

Variasi nukleotida gen COI pada Burung Sempidan (Genus *Lophura*)  
[(Nucleotide variations of COI gene on Gallopheasants Bird (Genus *Lophura*)]

Dwi Astuti, Mohamad Irham, & Hidyat Ashari

Puslit Biologi-LIPI, Jl. Raya Jakarta bogor, Km. 46, Cibinong – Bogor. Email: asdwi2016gmail.com

Memasukkan: Februari 2018, Diterima: Mei 2018

ABSTRACT

Gallopheasant birds (Genus *Lophura*) belonging to Phasianidae family. *L. inornata* and *L. ignita* were 2 of 5 species in Indonesia. This study was aimed to determine the genetic variation and diversity of those two bird species based on DNA sequences of COI gene. Total genomic DNA was extracted from blood samples and wet meat from 5 individuals (4 individuals *L. inornata hoogerwerfii* and 1 individual *L. Ignita*). Amplification of COI gene by PCR produced a single fragment of about 860 bp. The 785 bp of DNA sequence data from 5 birds were analyzed to determine its genetic variation and diversity, both of at intra and inter-species levels using MEGA 5 software. Genetic distance between individual bird (intraspecific) of *L. i. hoogerwerfii* ranged from 0.00 to  $0.0013 \pm 0.0012$ , whereas between 2 species (*L. hoogerwerfii* vs *L. ignita*) ranged from  $0.0467 \pm 0.0078$  to  $0.0481 \pm 0.0080$ . Three individuals of *L. i. hoogerwerfii* have the same DNA sequence haplotype (HLh1) and one individual has one haplotype that was very different from the other 3 individuals (HLh2), so from 4 individual birds there were only 2 haplotypes with  $0.400 \pm 0.237$  haplotype diversity (Hd) value. Nucleotide substitution / differences occurred in 4 nucleotide sites (site 320, 711, 738, and 779) and nucleotide diversity (Pi) was  $0.00204 \pm 0.00121$ . Between two species (*L. i. hoogerwerfii* and *L. ignita*) occurred 39 - 404 nucleotide substitution sites. The average number of codon encoding amino acid was 261 with a value of codon bias was 0.314. The existence of a nucleotide substitution indicated that there were genetic variations in both intraspecies and interspecies levels. Genetic variation and diversity of *L. i. hoogerwerfii* were low. Information from this research is useful for conservation of this bird.

**Keywords:** DNA sequence, COI, genetic variation, *Lophura inornata hoogerwerfii*, *L. ignita*.

ABSTRACT

Burung Sempidan (Genus *Lophura*) termasuk di dalam famili Phasianidae. *L. inornata* dan *L. ignita* adalah 2 dari 5 jenis di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik dari dua jenis burung tersebut berdasarkan sekuen DNA dari gen COI. Genom DNA total diekstraksi dari sampel-sampel darah dan daging basah dari 5 individu (4 individu *L. inornata hoogerwerfii* dan 1 individu *L. Ignita*). Amplifikasi gen COI melalui PCR menghasilkan fragmen tunggal sekitar 860 pb. Sekuen DNA sepanjang 785 pb dianalisis untuk mengetahui variasi urutan DNA, baik pada tingkat intra maupun inter-spesies dengan menggunakan MEGA 5. Jarak genetik antar individu spesies (intraspecific) *L. i. hoogerwerfii* berkisar antara 0,000 sampai  $0,0013 \pm 0,0012$ , sedangkan antara 2 spesies (*L. hoogerwerfii* vs *L. ignita*) berkisar  $0,0467 \pm 0,0078$  sampai  $0,0481 \pm 0,0080$ . Tiga individu *L. i. hoogerwerfii* memiliki haplotipe sekuen yang sama (HLh1) dan satu individu memiliki haplotipe yang sangat berbeda dengan 3 individu lainnya (HLh2), sehingga dari 4 individu hanya terdapat 2 haplotipe dengan nilai diversitas haplotipe (Hd) sebesar  $0,400 \pm 0,237$ . Substitusi basa/perbedaan basa terjadi pada 4 situs nukleotida (situs 320, 711, 738, dan 779) dan diversitas nukleotida (Pi):  $0,00204 \pm 0,00121$ . Dua spesies (*L. i. hoogerwerfii* dan *L. ignita*) terjadi substitusi basa sebanyak 39 – 404 situs. Rata-rata jumlah codon pengkode asam amino 261 dengan nilai codon bias 0,314. Adanya substitusi basa nukleotida ini menunjukkan bahwa terdapat variasi genetik baik pada tingkat intraspecies maupun interspecies. Variasi dan diversitas genetik dari *L. i. hoogerwerfii* rendah. Informasi dari penelitian ini bermanfaat dalam upaya konservasi burung ini.

**Kata Kunci :** sekuen DNA, COI, variasi genetik, *Lophura inornata hoogerwerfii*, *L. ignita*

PENDAHULUAN

Genus *Lophura* yang dalam bahasa Indonesia disebut sebagai burung Sempidan termasuk di dalam famili Phasianidae. Burung Sempidan hanya ada di daratan Asia. Ada 11-12 jenis tergantung penamaan taxonominya; yaitu *Lophura leucomelanos*,

*L. nycthemera*, *L. imperialis*, *L. edwardsii*, *L. swinhoii*, *L. hoogerswerfii*, *L. inornata*, *L. erythroptalma*, *L. haitensis*, *L. ignita*, *L. diaradi*, dan *L. bulweri*. Lima jenis di antaranya terdapat di Indonesia (Dickinson 2003) yang penyebarannya hanya di pulau Sumatra dan Kalimantan.

Secara morfologi *L. hoogerwerfii* awalnya

terpisah dari *L. inornata* tapi kemudian dinyatakan sebagai anak jenis dari *L. inornata* (del Hoyo & Collar 2014) sehingga ada 2 anak jenis dari *L. inornata*; yaitu *L. i. inornata* (Sempidan sumatra) dan *L. i. hoogerwerfii* (sempidan Aceh). *L.i. inornata* dikenal sebagai burung sempidan salvadori. Burung ini endemik di Sumatra, Indonesia, di pegunungan Barisan tengah dan selatan Sumatera, sedangkan *L. i. hoogerwerfii* ditemukan di Sumatera bagian utara (Aceh). Panjangnya 46-55 cm dan berekor pendek. Populasi burung dewasa di alam diperkirakan 15,000-19,999 (BirdLife International 2016).

*Lophura ignita* (Sempidan biru) berukuran sedang, sampai 70 cm, merupakan burung hutan, ditemukan di hutan dataran rendah Semenanjung Thailand-Melayu, Kalimantan dan Sumatera. Ada dua anak jenis, yaitu *L. i. ignita* (Shaw 1798) distribusi di Kalimantan (Borneo) and Bangka I (off SE Sumatra) dan *L. i. nobilis* (Sclater, 1863) di Sarawak and Sabah (N Borneo) (McGowan *et al.* 2018).

Kedua jenis *Lophura* tersebut (*L. inornata* dan *L. ignita*) populasinya menurun cepat diduga sebagai akibat dari tekanan perburuan, hilangnya habitat karena penebangan kayu, perambahan pertanian, dan semakin banyak kebakaran saat terjadi kekeringan (BirdLife International 2016), sehingga masuk di dalam IUCN Red List sebagai Near Threatened ver 3.1 (IUCN Red List of Threatened Species 2016). Bahkan, *L. inornata* dikategorikan sebagai burung endangered (Sukmatoro *et al.* 2007). Oleh karenanya berbagai langkah untuk konservasinya perlu dilakukan, salah satunya adalah kajian genetiknya., yang memiliki relevansi dan potensi dalam pengelolaan strategi breedig.

Gen COI merupakan satu dari 22 gen pengkode protein yang berada di dalam DNA mitokondria hewan. Panjang gen COI sekitar 2000 pasang basa yang ditetapkan sebagai gen/marka barcode secara Internasional (referens). Sekitar 650-bp dari total panjang gen ini diyakini dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies hewan (Kerr *et al.* 2007).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji variasi dan keragaman genetik dua *Lophura* pada tingkat intra-spesies dan inter-spesies berdasarkan analisis sekuen DNA dari gen COI pada *L.i hoogerswerfi* (sempidan Aceh) dan *L. ignita* (sempidan biru; Bornean crested fireback) terdapat di Malay Peninsula, Limur Laut Sumatera, dan

bagian Tenggara Borneo.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini menggunakan 4 sampel jaringan segar dari 4 burung *L. i. hoogerwerfii* yang mati yang berasal dari dari Aceh. Material kering burung disimpan sebagai koleksi MZB di laboratorium Ornithologi dengan nomor koleksi masing-masing adalah 30359, 30360, 30361, dan 30362 dengan nomor koleksi DNA berturut-turut LH13, LH14, LH15, dan LH16. Satu sampel darah dari *L. ignita* dengan kode AG 92 yang disimpan laboratorium genetik Bidang Zoologi, Puslit Biologi - LIPI. Hanya empat sampel yang bisa dianalisis di sini karena sulitnya mendapatkan sampel burung-burung tersebut.

Ekstraksi/isolasi DNA genom total dari 5 sampel tersebut dilakukan dengan metoda standard seperti yang telah diuraikan oleh Sambrook *et al.* (1989). Selanjutnya DNA yang diperoleh diencerkan 10 X dan digunakan sebagai template dalam proses analisis PCR. Selanjutnya analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mengamplifikasi gen COI dilakukan dengan menggunakan primer L6959xH7827 dan kondisi PCR mengikuti Mindel *et al.* (1999) dan DeFillipis (2000). Selanjutnya, dilakukan sekuensing DNA COI terhadap fragment target dari setiap sampel yang dipelajari. Primer yang digunakan dalam proses sekuensing DNA adalah primer-primer yang sama seperti yang digunakan di dalam proses amplifikasi gen.

Tahapan terakhir adalah melakukan analisa data sekuen dengan perangkat lunak Proseq untuk mensejajarkan semua data sekuen DNA. MEGA 5 version 4 untuk menganalisis variasi basa nukleotida, dan jarak genetik, dan pengelompokan individu melalui konstruksi pohon Neigborn-joining (NJ). DnaSP untuk menganalisis jumlah haplotipe (h), diversitas haplotipe (Hd), dan diversitas nukleotida.

## HASIL

Pasangan primer L6959xH7827 yang digunakan untuk mengamplifikasi gen COI menghasilkan fragmen DNA sekitar 860-pb. Hasil analisis sekuens DNA menunjukkan bahwa dari urutan basa yang dihasilkan pada 5 individu yang terdiri dari *L. i. hoogerwerfi* (4 individu) dan *L. ignita* (1 individu), diputuskan



individu *L.i. hoogerwerfi* (LH13, LH 14, dan LH 15) satu sama lainnya memiliki jarak genetik nol, tetapi satu individu *L.i. hoogerwerfi* (LH16) memiliki jarak genetik sebesar  $0,0013 \pm 0,0012$  atau divergensi sekuen 0,13 % terhadap ketiga individu lainnya (LH13, LH 14, LH15). Jarak genetik antara dua spesies; *L.i.hoogerwerfi* vs *L. ignita* berkisar  $0,0467 \pm 0,0078$  hingga  $0,0481 \pm 0,0080$ , atau nilai rata-rata 0,0472 (4, 72 %).

**Analisis neighbor-joining(NJ)**

Hasil dari analisis NJ ini memperlihatkan pengelompokan dari 5 individu burung yang diteliti (Gambar 2). Ada 2 grup yaitu grup 1 terdiri 4 individu *L.i.hoogerwerfi* (LH 13, LH4, LH15, dan LH 16), dan grup 2 terdiri dari 1 individu AG92 yang dipisahkan dengan 0,0472 (4, 72 %) divergensi genetik. Grup 1 terpecah menjadi 2 grup, yaitu grup yang terdiri dari 3 individu (LH13, LH14, dan LH15) dan grup yang hanya 1 individu LH16 yang dipisahkan oleh 0,0013 (0,13 %) divergensi genetik.

**PEMBAHASAN**

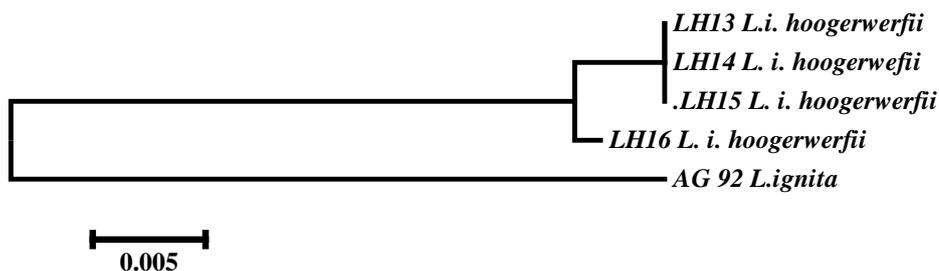
Tidak terdapatnya variasi basa nukleotida pada tiga individu *L.i.hoogerwerfi* (LH13, L14, dan LH15) menunjukkan bahwa tidak terdapat substitusi basa di antara ketiganya, jadi sekuen DNA COI nya identik dan jarak gentiknya 0 (nol). Tetapi, pada satu individu *L.i.hoogerwerfi* (LH16)

terjadi substitusi basa sehingga memiliki jarak genetik terhadap ketiga individu lainnya (LH13, LH 14, LH15) sebesar 0,13 %. Kemungkinannya, bahwa ketiga individu *L.i.hoogerwerfi* (LH13, LH14, dan LH15) tersebut hasil inbreeding dari induk-induk sebelumnya. *Inbreeding* bisa mengakibatkan ningkatan homogenitas, penyimpangan genetik, terbatasnya aliran gen. Pada populasi yang berukuran kecil, hal tersebut dapat berkontribusi pada pengurangan keragaman genetik, dan bahkan meningkatkan risiko kepunahan mereka (Frankham *et al.* 2010).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa variasi dan diversitas genetik pada individu-individu *L.i. hoogerwerfi* sangat kecil. Ini ditunjukkan dari nilai diversitas haplotipe ( $Hd=0,400 \pm 0,237$  dan diversitas nukleotidanya ( $Pi = 0,00204 \pm 0,00121$ ). Ini bisa dikarenakan jumlah sampel yang dianalisis sedikit atau memang diversitas genetik burung ini di alam kecil karena jumlah populasinya kecil. Burung ini merupakan burung endemik di pulau Sumatera. Biasanya pada populasi berukuran kecil dan terisolasi, dapat meningkatkan terjadinya perkawinan sedarah (*inbreeding*) dan berkurangnya keragaman genetik dapat meningkatkan resiko kepunahan (Furlan *et al.* 2012). Reduksi keragaman genetik juga lebih sering terjadi pada burung endemik (Cardoso *et al.* 2009). Populasi burung ini di alam memang sedang

**Tabel 1 .** Jarak genetik ± SD untuk pasangan individu (bawah) dan divergensi sekuen (sequence divergence) (atas) berdasarkan 785-bp gen COI pada *Lophura*.

Individu	1	2	3	4	5
<i>L.i.hoogerswerfi</i> (LH13)		0,00%	0,00%	0,13%	4,81%
<i>L. i.hoogerswerfi</i> (LH14)	0,0		0,00%	0,13%	4,81%
<i>L. i.hoogerswerfi</i> (LH15)	0,0	0,0		0,13%	4,81%
<i>L. i.hoogerswerfi</i> (LH16)	0 0013 ± 0,0012	0,0013 ± 0,0012	0,0013 ± 0,0012		4,67%
<i>L.ignita</i> (AG 92)	0,0481 ± 0,0008	0,0481 ± 0,0080	0,0481 ± 0,0080	0,0467 ± 0,0078	



**Gambar 2.** Pengelompokan individu *Lophura* dengan analisis neighbor-joining

mengalami penurunan drastis. Bahkan, *L.inornata* yang salah satu subspeciesnya adalah *L.i.hoogerwerfii* dikategorikan sebagai burung terancam punah (*endangered species*) (Sukamantoro *et al.*, 2007). Jika keadaan ini yang sesungguhnya terjadi di populasinya di alam, maka dikhawatirkan akan menurunkan ketahanan hidup burung ini, termasuk menurunnya kemampuan beradaptasi dengan lingkungan, dan kemampuan reproduksinya (Furlan *et al.*, 2012). Hal ini juga penting mempengaruhi potensi jangka panjang populasi untuk bertahan hidup (Bouzat 2010). Populasi dengan kecilnya keragaman genetik sering berakibat meningkatnya kecepatan kepunahan (Markert *et al.* 2010).

Burung *L. ignita* yang digunakan pada penelitian ini hanya 1 sampel sehingga tidak bisa diungkapkan variasi dan diversitas genetiknya, walaupun merupakan burung endemik bahkan statusnya pada IUCN Red List sebagai spesies yang Near Threatened (NT), maka ada kemungkinan kondisi keragaman genetiknya di alam juga menurun karena populasinya juga sedang dalam penurunan drastis (BirdLife International, 2016; IUCN Red List of Threatened Species, 2016). Jika keadaan populasi di alam benar-benar sedikit, maka implikasinya terhadap kelangsungan hidup kedua jenis burung ini (*L.inornata* dan *L. ignita*) menjadi mengkhawatirkan dan tindakan konservasinya perlu segera dilakukan. Kebijakan konservasi perlu dilakukan untuk meminimalkan hilangnya keragaman genetik lebih lanjut dan jika dimungkinkan menyelamatkan spesies terancam (Evans *et al.*, 2008).

Divergensi genetik COI antar individu burung *L.i.hoogerwerfii* ini relatif lebih rendah dibandingkan divergensi genetik *Lophura* jenis lain (*L. nycthemera*) yang berkisar 0,0015 hingga 0,0064 dengan rata-rata 0,0035. Ini menandakan hubungan darah antara individu satu dengan lainnya dari *L.i.hoogerwerfii* lebih dekat.

Jarak atau divergensi genetik antara dua spesies; *L. hoogerwerfii* dan *L. ignita* sebesar > 4 % adalah wajar untuk dua individu beda spesies. Jarak genetik COI antarspesies *Lophura* jenis lain (*L. edwardsii* vs *L. nycthemera*) adalah 5,56 % dan pada kelompok burung lain > 4 % (Kerr

*et al.*, 2007). Di sini terlihat jelas bahwa gen COI memberikan jarak atau divergensi genetik yang sangat berbeda pada tingkat *intra* spesies dan *inter*-spesies.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan: (1) terdapat variasi genetik diantara individu-individu *L.i. hoogerwerfii* vs *L. Ignita* dengan nilai divergensi 4,67 %, (2) tidak terdapat variasi genetik di antara 3 individu *L.i. hoogerwerfii* tetapi satu individu memiliki haplotipe yang berbeda dengan divergensi 0,13 %, (3) diversitas haplotipe dan diversitas nukleotida *L.i. hoogerwerfii* rendah yang menandakan keragaman genetiknya rendah. Perlu perhatian untuk keberadaan jumlah populasinya dan konservasi di alam.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada seluruh teknisi maupun staf peneliti Bidang Zoologi, yang telah membantu kelancaran kegiatan penelitian ini. Dana penelitian ini diperoleh dari Proyek Tematik-DIPA Puslit Biologi-LIPI.

## DAFTAR PUSTAKA

- BirdLife International. 2016. *Lophura ignita*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- BirdLife International. 2016. *Lophura inornata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T45355372A95145469.en>. Downloaded on 02 February 2018.
- Bouzat, JL. 2010. Conservation genetics of population bottlenecks: the role of chance, selection, and history. *Conservation Genet.* 11:463–478.
- Cardoso, MJ., MDB. Eldridge, & M. Oakwood. 2009. Effects of founder events on the genetic variation of translocated island populations: implications for conservation management of the northern quoll. *Conservation genetics.* 10:1719–1733.
- del Hoyo, J., NJ. Collar, DA. Christie, A. Elliott, & LDC. Fishpool. 2014. *HBW and BirdLife*

- International Illustrated Checklist of the Birds of the World. Volume 1: Non-passerines*. Lynx Edicions BirdLife International, Barcelona, Spain and Cambridge, UK).
- Dickinson, EC. 2003. Complete Checklist of the Birds of the World. Christopher Helm. London. 1039 p.
- Evans, SR. & BC. Sheldon, 2008. Interspecific Patterns of Genetic Diversity in Birds: Correlations with Extinction. *Conservation Biology* 22 (4): 1016-1025.
- Frankham, R., JD. Ballou, & DA. Briscoe. 2010. Introduction to conservation genetics. 2nd ed. Press Syndicate for the Univ. of Cambridge, Cambridge, U. K.
- Furlan E, J. Stoklosa, J. Griffiths, R. Ellis, RM. Huggins & AR. Weeks. 2012. Small population size and extremely low levels of genetic diversity in island populations of the platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. *Ecology and Evolution*. Open acces. 844-857. Published by Blackwell Publishing Ltd.
- Kerr. KCR., MY. Stoekle, CJ. Dove, LA. Weight, CM. Franciss, & DN. Hebert. 2007. Comprehensive DNA Barcode Coverage of North American Birds. *Molecular Ecology*. 7: 535-543.
- Markert, JA., MC. Denice, RG. Gobell, JS. Gear, A. Kuhn, McGreevy Jr, A. Roth. MJ. Bagley, & DE. Nacci. 2010. Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BMC Evolutionary Biology* 10:205
- McGowan, PJK., GM. Kirwan, & DA. Christie. 2018. Bornean Crested Fireback (*Lophura ignita*). In: del Hoyo, J. Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. (retrieved from <https://www.hbw.com/node/53496> on 9 February 2018).`
- Sukmantoro, W., M. Irham, W. Novarino, F. Hasudungan, N. Kemp, & M. Muchtar, M. 2007. Indonesian Bird Checklist (IBC) no. 2. Indonesian Ornithologists' Union, Bogor
- Thomas RH. 1994. Analyses of DNA from Natural History Museum Collections. *EXS* 69:311-321.