

**Inseri dan Delesi Intron Satu Gen Rhodopsin (RDP1) Nukleus Kelompok Burung
Megapoda (*Aves megapodiidae*) Indonesia**

**(Insertion and Deletions of Intron A Rhodopsin Gene (RDP1) of Nuclei of Megapodes Bird
Group (*Aves megapodiidae*) Indonesia)**

I Made Budiarsa

Dosen Program Studi Biologi Jurusan P-MIPA FKIP Universitas Tadulako, Palu Sulawesi Tengah
E-mail: budiarsa_imade@yahoo.com

Abstract

Insertion and deletion are information that reflect evolutionary potency of species or population, that nowadays, are central topics in conservation genetics. This research aims to reveal the proportion of insertion and deletion on RDP1 of species Megapodes in Indonesia. Whole blood DNA was extracted according to the protocol of *Qiaquick DNA Blood Mini Kit* (Qiagen), and used as template for PCR (Polymerase Chain Reaction) which was conducted according to the protocol of Takara Ex Taq™ PCR Kit in a Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600. PCR products were purified using a *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen, USA). The sequencing reaction for RDP1 was performed using BigDye v.3.1. *Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, USA) followed the protocol of *ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA). Alignment of RDP1 nucleotide sequences of megapodes and that are obtained from international DNA data base (DDBJ-DNA Data Bank of Japan) with accession number AF 394649 (RDP1) were conducted by using Clustal-X. Characteristics of RDP1 were analyzed by employing the DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) version 3.51 and Program MEGA version 4. The analysis result demonstrated there were insertion and deletion on RDP1 of species of Megapodes in Indonesia, which resulting in a gap of 1-10 bp and was concentrated in nucleotide 407-568. Alignments between species of Megapodes and two species of Galliformes showed more gaps, which were concentrated on nucleotides 480-708.

Key words: *Insertion, Deletion, RDP1, Megapodes*

PENDAHULUAN

Megapoda merupakan kelompok burung yang menggunakan sumber panas lingkungan, bukannya panas tubuh untuk mengerami telurnya (Jones & Birks, 1992; Jones *et al*, 1995). Sumber panas ini meliputi panas bumi, panas matahari dan panas yang dihasilkan dari dekomposisi mikrobial. Perbedaan habitat dan strategi inkubasi telur kelompok burung ini dilaporkan berperan di dalam keragaman jenis kelompok burung Megapoda (Clark, 1964) dan merupakan jalur evolusi kelompok burung tersebut (Birks & Edwards (2002). Strategi inkubasi yang unik dan adaptasi khas burung ini belum pernah dipertanyakan secara serius, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengungkap karakter genetik Megapoda di Indonesia.

Berkembangnya teknik biologi molekular mengakibatkan karakteristik DNA semakin banyak dapat diungkapkan. Terungkapnya sekuen DNA terutama setelah ditemukannya sekuen DNA dengan tingkat

polimorfisme yang tinggi, mendorong penggunaan kajian molekular dalam genetika populasi.

Salah satu penanda molekular yang telah digunakan untuk mempelajari atau menambah pemahaman tentang burung di habitat alami, khususnya spesies burung dari anggota kelompok Megapoda adalah sekuen intron satu dari gen rhodopsin (RDP1) nukleus (Birks dan Edwards, 2002). Rhodopsin adalah pigmen visual yang terdapat di bagian luar sel batang mata hewan (Goldsmith, 1990). Struktur gen rhodopsin yang *conserved* pada kebanyakan vertebrata, membuat gen tersebut berpotensi sebagai gen yang bermanfaat untuk penelitian lain (Okano *et al*, 1992), .

Gen rhodopsin terdiri dari lima ekson dan empat intron (Takao *et al.*, 1988). Gen ini telah banyak digunakan dalam analisis filogenetik dan bermanfaat untuk menentukan taksa burung, karena mempunyai ukuran yang sangat menguntungkan (~1kb), dan kemudahannya diamplifikasi untuk taksa

Galliformes. Kegunaan sejumlah ekson pada analisis molekular pada burung telah diinformasikan oleh Groth dan Barrowclough (1999); Lovette dan Bermingham (2000), bahwa susunan DNA pada gen tersebut berubah sangat lambat untuk perbandingan di tingkat spesies atau genus. Intron nukleus berpotensi mengisi kekurangan tersebut karena berubah relatif cepat dan mudah diamplifikasi (Slade *et al.*, 1994; Prytchitko & Moore, 1997). Sehingga gen tersebut sering dijadikan sebagai instrumen dalam genetika populasi untuk analisis pemisahan geografis dan hubungan filogenetik atau penelusuran organisme (Moore, 1995; Avise, 2006).

Tingkat evolusi gen RDP1 nukleus yang cukup tinggi, akan menghasilkan signal yang cukup untuk mengungkap karakter genetik kelompok burung Megapoda di Indonesia, terutama perubahan yang diakibatkan oleh adanya proses insersi dan delesi. Perubahan susunan DNA yang disebabkan oleh indels saat ini telah digunakan sebagai *genetic marker* untuk mempelajari populasi alami (Vali *et al.*, 2008) dan telah memberikan pemahaman yang cukup mengenai sejarah populasi dan mekanisme evolusi (Boissinot *et al.*, 2000; Shedlock *et al.*, 2004; Konkel *et al.*, 2007). Oleh karena itu mengungkap proporsi indels gen RDP1 kelompok burung Megapoda Indonesia penting dilakukan karena dapat digunakan sebagai *data base* untuk konservasi anggota kelompok Megapoda tertentu bagi kepentingan penelitian atau pertimbangan pemuliaan karakteristik satwa langka yang dilindungi di masa yang akan datang.

Analisis ini dilakukan berdasarkan atas pemikiran bahwa organisme merupakan entitas yang dinamis dan memiliki perbedaan susunan nukleotida dalam satu spesies (satu populasi) dan antar populasi. Weising *et al.* (1994) menyatakan bahwa perbedaan susunan nukleotida tersebut dapat digunakan untuk mempelajari karakter genetik dan hubungan filogenetik suatu organisme.

METODE PENELITIAN

Strategi pendekatan untuk mencapai tujuan penelitian, dilakukan dengan menggunakan data molekular yang dilakukan dalam 4 tahapan yaitu (i) Isolasi DNA total darah, (ii) Amplifikasi DNA dengan teknik PCR, (iii) Sekuensing DNA dan (iv) Analisis data.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *Disposable Syringe* 3cc/ml (Terumo), *Sentrifuge* 4°C (Beckman J6), *Mikrosentrifuge* (Beckman Microfuge 11), *UV Transiluminator*, Tabung PCR 0,5 dan 1,5 mL (Qiagen), *Thermal Cyclor* tipe 9600 (Perkin Elmer), *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA), *Thermal Cyclor Applied Biosystems* tipe 9700 (Perkin Elmer) dan *ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA).

Bahan yang digunakan adalah *Qiamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen), *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA), *Ethidium Bromide*, PCR Kit (Takara Ex Taq™), *QiaQuick PCR Purification Kit* (Qiagen, USA), *BigDye Terminator v.3.1. Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems USA), *Marker DNA* (GeneRay Biotech Co.Ltd), Primer RDP U1 (Oligo@SIGMA Genosys), Primer RDP1 L1 (Oligo@SIGMA Genosys), dan Agarose (Sigma).

Isolasi DNA total

DNA total darah diisolasi dengan mengikuti protokol *Qiamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) kemudian disimpan pada suhu -20°C. DNA diperiksa kualitasnya dengan diimigrasikan pada gel agarose 1,2 % dengan menggunakan buffer 1xTBE (89 mM Tris, 89 mM asam borat dan 2 mM EDTA, pH 8,0). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV (= 300 nm).

Amplifikasi Intron Satu Gen Rhodopsin (RDP1) dengan Teknik PCR

Amplifikasi DNA mengikuti protokol PCR Kit (Takara Ex Taq™), DNA total hasil ekstraksi diamplifikasi di dalam 50µl volume reaksi menggunakan *Perkin-Elmer Thermal Cyclor* 9600 dengan kondisi sebagai berikut: 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, perpanjangan pada suhu 72°C diikuti perpanjangan waktu terakhir selama 7 menit pada suhu 72°C. Primer yang digunakan adalah : U1 (*Forward*)5'GTAACAGGGTGCTACATCG A-3'dan L1(*Reverse*) 5'-ACAGACCACCACATATC GTT-3' (Birks & Edwards, 2002).

Sequencing DNA

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*.

Analisis Data

Sekuen DNA yang diperoleh dari masing-masing individu yang dikaji dan sekuen DNA spesies yang diperoleh dari data bases internasional DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) (Tabel. 1) digunakan sebagai dasar untuk mengetahui proporsi insersi dan delesi gen RDP1 nukleus. Analisis ini menyertakan 20 individu dari 5 spesies anggota kelompok burung Megapoda Indonesia. Sekuen gen RDP1 hasil sekuensing dan dan sekuen yang diperoleh dari *data bases international* (<http://ddbj.nig.ac.jp>) (Birks & Edwards, 2002), diedit dengan program PFE (*Programmer File Editor*). *Multiple alignment* dilakukan dengan menggunakan Program Clustal-X (Thomson *et al.*, 1997). Karakter gen RDP1 dianalisis dengan menggunakan program DnaSP versi 3.51 (Rozas-Rozas, 1999) dan program MEGA versi 4 (Tamura *et al.*, 2007)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen RDP1 nukleus teramplifikasi sebagai fragmen tunggal untuk seluruh anggota populasi burung maleo yang dikaji dengan ukuran sekitar 807bp (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa amplifikasi gen RDP1 nukleus dilakukan pada kondisi optimal sesuai dengan hasil amplifikasi gen RDP1 yang dilaporkan oleh Birks dan

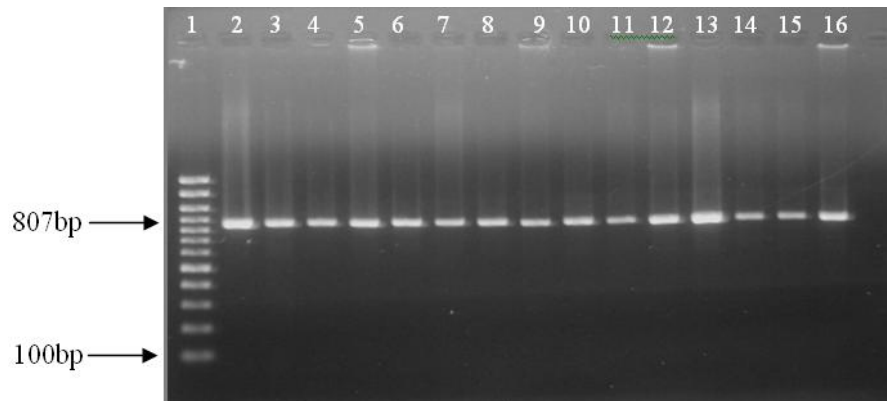
Edwards (2002). Menurut Birks dan Edwards (2002) fragmen ini mencakup 7bp urutan pengapit dari ekson 1 dan 42bp dari ekson 2.

Sekuen gen RDP1 nukleus burung maleo sepanjang 807bp yang dibandingkan dengan sekuen gen RDP1 yang diperoleh dari *data bases* DNA internasional dengan nomer akses AF 394649 menunjukkan tidak ditemukan insersi dan delesi (indels) tetapi ditemukan 12 situs polimorfik.

Hasil *alignment* (*multiple alignment*) sekuen gen RDP1 nukleus burung maleo bersama-sama dengan seluruh spesies kelompok Megapoda menunjukkan adanya insersi dan delesi sehingga mengakibatkan adanya *gap* yang jumlahnya mencapai 1-10bp (Tabel 2). Proporsi indels terbesar terjadi antara basa ke 407-568 (42%) dan terkecil terjadi antara basa ke 1-201(3,4%). Celah (*gap*) sebagai akibat adanya insersi dan delesi (indels) yang ditemukan pada penelitian ini serupa dengan jumlah *gap* yang ditemukan pada intron 5 gen *-fibrinogen nukleus* (- fib5), *intron 2 of the transforming growth factor* (TGFb2) yang dilaporkan oleh Marks *et al.* (2007) dan FIB7 (Johnson & Clayton, 2000; Benz *et al.*, 2006), tetapi lebih kecil dari jumlah *gap* yang dilaporkan Irestedt *et al.* (2002) dan Ericson & Johansen (2003) pada intron 2 mioglobin beberapa spesies burung, yaitu antara 1 sampai 19 nukleotida. Perbedaan tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan gen dan spesies yang digunakan. Besarnya proporsi indels pada penelitian ini mungkin terkait dengan tingkat evolusi gen RDP1 nukleus yang cukup tinggi. Data ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa intron memiliki tingkat evolusi yang lebih tinggi dari ekson nukleus. Untuk memperkuat temuan ini perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan melibatkan seluruh anggota spesies burung kelompok Megapoda atau menggunakan *region* lain dari gen RDP1 nukleus.

Tabel 1. Spesies dan nomer akses sekuen gen RDP1 dari *DNA Data Bank of Japan*

No	Genus/Spesies	Nama Umum	Nomer Akses Gen RDP1
1	Macrocephalon maleo	Maleo	AF 394649
2	Eulipoa wallacei	Moluccan megapode	AF 394650
3	Megapodius tenimberensis	Tanimbar megapode	AF 394659
4	Talegalla fuscirostris	Black-billed talegalla	AF 394648
5	Megapodius freycinet Galliformes	Dusky megapode	AF 394654
6	Pavo cristatus	Common peafowl	AF 394640
7	Numida meleagris	Helmeted guineafowl	AF 394642



Gambar 1. Profil fragmen DNA hasil amplifikasi gen RDP1 nukleus dengan primer RDP. U1 (F) dan RDP.L1(R) pada gel agarosa 1,2 %. Keterangan: Lajur 1. DNA penanda 100 bp (Promega). Lajur 2-16 : satwa yang dikaji.

Tabel 2. Posisi insersi/delesi (indel) gen RDP1 nukleus Megapoda

Jumlah Indels	Posisi Nukleotida
1	60,75, 291,451,557, 600, 629
2	255-256, 408-409
3	35-37, 374-376, 288-290, 648-650
4	453-456, 475-478, 837-840
6	521-526,
7	134-140, 424-430, 563-569, 574-510
8	571-578
9	661-669
10	511-520, 581-590, 601-610, 651-660, 851-860

Hasil *alignment* antara anggota spesies kelompok Megapoda dengan anggota spesies Galliformes ditemukan adanya celah yang lebih banyak dan terkonsentrasi pada nukleotida nomer 480 sampai nomer 708. Karakter ini serupa dengan data yang dilaporkan oleh Birks dan Edwards (2002) yaitu *gap* terkonsentrasi pada nukleotida nomer 500 sampai 700. Sekuen gen RDP1 sepanjang 807 bp pada penelitian ini juga ditemukan 167 situs apomorfik dan 23 situs plesiomorfik yang mengindikasikan bahwa anggota spesies Galliformes merupakan *common ancestor* dari kelompok burung Megapoda (Tabel 3).

Insersi-delesi pada daerah intron jarang ditemukan, secara umum tidak menunjukkan perbedaan urutan nukleotida yang tinggi sehingga homologi dan letak indels dapat diamati secara langsung (Moyle & Marks, 2006; Marks *et al.*, 2007; Benz *et al.*, 2006). Namun demikian insersi dan delesi dilaporkan telah memberikan sumbangan

yang sangat berarti di dalam studi keragaman genetik organisme (Vali *et al.*, 2007). Misalnya, 13 dari 18 celah (*gap*) gen RDP1 dilaporkan telah diketahui ikut mendukung monofili kelompok Megapoda kecuali pada daerah *conserved* di sekitar perbatasan intron dan ekson, serta sepertiga pertama intron gen tersebut (Birks & Edwards, 2002).

Tabel 3. Situs polimorfik, apomorfik dan situs plesiomorfik sekuen gen RDP1 nukleus

Gen RDP1	
nukleus	Posisi Nukleotida
Situs polimorfik	158, 213, 331,345, 395, 473, 518, 576, 608,670, 630, 695
Situs apomorfik	1-5, 21-27, 345-473, 518, 213, 221-230, 281-286, 911-920
Situs plesiomorfik	6, 28-30, 33, 38, 39, 51, 59, 70, 73, 120, 121-126, 158,213, 335

Perubahan susunan DNA yang disebabkan oleh insersi dan delesi saat ini telah digunakan sebagai *genetic marker* untuk mempelajari populasi alami (Vali *et al.*, 2008) dan telah memberikan pemahaman yang cukup mengenai sejarah populasi dan mekanisme evolusi (Boissinot *et al.*, 2000; Shedlock *et al.*, 2004; Konkel *et al.*, 2007). Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa indel sudah ditemukan pada manusia (Mills *et al.*, 2006); *Drosophila* (Ometto *et al.*, 2005) dan ayam (Brandstrom & Ellegren, 2007).

SIMPULAN

Proporsi insersi dan delesi sekuen gen RDP1 anggota spesies kelompok burung Megapoda Indonesia, 42% terkonsentrasi antara basa 407-568 dengan jumlah *gap* antara 1-10bp. Indels gen RDP1 merupakan salah satu karakter yang ikut menentukan monofili dari kelompok burung Megapoda.

DAFTAR PUSTAKA

- Awise, J. 2006. *Evolutionary Pathways In Nature. A Phylogenetic Approach*. Cambridge University Press. New York. pp.190-210.
- Benz, B. W., M.B. Robbins & A.T. Peterson. 2006. Evolutionary History of Woodpeckers and Allies (Aves: Picidae): Placing Key Taxa on the Phylogenetic Tree. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **40**: 389-39.
- Birks, S.M. & S.V. Edwards. 2002. A Phylogeny of the Megapodes (Aves: Megapodiidae) Based on Nuclear and Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. **23**: 408-421.
- Boissinot, S., P. Chevret & A.V. Furano. 2000. L1 (LINE-1) Retrotransposon Evolution and Amplification in Recent Human History. *Molecular Biology and Evolution*. **17**:915-928.
- Brandstrom, M & H. Ellegren. 2007. The Genomic Landscape of Short Insertion and Deletion Polymorphisms in the Chicken (*Gallus gallus*) Genome: a High Frequency of Deletions in Tandem Duplicates. *Genetics*. **176** :1691-1701.
- Clark, G.A. 1964. Life Histories and the Evolution of Megapodes. *Living Bird*. **3**: 149-167.
- Ericson, P.G.P. & U.S. Johansson. 2003. Phylogeny of Passerida (Aves: Passeriformes) Based on Nuclear and Mitochondrial Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **29**: 126-138.
- Goldsmith, T.H. 1990. Optimization, Constraint, and History in the Evolution of Eyes. *the Quarterly Review of Biology*. **65**: 281-321.
- Groth, J.G. & G.F. Barrowclough. 1999. Basal Divergences in Birds and the Phylogenetic Utility of the Nuclear. RAG-1 gene. *Molecular Phylogenetic and Evolution* **5**: 368-382.
- Irestedt, M., J.Fjelds, U.S. Johansson & P.G.P. Ericson. 2002. Systematic Relationships and Biogeography of the Tracheophone Suboscines (Aves:Passeriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **23**: 499-512.
- Johnson, K.P. & D.H. Clayton. 2000. Nuclear and Mitochondrial Genes Contain Similar Phylogenetic Signal for Pigeons and Doves (Aves: Columbiformes). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. **14**:141-151.
- Jones. D. & S. Birks. 1992. Megapodes: Recent Ideas on Origins Adaptions and Reproduction. *Trends in Ecology and Evolution* **7**, 88-91.
- Jones, D., R.W.R.J. Dekker & C.S. Roselaar. 1995. *The Megapodes*. Oxford University Press, Oxford.
- Konkel. M.K., J.X. Wang., P. Liang & M.A. Batzer. 2007. Identification And Characterization of Novel Polymorphic LINE-1 Insertions Through Comparison Of Two Human Genome Sequence Assemblies. *Gene*. **390**:28-38.
- Lovette, I.J. & E. Bermingham. 2000. Variation in Songbirds: Molecular Evolution, Phylogenetic Implications, and Comparisons with Mitochondrial Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. **17**:1569-1577.
- Marks, B.D., J.D. Weckstein, & R.G. Moyle. 2007. Molecular Phylogenetics of the Bee-Eaters (Aves: Meropidae) based on Nuclear and Mitochondrial DNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **45**: 23-32.
- Mills, R.E., C.T. Luttig & C.E. Larkins *et al.* 2006. An Initial Map of Insertion and Deletion (INDEL) Variation in the

- Human Genome. *Genome Research*. **16**:1182–1190.
- Moyle, R.G. & B.D. Marks. 2006. Phylogenetic Relationships of the Bulbuls (Aves : Pycnonotidae) based on Mitochondrial and Nuclear DNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. **40**: 687-695.
- Moore, W.S. 1995. Inferring Phylogenies from mtDNA Variation Mitochondrial Gene Trees Versus Nuclear Gene Trees. *Evolution*. **49**: 718-726.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. **89**: 5932-5936.
- Ometto, L., W. Stephan & D. De Lorenzo. 2005. Insertion/Deletion and Nucleotide Polymorphism Data Reveal Constraints in *Drosophila Melanogaster* Introns and Intergenic Regions. *Genetics*. **169**:1521–1527.
- Prychitko, T.M. & W.S. Moore. 1997. The Utility of DNA Sequences of an Intron from the α -fibrinogen Gene In Phylogenetic Analysis of Woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. **8**: 193-204.
- Shedlock. AM., K. Takahashi & N. Okada. 2004. Sines of Speciation: Tracking Lineages with Retroposons. *Trends in Ecology and Evolution*. **19**:545–553.
- 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 and Evolution* **11**: 341-356.
- Takao, M., A. Yasui & F. Tokunaga. 1988. Isolation and Sequence Determination of The Chicken Rhodopsin Gene. *Vision Research*. **28**: 471-480.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar.2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. **24**: 1596-1599.
- Thomson, J.D., T.J.Gibson, F. Flewiak, F. Jeanmougin & D.G. Higgins. 1997. The Clustalx Windows Interface: *Flexible Strategies for Multiplesequence Alignment Aidedby Quality Analysis Tool*. *Nucleic Acid Research*. **24**: 4876-4882.
- Vali, U., M. Brandstrom, M. Johansson & H. Ellegren. 2008. Insertion Deletion Polymorphisms (Indels) as Genetic Markers in Natural Populations. *BMC Genetics*. **9**:8.
- Weising, K., H. Nybon, K. Wolf & W. Meyer. 1994. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press. Florida, USA.