

KAJIAN KERAGAMAN GENETIK BURUNG KAKATUA TANIMBAR
(*Cacatua goffini*, Finsch) MENGGUNAKAN PENCIRI "RAPD"
[Study on Genetic Diversity of Goffin's Cockatoo (*Cacatuagoffini*, Finsch)
Bird Using RAPD Marker]

Dwi Astuti¹, Siti N. Priyono¹, Heddy Julistiono¹ & Dedy Duryadi²

1. Puslitbang Biologi-LIPI
2. FMIPA-Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

*The study was conducted to analyse genetic diversity of Goffin's Cockatoo (*Cacatua goffini* Finsch) bird using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) marker. PCR (Polymerase Chain Reaction) was performed on DNA samples extracted from 14 birds, using 18 random 10-mer primers and 2 random 12-mer primers. Fourteen out of 20 primers (70%) successfully amplified DNA fragments and 11 out of 14 primers (78,57%) generated 1-2 specific alleles. The result clearly demonstrated that the RAPD marker allows for genetic diversity analyses of these birds in efficiently. Tree of relationship among 14 birds showed that there were two groups in the population of Goffin's Cockatoo.*

Key words: *Cacatua goffini*, *genetic diversity*, *PCR*, *RAPD*

PENDAHULUAN

Burung Kakatua Tanimbar (*Cacatua goffini*, Finsch) merupakan burung endemik di Kepulauan Tanimbar (Forshaw & Cooper, 1989) yang oleh karenanya cenderung mempunyai tingkat homozigositas tinggi, dan sudah dimasukkan dalam Appendix I-CITES pada tahun 1992. Informasi mengenai keragaman genetik diperlukan untuk menduga tingkat homozigositas. Pada level molekuler, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dapat digunakan sebagai penciri DNA untuk analisis keragaman genetik dalam populasi hewan (Williams *et al.* 1990). Dalam analisis ini, primer "random" (karena sekuen dan primer dibuat secara acak) digunakan dalam proses Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk mengamplifikasi fragmen DNA yang sekuennya diapit oleh primer tersebut. Keragaman ukuran fragmen DNA hasil proses PCR sampel DNA yang diekstrak dari sekelompok hewan menunjukkan adanya keragaman rangkaian sekuen DNA dalam suatu populasi.

Selain dapat menganalisis keragaman genetik dalam suatu populasi, penciri "RAPD" juga dapat menganalisis keragaman genetik antara satu populasi dengan populasi lain pada daerah penyebaran yang berbeda (Carter *et al.* 1995). Penggunaan penciri "RAPD" melalui PCR relatif sederhana, karena total DNA yang dipedukan dalam analisis PCR sangat sedikit dan yang lebih penting sekuen primer dapat dirancang secara acak.

Sejauh pengetahuan penulis, analisis keragaman genetik, khususnya dengan penciri "RAPD" melalui PCR pada burung Kakatua Tanimbar (*C. goffini*) belum pernah dilakukan. Dengan demikian, kondisi PCR dan primer perlu dioptimalkan sehingga "RAPD" dapat mencirikan keragaman genetik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keragaman genetik sekelompok burung Kakatua Tanimbar (*C. goffini*) dengan menguji 20 primer tunggal pada kondisi PCR tertentu berdasarkan penciri "RAPD".

BAHAN DAN CARA KERJA

Burung

Empatbelas (14) burung Kakatua Tanimbar (*C. goffini*) yang telah dipelihara di dalam kandang penangkaran digunakan dalam penelitian ini. Hubungan kekerabatan antara individu satu dengan individu lainnya tidak diketahui.

Pengambilan darah.

Tiap burung diambil darahnya sebanyak 0,05 sampai 0,15 ml pada bagian vena sayap, menggunakan alat suntik yang telah diisi/dibasahi dengan larutan 10% EDTA.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menurut metode Duryadi (1995, komunikasi pribadi). Tiap sampel darah burung yang telah diambil langsung dimasukkan dalam tabling eppendorf dan dicampur dengan

larutan penyangga pelisis (0,32 M sukrose; 1 % (v/v) Triton X-100; 5 mM MgCl₂; 10 mM Tris-Cl, pH=7,4), disentrifugasi pada 6500 rpm selama 1 menit. Supernatannya dibuang dan endapannya ditambah larutan penghancur (200 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH=9.0; 100 mM EDTA, pH=8.0; 1 % (w/v) SDS; 0,5 mg/ml Proteinase K; 0,1 mg/ml RNAase). Campuran ini diaduk secara merata dengan bantuan vortex dan diinkubasi dalam "waterbath" pada suhu 57 °C selama 16 jam. Selanjutnya larutan tersebut disentrifugasi pada 13000 rpm selama 2 menit. Supernatannya dipindahkan ke tabung eppendorf baru dan larutan phenol ditambahkan untuk membersihkan protein dan molekul besar lainnya. Tahapan ini diulang lagi dengan menambahkan larutan phenolchloroform-isoamyl alkohol sebanyak satu kali volume sampel. Campuran tersebut dikocok selama 30 menit dan disentrifugasi pada 13000 rpm selama 2 menit. Lapisan bening yang terbentuk dicampur dengan alkohol absolut dingin (4° C) dan dicuci dengan alkohol 70 % dingin. Endapan DNA yang terbentuk dikentangkan dan pellet DNA dilarutkan kembali dengan larutan TE (pH 7,5) yang mengandung 20 g/ml RNAse, dan disimpan dalam freezer -20 °C.

Konsentrasi DNA

Sampel DNA hasil ekstraksi dan DNA Standard (GIBCO BRL), dimasukan ke dalam 1 % gel agarose yang mengandung larutan ethidium bromide dan dielektroforesis selama 75 menit, 80 Volt. DNA dalam gel agarose hasil elektroforesis divisualisasi di bawah sinar Ultra Violet dan difoto dengan kamera polaroid. Konsentrasi DNA dihitung dengan cara membandingkan intensitas sampel DNA yang tampak pada foto dengan satu seri DNA yang konsentrasinya telah diketahui (DNA Standard). Untuk amplifikasi dengan PCR, DNA tadi diencerkan sedemikian rupa sehingga mencapai konsentrasi tertentu, dan konsentrasi DNA dari tiap-tiap sampel menjadi relatif sama.

Primer

Primer random yang dicoba untuk amplifikasi DNA dengan PCR pada penelitian ini, sebanyak 18 primer tunggal dengan panjang 10- mer dan 2 primer tunggal 12- mer sesuai dengan kriteria yang diberikan oleh Welsh *et. al* (1995) dan (Hallden *et al.* 1996).

Primer-primer tersebut adalah: 5'-TGTTGGACCA-3' (RP1), 5'-ACCACCCACC-3' (RP2), 5'-ACTGAACGCC-3'(RP3), 5'-ACAACCTGGGG-3¹ (RP4), 5'-CAAAGCGCTC-3' (RP5) (Bioprocessing Technology Center, Singapore), 5'-CAGTTCACGC-3' (S15), 5'-AACGGCGACA-

3'(T8), 5'-GGTGAACGCT-3' (T16), 5'-GTAGCCGTCT-3' (R11), 5'-GGACAACGAG-3' (R15), 5'-GAGGTCCACA-3' (U18), 5'-GGACGGCGTT-3¹ (V8), 5'-CAGTGCCGGT-3' (V15), 5'-ACCGGCTTGT-3' (V17), 5'-GGTCGATCTG-3' (Y14), 5'-GGGCCAATGT-3' (Y16), 5'-CTGGGGACTT-3 (D19), 5'-GTAGACCCGT-3' (B11), 5'-AAGGCGCGAACG-3' (165), dan 5'-TTGCCGGGACCA-3' (166). Lima belas primer yang disebutkan terakhir adalah pemberian dari Dr. Kobayashi (Society for Techno-Innovation of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba, Japan).

Optimalisasi Kondisi PCR (Polymerase Chain Reaction)

Sebelum dilakukan amplifikasi DNA, optimalisasi kondisi PCR harus dilakukan terlebih dahulu. Pembakuan ini dilakukan terhadap beberapa faktor yang mempengaruhi "RAPD" melalui PCR. Faktor-faktor ini adalah denaturasi, hibridisasi primer, elongasi hasil hibridisasi, jumlah siklus amplifikasi yang diperlukan, jenis primer yang digunakan, serta konsentrasi dari reagensia yang dipakai dalam campuran reaksi PCR; seperti konsentrasi MgCl₂, dan konsentrasi DNA sampel.

Campuran reaksi PCR dibuat dalam 10 µl, yang terdiri dari sekitar 15 ng sampel DNA, 200 µM dNTP'S, 0,5 unit Taq Polymerase (Boehringer Mannheim), dan 100 - 122 ng primer, 2 - 3 mM MgCl₂ dan dH₂O. Untuk menghindari terjadinya evaporasi campuran reaksi tersebut akibat proses PCR (Tehne PHC-2), 10 µl minyak mineral ditambahkan ke dalam campuran tersebut.

Proses PCR dilakukan pada kondisi sebagai berikut: 94° C - 5 menit, satu siklus, (94° C - 1 menit, 37° C-1 menit, 72° C- 1 menit 30 detik) x 35 siklus, 72° C-10 menit. Fragmen DNA hasil PCR dicampur dengan 1x larutan pemberat (=loading dye) dan dimasukan dalam sumur gel agarose 1,2 % (Boehringer Mannheim). Fragmen DNA yang telah diketahui ukurannya (DNA ladder 100 bp, GIBCO BRL) juga dimasukkan ke dalam sumur gel yang lain untuk mengestimasi ukuran fragmen DNA yang dihasilkan. Pemisahan fragmen dilakukan dengan elektroforesis submarine (Hoefler, USA) selama 105 menit pada 80 Volt. Selanjutnya fragmen DNA divisualisasi pada UV Transilluminator dan difoto dengan kamera polaroid.

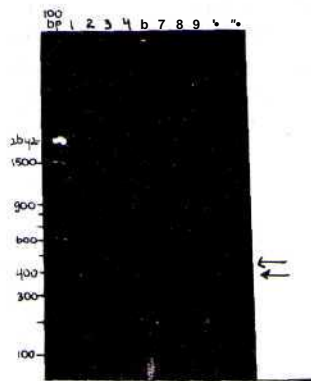
Dari fragmen-fragmen DNA yang berhasil diamplifikasi melalui proses PCR, yang menunjukkan adanya polimorfisme (alel spesifik) kemudian dilakukan analisis lebih lanjut dengan analisis Muster berdasarkan jarak Euclidean, menggunakan perang-

kat lunak komputer "SPSS" (Statistical Progame for Social Science).

HASIL

Hasil analisis melalui PCR menunjukkan bahwa dan 20 macam primer yang diuji, fragmen-fragmen DNA (dalam hal ini dianggap sebagai lokus) berhasil diamplifikasi oleh 14 primer (70 %), masing-masing adalah RP1, RP2, RP3, RP4, RP5, S15, T8, T16, V17, Y14, Y16, B11, 165, dan 166. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya pita-pita DNA hasil amplifikasi PCR setelah dielektroforesis pada gel agorose 1,2 % . Sedangkan 6 primer yaitu R11, R15, U18, V8, VIS, dan D19 gagal mengamplifikasi DNA .

Sebanyak 11 primer (78,57 %) dari 14 primer yang berhasil mengamplifikasi DNA menunjukkan adanya alel spesifik. Primer-primer tersebut RP1, RP2, R P3, S15, T16, V17, Y14, Y16, B11, 165, 166. Jumlah alel spesifik yang ditemukan pada tiap-tiap primer tersebut berkisar antara 1-2 alel . Dari 11 primer tersebut secara keseluruhan menghasilkan 16 alel spesifik yang berkisar antara 350-1200 pasang basa (Tabel 1 dan Tabel 2). Adanya alel spesifik tersebut menunjukkan bahwa di dalam sekelompok burung Kakatua Taniinbar yang diteliti terdapat keragaman genetik (keterangan mengenai alel spesifik atau alel non spesifik dapat dilihat pada "Pembahasan".



Gambar 1. Satu contoh pola keragaman fragmen DNA (alel spesifik) yang dihasilkan dalam analisis PCR dengan primer B11. Tanda panah menunjukkan 2 alel spesifik (425 pb dan 450 pb)
100 bp : penanda ukuran DNA
lajur 1-12 : nomor individu burung

Secara keseluruhan, jenis primer yang menghasilkan alel spesifik dan ukuran alel spesifik tersebut, disajikan pada Tabel 1. Sedangkan pola alel (fragmen) spesifik yang dihasilkan oleh tiap primer disajikan dalam Tabel 2.

Analisis kluster terhadap alel-alel spesifik tersebut, menghasilkan dendrogram (Gambar 2) yang menunjukkan adanya hubungan kekerabatan antara individu-individu burung Kakatua Tanimbar (*C. goffini*) yang diteliti.

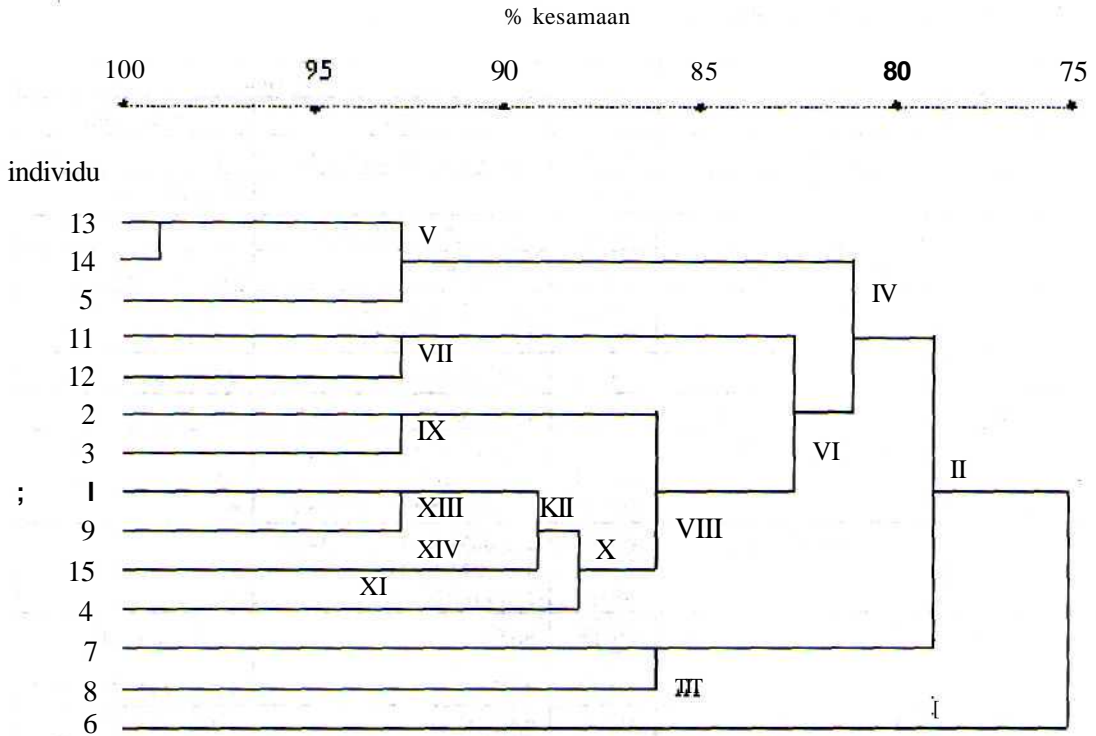
Tabel 1. Jenis primer dan alel spesifik yang dihasilkan oleh tiap jenis primer.

No.	Kode	Sekuen	Alel	Individu	
				Ada	Tidak ada
1.	RP1	5'-TGGTGGACCA-3'	350 pb	1,2,3,4,5,7,9,11,12,13,14,15	6,8
2.	RP2	5'-ACCACCCACC-3'	450 pb	1,2,3,4,6,9,11,12,	5,7,8,13,14,15
3.	RP3	5'-ACTGAACGCC-3'	1150 pb	1,2,3,4,6,7,8,9,11,12,14,15	13
4.	S15	5'-CAGTTCACGC-3'	1200 pb	1,4,5,6,7,8,11	2,3,9,12,13,14,15
5	T16	5'-GGTGAACGCT-3'	400 pb	1,2,3,4,5,7,8,9,11,14,15	6,12,13
			1000 pb	1,2,3,4,6,7,8,9,11,12,15	5,13,14
6	V17	5'-ACCGGCTTGT-3'	650 pb	1,4,9,12,13,14,15	2,3,5,6,7,8,11
7	Y14	5'-GGTCGATCTG-3'	850 pb	1,2,3,4,5,6,8,9,11,12,13,14,15	7
8	Y16	5'-GGGCCAATGT-3'	650 pb	1,2,3,4,5,7,8,9,11,12,13,14,15	6
			1050 pb	1,2,4,6,7,8,11,13,14,15	3,9,12
			1100 pb	1,2,3,5,6,7,8,9,11,12,13,14,15	4
9	B11	5'-GTAGACCCGT-3'	425 pb	1,2,3,4,5,6,8,9,11,12,13,14,15	7
			450 pb	1,2,4,5,6,7,8,9,11 12,13,14,15	3
10	165	5'-AAGGCGCGAACG-3'	350 pb	6,11	1,2,3,4,5,7,8,9,12,13,14,15
			700 pb	4,6,7,8	1,2,3,5,9,11,12,13,14,15
11	166	5'-TTGCCGGGACCA-3'	400 pb	7,9,11,12,15	1,2,3,4,5,6,8,13,14

Keterangan : pb = pasang basa

Tabel 2. Pola fragmen DNA (yang merupakan alel spesifik) pada tiap individu, yang dihasilkan oleh 11 primer.

No.	Ukuran alel spesifik	Primer	Nomor Individu														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	
1.	1200 pb	S15	-														
2.	1150 pb	Rp3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3.	1100 pb	Y16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4.	1050 pb	Y16	-	-													
5.	1000 pb	T16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6.	850 pb	Y14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7.	700 pb	165															
8.	650 pb	F17	-														
9.		Y16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10.	450 pb	B11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11.		Rp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12.	425 pb	B11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13.	400 pb	T16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14.		166															
15.	315 pb	Rp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16.		165															



Gambar 2. Dendrogram DNA alel spesifik dari individu-individu Kakatua Tanimbar (*C. gaffini*).

PEMBAHASAN

Pada proses PCR, kegagalan dalam mengamplifikasi fragmen DNA oleh 6 macam primer (R11, R15, U18, V8, V15, dan D19) yang digunakan dalam penelitian ini, disebabkan oleh beberapa faktor. Mungkin disebabkan oleh tidak adanya sekuen DNA yang cocok dengan sekuen primer yang digunakan. Kemungkinan lain adalah posisi sekuen DNA yang cocok dengan sekuen primer terletak terlalu jauh sehingga PCR tidak dapat mengamplifikasi fragmen DNA yang diapit oleh primer tersebut. Ada kemungkinan juga faktor penyebab kegagalan ini disebabkan tidak tepatnya suhu "annealing" dalam proses PCR. Suhu optimal untuk penempelan primer tergantung dari panjang dan kandungan G+C primer yang digunakan. Pada penelitian ini kandungan G-C primer yang digunakan antara 50-70%. Suhu yang terlalu tinggi mungkin akan mengakibatkan gagalnya amplifikasi fragmen DNA sedang suhu yang terlalu rendah bisa menghasilkan produk-produk yang tidak diinginkan (Rychlik, 1990).

Seperti diharapkan bahwa lebih dari satu fragmen DNA (dalam hal ini dianggap sebagai alel) berhasil diamplifikasi lebih dari satu, oleh masing-

masing primer pada setiap DNA dari individu burung yang dianalisis, yang secara keseluruhan berukuran antara 160 pb dan 1400 pb (pasangbasa). Dengan kata lain, setiap lokus bersifat multi alel. Dari sejumlah alel yang diperoleh pada setiap lokus, beberapa alel yang dihasilkan Himilid oleh semua individu (= alel non spesifik) dan beberapa alel lainnya tidak dimiliki oleh individu lain (alel spesifik) (Lihat Gambar 1)

Alel spesifik yang dihasilkan oleh tiap primer dalam "RAPD" ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Haig *etal* (1994) yang mendapatkan 1 alel spesifik per primer pada burung *Pkoides borealis*. Adanya alel spesifik yang dihasilkan menunjukkan bahwa di dalam sekelompok burung *Q gaffini* yang diteliti terdapat keragaman genetik antara individu satu dengan individu lainnya. Keragaman genetik yang ditimbulkan berdasarkan analisis "penciriRAPD" dalam populasi ini mungkin dikarenakan adanya mutasi pada molekul DNA (Williams *et. al*, 1990) pada individu tertentu. Meskipun demikian, hasil penelitian ini tidak dapat menjelaskan sebab-sebab terjadinya mutasi tersebut.

Pola fragmen yang ditunjukkan pada Tabel 2 menampakan adanya keragaman genetik antara

individu dalam kelompok burung Kakatua Tanimbar (*C. goffini*) yang diteliti.

Dati dendrogram (Gambar 2) tersebut diungkap bahwa dalam sekelompok burung yang diteliti tersebut terbagi dalam 2 kelompok besar, yaitu kelompok I (individu 6) dan kelompok II (individu 1,2,3,4,5,7,8,9,11,12,13,14,15), dengan tingkat kesamaan 75 %. Kelompok II terbagi menjadi kelompok III (individu 7,8) dan kelompok IV (individu 1,2,3,4,5,9,11,12,13,14,15) dengan tingkat kesamaan-nya 79 %. Kelompok IV terbagi menjadi kelompok V (individu 5,13,14) dan kelompok VI (individu 4,15,9,1,3,2,12,11) dengan tingkat kesamaan 81 %. Kelompok VI terbagi menjadi kelompok VII (individu 11,12) dan kelompok VIII (individu 4,15,9,1,3,2) dengan tingkat kesamaan 82,5 %. Kelompok VIII terbagi menjadi kelompok EX (individu 2,3) dan kelompok X (individu 4,15,9,1) dengan tingkat kesamaan 86 %. Kelompok X terbagi menjadi kelompok XI (individu 4) dan kelompok XII (individu 1,9,15) dengan tingkat kesamaan 88 %. Kelompok XII terbagi menjadi kelompok XIII (individu 1,9) dan kelompok XIV (individu 15) dengan tingkat kesamaan 89 %. Pada dendrogram tampak bahwa tingkat kesamaan terbesar adalah antara individu 13 dengan 14 yaitu 98 %.

Tingkat kesamaan antar individu-individu burung yang diamati cukup tinggi, berkisar antara 75 % sampai 98 %. Ini dapat dipahami karena individu-individu yang diamati masih dalam satu jenis. Meskipun demikian data tersebut juga menunjukkan adanya keragaman antara individu-individu tersebut, terutama pada kelompok kedua. Terjadinya keragaman ini kemungkinan karena selain terjadi mutasi pada beberapa individu burung tersebut, kemungkinan lain individu-individu burung yang diteliti berasal dari keluarga yang berbeda atau dari populasi yang berbeda.

KESIMPULAN

Terdapat keragaman genetik pada individu-individu burung Kakatua Tanimbar (*C. goffini*) yang diamati. Analisis keragaman genetik burung *C. goffini* dengan penciri "RAPD" pada kondisi PCR ini cukup efisien, karena 14 dari 20 primer yang diuji (70 %) berhasil mengamplifikasi fragmen DNA, dan 11 primer (78,57 %) menghasilkan alel spesifik yang menunjukkan adanya keragaman. Data yang diperoleh menunjukkan sedikitnya terdapat 2 kelompok keragaman dalam sekelompok burung *C. goffini* yang

diteliti. Pada kelompok kedua terdiri dari beberapa individu, namun demikian diantara individu tersebut masih dapat dibedakan. Penciri "RAPD" ini diharapkan dapat digunakan sebagai salah satu pendekatan dalam analisis keragaman genetik dalam upaya pelestarian maupun studi penyebaran populasi *C. goffini* di kepulauan Tanimbar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ir. Ibnu Maryanto, MS. yang membantu dalam analisis kluster. Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Hayati Puslitbang Biologi - LIPI.

DAFTAR PUSTAKA

- Carter DA, Burt A and Taylor JW. 1995.** Direct Analysis of Specific Bonds from Arbitrarily Primed PCR Reactions. In "PCR Strategies", ed. by M.A Innis & David, H. Academic Press. S.Diego, N.Y., Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, p. 325-346.
- Forshaw JM and Cooper WT. 1989.** *Parrot of The World*. Third (Revised) Ed. Landowne Edition. 672 p.
- Haig SM, Rhymer JM and Heckel DG. 1994.** Population Differentiation in Randomly Amplified Polymorphic DNA of Red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Molecular Ecology* 3 : 581-595.
- Hallden C, Nilsson NO, Rading LM, Sail T. 1994.** Evaluation of RFLP and RAPD Markers in A Comparison of Brassicanapus Breeding Lines. *Theor. Appl. Genetic* 88: 123-128.
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE 1990.** Optimization of The Annealing Temperature for DNA Amplifikasi in vitro. *Nucl. Acids Res.* 18. 6049-60412
- Welsh J, David R and Michael M. 1996.** DNA and RNA Fingerprinting Using Arbitrarily Primer PCR. In *PCR Strategis*. Ed. by M.A. Innis, David, H.G. & John J.S. academic Press San Diego, N.Y., Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, p. 247-276.
- Williams JG, Kubelik AR., Livak KJ, Rafalki JA and Tingey SV. 1990.** DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acid res.* 18:6531-186535.