvers. Substitusi yang teramati terletak pada basa di ketiga pada kodon. Banyak *haplotipe* (h) adalah 3 dan diversitas *haplotipe* (Hd) adalah 0,621.

Rekonstruksi pohon filogeni

Berdasarkan estimasi pola substitusi yang terjadi menggunakan *Software MEGA 5.2*, maka model JC (Juke-Cantor) merupakan pola substitusi yang terbaik pada kejadian substitusi pada sekuens gen *cyt b*. Berdasarkan pola substitusi JC, metode *Maximum Likelihood* dan uji *Bootstrapping* 1000x, rekonstruksi pohon filogeni dapat ditunjukkan pada Gambar 1. Topologi pohon menunjukkan pohon tanpa akar, di mana semua ayam hutan merah sampel membentuk klade sendiri dan terpisah dengan spesies dan aksesori lain, namun terhimpun pada klade *Gallus gallus*.



Gambar 1. Rekonstruksi pohon filogeni Ayam hutan merah

Pembahasan

Profil sekuens

Gen *cyt b*, adalah salah satu gen penyandi protein pada mtDNA. Produk gen *cyt b* adalah sitokrom b. Berdasarkan data GenBank, gen DNA mitokondria ayam *Gallus gallus* keseluruhan berjumlah 16784nt. Pada genom mitokondria ayam, posisi gen *cyt b* dengan panjang 1143nt terdapat pada situs nomor 14902 hingga 16044 pada keseluruhan gen DNA mitokondria ayam *Gallus gallus*. Lokasi gen *cyt b* diapit gen ND5 dan gen tRNA-Thr. Lokasi potongan gen yang teramati pada gen *cyt b* berada pada situs nomor 118 hingga 429. Gen yang teramati merupakan bagian gen *cytochrom b (N-terminus)* terletak pada situs nomor 28 hingga 621 pada gen *cyt b*.

Hasil penyelarasan rangkap sekuens sampel ditambah sekuens yang diambil dari GenBank, ditemukan beberapa situs yang polimorfik sebagai akibat dari kejadian substitusi basa, di mana melibatkan kejadian substitusi transisi maupun transversi.

Perbandingan kejadian substitusi transisi yang jauh lebih besar daripada substitusi transversi, sejalan dengan yang dikatakan Brown *et. al.*, (1982) bahwa pada gen-gen mitokondria kejadian substitusi transisi lebih dominan daripada substitusi transversi. Roos *et. al.*, (2008) mengemukakan bahwa biasanya pada mtDNA substitusi transisi lebih dominan daripada substitusi transversi, dan saturasi $T \leftrightarrow C$ akan jauh lebih besar dibanding $A \leftrightarrow G$. Lebih lanjut Roos *et. al.*, (2008), mengemukakan bahwa substitusi nukleotida pada tingkat spesies sebagian besar adalah transisi sedangkan pada tingkat genus adalah transversi.

Brown *et. al.*, (1982) mengatakan bahwa faktor yang bertanggung jawab sehingga tingginya laju mutasi mtDNA melampaui DNA inti antara lain: a) kecenderungan rusaknya sistim replikasi, b) kurang efisiensinya fungsi pengeditan dan c) tingginya tingkat pertukaran (*turnover*).

Filogeni

Domestikasi ayam dari jenis liar berawal di Asia tenggara, kemudian menyebar ke China, dan selanjutnya menyebar sampai ke Eropa (West and Zhou, 1988). Ayam hutan merah memiliki dimorfik seksual mencolok dengan jantan yang memiliki pial berdaging merah, dan tersebar hampir di semua daerah. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik berbasis gen *cyt b* mtDNA, di mana ayam hutan merah Minahasa yang berkelompok dengan *Gallus gallus* (FM205718.1; FM205716.1; DQ512917.1) dan terpisah dengan kelompok subspecies lainnya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Sekuens sebagian gen *cyt b* ayam hutan merah Minahasa menunjukkan profil yang spesifik. Berdasarkan sebagian gen *cyt b* ayam hutan merah Minahasa berkerabat dekat dengan *Gallus gallus* (FM205718.1; FM205716.1; DQ512917.1) dan terpisah dengan kelompok subspecies lainnya.

Hasil penyelarasan mengungkapkan ada 3 situs polimorfik (bervariasi). Posisi situs yang polimorfik tersebut adalah nomor 216, 291 dan 294. Pada situs nomor 216 basa $A \rightarrow G$, mengalami substitusi transversi. Situs nomor 291 basa $A \rightarrow G$, mengalami substitusi transversi. Situs nomor 294 basa $A \rightarrow C$, mengalami substitusi transversi. Substitusi yang teramati terletak pada basa di ketiga pada kodon.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan informasi lebih lengkap mengenai profil sekuens dan sejarah evolusioner ayam hutan merah Minahasa melalui pengungkapan seluruh genom mtDNA atau melalui penggunaan penanda genetik lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

Avise, J. C., R. A. Lansman, & R. O. Shade, (1979). Use endonuclease to Measure Mitochondrial DNA Sequence Relatedness in Natural

- Population. I. Population Structure and Evolution in Genus *Peromyscus*. *Genetics* 92:279-295.
- Brown, W. M., E.M. Prager, A.Wang, & A.C.Wilson, (1982). Mitochondrial DNA sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 18:225-239.
- Fumihito, A., Miyake, T., Takada, M., Shingu, R., Endo, T., *et al.* (1996) Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6792-6795.
- Roos, C., T. Nadler & L. Walter, (2008). Mitochondrial phylogeny, taxonomy and biogeography of silver langur species group (*Trachypithecus cristatus*). *Molecular, Phylogenetics Evolution*. 47:629-636.
- West, B. & Zhou, B. (1988) Did chickens go north? New evidence for domestication. *Journal of Archaeological Science*. 15: 515-33.