

**STUDI FILOGENETIK ELANG LAUT PERUT PUTIH (*Haliaeetus leucogaster*)
BERDASARKAN DNA BARCODING CYTOCHROME-C OXIDACE SUB UNIT I (COI)**

The Phylogenetic Study of The White-bellied Sea Eagle (Haliaeetus leucogaster) Based on DNA Barcoding Cytochrome-C Oxidase Sub Unit I (COI)

Riri Wiyanti Retnaningtyas, Windri Hermadhiyanti, Dwi Listyorini

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang

E-mail:riri.suryadinata@gmail.com

Abstract: The White-bellied Sea Eagle (*Haliaeetus leucogaster*) is one of the top predators living in the coastal area of Indonesia. This species has the range of distribution in all across Indonesian archipelago. However, this raptor population decreases particularly in the Java southern seas due to illegal hunts and the decreasing quality of their natural habitat. Meanwhile, this bird is still poorly studied in Indonesia. This research focuses on the identification of *Haliaeetus leucogaster* and the phylogenetic study of this species by means of morphometrical analysis and DNA barcode cytochrome-c oxidase sub unit I (COI) in regards to the conservation of this species. The method used in this research is by measuring the morphological characteristics and mitochondrial DNA isolation using *Forward* primer BirdF1 5'- TTC TCC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3' and *Reverse* primer BirdR2 5' ACT ACA TGT GAG ATG ATT CCG AAT-3'. The phylogenetic analysis using MEGA 6 with *Maximum Likelihood* method shows that *Haliaeetus leucogaster* in this study is closely related to *Haliaeetus albicilla*, *Haliaeetus leucocephalus* dan *Haliaeetus pelagicus*.

Keywords: phylogenetic study, *Haliaeetus leucogaster*, morphological characteristics, DNA barcoding, Cytochrome-c Oxidase Sub Unit I (COI)

PENDAHULUAN

Elang laut perut putih merupakan salah satu pemangsa puncak dalam ekosistem pesisir di Indonesia dan dapat berperan sebagai indikator kestabilan ekosistem perairan dan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh keberadaan manusia terhadap ekosistem tersebut (Romin and Muck 1999). Sementara itu, populasi spesies ini, terutama di pesisir selatan Jawa, semakin menurun akibat perburuan liar, perdagangan satwa ilegal, deforestasi dan aktivitas manusia lainnya (Retnaningtyas, 2013).

Retnaningtyas, *et al* (2013) menjelaskan bahwa Elang Laut Perut Putih dewasa memiliki panjang tubuh sekitar 70 – 80 cm, bentang sayap sepanjang 1,8 – 2 meter dan lebar sayap \pm 50 cm. Elang Laut Perut Putih memiliki tubuh yang tertutup oleh bulu berwarna putih dan abu-abu.

Warna iris mata Elang Laut Perut Putih adalah coklat gelap dengan pupil berwarna hitam dan memiliki tonjolan pada bagian atas mata. Pada tarsus hingga cakar, kulitnya tertutup oleh sisik berwarna kekuningan.

Spesies yang digunakan sebagai pembandingan merupakan spesies yang berada dalam satu genus dengan Elang Laut Putih, yaitu Elang Botak (*Haliaeetus leucocephalus*), Elang Laut Steller (*Haliaeetus pelagicus*), Elang Ekor Putih (*Haliaeetus albicilla*) dan Hering Kalkun (*Cathartes aura*) sebagai spesies outgroup atau spesies nenek moyang. Perbedaan karakter morfologi Elang Laut Perut Putih dengan elang lain dari genus *Haliaeetus* ditunjukkan oleh Gambar 1.



Gambar 1. A. Elang Laut Perut Putih (*Haliaeetus leucogaster*), B. Elang Botak (*Haliaeetus leucocephalus*) C. Elang Ekor Putih (*Haliaeetus albicilla*) ,D. Elang Laut Steller (*Haliaeetus pelagicus*)

DNA barcode adalah teknik identifikasi organisme dengan menggunakan sekuen pendek dari DNA mitokondria dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi organisme hingga tingkat spesies dengan cepat dan akurat (Hebert & Gregory, 2005). Salah satu gen yang termasuk Barcode adalah gen *cytochrom-c oksidasesubunit-1 (COI)* yang merupakan salah satu gen mitokondria (mtDNA). Kelebihan gen *COI* dibandingkan dengan gen lainnya adalah panjang seluruh gen *COI* relatif pendek yaitu hanya sekitar 648 bp, memiliki variabilitas rendah (1 – 2%) sehingga cocok untuk menentukan identitas suatu organisme (Zein & Prawiradilaga, 2013), relatif stabil, dan jarang terjadi delesi dan insersi dalam sekuennya (Hebert *et al.*, 2003).

Pohon filogenetik merupakan diagram yang menggambarkan hubungan antar organisme dengan nenek moyang terdekatnya berdasarkan persamaan sifat-sifat yang diturunkan oleh masing-masing kelompok organisme (Gregory, 2008). DNA barcode dapat merekonstruksi filogeni

dengan cara menyeleksi taksa karena DNA barcode digunakan untuk mengidentifikasi hingga tingkat spesies baik pada spesies yang sudah diidentifikasi maupun spesies yang baru ditemukan (Hajibabaei, *et al.*, 2007)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kekrabatan Elang laut perut putih dengan elang lain dari genus *Haliaeetus*.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Elang Laut Perut Putih (*Haliaeetus leucogaster*) dewasa berusia 9 tahun yang telah mengalami domestikasi. Penelitian ini dilakukan dengan cara mengisolasi DNA mitokondria yang diambil dari darah Elang Laut Perut Putih. Darah diambil dari *vena pectoralis subclavia* yang terletak di bagian ventral sayap sebanyak kurang lebih 1 mL kemudian disimpan dalam alcohol 70%. Setelah itu dilakukan prosedur isolasi DNA dari darah menggunakan *High Pure DNA Template PCR kit* dari Roche dengan protokol yang



dimodifikasi. Setelah didapatkan DNA murni hasil isolasi, maka dilakukan *nanodrop* untuk mengetahui kuantitas DNA murni yang didapatkan. Setelah didapatkan kuantitas DNA yang sesuai, dilakukan tahap PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mengamplifikasi gen target dengan sepasang primer. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah Primer universal *Forward* Bird F1 5'-TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' dan Primer *Reverse* Bird R2 5'-ACTACATGTGAGATGATTCCGAATCCAG-3' (Hebert *et al.*, 2004). Hasil amplifikasi kemudian dianalisis menggunakan *software DNA Baser* untuk mendapatkan sekuen consensus forward dan reverse. Kemudian dilakukan analisis menggunakan *software Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk memastikan bahwa fragmen yang didapatkan adalah benar gen *COI*, selanjutnya dilakukan alignment menggunakan *software ClustalX* untuk membuat multiple alignment antara gen *COI* sampel dengan *data base* kerabat dekat yang didapatkan dari *BOLDSystem* yaitu *Haliaeetus leucocephalus*, *Haliaeetus pelagicus*, *Haliaeetus albicilla* dan kelompok outgroup *Cathartes aura*. Selanjutnya dilakukan rekonstruksi topologi filogenetik menggunakan *software MEGA6* dengan menggunakan metode *Maximum Likelihood* (ML) dengan menggunakan model perhitungan algoritmik parameter Kimura-2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

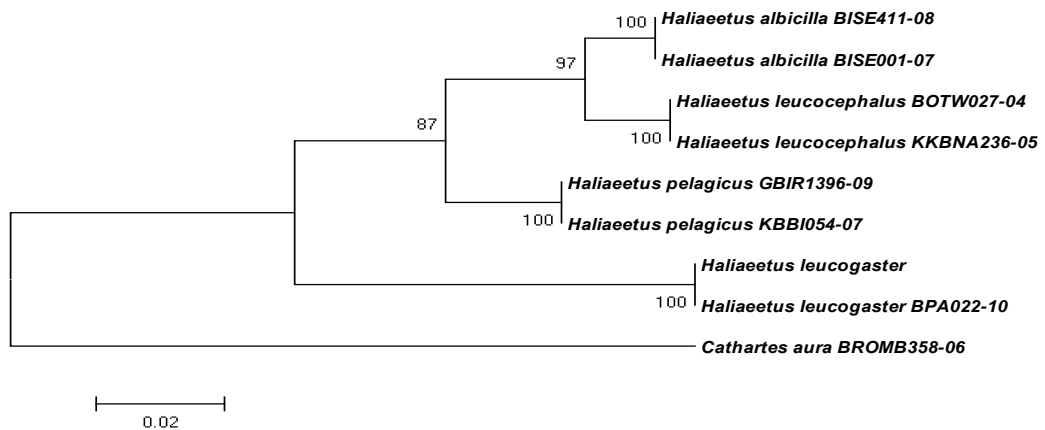
Untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar ketiga spesies tersebut. Maka dari itu, dalam hal ini perlu adanya kajian filogenetik untuk mengetahui

kekerabatan Elang Laut Perut Putih dengan spesies lain anggota genus *Haliaeetus*.

Rekonstruksi topologi pohon filogenetik dilakukan menggunakan metode *Maximum Likelihood*. Metode ini mempertimbangkan untuk masing-masing pohon, jumlah perubahan sekuen atau mutasi yang terjadi yang memberikan variasi sekuen (Dharmayanti, 2011), terutama kemungkinan terjadinya transisi basa nukleotida dari satu nukleotida ke nukleotida lain dalam suatu interval waktu pada masing-masing cabang pohon filogenetik (Dowell, 2005). Gregory (2008) menjelaskan bahwa jika nilai *bootstrap* dari masing-masing topologi menunjukkan hasil lebih dari 50 maka dapat dinyatakan bahwa hasil topologi tersebut benar.

Hasil rekonstruksi topologi pohon filogenetik menunjukkan bahwa *Haliaeetus leucogaster* sampel dalam penelitian ini masih tergolong dalam spesies yang sama dengan *Haliaeetus leucogaster* yang ada di data base voucher BPA022-10 dengan nilai *bootstrap* 100 dan berada pada cabang yang berbeda dengan genus *Haliaeetus* yang lain. Spesies *Haliaeetus leucogaster* berkerabat dekat dengan *Haliaeetus pelagicus*, *Haliaeetus leucocephalus*, dan *Haliaeetus albicilla*. *Haliaeetus leucocephalus* voucher BOTW027-04 dan KKBNA236-05 dan *Haliaeetus albicilla* voucher BISE411-08 dan BISE001-07 merupakan *sister species* yang berada pada *clade* yang sama dengan nilai *bootstrap* 97. *Haliaeetus albicilla*, *Haliaeetus leucocephalus*, dan *Haliaeetus pelagicus* berada pada cluster yang sama dengan nilai *bootstrap* 87. Hasil rekonstruksi topologi filogenetik ditunjukkan pada Gambar 2.





Gambar 2. Hasil rekonstruksi topologi filogenetik menggunakan metode *Maximum Likelihood* yang menunjukkan bahwa *Haliaeetus leucogaster* berkerabat dekat dengan *Haliaeetus pelagicus*, *Haliaeetus albicilla*, dan *Haliaeetus leucocephalus*. Pada masing-masing cabang terdapat angka yang menunjukkan nilai *bootstrap*.

Nenek moyang bersama dari seluruh anggota taksa dari pohon filogenetik tersebut haruslah organisme yang mempunyai sifat-sifat yang dimiliki oleh seluruh keturunannya, yaitu yang berasal dari familia atau genus yang berbeda (Mirabella, 2011). *Cathartes aura* dipilih menjadi outgroup dalam pohon filogenetik karena *Cathartes aurater* termasuk dalam famili Cathartidae yang berbeda family dengan sampel yang tergolong pada family Accipitridae. Hasil topologi filogenetik menunjukkan bahwa *Cathartes aura* berada pada cabang yang terpisah dengan kelompok modern yaitu terletak pada bagian basal.

Analisis jarak genetic merupakan analisis berdasarkan penghitungan matriks dari "jarak" antar pasangan basa antara sekuen yang mendekati jarak evolusioner (Dowell, 2005). Analisis berdasarkan jarak genetic menunjukkan bahwa *Haliaeetus leucogaster* yang menjadi sampel dalam penelitian ini termasuk spesies yang sama dengan *Haliaeetus leucogaster* yang ada di dalam data base dengan voucher BPA022-10. Hal ini ditunjukkan dengan jarak genetic sebesar 0,00, artinya sekuen gen dari *Haliaeetus leucogaster* sampel tidak mengalami mutasi. Jarak genetic dari masing-masing taksa pada pohon filogenetik ditunjukkan pada Gambar 3.

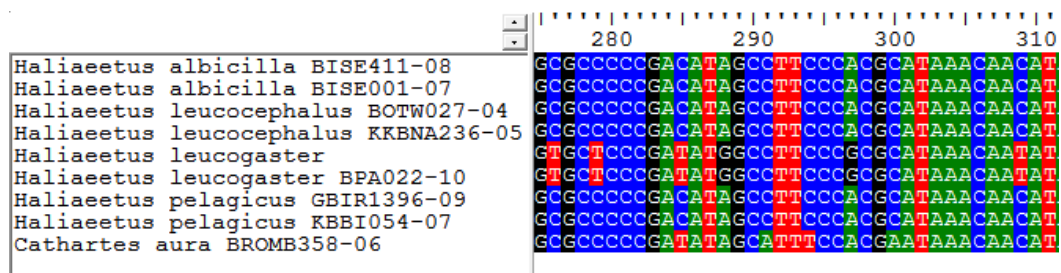
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>Haliaeetus albicilla</i> BISE411-08								
2. <i>Haliaeetus albicilla</i> BISE001-07	0.000							
3. <i>Haliaeetus leucocephalus</i> BOTW027-04	0.024	0.024						
4. <i>Haliaeetus leucocephalus</i> KKBNA236-05	0.024	0.024	0.000					
5. <i>Haliaeetus leucogaster</i>	0.110	0.110	0.116	0.116				
6. <i>Haliaeetus leucogaster</i> BPA022-10	0.110	0.110	0.116	0.116	0.000			
7. <i>Haliaeetus pelagicus</i> GBIR 1396-09	0.051	0.051	0.051	0.051	0.104	0.104		
8. <i>Haliaeetus pelagicus</i> KBBIO54-07	0.051	0.051	0.051	0.051	0.104	0.104	0.000	
9. <i>Cathartes aura</i> BROMB358-06	0.179	0.179	0.189	0.189	0.202	0.202	0.170	0.170

Gambar 3. Hasil analisis jarak genetic yang menunjukkan jarak genetic antara Elang Laut Perut Putih sampel dengan Elang Laut Perut Putih voucher BPA022-10 sebesar 0,00.



Sekuen gen *COI* dari *Haliaeetus leucogaster* sampel sama dengan sekuen gen *Haliaeetus leucogaster* voucher BPA022-10. Bila sekuen gen dari kedua individu *Haliaeetus leucogaster* tersebut dibandingkan dengan sekuen gen *Haliaeetus pelagicus* voucher GBIR1396-09 dan KBBIO54-07; *Haliaeetus leucocephalus* voucher BOTW027-04 dan KKBNA236-05; dan *Haliaeetus albicilla* voucher BISE411-08 dan BISE001-07, maka akan terdapat perbedaan pada beberapa basa karena adanya substitusi basa nukleotida yaitu transisi dan transversi. Hasil perbandingan sekuen Elang Laut Perut Putih dengan

spesies pembandinglainnya, menunjukkan adanya karakter automorfi yang merupakan karakter yang hanya dimiliki oleh Elang Laut Perut Putih dan tidak dimiliki oleh spesies pembanding. Karakter automorfi yang dimiliki oleh sekuen gen Elang Laut Perut Putih antara lain terdapat pada basa 276 ditunjukkan oleh T, basa 279 ditunjukkan oleh T, basa 285 ditunjukkan oleh basa T, basa 288 ditunjukkan oleh basa G, basa 297 ditunjukkan oleh basa G, dan basa 309 ditunjukkan oleh basa T. Karakter automorfi yang dimiliki oleh Elang Laut Perut Putih dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Karakter automorfi yang hanya dimiliki oleh spesies *Haliaeetus leucogaster*.

KESIMPULAN

Berdasarkan kajian filogenetik yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa Elang Laut Perut Putih (*Haliaeetus leucogaster*) pada penelitian ini termasuk dalam spesies yang sama dengan Elang Laut Perut Putih yang ada pada data base (*Haliaeetus leucogaster* voucher BPA022-10) dan berkerabat dekat dengan *Haliaeetus leucocephalus*, *Haliaeetus pelagicus* dan *Haliaeetus albicilla*

DAFTAR PUSTAKA

Dharmayanti, N.L.P. Indi. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. (Online) Diakses tanggal 28 Mei 2014

Dowell, Karen. 2005. *Molecular Phylogenetics An Introduction To Computational Methods And Tools For Analyzing Evolutionary Relationships*. Math 500 : 1-19

Gegory, T. R. 2008. Understanding Evolutionary Trees. *Evo Edu Outreach* 2008(1): 121-137.

Hebert Paul D. N., Alina Cywinska, Shelley L. Ball and Jeremy R. de Waard. 2003. *Biological Identifications Through DNA Barcodes*. Proceeding. The royal society (Online) diakses tanggal 27 mei 2014.

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. 2004. Identification of Birds Through DNA Barcodes. *PLoS Biology* 2004 (2): 6.

Hebert, Paul D. N., T. Ryan Gregory. 2005. *The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy*. *Systematic Biology* 54 (5) :852-859, 2005

Hajibabaei, Mehrdad, Gregory A.C. Singer, Paul D.N. Hebert, Donal A. Hickey. 2007. DNA Barcoding: How It Complements Taxonomy, Molecular Phylogenetics And Population Genetics. *Trends In Genetics* Vol.23 (4) : 167-172.

Mirabella, M. F. 2011. *Pendekatan Pohon dalam Filogenetik*. Bandung: Institut Teknologi Bandung

- Retnaningtyas, Riri Wiyanti, Windri Hermadhiyanti, Dwi Anggorowati Rahayu, Dwi Listyorini. 2013. *The Identification of The White-bellied Sea Eagle (Haliaeetus leucogaster) Based on Morphological Characteristics*. Proceeding. International Conference on Biological Sciences
- Romin, L. A., and Muck, J. A. (1999). *Guidelines For Raptor Protection From Human And Land Use Disturbances*. US Fish and Wildlife Service, Salt LakeCity, UT.
- Zein, M. S. A., & Prawiradilaga, D. M. 2013. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Jakarta: Kencana Prenadamedia Group.

