

Variasi Gen Mitokondria *Cytochrome b* pada Dua Jenis Burung Kakatua Putih (*Cacatua alba* dan *C. moluccensis*)

Dwi Astuti

Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong Science Centre, Jl. Raya Jakarta-Bogor, Cibinong-Indonesia. E-mail: wiek003@yahoo.com

ABSTRACT

Variation in The Mitochondrial Cytochrome b Gene in The Two White Cockatoo Species (*Cacatua alba* and *C. moluccensis*). DNA sequence variation in the 791-bp of mitochondrial cytochrome b gene in the two white cockatoo species (*C. alba* and *C. moluccensis*) were analyzed in this study. Two pairs of internal primers used to amplify two fragments of cytochrome b from 30 individuals cockatoo. The results show that there were genetic variations among individuals of *C. alba* and *C. moluccensis*. Twenty eight haplotypes occurred in 30 individuals studied; 14 haplotypes (Hca1-Hca14) in 16 individuals of *C. alba*, and 14 haplotypes (Hcm1-Hcm14) in 14 individuals of *C. moluccensis*. Hca5 was dominant and owned by 3 individuals (H37, KBS62, 28, BBP88). Within *C. alba* there were 18 variable sites, 0.00701 of nucleotide diversity (Pi), 0.975 ± 0.035 of haplotype diversity (Hd), and 0.005 ± 0.002 of mean genetic distance. Within *C. moluccensis* there were 18 variable sites, 0.00830 of Pi, and 0.9999 ± 0.028 of Hd, and 0.010 ± 0.002 (0.001-0.010) mean genetic distance. Divergence between *C. alba* and *C. moluccensis* was 0.064 ± 0.088 %. Neighbor-joining (NJ) analysis showed two main clusters consisted of : *C. alba* and *C. moluccensis* separately, and indicated that although there were some variations in the DNA sequences, but the individuals within a species remain clustered in the same cluster.

Key words: genetic variation, mitochondrial cytochrome b, cockatoo bird, *Cacatua alba*, *Cacatua moluccensis*

PENDAHULUAN

Di dunia terdapat 11 jenis kakatua putih yg termasuk dalam marga *Cacatua*. Enam jenis diantaranya terdapat dan endemik di kepulauan Indonesia, dan *C. alba* dan *C. moluccensis* merupakan kakatua yang endemik di kepulauan Maluku. Menurut Forshaw (1989) secara umum burung kakatua memiliki jambul di kepalanya dan paruh besar yang melengkung dan kuat. *C. moluccensis* memiliki bulu tubuh dengan warna pink,

panjang tubuh 52 cm. *C. alba* bulu tubuhnya putih dengan panjang tubuh 46 cm.

Saat ini populasi kedua jenis kakatua tersebut di alam cenderung mengalami penurunan, sehingga tercatat dalam dan menjadi prioritas dalam World Conservation Union, IUCN 2006, dan termasuk ke dalam to appendics CITES; dimana *C. moluccensis* di dalam appendics I dan *C. alba* di dalam appendics II.

Untuk tujuan konservasi dari kedua jenis kakatua ini, maka berbagai penelitian dan kegiatan lain dilakukan baik secara *ex-situ* maupun *in-situ*. Semenjak penangkaran diketahui berperan penting di dalam mekanisme konservasi satwa langka, maka upaya konservasi kedua jenis kakatua ini dilakukan di beberapa Taman Margasatwa dan penangkaran. Dari perspektif konservasi, harus diprioritaskan pada kuantifikasi dan karakterisasi tingkat diversitas genetiknya bagi semua satwa terancam punah, karena ini dapat menuntun kita dalam mengevaluasi efek genetik dari perubahan populasi pada masa mendatang dan dapat dijadikan sebagai petunjuk dalam pengelolaan konservasi yang bertujuan untuk menjaga tingkat diversitas saat sekarang (Roques & Negro 2005). Satwa terancam punah memiliki ciri dengan tingkat variasi genetik yang rendah, khususnya bila dibandingkan dengan jenis kerabat yang tidak terancam punah (Ardern & Lambert 1997; Spielman *et al.* 2004). Jadi diperlukan pengetahuan tentang variasi ditingkat molekuler dengan menggunakan analisis penanda molekuler.

Penanda molekuler telah berguna untuk menjawab berbagai pertanyaan menyangkut upaya konservasi dan biologi populasi pada berbagai jenis burung, misal pada *S. albifrons* (Whittier *et al.* 2006). DNA mitokondria adalah penanda genetik yang sangat penting digunakan dalam mempelajari evolusi, kekerabatan, dan variasi genetik pada berbagai taxa hewan (Kocher *et al.* 1989, Ingman *et al.* 2000) dan juga sering digunakan untuk mengevaluasi diversitas genetik pada berbagai jenis burung (Gill *et al.* 2005; Martens *et al.* 2006).

Cytochrome b adalah salah satu dari gen pada mitokondria yang mengkode protein dan diketahui sebagai penanda DNA dalam mengungkap sejarah evolusi hewan (Kocher *et al.* 1989; Montgelard *et al.* 1997; Prusak *et al.* 2004) bahkan untuk mempelajari variasi genetik pada tingkatan jenis maupun marga pada mamalia, burung, reptile, ikan dan hewan vertebrata lainnya. Pada ikan marga *Cynolebia*, *cytochrome b* menunjukkan tingkat divergensi sekuen yang tinggi (28 %) antara jenis-jenis ikan tersebut (Garcia *et al.* 2000), namun pada *Macruronus* menunjukkan kurangnya diferensiasi genetik (Olavarria *et al.* 2006).

Pada penelitian ini dilakukan analisis pada sekuen DNA dari mitokondria *cytochrome-b* pada dua jenis burung kakatua; *Cacatua alba* dan *C. moluccensis* untuk mengetahui variasi genetik diantara individu dalam satu jenis (*intraspecies*) maupun beda jenis (*interspecies*).

BAHAN DAN CARA KERJA

Tiga puluh (30) sampel darah dari masing-masing individu burung kakatua (*C. alba* dan *C. moluccensis*) dikoleksi dari taman Margasatwa, penangkaran, maupun Taman Burung di Indonesia. Darah dipreservasi dengan etanol absolut di dalam tabung plastik 2 mL dan disimpan dalam almari es pada temperatur 4 °C di Laboratorium Genetika, Bidang Zoologi-Puslit Biologi_LIPI, Cibinong. DNA total diekstraksi dari masing-masing sampel, dengan menggunakan DNA Extraction Mini Kit Qiagen. Larutan DNA yang didapat di simpan dalam almari es 4 °C dan untuk selanjutnya digunakan pada

proses analisis berikutnya. *Probociger aterrimus* digunakan sebagai *outgroup* dalam mengkonstruksi pohon NJ.

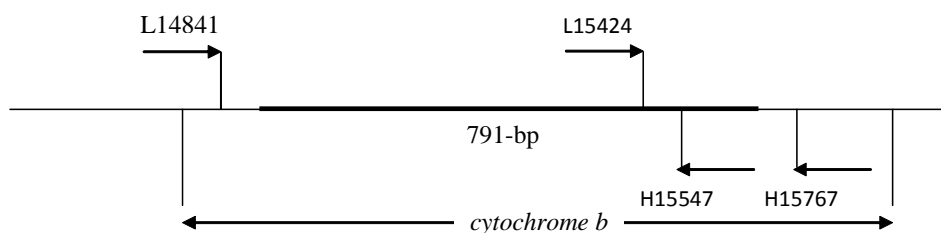
Dua fragmen dari gen *cytochrome b* diamplifikasi melalui proses PCR dengan menggunakan dua pasang primer internal: L14841 (Kocher *et al.* 1989) / H 15547 dan L15424/H15767 (Edwards *et al.* 1991). Posisi primer-primer ini digambarkan pada Figure 1. Larutan untuk PCR dibuat dalam volume 20 μ L, dan dalam kondisi 35 siklus dari (denaturasi 94°C - 1 menit; penempelan 52°C - 1 min; ekstensi 72°C - 2 menit) dan dilengkapi dengan 1 x siklus pada 72°C - 10 min. Selanjutnya 3 μ L dari produk PCR dielektroforesis pada 1 % gel agarose dan direndam dalam larutan ethidium bromide, dan divisualisasi di bawah ultraviolet illuminator. Sisa larutan produk PCR dipurifikasi dengan QIAquick (QIAGEN) dan kemudian disekuensekan DNA-nya pada dua sisi (forward-reverse) using the ABI Prism™ 3100 automated sequencer. Primer yang digunakan sama dengan primer PCR.

Proses mensejajarkan (align) sekuen DNA dari semua individu yang diteliti, dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak ProSeq software. Karakter data sekuen DNA

seperti komposisi basa, substitusi transisi-transversi, jarak genetik, situs bervariasi, dan sekuen variasi dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA3 (Kumar *et al.* 2004). Diversitas nukleotida dan diversitas haplotipe dianalisis dengan perangkat lunak DnaSP4. Data tersebut juga dikonfirmasi ke asam amino untuk mengetahui apakah fragmen DNA yang teramplifikasi adalah benar-benar target yang diinginkan. Untuk mengkonfirmasi bahwa variasi genetik yang terdapat diantara individu dalam satu spesies tidak mempengaruhi dalam pengelompokannya, maka dikonstruksi pohon neighbor-joining (Saitou & Nei 1987) berdasarkan Kimura's 2-parameter distance pada MEGA3 dan nilai bootstrap dianalisis dengan 1000 x pengulangan.

HASIL

Pasangan primer L14841/ H 15547 mengamplifikasi fragmen DNA sepanjang sekitar 760-bp, sedangkan L15424-H15767 mengamplifikasi fragmen 370-bp. Pada proses mensejajarkan data sekuen DNA (align), sepanjang sekitar 100-bp data sekuen posisinya *overlapping* diantara dua set primer tersebut. Disamping itu,



Gambar 1 Posisi dari primer-primer yang digunakan dalam mengamplifikasi gen *cytochrome b*. Garis tebal dengan angka 791- bp adalah posisi dan panjang sekuen DNA yang dianalisis pada penelitian ini.

beberapa data sekuen DNA dari beberapa individu kakatua yang diteliti tidak lengkap, sehingga hanya 791-bp yang dianalisis pada penelitian kali ini. Hasil dari proses menterjemahkan data sekuen DNA menjadi asam amino, menunjukkan bahwa fragmen ataupun sekuen DNA yang teramplifikasi, benar-benar merupakan gen target, ini ditunjukkan dengan tidak terdapatnya *stop codon* sebagai ciri khas dari gen pengkode protein.

Komposisi basa timin, sitosin, adenin, dan guanin pada sekuen DNA *cytochrome b* sepanjang 791-bp ditampilkan dalam Tabel 1. Komposisinya meliputi 40,3 % basa purine dan 59,7 % basa pirimidin. Komposisi guanin paling rendah (14,2 %) dan sitosin tertinggi (34,2 %). Ini juga terlihat pada *cytochrome b* baik pada *C. alba* maupun *C. moluccensis* jika kedua spesies ini dianalisa secara terpisah.

Substitusi transisi dan transversi

Transisi merupakan substitusi antara dua basa purin (adenin dan guanin) atau

antara dua basa pirimidin (timin dan sitosin). Transversi merupakan substitusi basa antara purin dan pirimidin. Table 2 menampilkan frekuensi substitusi basa yang terjadi pada 30 data sekuen *cytochrome b* sepanjang 791-bp, terdapat 23 substitusi yang bersifat transisi, yang meliputi 11 purin (T <--> C) dan 12 pirimidin (A <--> G). Sedangkan substitusi transversi hanya 5. Jumlah transisi lebih banyak dari transversi, ditunjukkan baik pada *C. alba* maupun *C. moluccensis*.

Pada 30 individu yang dianalisis, substitusi basa terjadi paling banyak pada posisi codon 3 (20 substitusi) diikuti codon pertama (5 substitusi) dan kedua (4 substitusi). Begitu juga jika analisis dilakukan secara terpisah, baik pada *C. alba* maupun *C. moluccensis* menunjukkan substitusi basa yang juga mengikuti pola yang sama yaitu substitusi paling banyak terjadi pada posisi codon ketiga, diikuti posisi pertama dan kedua (Tabel 2).

Jarak genetik antara individu-individu *C. alba* dengan *C. moluccensis*

Tabel 1 : Komposisi basa di dalam 791-bp gen *cytochrom b* pada kakatua yang diteliti

Posisi codon	Komposisi basa											
	<i>C. alba</i>				<i>C. moluccensis</i>				<i>(C. alba & C. moluccensis)</i>			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
Total	25.8	34.0	26.5	13.7	25.5	34.4	25.7	14.4	25.5	34.2	26.1	14.2
ke-1	23.5	29.2	24.8	22.6	23.3	29.1	24.8	22.8	23.6	29.0	24.8	22.6
ke-2	38.6	28.0	20.0	13.4	38.4	28.0	20.3	13.3	38.5	27.6	20.1	13.7
ke-3	15.3	44.7	34.9	5.1	14.9	46.2	32.0	6.9	14.4	46.1	33.4	6.2

(*between species*) adalah 0.064 ± 0.088 . Sedangkan jarak genetik di antara individu-individu di dalam satu jenis (*within species*) kakatua adalah 0.005 ± 0.002 ($0.001 - 0.015$) pada *C. alba*, dan 0.010 ± 0.002 ($0.001-0.010$) pada *C. moluccensis*.

Variasi sekuen DNA, diversitas nukleotida, haplotipe, dan diversitas haplotipe.

Dari semua data sekuen DNA sepanjang 791-bp pada 30 individu kakatua, terjadi substitusi basa pada 63 situs, ini menunjukkan adanya situs yang bervariasi (*variable sites*) sebesar sekitar 8,8 % . Di antara individu-individu *C. alba* terdapat 18 (2,42 %) situs yang bervariasi , dan di antara individu-individu *C. moluccensis* terdapat 19 (2,44 %) situs yang bervariasi. Terdapatnya substitusi basa diantara sekuen DNA *cytochrome b* ini memperlihatkan adanya susunan basa yang bervariasi dan juga tipe substitusi basanya, sehingga pada penelitian ini terdeteksi adanya haplotipe-

haplotipe dari sekuen DNA gen *cytochrome b*, baik diantara maupun antara jenis kakatua yang diteliti.

Jumlah situs yang mengalami substitusi diantara dua jenis *C. alba* dan *C. moluccensis* relatif sedikit bahkan kurang dari 10 %. Namun demikian dari sejumlah situs yang bervariasi itu menghasilkan nilai diversitas nukleotida maupun diversitas haplotipe yang tinggi.

Analisis dari seluruh 30 individu (16 *C. alba* dan 14 *C. moluccensis*) yang diteliti secara keseluruhan terdapat 28 haplotipe di dalam 791- bp *cytochrome b*. Haplotipe ini meliputi 14 haplotipe (Hca1-Hca14) terdapat pada *C. alba*, dan 14 haplotipes (Hcm1-Hcm14) pada *C. moluccensis*. Tiga individu (H37, KBS62, dan BBP88) memiliki haplotipe yang sama yaitu Hca5. Ini artinya bahwa haplotipe Hca5 adalah paling dominan dan ketiga individu tersebut memiliki urutan sekuen DNA yang sama atau tidak terjadi substitusi basa diantara ketiganya. Mengejutkan, bahwa di antara individu-individu *C. moluceensis*, tidak

Table 2 : Rata-rata frekuensi substitusi basa di dalam 791-bp dari *cytochrome b* pada *C. alba* dan *C. moluccensis*

Positi kodon	<i>C. alba</i>			<i>C. moluccensis</i>			<i>C. alba + C. moluccensis</i>		
	ii	si	sv	ii	si	sv	ii	si	sv
Total	785	4	2	783	5	3	763	23	5
Ke-1	263	1	0	262	1	1	259	4	1
Ke-2	263	0	1	263	0	1	261	2	2
Ke-3	259	3	1	258	4	1	243	18	2

Catatan: ii = pasangan identik, si = transisi, sv = transversi.

ada satupun individu yang memiliki urutan sekuen DNA yang sama. Sehingga ini memunculkan haplotipe yang berbeda satu dengan lainnya dan tidak ada haplotipe yang dominan pada *C. moluccensis*. Situs yang bervariasi, variasi sekuen DNA, dan gambaran haplotipe disajikan pada Tabel 3.

Parameter diversitas meliputi banyaknya variasi, diversitas nukleotida, jumlah dan diversitas haplotipe yang terdapat pada sekuen DNA *cytochrome b* pada semua individu (Tabel 4).

Tabel 4 menunjukkan, bahwa diversitas nukleotida dan haplotipe dari *C. moluccensis* relatif lebih tinggi dari *C. alba*.

Analisis Neighbor-joining

Analisis pohon Neighbor-joining (NJ) menghasilkan 2 kelompok yang terpisah secara jelas yaitu: 1) kelompok yang terdiri dari individu-individu *C. alba*, dan 2) kelompok individu-individu *C. moluccensis*, yang masing-masing didukung dengan nilai bootstrap 100 %. Kedua jenis dipisahkan dengan divergensi sekuen 6,4 %. Kelompok *C. alba* terbagi menjadi 2 kelompok utama, sedangkan pada *C. moluccensis* dua individu Bn9 dan Bn10 terpisah dari individu-individu lainnya. Individu-individu *C. moluccensis* dengan kode BBP terpisah dari individu-individu TMR dan KBY, namun pengelelompokan di dalam kelompok *C. alba* maupun kelompok *C. moluccensis* hanya didukung nilai bootstrap kurang dari 50 %. Pohon NJ (Gambar 2) memperlihatkan bahwa individu-individu satu jenis mengelompok pada kelompok yang sama.

DISKUSI

Komposisi basa pada kedua kakatua ini sesuai dengan *cytochrome b* pada burung lain (e.g Turdus: Pan *et al.* 2007), vertebrata lain (Prusak & Grzybowski 2004) termasuk ikan (Abol-Munafi *et al.* 2007). Ciri khas dari gen pengkode protein termasuk *cytochrome b* adalah komposisi guanin menempati paling rendah dan sitosin yang tertinggi (Avice 1994). Seperti yang dikatakan oleh Brown *et al.* (1982) bahwa biasanya substitusi transisi lebih dominan terjadi dibandingkan dengan transversasi. Basa purin (A dan G) memperlihatkan terjadinya saturasi pada tingkat divergensi yang rendah dibandingkan pirimidin (T dan C), itu menyebabkan frekuensi A dan G menjadi jauh berbeda dari frekuensi C dan T (Kocher & Carleton 1997). Pola substitusi basa dimana substitusi paling banyak terjadi pada posisi codon ketiga, diikuti posisi pertama dan kedua, ini sesuai dengan pola substitusi pada DNA mitokondria khususnya gen *cytochrome b* pada beberapa kelompok burung lainnya misalkan Turdus (Pan *et al.* 2007).

Hasil analisis terhadap jarak genetik menunjukkan dengan pasti, bahwa antara dua jenis yang berbeda memiliki jarak genetik lebih tinggi dibandingkan dengan di antara individu-individu pada jenis yang sama (*intraspecies*). Rata-rata jarak genetik antara individu pada *C. moluccensis* (0.010 ± 0.002) lebih tinggi dari *C. alba* (0.005 ± 0.002), dan jarak di antara kedua jenis adalah 0.064 ± 0.088 . Jarak genetik pada *Oryx* 0.062 (Khan *et al.* 2008). Dilaporkan Dai *et*

Table 3 : Situs nukleotida yang bervariasi dan tipe haplotipe di dalam 791-bp sekuen DNA dari gen cytochrome b

No Sampel	Jenis	Situs nukleotida yang bervariasi																														Haplotipe
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1	Bn11	A	A	C	T	A	G	A	A	G	T	A	G	C	T	C	C	T	G	A	A	C	T	A	C	G	G	A	C	A	Hca1	
2	Bn12	Hca2	
3	H35	G	Hca3		
4	H36	G	.	.	.	A	.	G	.	.	.	T	Hca4		
5	H37	G	Hca5		
6	H38	A	.	Hca6	
7	BPP6	.	.	.	C	.	.	G	G	C	.	T	Hca7		
8	KBY5	G	G	.	.	.	T	Hca8		
9	KBS62	G	A	.	G	G	Hca9		
10	KBS67	A	Hca10		
11	BBP88	G	Hca11		
12	BBP19	G	G	G	T	Hca12		
13	BBP20	G	C	G	C	Hca13		
14	TMI16	G	C	G	A	Hca14		
15	TMR57	G	C	G	A	Hca15		
16	TMR58	G	C	G	.	.	.	T	.	.	.	A	Hca16		
17	BN9	G	.	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	A	C	.	.	A	.	G	T	G	Hcm1	
18	BN10	G	.	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	A	C	.	.	A	.	G	.	G	Hcm2	
19	BBP13	G	C	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	G	.	.	G	T	G	Hcm3		
20	BBP14	G	C	T	C	.	A	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	G	.	.	G	T	G	Hcm4	
21	BBP78	G	C	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	G	.	.	G	T	G	Hcm5		
22	BBP79	G	C	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	G	.	.	G	T	G	Hcm6		
23	BBP80	G	C	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	G	.	.	G	T	G	Hcm7		
24	BBP81	G	C	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	G	.	.	G	T	G	Hcm8		
25	KBY2	G	.	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	A	C	.	.	A	.	G	T	G	Hcm9	
26	TMR52	G	.	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	.	.	A	.	G	T	G	Hcm10	
27	TMR53	G	C	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	.	.	T	A	.	G	T	G	Hcm11
28	TMR54	G	.	T	C	.	A	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	.	.	A	.	G	T	G	Hcm12
29	TMR55	G	.	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	.	.	A	.	G	T	G	Hcm13	
30	TMR56	G	.	T	C	.	G	C	T	G	A	C	G	A	C	T	T	A	C	G	G	.	C	.	.	A	.	G	T	G	Hcm14	

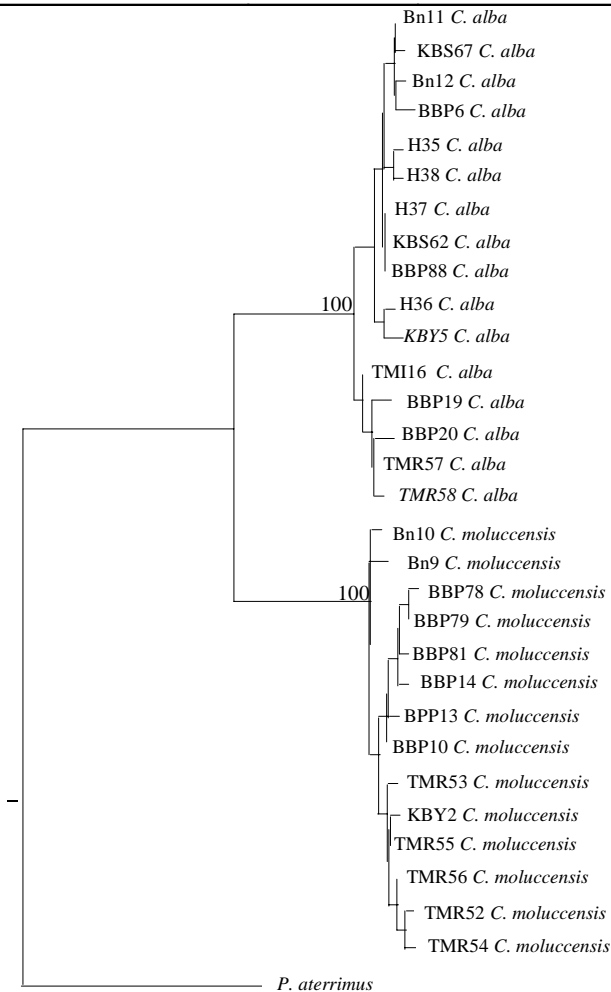
Tabel 3. Lanjutan

No	Sampel	Jenis	Situs nukleotida yang bervariasi																																		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30					
1	Bn11	<i>C. alba</i>	C	C	A	A	T	C	A	A	T	C	A	C	G	G	T	A	C	C	G	A	G	T	C	T	A	H	eal								
2	Bn12	<i>C. alba</i>	H	ea2			
3	H35	<i>C. alba</i>	H	ea3			
4	H36	<i>C. alba</i>	H	ea4			
5	H37	<i>C. alba</i>	H	ea5			
6	H38	<i>C. alba</i>	H	ea6			
7	BPP6	<i>C. alba</i>	H	ea7			
8	KBY5	<i>C. alba</i>	T	H	ea8			
9	KBS62	<i>C. alba</i>	H	ea9		
10	KBS67	<i>C. alba</i>	H	ea10		
11	BBP88	<i>C. alba</i>	T	H	ea11		
12	BBP19	<i>C. alba</i>	G	H	ea12		
13	BBP20	<i>C. alba</i>	G	H	ea13	
14	TMI16	<i>C. alba</i>	G	H	ea14	
15	TMR57	<i>C. alba</i>	G	H	ea15	
16	TMR58	<i>C. alba</i>	G	H	ea16
17	BN9	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em1	
18	BN10	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em2	
19	BBP13	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em3	
20	BBP14	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em4	
21	BBP78	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	A	G	G	G	H	em5	
22	BBP79	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em6	
23	BBP80	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em7	
24	BBP81	<i>C. moluccensis</i>	.	.	C	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em8	
25	KBY2	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em9	
26	TMR52	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	A	G	G	G	H	em10	
27	TMR53	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em11	
28	TMR54	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em12	
29	TMR55	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em13	
30	TMR56	<i>C. moluccensis</i>	.	.	T	G	C	T	C	.	G	G	G	H	em14	

Variasi Gen Mitokondria *Cytochrome b* pada Dua Jenis Burung

Table 4. Parameter-parameter diversitas mitokondria DNA gen *cytochrome b* di dalam 791-bp pada dua jenis kakatua (*C. alba* dan *C. moluccensis*)

Parameter genetika	<i>C. alba</i>	<i>C. moluccensis</i>	Total
Jumlah individu (n)	16	14	30
Jumlah situs bervariasi (S)	18	19	63
Diversitas nukleotida/ asam amino (Pi)	0,00701	0,00830	0,03353
Jumlah haplotipe (h)	14	14	28
Diversitas haplotipe (Hd):	0.975 ± 0.035	0.9999 ± 0.027	0.991 ± 0.012



Gambar 2. Pohon Neighbor-joining (NJ) dari 30 individu *C. alba* dan *C. moluccensis* yang dikonstruksi berdasarkan substitusi transisi dan transversi pada 791 bp sekuen DNA gen *cytochrome b*. Nilai-nilai bootsrap di bawah 50 % tidak ditampilkan.

al. (2010), bahwa divergensi sekuen DNA *cytochrome b* di antara individu-individu pada jenis burung yang sama (within species) berkisar dari 0 (*Parus dichrous*) hingga 2,8 % (*Aegithalos concinnus*), dan antara dua jenis dalam satu marga sebesar $8,10 \pm 0.007$ (*Aegithalos*) dan 0.077 ± 0.005 (*Parus*). Individu-individu dari populasi yang sama dibedakan oleh 1 % divergensi sekuen, sedangkan divergensi sekuen antara lokasi yang berbeda sebesar 0.25% - 8%, dan antara dua jenis 3 %- 21 %. Divergensi intraspesifik secara ekstrim bervariasi dari 0 hingga 1% pada sebagian besar kasus tetapi bisa lebih tinggi pada beberapa jenis burung (4.1% antara dua individu *S. collaris*, dan 5.3%-6.3% di antara *S. castaneiventris* (Lijtmaer *et al.* 2004).

Jumlah situs yang bervariasi diantara individu pada jenis yang sama pada kedua kakatua ini tidak lebih dari 10 %, tetapi kedua kakatua ini memiliki nilai diversitas tinggi. Dilaporkan oleh Germin *et al.* (2007) bahwa di antara populasi burung *Alectoris chukar* diversitas haplotipenya tinggi (0,85 %) demikian juga dengan diversitas nukleotidanya di dalam populasi 0,17 % - 0, 25 %. Pada burung Taiko yang berstatus terancam punah juga memiliki diversitas haplotipe (0,68 %) dan nukleotida (0,13 %) (Lawrence & Taylor 2008), dan pada mamalia kecil (*Lontra felina*) yang terancam punah dengan diversitas haplotipe 0.86 dan diversitas nukleotida 0.0117 (Valqui *et al.* 2010). Tingginya nilai diversitas dipengaruhi oleh beberapa faktor misalnya karena seleksi terkadang

mendukung retensi keanekaragaman genetik yang sangat tinggi dalam populasi kecil dan terisolasi (Kaeuffer *et al.* 2007), kemungkinan kenyataan bahwa ada burung yang belum ditemukan berbiak di tempat lain, sehingga dapat meningkatkan estimasi ukuran populasi. Keanekaragaman genetik relatif tinggi pada jenis langka dapat menunjukkan bahwa penurunan jumlah populasi tersebut terjadi relatif baru-baru ini (Moritz 1994).

Tingginya keanekaragaman genetik walaupun secara substansial ada penurunan populasi telah ditunjukkan pada satwa berumur panjang dengan kematangan seksual tertunda seperti burung Taiko (Lawrence & Taylor, 2008), Ornate Box Turtle *Terrapene ornate* (Kuo &Janzen 2004) ; Orang-utan *Pongo pygmaeus* (Goossens *et al.* 2005), Copper Redhorse *Moxostoma hubbsi* (Lippe *et al.* 2006). Hal ini menunjukkan bahwa ciri-ciri sejarah kehidupan generasi lama dan kematangan seksual yang tertunda dapat menjadi buffer (penyangga) hilangnya variasi genetik, terutama ketika penurunan terjadi baru-baru ini. Teori genetika populasi memprediksi bahwa *severe bottlenecks* tidak dapat secara drastis mengurangi keragaman genetik ketika mereka berakhir dengan jumlah populasi yang kecil (Amos & Balmford 2001). Kakatua juga merupakan burung berumur panjang, bisa hidup mencapai umur 80 tahun dan reproduksi lambat dengan dewasa kelamin dicapai paling cepat pada umur 3-4 tahun (Forshaw 1989), sehingga bisa mengurangi tingkat pergeseran genetik tetapi juga memperlambat pemulihan jumlah populasinya. Jadi wajar jika pada

kakatua yang diteliti di sini memiliki nilai diversitas genetik yang tinggi, walau populasi di alam mengalami penurunan. Dari hasil ini diharapkan dapat memberikan informasi dasar dalam program pelestarian burung kakatua baik di alam maupun di penangkaran. Seperti dikatakan oleh Iyengar *et al.* (2007) bahwa perspektif yang memiliki nilai global tentang program penangkaran yang lebih efektif, adalah dengan perlunya mengetahui dan merawat diversitas genetik untuk menjaga jenis-jenis terancam punah, dan dimungkinkan dalam mendukung upaya konservasi ini, karena secara nyata dapat berkontribusi di dalam program penangkaran dan strategi reintroduksi untuk konservasi berbagai satwa yang terancam punah (Russello & Amato 2007).

Secara keseluruhan rata-rata jumlah basa yang bervariasi (k) dan nilai diferensiasi pada *C. alba* lebih rendah dari *C. moluccensis*. Demikian juga untuk nilai diversitas nukleotida dan diversitas haplotipe. Pada penelitian ini tidak diketahui lokasi maupun populasi individu-individu tersebut, karena sampel darah dikoleksi dari individu-individu yang sudah berada di taman Margasatwa maupun tempat penangkaran. Ini kemungkinan individu-individu berasal dari populasi yang berbeda, bahkan mungkin dari pulau-pulau yang berbeda, atau berkaitan dengan isolasi geografiknya (Randi *et al.* 2006). Seperti dikatakan oleh Forshaw (1989) bahwa *C. moluccensis* hanya tersebar di Ceram, Saparua and Haruku, dan *C. alba* terdistribusi Obi, Bacan, Halmahera. Dikatakan bahwa perbe-

daan sejarah populasi dan hidup serta ekologi reproduksi hewan dapat berefek pada kecepatan penurunan dan diversitas genetiknya (Kuo & Janzen 2004).

Nilai divergensi sekuen atau jarak genetik antara individu-individu satu jenis dan antara individu-individu beda jenis kakatua, sangat jelas bedanya. Perbedaan jarak genetik ini berimplikasi pada pengelompokan yang terjadi pada hasil analisis neighbor-joining, dimana individu-individu beda jenis pada penelitian ini berada pada kelompok yang berbeda dan individu-individu sejenis mengelompok pada kelompok yang sama, seperti ditunjukkan pada pohon NJ.

KESIMPULAN

Jumlah situs yang mengalami substitusi basa dan bervariasi pada individu-individu sejenis kurang dari 10 % dari panjang basa *cytochrome b* yang dianalisis, namun diversitas nukleotida/asam amino maupun haplotipe pada individu-individu *C. alba* maupun *C. moluccensis* yang diteliti, relatif tinggi. Analisis neighbor joining memisahkan kelompok antara *C. alba* dan *C. moluccensis*, dengan nilai divergensi sekuen 6,4 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada sdr. Agus Kundarmasno dan Alwin Marakamah yang telah membantu dalam proses koleksi sampel darah, staf di Laboratorium Genetika, Bidang Zoologi-Puslit Biologi LIPI atas kerjasamanya. Penelitian ini didukung oleh JICA

Konservation Project dan JSPS Core University Project.

DAFTAR PUSTAKA

- Abol-Munafi AB, MA. Ambak, P.Ismail, BM. Tam. 2007. Molecular data from the *cytochrome b* for phylogeny of Channidae (channa sp.) in Malaysia. *Biotechnology* 6 (1): 22-27.
- Amos W, & A. Balmford. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* 87:257– 265
- Ardern SL, DM.Lambert 1997. Is the Black Robin in genetic peril? *Mol Ecol* 6:21–28
- Avise JC. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2nd edn. Sinauer Associates, Massa-chusetts
- Brown WM, EM. Prager, A. Wang, & AC. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225–239.
- Crochet, PA., JD. Lebreton, & F. Bonhomme. 2002. Systematics of large white-headed gulls: patterns of mitochondrial DNA variation in western European taxa. *Auk* 119: 603-620.
- Dai C, K. Chen, R. Zhang, X. Yang, Z. Yin , H. Tian, Z. Zhang, Y. Hu, F. Lei. 2010. Molecular phylogenetic analysis among species of Paridae, Remizidae and Aegithalos based on mtDNA sequences of COI and cyt b. *Chinese Birds* 1(2):112–123
- Edwards SV, P. Artander, & AC.Wilson. 1991. Mitochondrial resolution of a deep branch in the geneological tree for perching birds. Proceedig Royal Society london. *Science* 243: 99-107.
- Forshaw JM. 1989. Parrots of the World. Tird Edn. Lansdowne Editions, Sydney, Australia.
- Garci AG, G. Wlasiuk & EP. Lessa. 2000. High levels of mitochondrial *cytochrome b* divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zool. J. Linnean Soc.* 129: 93–110
- Gill FB, B. Silkas, FH. Sheldon. 2005. Phylogeny of titmice (Paridae): II. Species relationships based on sequences of the mitochondrial cytochrome-b gene. *Auk*. 122:121–143.
- Goossens B, L. Chikhi, MF. Jalil, M.Ancrenaz, I. Lackman Ancrenaz, M. Mohamed, P. Andau, & MW. Bruford. 2005. Patterns of genetic diversity and migration in increasingly fragmented and declining Orang-utan (*Pongo pygmaeus*) populations from Sabah, Malaysia. *Mol. Ecol.* 14:441–456
- Guerrini, M., P. Panayides, P. Hadjigerou, L.Taglioli, F. Dini., & F. Barbanera. 2007. Lack of genetic structure of Cypriot *Alectoris chukar* (Aves, Galliformes) populations as inferred from mtDNA sequencing data. *Animal Biodiv. Cons.* 30.1: 105–114.
- Ingman M, H. Kaessmann, S. Paabo., & U. Gyllensten. 2000. Mitochondrial genome variation and the

- origin of modern humans. *Nature* 408: 708-713.
- IUCN (The World Conservation Union). 2006. 2006 IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org>, Cited 13 Nov 2006
- Iyengar A, T. Gilbert, T. Woodfine, JM. Knowles. 2007. Remnants of ancient genetic diversity preserved within captive groups of scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Mol. Ecol.* 16: 2436-2449.
- Kaeuffer R, DW. Coltman, JL. Chapuis, D. Pontier, & D. Reale. 2007. Unexpected heterozygosity in an island Mouflon population founded by a single pair of individuals. *Proc Royal. Soc B* 274:527-533.
- Kocher TD, WK. Thomas, A. Meyer, SV. Edwards, S. Paabo, FX. Villablanca, & AC. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*.86: 6196-200.
- Kocher RD & KL Carleton. 1997. Base substitution in fish mitochondrial DNA: patters and rates. In *Molecular systematics of Fish*. Kocher, TD and Ca Stepien (Eds.). Academic Press: San Diego.
- Kuo C-H, & FJ. Janzen. 2004. Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of Ornate Box Turtles (*Terrapene ornata*). *Cons. Gen.* 5:425-437
- Khan HA, IA. Arif, AA. Al Homaidan, & AH. Al Farhan. 2008. Application of 16S rRNA, *cytochrome b* and control region sequences for understanding the phylogenetic relationships in *Oryx* species. *Cons.Gen.* 9:1293-1301
- Kumar S, K. Tamura, & M. Nei. 2004. MEGA3. Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163
- Lijtmaer DA, NMM. Sharp, PL. Tubaro, SC. Loughheed. 2004. Molecular phylogenetics and diversification of the genus *Sporophila* (Aves: Passeriformes). *Mol.Phyl.Evol.* 33: 562-579
- Lippe C, P. Dumont, L. Bernatchez (2006). High genetic diversity and no inbreeding in the endangered Copper Redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time. *Mol Ecol* 15:1769-1780
- Martens J, DT. Tietze, & YH. Sun. 2006. Molecular phylogeny of *Parus* (*Periparus*), a Eurasian radiation of tits (Aves: Passeriformes: Paridae). *Zool. Abh. Mus. Tierkd Dresden.* 55:103-120.
- Montgelard C, FM. Catzeflis, E. Douzery. 1997. Phylogenetic relationships of artiodactyls and cetaceans as deduced from comparison of *cytochrome b* and 12S rRNA mitochondrial sequences. *Mol. Biol Evol.* 14: 550-9.
- Moritz, C. 1994 Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Mol Ecol.* 3:401-411
- Olavarria C, F. Balbontin, R. Bernal, & C. Baker. 2006. Lack of divergence

- in the mitochondrial *cytochrome b* gene between *Macruronus* species (Pisces: Merlucciidae) in the Southern Hemisphere. Short communication. *New Zealand J.Mar. Freshwater Res.* 40: 299–304.
- Pan QW, FM. Lei, ZH. Yin, A. Kristin, & P. Kanuch. 2007. Phylogenetic relationships within *Turdus* species: mitochondrial cytochrome-b gene analysis. *Ornis Fennica* 84: 1-11.
- Prusak B, G. Grzybowski, & G. Zieba. 2004 Taxonomic position of *Bison bison* (Linnaeus, 1758) and *Bison bonasus* (Linnaeus, 1758) based on analysis of *cytb* gene. *Anim. Sci Pap Rep.* 22: 27–35.
- Prusak B & T. Grzybowski. 2004. Non-random base composition in codons of mitochondrial *cytochrome b* gene in vertebrates. *Acta Biochimica Polonica* 51 (4): 897–905
- Randi, E., C. Tabarroni. & S. Kark 2006. The role of history vs. demography in shaping genetic population structure across an ecotone: chukar partridges (*Alectoris chukar*) as a case study. *Diversity and Distributions*, 12: 714–724.
- Rocha-Olivares A, CA. Kimbrell, BJ. Eitner & RD. Vetter. 1999. Evolution of a Mitochondrial *Cytochrome b* Gene Sequence in the Species-Rich Genus *Sebastes* (Teleostei, Scorpaenidae) and Its Utility in Testing the Monophyly of the Subgenus *Sebastomus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11 (3): 426–440.
- Roques S, & JJ. Negro. 2005. MtDNA genetic diversity and population history of a dwindling raptorial bird, the Red Kite (*Milvus milvus*). *Biol Cons.* 126:41–50
- Russello MA & G. Amato. 2007. On the horns of a dilemma: molecular approaches refine *ex situ* conservation in crisis. *Mol. Ecol.* 16: 2405-2406.
- Spielman D, BW. Brook, & R. Frankham. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc. Natl Acad Sci USA* 101:15261–15264
- Saitou N & M. Nei. 1987 The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425
- Whittier JB, JR. Leslie. RA.van Den Bussche. 2006. Genetic variation among subspecies of Least Tern (*Sterna antillarum*): implications for conservation. *Waterbirds* 29:176–184.

Memasukkan: Desember 2010

Diterima: Mei 2011