

Barcoding Molekuler Burung Nuri Talaud Berdasarkan Gen COI (*Cytochrome Oxidase Subunit I*)

Triana E.C. Bangkulu^{1*}, Revolson Alexius Mege², dan Yermia Samuel Mokosuli²

¹Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Manado

²Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Manado

Kampus Unima di Tondano

*Korespondensi penulis, email: evclra@gmail.com

Diterima 1 Maret 2020/Disetujui 2 Juni 2020

ABSTRACT

Indonesia is known as a high biodiversity country having 60% diversity of fauna in the world, including birds. Some types of birds are endemic can only be found in Indonesia, for example parrots and relatives. Talaud Parrot (*Eos Histrio*) is grouped into a family of twisted beak birds (*Psitticidae*). The study aims to obtain the position of the Talaud parrot species based on the I (COI) Cytochrome Genes and use a descriptive method with laboratory experiments. Total DNA is obtained by the extraction and purifying of the parrot muscle tissue. COI genes are amplified using PCR method and divisualize with automatic electrophoresis. Sequencing is performed at FIRST BASE Singapore. The result of analysis of the COI-Talaud parrot gene sequence using the BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) method showed the Talaud parrot resemblance to the Southern Brown Kiwi.

Keywords: Blast, Talaud parrot, gene COI.

ABSTRAK

Indonesia dikenal sebagai Negara dengan keanekaragaman hayati yang tinggi, memiliki 60% keanekaragaman fauna di dunia, termasuk diantaranya burung. Beberapa jenis burung bersifat endemik hanya dapat ditemukan di Indonesia, sebagai contoh burung nuri dan kerabatnya. Nuri Talaud (*Eos Histrio*) dikelompokkan dalam keluarga burung paruh bengkok (*Psitticidae*). Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan kedudukan spesies Burung Nuri Talaud berdasarkan gen Sitokrom Oksidase I (COI) dan menggunakan metode deskriptif dengan eksperimen laboratorium. DNA total diperoleh dengan ekstraksi dan purifikasi jaringan otot burung nuri. Gen COI diamplifikasi menggunakan metode PCR dan divisualisasi dengan automatic eletroforesis, Sekuensing dilakukan di FIRST BASE Singapura. Hasil analiis sekuen gen COI Burung Nuri Talaud menggunakan metode Blast (Basic Local Aligment Search Tool) menunjukkan Burung Nuri Talaud memiliki kemiripan dengan Southern Brown Kiwi.

Kata kunci: Blast, burung nuri Talaud, gen COI.

PENDALUHUAN

Indonesia dikenal sebagai Negara dengan keanekaragaman hayati yang tinggi, memiliki 60% keanekaragaman fauna di dunia, termasuk diantaranya burung. Beberapa jenis burung bersifat endemik hanya dapat ditemukan di Indonesia, sebagai contoh burung nuri dan kerabatnya. Burung nuri dan kerabatnya digolongkan kedalam kelompok parrot, karena memiliki paruh bengkok. Penyebaran burung-burung tersebut lebih banyak di kawasan timur Indonesia seperti Sulawesi, Flores, Maluku dan Papua.

Sampiri atau Nuri Talaud memiliki nama latin *Eos histrio* dari subfamili Loriinae, merupakan salah satu satwa endemik Pulau Talaud Sulawesi Utara yang statusnya dilindungi dan terancam punah. Menurut Coates dan Bishop (2000), Nuri Talaud (*E. histrio*) memiliki tiga subspecies yaitu *E.h. histrio* (Kepulauan Sangihe), *E.h. talautensis* (Kepulauan Talaud), *E.h. callengeri* (Pulau miangas dan Kepulauan Nanusa). Habitatnya berada di Kepulauan Talaud yaitu meliputi

pulau-pulau karang antara lain : Karakelong, Salebabu dan Kaburuang serta sejumlah kepulauan kecil lainnya. Menurut Lambert (1997), hanya ada satu sub spesies saja yang populasinya mampu bertahan hidup yaitu *E.h. talautensis*.

Berdasar penurunan populasi dan ancaman yang terus terjadi, IUCN memasukkan Nuri Talaud (*Eos histrio*) dalam status konservasi Endangered (Terancam; EN). Sedangkan status perdagangan Internasionalnya adalah CITES Appendix I yang berarti tidak boleh diperdagangkan secara internasional kecuali untuk tujuan khusus (seperti riset). Di Indonesia sendiri, burung endemik langka ini termasuk burung yang dilindungi berdasarkan PP Tahun 1999.

Teknik DNA barcode merupakan sistem yang dirancang untuk melakukan identifikasi secara cepat dan akurat berdasarkan urutan basa nukleotida dari gen penanda pendek yang telah terstandarisasi yaitu gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI). Gen COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) merupakan

salah satu gen penyandi dalam genom mtDNA yang dikenal memiliki banyak kelebihan salah satunya yakni gen COI sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuennya serta banyak bagian yang bersifat conserve (lestari) sehingga dapat digunakan sebagai DNA barcode, yaitu penciri setiap spesies (Hebert et al. 2003).

Keberadaan burung nuri di habitatnya dapat merupakan reservoir bagi kekayaan plasma nutfah, baik sebagai koleksi dan konservasi keanekaragaman hayati maupun untuk materi pemuliaan. Dalam memanfaatkan sekaligus sebagai salah satu upaya pelestarian secara berkelanjutan. Selain itu, informasi ini sangat berguna dan berharga untuk penelitian ekologi, perilaku, dan fisiologi burung nuri dan spesies dari family *Psittacidae* lainnya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan \pm 5 bulan mulai bulan Juli 2018 sampai Desember 2018. Tahap ekstraksi sampai elektroforesis diadakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Biofarmaka FMIPA Universitas Negeri Manado dan sekuensing di laboratorium *First Base* Singapura, dengan menggunakan metode deskriptif. data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu : pinset, scalpel, 2ml *collection tube* QIAGEN, Mikropipet 1-1000 μ L (Eppendorf), *Tips pipet* 1-1000 μ L, *Dry Block Thermostat* (Biosan) *Real-Time PCR (Rotor Gene Q Series)*, *Nano Photometer*, *Automatic Electroforesis QIAxcel Advanced*, *Centrifuge 5430 Eppendorf*.

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel (daging) burung nuri Talaud, Alkohol 70%, *DNeasy® Blood and tissue kit*, *PCR Top Taq Master Mix Kit (QIAGEN)*, Primer *Forwar LCO 1490* dan Primer *Reverse HCO 2198* (Folmer et al, 1994).

Burung nuri talaud di ambil dari Desa Apan, Kecamatan Gemeh, Kabupaten Kepulauan Talaud. Ekstraksi DNA dilakukan mengikuti protokol Purifikasi DNA Total dari daging Hewan (*DNeasy® Blood and Tissue Handbook*, 2006 : 28).

Amplifikasi gen target (COI) dilakukan dengan metode PCR (*Polymorize Chain Reaction*) menggunakan *Real Time PCR – Rotor Gene Q Series*. Sampel yang telah terdapat *pure* DNA, terlebih dahulu ditambah dengan *Top Taq Master MixKit* QIAGEN sebanyak 50 μ l. kemudian sampel dimasukkan dalam *Rotor Gene Q Series Cube*, dan dijalankan dengan *Rotor Gene Q Series Software 2.0.3*.

Produk PCR dilakukan pembaca pita-pita DNA-nya menggunakan *QLAxcel Advanced*.

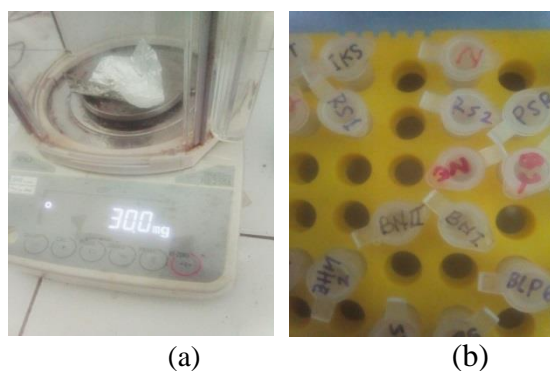
Sampel yang menunjukkan adanya pita DNA pada panjang pasangan basa tertentu siap untuk dilanjutkan dengan proses sekuensing.

Data hasil sekuensing dianalisis dengan software MEGA 6.06 untuk membaca consensus urutan nukleotida. Selanjutnya dilakukan analisis homologi dengan menggunakan metode BLAST (Astchul et al., 1990) dalam software Geneious 9.0.3 (Kearse et al., 2012) yang terhubung secara online Gen Bank NCBI (*National Center Of Biotechnology Information*). Penyejajaran sekuen dilakukan dengan metode CLustalW pada MEGA 6.06 software. Analisis komposisi basa nukleotida, perbedaan basa-basa nukleotida dengan menggunakan model substitusi *General Time Revelsible* dan *Gamma Distributed*, dengan *Bootstrap* 1000 pada MEGA 6.06 software.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Purifikasi Total Burung Nuri

Ekstraksi dan Purifikasi DNA menggunakan jaringan otot paha burung nuri. Sebelum diekstraksi, dipreservasi dengan etanol 70 % selama 24 jam. Sebanyak 30 mg jaringan digunakan untuk ekstraksi DNA menggunakan *kit ekstraksi dan purifikasi DNA Geneiad*. Prosedur ekstraksi DNA berdasarkan portokol kit. Modifikasi dilakukan pada tahap perendaman jaringan dengan enzim proteinase K. Pada protokol kit, untuk jaringan hewan direndam selama 30 s/d 60 menit. Pada penelitian ini jaringan direndam selama 24 jam pada termoblock, suhu 60 °C selama 24 jam. DNA hasil ekstraksi sebanyak 100 μ l.



Gambar 1. (a) Jaringan otot paha burung nuri Talaud sebanyak 30mg, (b) DNA total hasil ekstraksi.

Amplifikasi Gen COI dan Visualisasi Amplicon

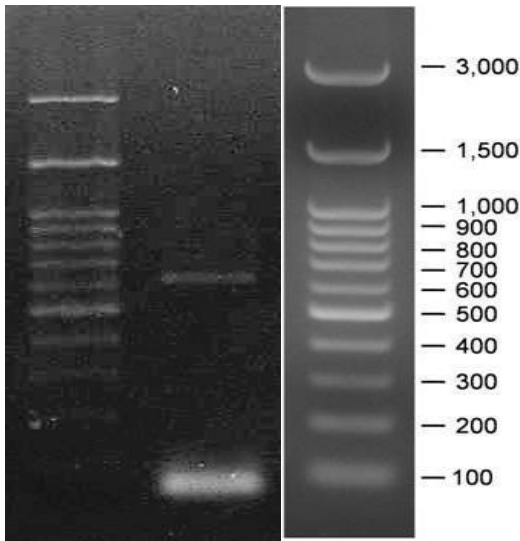
Amplifikasi gen COI dilakukan melalui PCR. PCR dilakukan dalam volume total yaitu 50 μ l. Komponen dari reaksi PCR adalah sebagai berikut: 25 μ l My Tag HS Red Mix, 1 μ l Primer Forward HCO, 1 μ l Primer Reverse LCO, 2 μ l DNA Template, 21 μ l ddH₂O/water one. Kondisi PCR hasil modifikasi yaitu Denaturasi pada suhu 94°C selama 60 detik,

annealing pada suhu 50⁰C selama 30 detik, ekstension pada suhu 72⁰C selama 30 detik, final ekstension pada suhu 72⁰C selama 60 detik.



Gambar 2. Proses amplifikasi DNA burung nuri Talaud.

Setelah melewati proses PCR, dilanjutkan dengan elektroforesis menggunakan kit DNA Screening Qiagen (Qiaxel) dan prosedur kerja disesuaikan dengan protocol kit. Visualisasi menggunakan elektroforesis menunjukkan gen COI pada panjang 650 bp.



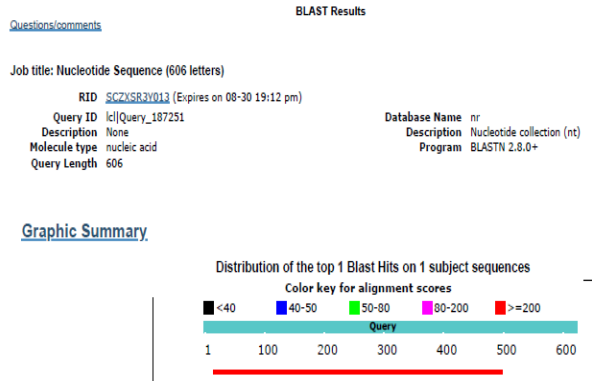
Gambar 3. Visualisasi DNA burung nuri Talaud yang di amplifikasi dengan gen COI.

TAGCATGAGTATGCACGCCGATTTCAGATTCTA
 TTTCTCTTCATCCTGTTGACTTTTACGTTTACCC
 CCTCCAAAGGAAAACAAAAATATCCCCTTA
 AAAATGAAGAATGTGCCTTAAATCAAATACAA
 CTCAGCTACCCGAGTCCCATTTTTGTTGTTGTTG
 TCTCATGTCCATGCATTTTGCCTCTAGTGATATA
 AAAGGAAACCCCTTCAATTTAAAGGTCAAATGG
 GGGCCCTTTGTTTTAACCCCTCGAACCATGACA
 ATGGCATTTCGCATATATTATCTTTAGTCCTTCTG
 CGAATGCTATAGTTGTGGCCCGAGGGGAGGCT
 TGGCCGATTTGCTTGCCTGATTTTTTTAAGAT
 ATAAAAAATACTAAATTTCTGCAGTTAAGTGTG
 CTTGATTGAGTAATATTCTGAAAATCTGATCAA
 TACCAAATCTGATTTTCTTTGATTGATAAGGCA
 CATTACCCGCACTATGAAAGATTATTGCTTTC
 TTTAAAGAAGAAAATAACGATTCACAATTCA
 GGATGGTCTGAACCTTCTGCTGCCTCCATCCTT
 TTCAATCCCCTGCCTTGATTTTTTTGGTCACCCT
 GAAATTTAATT

Gambar 4. Sekuens DNA gen COI burung nuri Talaud

Sekuensing

Hasil sekuensing dari First BASE Singapura diperoleh dari bentuk file *seq* forward dan reverse. Pembacaan dan pengurutan nukleotida dari hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan program Geneious 10.1.3 (Drummond *et.al* 2012).



Gambar 5. Hasil BLAST DNA gen COI burung nuri Talaud.

Uraian hasil BLAST, menghasilkan 1 sekuens termirip. 86,96% similaritas species termirip, diteliti oleh Prifer, Kay., Dannemann, Michael., Kelso, Janet., LeDuc, Diana., Meyer, Matthias. and Castellano, Sergi.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Apteryx australis mantelli genome assembly AptMant0, scaffold scaffold92	538	538	78%	9e-149	86.96%	LK065094.1



Gambar 6. Species Termirip hasil BLAST.

Apteryx australis mantelli genome assembly AptMant0, scaffold scaffold92
 Sequence ID: LK065094.1 Length: 17982995 Number of Matches: 1
 Range 1: 17455211 to 17455692

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
538 bits(291)	9e-149(0)	420/483(87%)	6/483(1%)	Plus/Minus	

Features:

Query 17	GCCGGATT	CAGATTCT	ATTTCT	CCTCAT	CTGTTG	ACCTTT	TACGTTA	CCCCCT	CCCAA	75
Sbjct 17455692	GCCAGATT	CAGATTC	CAATTC	CTTCAT	CAATTT	GCATTT	GGTTT	ACCC	CCCCCT	CCCAA
Query 76	AGGAAAAC	AAAAAAT	ATCCC	CTAAAA	AAATGAA	GAATG	GCCTT	AAAT	CAATACA	CTC
Sbjct 17455632	AGGAAAAG	AAAAAAT	ATCCC	CTAAAA	AAATGAA	GAATG	GCCTT	AAAT	CAATACA	CTC
Query 135	AGCTAC	CCGAGT	CCCA	TTTT	GTGTTG	TGT	CTCAT	GCCAT	GCAAT	GGCCT
Sbjct 17455572	AGCTAC	CCGAGT	CCCA	TTTT	GTGTTG	TGT	CTCAT	GCCAT	GCAAT	GGCCT
Query 194	GATATA	AAAGGA	AAACCC	TTCA	TTTAA	AGGT	CAAT	GGGG	CCCTT	GT
Sbjct 17455512	GATATA	AAAGGA	AAACCC	TTCA	TTTAA	AGGT	CAAT	GGGG	CCCTT	GT
Query 254	GAACCAT	GACAAT	GGCATT	GCATAT	TATAT	CTTT	AGT	CCCTT	GC	GAATG
Sbjct 17455452	GAACCAT	GCAATG	GGTATT	CACATAT	TATAT	CTTT	AGT	CCCTT	GC	GAATG
Query 314	TGGCCG	AGGGG	AGGCT	TGGCCG	ATTT	GGCT	GC	CACT	GA	TTTT
Sbjct 17455392	TAGCCAG	AGGGG	AGGCT	TGGCCG	ATTT	GGCT	GC	CACT	GA	TTTT
Query 374	CTAAAT	TTCTG	CAGTT	AAAGT	GTCT	TGATT	GA	GA	GA	GA
Sbjct 17455333	CTAAAT	TTCTG	CAGTT	AAAGT	GTCT	TGATT	GA	GA	GA	GA
Query 432	CCAAAT	CTGAT	TTCT	TGATT	GATA	AGGC	CAC	AT	CACCC	CACT
Sbjct 17455273	CCAAAT	CTGAT	TTCT	TGATT	GATA	AGGC	CAC	AT	CACCC	CACT
Query 492	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT
Sbjct 17455213	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT

Gambar 7. Penyejajaran sekuens COI nuri Talaud dengan hasil BLAST nukelotida

DNA diekstraksi dari jaringan otot paha burung nuri talaud, menggunakan Genomic DNA Screening Qiagen (Qiaxcel). Sampel dimasukkan ke dalam 1,5 ml microcentrifuge tube menggunakan micropastel untuk menghancurkan jaringan. mtDNA diekstraksi menggunakan Genomic DNA Screening Qiagen (Qiaxcel) Geneaid dengan mengikuti protokol kit.

DNA total yang didapat dari hasil ekstraksi DNA selanjutnya diamplifikasi dengan alat PCR menggunakan TopTag Master Mix dan primer sitokrom oksidase sub unit 1 (CO1). Amplifikasi gen CO1 Burung Nuri Talaud dengan kondisi modifikasi komponen PCR menggunakan MyTaq HS Red Mix Bioline dengan modifikasi kondisi PCR yaitu denaturasi 94°C selama 60 detik, aneling 50°C selama 30 detik, ekstension 72°C selama 30 menit, dan final ekstension 72°C selama 60 detik menghasilkan amplicon yang baik pada proses visualisasi dengan automatic elektroforesis.

Amplicon yang baik ditandai dengan terbentuknya pita tebal hitam pekat pada visualisasi menggunakan automatic elektroforesis, sedangkan yang kurang baik ditandai dengan tidak terbentuknya pita hitam pekat atau pita yang kurang jelas. Amplifikasi gen COI pada sampel menunjukkan hasil amplicon yang bagus dibuktikan dengan munculnya pita pada hasil visualisasi PCR dengan menggunakan automatic elektroforesis.

Penelusuran dalam NCBI (*National Center Of Biotechnology Information*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dengan metode Blast (Basic Local Alignment Search Tool) untuk sekuens COI Burung Nuri Talaud memiliki kemiripan dengan Southern Brown Kiwi (*Apteryx australis*).

KESIMPULAN

Gen CO1 Burung Nuri Talaud diamplifikasi dengan panjang 500 bp. Dan Berdasarkan hasil analisis BLAST ternyata diperoleh kemiripan 86,96% dengan Southern Brown Kiwi (*Apteryx australis*).

DAFTAR PUSTAKA

Alamendah. 2015. Nuri Talaud Burung Endemik Endangered. Klasifikasi Ilmiah Nuri Talaud. 20 Maret 2019.
Anderson S, et al, 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290, 457-465.
Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Herbert PDN. 2006. DNA barcoding of cal bats: spesies identification and

discovery within Guyana. *Molecular Ecology*. Jurnal Compilation 2006. Blackwell Publishing Ltd.
Folmer O, Black M., Hoeh, W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I diverse metazoan invertebrates*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5), 294-299.
Hajbabaei M, deWaard JR, Ivanova NV. 2006. DNA barcodes distinguish spesies of tropi-cal Lepidoptera. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*. 103:968-971.
Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003. *Biological identification through DNA barcodes*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Science* 270.313-322.
Herbert PDN, Penton EH, Burn JM, Jansen DH, Hallwachs W. 2004. Ten spesies in one: DNA barcoding reveals cryptic spesies in Neotropical skipper butterfly *Astraptes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101:14812-14817.
Ivanova NV, deWaard JR, Herbert PDN. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high quality DNA. *Molecular ecology*. Notes doi:10.1111/j.1471-8286.2006.0147x.
Larkin, MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettingan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM., Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
Mitchell JE, Greta LM, Sergion OK, Matthew SL, Andrew PM, George A. 2010. Bar-coding bushmeat: molecular identification of Central African and South American har-vested vertebrates. *Conserv Genet*:11:1389-1404.
NCBI.1988. *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*. [Computer software]. www.ncbi.nlm.nih.gov.
Qiagen. 2006. *DNeasy Blood and Tissue Handbook: DNeasy Blood and Tissue Kit, DNeasy 96 Blood & Tissue Kit*. www.qiagen.com.
Saitou N, Nei M. 1987. *The neighbor-joining method- a new method for reconstructing phylogenetics trees*. [Computer software]. *Mol. Biol. Evol.* 4: 25-406.
Slater GW, Turmel C, Lalande, M, Noolandi J. 1989. DNA gel electrophoresis: effect of field intensity and agarose concentration on band inversion. *Biopolymers*, 28 (10), 1793-1799.

- Somura H, Hori H, Manome Y. 2012. Sequence Analysis of Mitochondrial DNAs of 12SrRNA, 16S rRNA, and Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) Regions in Slow Lorises (Genus *Nycticebus*) May Contribute to Improved Identification of Confiscated Specimens. *International Scholarly Research Network Zoology*.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Herbert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Sciences*. 360:1847-1857.