

KARAKTERISASI GEN INTERFERON REGULATORY FACTOR 2 (IRF-2) PADA BURUNG MALEO (*Macrocephalon Maleo* S. Müller 1846) DESA TUVA KECAMATAN GUMBASA KABUPATEN SIGI SULAWESI TENGAH DAN PEMANFAATANNYA SEBAGAI MEDIA PEMBELAJARAN

The Characterization of Interferon Regulatory Factor 2 (IRF-2) Gene From Maleo (*Macrocephalon Maleo* S. Müller 1846) Tuva Village Gumbasa Sub-District Sigi Regency Central Sulawesi and it's Utilization as Learning Media

* Abdul Ashari, I Made Budiarsa, & Astija

Pendidikan Sains Program Magister/Pascasarjana – Universitas Tadulako, Palu – Indonesia 94118

Article History

Received 03 December 2016

Revised 08 January 2017

Accepted 14 February 2017

Keywords:

Characterization,
Macrocephalon maleo, IRF-2
gene

Abstract

IRF-2 is a member of the Interferon Regulatory Transcription Factor (IRF) which encodes interferon regulating factors. The study aimed to describe the character of the Interferon Regulatory Factor 2 (IRF-2) gene sequence from maleo and provide experimental module about molecular genetic methods. This study used descriptive methods. Genetic data was obtained by using molecular method through three stages of DNA isolation, DNA amplification and sequencing. Alignment is done by using Clustal X in MEGA6 program. Phylogeny tree constructed by Neighbor-Joining algorithm and Juke-Cantor evolution's model from program MEGA6. The sample consisted of 0,3 ml blood from two individual maleo and species of Megapode group as comparison that were obtained from GenBank. The results of the analysis from 612 bp of IRF-2 genes identified with the composition of the nucleotide base of 23.1% T, 20,8% C, 35.1% A and 21.0% G. IRF-2 gene sequence of nucleotide composition was rich in adenine (A). Analysis of IRF-2 gene sequences phylogeny tree topology tree was produces good enough and has aggregated species from Megapodiidae family. Moreover, the validation suggested that the practical guide book in this study were 'eligible' to be used as learning media.

doi: 10.22487/j25490192.2017.v1.i1.xxxx

Pendahuluan

Holmes dan Phillips (1999) menyatakan Sulawesi adalah sebuah pulau dengan segala keunikan, baik bentuk pulau itu sendiri yang mirip huruf K, masyarakatnya, terutama faunanya yang kaya akan jenis-jenis endemik. Hal ini dikarenakan pulau Sulawesi merupakan pulau terbesar dikawasan Wallacea dan secara geologis paling rumit dimana menjadi tempat hidup fauna campuran oriental dan Australia, serta menjadi arena evolusi berbagai jenis endemik (Coates *et al*, 2000). Salah satu jenis burung endemik dan

terkenal di daerah Sulawesi adalah burung maleo (*Macrocephalon maleo*).

Burung maleo adalah salah satu jenis satwa liar endemik Sulawesi yang langka. Burung ini termasuk spesies *burrow nester*, yaitu burung pembuat lubang atau liang dan tersebar hampir di semua daratan Sulawesi yang meliputi Sulawesi Utara, Sulawesi Tengah dan Sulawesi Tenggara (Whitten *et al.*, 1987).

International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) (2013), mengategorikan tingkat konservasi *Macrocephalon maleo* dalam tingkatan genting atau *Endangered Species (EN)*. Total populasi diperkirakan berada berjumlah 4.000-7.000 pasang, setara dengan 8.000-14.000 individu dewasa atau 12.000-21.000 individu secara total dan menurun dengan cepat hingga 90% sejak 1950 (Butchart dan Baker, 2000). Maka

*Correspondence:

Abdul Ashari

e-mail: abdulashari@yandex.com

Copyright © 2018 Author(s) retain the copyright of this article.

This article is published under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0.

dari itu, tidak menutup kemungkinan jika burung maleo akan berubah statusnya menjadi kritis atau *Critically Endangered* (CR) apabila mulai kehilangan habitat alaminya. Hilangnya habitat alami disebabkan karena kegiatan penebangan hutan (*logging*), selain itu perburuan telur dan dagingnya serta faktor predator alami turut mempengaruhi keberadaan spesies ini (Ahmad, 2014).

Eksplorasi terhadap telur burung maleo secara berlebihan menjadi masalah utama, selain itu juga pengrusakan habitat dan fragmentasi habitat dapat menyebabkan penurunan populasi burung maleo bahkan akan menuju kepunahan (Gunawan, 1995). Sehubungan dengan masalah tersebut perlu dilakukan tindakan untuk membantu melestarikan populasi burung maleo melalui upaya konservasi satwa baik secara *in situ* atau *ex situ* (Yuriadi, 2009). Namun upaya konservasi tersebut masih belum membuahkan hasil yang baik, sehingga perlu dibutuhkan informasi ilmiah tertentu mengenai burung maleo untuk menentukan langkah strategis dalam upaya konservasi satwa tersebut.

Informasi ilmiah mengenai karakter atau penanda genetik burung maleo belum banyak dilaporkan. Oleh karena itu, perlu upaya penelitian untuk menggali informasi mengenai karakter atau penanda genetik burung tersebut. Salah satu cara untuk menggali informasi tersebut dengan menggunakan data molekuler. Riset dasar genetika molekuler perlu dilakukan karena informasi genetik yang diperoleh memiliki kontribusi penting dalam taksonomi dan tindakan konservasi (Supriatna, 2008). Hasil serta kajian penelitian tersebut dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya sekaligus dapat membantu penentuan konservasi burung maleo menjadi lebih terarah dan dapat mencapai sasaran dimasa mendatang (Yuriadi, 2009).

Penelitian penentuan karakter genetik gen IRF-2 pada burung maleo diharapkan dapat melengkapi data genetik burung maleo dan dapat digunakan sebagai panduan dalam

konservasi. Alasan pemilihan gen ini salah satunya karena gen IRF-2 termasuk dari intron gen nukleus yang telah terbukti cocok digunakan sebagai kajian karakter genetik suatu spesies karena kelimpahannya dalam genom nukleus dan berpotensi untuk diamplifikasi dengan metode PCR sehingga mudah untuk dianalisis (Prychitko dan Moore, 1997).

Material dan Metode

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif eksploratif. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Populasi dalam penelitian ini adalah burung maleo yang terdapat di desa Tuva, sedangkan yang menjadi sampel dalam penelitian ini adalah darah dari burung maleo. Tahap awal dalam proses pengambilan sampel adalah penentuan lokasi penelitian, kemudian pengambilan sampel darah dan dilanjutkan dengan tahap isolasi, amplifikasi dan *sequencing*.

Penelitian ini menggunakan data primer yang dikumpulkan secara langsung dari hasil analisis *sequencing* gen IRF-2. Data sekunder adalah data sekuen gen IRF-2 yang diunduh dari GenBank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sebagai data pembandingan dan data pendukung lainnya yang diperoleh dari artikel ilmiah, jurnal, dan buku serta referensi lainnya yang mendukung penelitian ini

Pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan metode yang digunakan oleh Buchart (1998) yang dimodifikasi. Sampel darah sebanyak 0,3 ml diambil dari burung *Macrocephalon maleo* yang diperoleh di desa Saluki.

Amplifikasi DNA mengikuti protokol PCR Kit (Takara Ex Taq™), DNA total hasil ekstraksi diamplifikasi di dalam 50 µl volume reaksi yang terdiri dari 1 µl DNA sampel (17,44-18, 21ng/ul, 5µl 10xbuffer PCR, 4µl dNTP (40mM), 2µl primer *forward* (20 picomol/µl), 2 µl primer *reverse* (20 picomol/µl), 0,25µl Taq Polymerase (5 unit/ul), dan 35,075 µl ddH₂O.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600 dengan kondisi sebagai berikut: pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 15 detik, penempelan (*annealing*) pada suhu 51,5°C selama 30 detik, pemanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama 30 detik yang diikuti dengan pemantapan (*post-extension*) pada suhu 72°C selama 5 menit. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus. Amplifikasi gen IRF-2 pada sampel penelitian burung maleo menggunakan primer *forward* IRF2.2F (5'-ATGTCTTTGGGTTCGGGTTTA-3') dan primer *reverse* IRF2.3R (5'-GAAACTGGGCAATTCACACA-3')

DNA yang diperoleh dari hasil PCR dimurnikan dengan menggunakan QIAquick gel extraction kit. Kemudian dilanjutkan dengan *sequencing* menggunakan primer seperti pada tahap amplifikasi. Hasil *sequencing* dipurifikasi dengan QIAGEN QiaQuick PCR Purification Kit dan dilakukan pengukuran konsentrasi DNA menggunakan UV spectrophotometer pada panjang gelombang 230, 260 dan 280 nm. Konsentrasi DNA yang dipakai untuk reaksi *cycle sequencing* disesuaikan dengan produk PCR dengan menggunakan kembali primer yang digunakan pada saat amplifikasi gen dengan menggunakan program yang disesuaikan dengan suhu *annealing* primer dan ukuran DNA. Hasil *cycle sequencing* yang berupa fragmen-fragmen DNA terlabel fluoresens dipurifikasi dengan metode purifikasi EDTA. Selanjutnya fragmen DNA dilarutkan dalam 10 µl Hi-Di Formamide sebelum didenaturasi pada suhu 95°C selama 4 menit.

Urutan DNA yang diperoleh dari hasil *sequencing* berupa sekuen *forward* dan *reverse* yang perlu diedit dan digabungkan menjadi sekuen utuh gen IRF-2 menggunakan program MEGA6 dengan memilih opsi yang tersedia pada tab program MEGA6. Urutan DNA disejajarkan dengan pembandingan dari beberapa anggota famili Megapodiidae yang dipublikasikan dalam GenBank. Proses

penjajaran menggunakan Clustal W yang ada dalam program MEGA6.

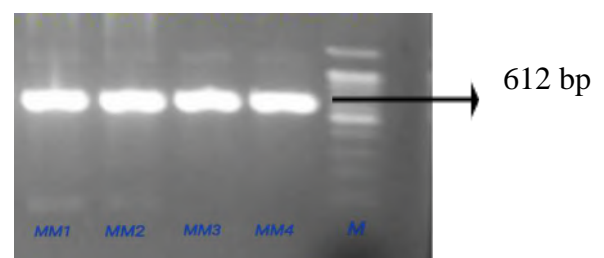
Analisis yang dilakukan meliputi perhitungan komposisi nukleotida, substitusi basa, jarak genetik berdasarkan sekuen gen IRF-2. Proses analisis menggunakan program MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Perhitungan jarak genetik dilakukan berdasarkan model Juke Cantor. Rekonstruksi pohon filogeni dilakukan berdasarkan sekuen gen IRF-2 untuk semua nukleotida yang bersifat variatif. Rekonstruksi pohon filogeni kedua dilakukan menggunakan metode *Neighbor-Joining* model Juke-Cantor dengan bootstrap 1000 kali.

Data sekuen dianalisis menggunakan program software Clustal X dan MEGA6. Data sekuen gen IRF-2 famili Megapodiidae dari *International Database (DNA Data Bank of Japan* dan NCBI) diedit dengan program MEGA6 dan digunakan sebagai pembandingan dengan *Macrocephalon maleo* untuk di *alignment* dengan program Clustal X. Kemudian data sekuen dianalisis menggunakan program MEGA6 untuk mengkarakterisasi genetiknya.

Hasil dan Pembahasan

Amplifikasi Gen *Interferon Regulatory Factor 2* (IRF-2)

Visualisasi DNA hasil amplifikasi menggunakan primer *forward* IRF2.2F dan primer *reverse* IRF2.3R disajikan pada Gambar.



Gambar 1. Hasil Visualisasi pita DNA sampel amlifikasi gen IRF-2

Ket. MM= sampel penelitian maleo 612 bp
MM2 MM3 MM4
M= DNA ladder (promega)

Hasil visualisasi pada Gambar 1. memperlihatkan pita IRF-2 tampak tebal dan dapat teramplifikasi dengan baik. Pada gambar terdapat lajur dengan tanda MCT1, MCT2, MM1, dan MM2 menunjukkan pita hasil visualisasi sampel penelitian burung maleo sedangkan lajur tanda M merupakan ladder atau marker (penanda) Promega 100 bp. Pita tunggal yang dihasilkan jelas dan tebal menunjukkan kondisi PCR yang optimal

tercapai sehingga proses PCR dapat berlangsung dengan baik dan dapat diproses pada tahap selanjutnya yaitu *sequencing*. Selanjutnya dilakukan analisis BLAST, yaitu membandingkan sekuen kedua sampel penelitian burung maleo dengan database yang ada pada *GenBank* untuk melihat tingkat homologinya. Hasil analisis BLAST dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Analisis BLAST Perbandingan Sekuen gen *Inteferon Regulatory Factor 2* (IRF-2) pada Burung Maleo dengan Pembanding dari GenBank

No	Pembanding (GenBank)	ACC Number	Homologi	E-value	Query
1	<i>Macrocephalon maleo</i>	KF833788.1	99%	0.0	99%
2	<i>M. cumingii</i>	KF833759.1	97%	0.0	99%
3	<i>Eulipoa wallacei</i>	KF833811.1	97%	0.0	99%
4	<i>M. eremite</i>	KF833788.1	97%	0.0	99%
5	<i>M. forstenii</i>	KF833766.1	97%	0.0	99%
6	<i>M. freycinet</i>	KF833768.1	97%	0.0	99%
7	<i>M. decollates</i>	KF833760.1	97%	0.0	99%
8	<i>M. laperouse</i>	KF833778.1	96%	0.0	99%
9	<i>M. layardi</i>	KF833786.1	96%	0.0	99%
10	<i>M. pritchardii</i>	KF833793.1	96%	0.0	99%
11	<i>M. reinwardt</i>	KF833806.1	96%	0.0	99%
12	<i>M. tenimberensis</i>	KF833807.1	96%	0.0	99%
13	<i>Talegalla fuscirostris</i>	KF833770.1	96%	0.0	99%
14	<i>Talegalla jobiensis</i>	KF833772.1	95%	0.0	99%
15	<i>Alectura lathami</i>	KF833784.1	96%	0.0	99%
16	<i>Leipoa ocellata</i>	KF833790.1	97%	0.0	99%
17	<i>Aepyodius arfakianus</i>	KF833757.1	97%	0.0	99%
18	<i>Aepyodius bruijnii</i>	KF833758.1	97%	0.0	99%

Karakter gen *Interferon Regulatory Factor 2* (IRF-2)

Merujuk pada data yang terdapat pada Tabel 1, diperoleh nilai homologi tertinggi gen IRF-2 burung maleo dengan tingkat kesamaan (homologi) yaitu 99%. Hal ini menunjukkan bahwa benar burung maleo sampel dalam penelitian adalah identik dengan burung maleo dari *GenBank*. Nilai homologi pada kisaran 95%-99% yang terjadi pada sampel

penelitian dengan pembanding dari *GenBank* menunjukkan kekerabatan yang dekat antara spesies sampel penelitian dengan spesies dari kelompok Megapodiidae.

Komposisi Nukleotida

Berdasarkan pada Tabel 2, sekuen gen IRF-2 pada kedua sampel penelitian burung maleo yang berukuran 612 bp diperoleh komposisi nukleotida antara lain 23,1% (T), 20,8% (C), 35,1 (A) dan 21,0 (G). Gen IRF-2

pada burung maleo kaya kandungan adenin (A). Perbandingan kandungan basa A-T (58,2 %) pada gen IRF-2 *M. maleo* lebih tinggi dibandingkan kandungan G-Cnya (41,8 %). Komposisi A+T paling rendah ditemukan pada *Aepyodius bruijnii* (57,8%) dan paling tinggi pada *M. pritchardii* (58,8%). Sebaliknya, kandungan G+C paling tinggi pada *Aepyodius bruijnii* (42,2%) dan paling rendah pada *Talegalla jobiensis* (40,1%).

Menurut Chalikian *et al.* (1999), kandungan A+T dan G+C menunjukkan tingkat kestabilan antar ikatan untai heliks ganda DNA. Kandungan G+C yang tinggi memiliki interaksi antar untai yang kuat karena G+C memiliki ikatan hidrogen rangkap

tiga, sedangkan kandungan A+T yang tinggi memiliki interaksi antar untai yang lemah karena A+T memiliki ikatan hidrogen rangkap dua. Sehingga DNA yang mengandung pasangan basa G+C yang tinggi lebih stabil daripada DNA berpasangan basa G+C rendah. Stabilitas DNA salah satunya dapat diukur berdasarkan temperatur lebur DNA (T_m), dimana temperatur lebur ini bergantung pada kekuatan ionik dan konsentrasi DNA (Isaksson *et al.*, 2004). Hasil analisis persentase komposisi basa nukleotida pada sekuen gen IRF-2 burung maleo dan beberapa spesies anggota famili Megapodiidae disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi basa nukleotida burung maleo dan beberapa spesies anggota famili Megapodiidae dengan menggunakan software MEGA6

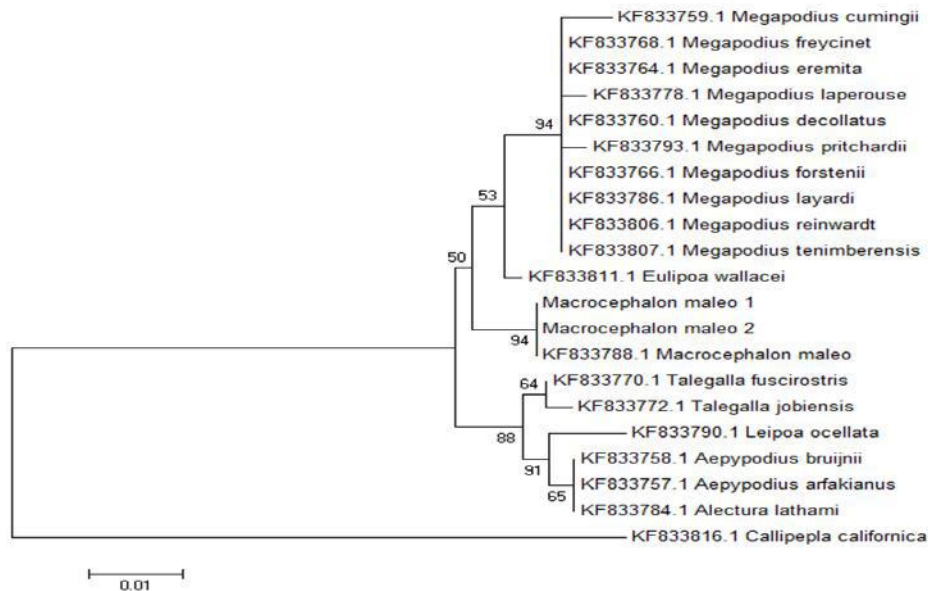
No.	Sampel dan Kode Akses <i>GenBank</i>	Kandungan Basa Nitrogen				Total		Basa (bp)
		T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	T+A	G+C	
						(%)	(%)	
1	<i>M. maleo</i> (S1)	23.1	20,8	35.1	21.0	58,2	41,8	612
2	<i>M. maleo</i> (S2)	23.1	20.8	35.1	21.0	58,2	41,8	612
3	KF833788.1 <i>Macrocephalon maleo</i>	23.2	20.8	35.2	20.8	58,4	41,6	612
4	KF833811.1 <i>Eulipoa wallacei</i>	23.2	20.9	35.1	20.8	58,3	41,7	612
5	KF833759.1 <i>M. cumingii</i>	23.5	20.6	35.1	20.8	58,6	41,4	612
6	KF833764.1 <i>M. eremite</i>	23.3	20.7	35.0	21.0	58,3	41,7	612
7	KF833766.1 <i>M. forstenii</i>	23.5	20.5	34.9	21.1	58,4	41,6	612
8	KF833768.1 <i>M. freycinet</i>	23.6	20.6	34.9	20.9	58,4	41,6	612
9	KF833760.1 <i>M. decollatus</i>	23.5	20.5	34.9	21.1	58,4	41,6	612
10	KF833778.1 <i>M. laperouse</i>	23.3	21.0	34.8	21.0	58,0	42,0	612
11	KF833786.1 <i>M. layardi</i>	23.6	20.7	35.0	20.8	58,5	41,5	612
12	KF833793.1 <i>M. pritchardii</i>	23.7	20.3	35.1	20.9	58,8	41,2	612
13	KF833806.1 <i>M. reinwardt</i>	23.4	20.6	34.9	21.1	58,3	41,7	612
14	KF833807.1 <i>M. tenimberensis</i>	23.6	20.8	34.4	21.3	57,9	42,1	612
15	KF833770.1 <i>Talegalla fuscirostris</i>	23.3	20.8	35.0	20.8	58,3	41,7	612
16	KF833772.1 <i>Talegalla jobiensis</i>	22.8	20.7	37.0	19.5	59,9	40,1	612
17	KF833784.1 <i>Alectura lathamii</i>	22.6	20.9	35.5	21.1	58,0	42,0	612
18	KF833790.1 <i>Leipoa ocellata</i>	23.0	20.8	35.3	20.8	58,3	41,7	612
19	KF833757.1 <i>Aepyodius arfakianus</i>	22.5	20.9	35.5	21.1	58,0	42,0	612
20	KF833758.1 <i>Aepyodius bruijnii</i>	22.5	21.0	35.3	21.2	57,8	42,2	612
	Rata-rata	23.7	20,8	35.1	20.3	58,35	41,65	612

Ket. : Basa Nukleotida = T (Timin), C (Sitosin), A (Adenin) dan G (Guanin)

Hubungan Filogenetik

Berdasarkan *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou dan Nei, 1987) dengan *Bootstrap* 1000x ulangan (Felsenstein, 1985) diperoleh konstruksi filogeni (Nei dan Kumar, 2000)

burung maleo dengan beberapa spesies anggota Megapodiidae. Analisa hubungan kekerabatan antar sampel penelitian dengan pembandingan dilakukan terhadap 612 bp nukleotida yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pohon filogenetik berdasarkan gen IRF-2 antara *M. maleo* dan beberapa spesies pembandingan Megapode dengan kelompok *outgroup* menggunakan Neighbor-Joining dan model Juke-Cantor

R Dari Gambar 2, terlihat bahwa Genus Megapodius, Macrocephalon, Eulipoa, Leipoa, Talegalla dan Aepyodius bergabung membentuk *clade* tersendiri karena merupakan *ingroup* Megapode. Pada *ingroup* Megapode juga terbagi lagi menjadi 2 *clade* utama. *Clade* pertama beranggotakan Genus Megapodius, Eulipoa dan Macrocephalon, sedangkan *Clade* kedua beranggotakan genus Leipoa, Talegalla dan Aepyodius. Adapun *Callipepla californica* tampak memisah dengan *clade ingroup* Megapodiidae karena jauh kekerabatannya dan merupakan kelompok *outgroup* yang berperan untuk menyempurnakan topologi pohon filogeni.

Kedua sampel penelitian burung maleo berada dalam satu *clade* dengan burung maleo dan memiliki nilai *bootstrap* 94 artinya set data yang digunakan dalam pohon filogeni ini baik dan valid sehingga dapat dipercaya serta dapat dilibatkan dalam konstruksi pohon filogeni.

Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan *Bootstrap* 1000x model Juke-Cantor, memperlihatkan bahwa analisis menggunakan gen IRF-2 menghasilkan pohon filogenetik yang memiliki daya pilah cukup baik.

Pembahasan

Karakter Molekular *Macrocephalon maleo*

Pada penelitian ini diekplorasi sekuen gen *Interferon Regulatory Factor 2* (IRF-2) pada burung maleo. IRF-2 diidentifikasi sebagai faktor transkripsi yang terlibat dalam sistem regulasi interferon (IFN). Interferon adalah protein berbentuk sitokin yang terlibat dalam berbagai interaksi kekebalan tubuh baik pada kekebalan bawaan maupun kekebalan yang didapat selama infeksi virus (Priyanka, 2014). Alasan pemilihan gen ini salah satunya karena gen IRF-2 termasuk dari intron gen nukleus yang telah terbukti bermanfaat untuk analisis filogenetik vertebrata yang baru saja berevolusi (Shapiro dan Dumbacher, 2001).

Kondisi PCR yang optimal untuk mengamplifikasi gen IRF-2 pada sampel burung maleo yaitu tahap pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 51,1°C selama 30 detik, *elongation* awal pada suhu 72°C selama 30 detik, diikuti dengan *elongation* akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus yang menghasilkan fragmen DNA dengan panjang 612 bp.

Amplifikasi daerah gen IRF-2 pada kedua sampel penelitian burung maleo menggunakan primer *forward* IRF2.2F dan primer *reverse* IRF2.3R (Kimball *et al.*, 2009). Keberhasilan amplifikasi gen IRF-2 sejalan dengan pernyataan Prychitko dan Moore (1997) bahwa intron mudah untuk diamplifikasi oleh PCR untuk berbagai tingkatan karena mereka diapit oleh ekson, yang menyediakan bagian untuk primer PCR.

Hasil dari amplifikasi PCR berjalan dengan baik, hal ini ditandai dengan tampaknya pita tunggal pada sampel yang tebal dan jelas. Terlihat adanya pola *band* DNA yang terbentuk tebal dan mengumpul (tidak menyebar). Tingkat ketebalan *band* DNA ditentukan dari kemurnian atau proses ekstraksi kurang tepat pada sampel yang diamati. *Band* DNA yang

terbentuk tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang di ekstrak dalam kondisi utuh (Irmawati, 2003). Hal ini juga menunjukkan kondisi PCR yang dilakukan berjalan dengan baik dan optimal karena primer *forward* dan *reverse* yang digunakan berhasil menempel dengan baik sehingga diperoleh pita gen IRF-2 sesuai target yang berukuran ±612 bp. Selanjutnya hasil PCR pada gen IRF-2 tersebut akan digunakan sebagai *template* untuk ketahap *sequencing* DNA.

Berdasarkan hasil BLAST dari ketiga sekuen sampel penelitian yang diperoleh menunjukkan nilai homologi yaitu 99% pada gen IRF-2 *Macrocephalon maleo* (*GenBank*). Hal tersebut menunjukkan bahwa *M. maleo* sampel penelitian mempunyai hubungan kekerabatan yang sangat dekat atau identik dengan *M. maleo* (*GenBank*). Perbedaan nukleotida antara kedua sampel penelitian dan perbandingan digambarkan melalui sekuen nukleotida hasil *alignment* BLAST (Gambar 4.2). Terdapat perbedaan pada basa pertama dan kedua yaitu A & G dimana terjadi mutasi. Li dan Graur (1991) melaporkan bahwa beberapa nukleotida lebih rentan terhadap mutasi dari yang lain dimana frekuensi mutasi untuk keempat basa nitrogen tidak selalu sama dan arah mutasi tidak bersifat acak (*non-random*).

Berdasarkan runutan frekuensi nukleotida dalam sekuen gen IRF-2 pada kedua sampel penelitian *M. Maleo* yang berukuran 612 bp diperoleh komposisi nukleotida antara lain 23,1% (T), 20,8% (C), 35,1 (A) dan 21,0 (G). Gen IRF-2 pada *M. maleo* kaya kandungan adenin (A). Perbandingan kandungan basa A-T (58,2 %) pada gen IRF-2 *M. maleo* lebih tinggi dibandingkan kandungan G-Cnya (41,8 %) (Tabel 4.1). Hasil tersebut sesuai pendapat Dimcheff *et al.* (2002) dan Uddin *et al.* (2015) bahwa Aves memiliki komposisi kandungan basa A+T lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan G+Cnya pada gen IRF-2. Li and Graur (1991) menyatakan bahwa 64,5% dari

semua mutasi yang terjadi didaerah *noncoding* menghasilkan basa A dan T, sehingga seiring berjalannya evolusi maka sekuen *noncoding* seperti gen IRF-2 menjadi kaya akan basa A-T. Fenomena melimpahnya basa A-T ini juga menjadi keunikan dari sekuen *noncoding*.

Analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining* model Juke-Cantor dengan *Bootstrap* 1000x ulangan terhadap runutan nukleotida gen IRF-2 terlihat bahwa kedua sampel penelitian dan *M. maleo GenBank* membentuk cabang tersendiri begitu pula dengan spesies pembanding membentuk cabang tersendiri. Pemisahan ini didukung oleh nilai bootstrap yang cukup tinggi (>70%). Gen IRF-2 menghasilkan topologi pohon filogenetik yang baik memiliki daya pilah pada tingkat spesies namun tidak mampu membedakan intraspecies karena tidak dapat memisahkan percabangan kedua sampel penelitian dan *M. maleo GenBank*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gen IRF-2 dapat untuk membedakan spesies Megapode. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Prychitko dan Moore (1997), yang melaporkan bahwa intron memiliki beberapa sifat dapat digunakan untuk analisis filogenetik. Selain mudah untuk diamplifikasi oleh PCR, intron berevolusi lebih cepat daripada urutan ekson nukleus (secara keseluruhan), meskipun lebih lambat dari mtDNA (Hughes dan Yeager, 1997). Sehingga gen IRF-2 dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk membedakan antar spesies kelompok Megapode tetapi tidak dapat untuk membedakan intra spesies burung maleo. Hal ini disebabkan karena kedua sampel penelitian dan burung maleo bergabung dalam satu *clade* yang sama.

Berdasarkan hasil pohon filogenetik, menggambarkan bahwa kedua sampel penelitian dan burung maleo berada dalam satu *clade* dengan nilai *bootstrap* 94% dimana hal ini menunjukkan kekerabatan yang sangat dekat (identik). Nilai *bootstrap* menjadi tolak ukur penentu tingkat kepercayaan pohon filogeni, semakin besar nilai *bootstrap* maka

semakin tinggi pula tingkat kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi tersebut (Zein dan Sulandari, 2008). Pada *ingrup* Megapode juga terbagi lagi menjadi 2 *clade* utama. *Clade* pertama beranggotakan Genus Megapodius, Macrochepalon dan Eulipoa, sedangkan *clade* kedua beranggotakan genus Leipoa, Tallegala dan Aepyodius. Hasil ini sesuai dengan penelitian Birks dan Edwards (2002) dan Harris *et.al.*, (2014) dimana kelompok Megapode terbagi menjadi 2 *clade* utama yaitu '*brush-turkey clade*' yang beranggotakan beranggotakan Genus Leipoa, Tallegala dan Aepyodius serta '*scrubfowl clade*' yang beranggotakan Genus Megapodius, Macrochepalon dan Eulipoa. Topologi pohon filogenetik menempatkan burung maleo pada *scrubfowl clade* bukan pada *brush-turkey clade*. Hal ini dikarenakan burung ini memiliki morfologi unik termasuk tonjolan kepala mirip tombol dan pola yang berbeda di antara jari-jari kakinya. Dengan demikian, penempatan filogenetiknya menjadi sesuatu yang menarik, tetapi terhambat oleh fakta bahwa perbedaan garis keturunannya lebih awal dalam Megapode, dan saat ini tidak ada spesies yang terkait erat (Harris, *et.al.*, 2014)

Hasil konstruksi pohon filogeni (Gambar 4.5) menjelaskan bahwa kedua sampel penelitian merupakan monofiletik dari kelompok *ingrup* karena memiliki moyang yang sama. Hasil ini sesuai dengan Birks dan Edwards (2002) yang melaporkan bahwa famili Megapodiidae merupakan monofiletik. Berdasarkan analisis pohon filogenetik, kelompok *outgroup* yaitu *Callipepla californica* yang berkerabat sangat jauh dengan kedua sampel penelitian terpisah dalam percabangan pohon filogenetiknya. Hal ini dikarenakan *Callipepla californica* merupakan parafiletik dengan kedua sampel karena memiliki nenek moyang yang berbeda. Penggunaan kelompok *outgroup* dalam penentuan pohon filogeni bertujuan untuk menyempurnakan topologi pohon filogeni. Hal ini dilihat dari memisahkannya *clade* antara *ingrup* dan *outgroup*. Pohon filogeni direkonstruksi kembali untuk

melihat kestabilan topologi pohon filogeni berdasarkan gen IRF-2 dengan tidak melibatkan kelompok *outgroup* dan pohon filogeni yang dihasilkan tetap stabil, hal ini ditunjukkan dengan tidak berubahnya susunan *clade* pohon filogeninya. Hal ini dikarenakan karakter genetik pada famili Megapodiidae sehingga menyebabkan pohon filogenetik yang dihasilkan tetap stabil.

Brito dan Edwards (2008) menyatakan bahwa karakter genetik memiliki peranan yang penting di dalam analisis filogenetik dan filogeografi, baik yang dilakukan menggunakan *single* lokus ataupun *multiple* lokus. Karena masing-masing gen memiliki perbedaan karakter pohon filogenetik yang dihasilkan. Berdasarkan hasil analisis, dapat disimpulkan bahwa penelusuran karakter genetik pada sampel penelitian *M. maleo* dengan menggunakan analisis filogenetik molekular berdasarkan sekuen gen IRF-2 dianggap *representative* dan baik sebagai pembeda antar individu dalam satu spesies dan penanda (marka) untuk pemisahan antar spesies.

Hasil dari penelitian ini memiliki kontribusi penting dalam taksonomi dan tindakan konservasi (Supriatna, 2008). Hal ini dapat dilakukan karena setiap organisme memiliki perbedaan susunan nukleotida dalam interspesies atau antarspesies populasi dan perbedaan tersebut dapat digunakan untuk mempelajari diversitas genetik dan hubungan kekerabatan suatu organisme (Weising *et al.*, 1994).. Oleh sebab itu hasil penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya sekaligus dapat membantu penentuan konservasi burung maleo menjadi lebih terarah dan dapat mencapai sasaran dimasa mendatang (Yuriadi, 2009).

Kesimpulan

Karakter gen IRF-2 pada maleo menghasilkan ukuran sekuen gen sebesar 612. Hasil analisis sekuen gen IRF-2 kedua burung maleo sampel penelitian diperoleh komposisi nukleotida 23,1% T, 20,8% C, 35,1% A dan

21,0% G serta A+T 58,2% dan G+C 41,8%. Sekuen gen IRF-2 pada maleo memiliki kadar basa adenin (A) yang tinggi dan kadar A+T yang lebih tinggi daripada G+C. Topologi pohon filogeni berdasarkan gen IRF-2 menghasilkan pohon filogeni yang baik dan memiliki daya pilah pada tingkat spesies.

Ucapan Terimakasih

Penulis akui bahwa dalam pelaksanaan penelitian ini, penulis telah banyak mendapatkan bantuan, terutama kepada teman-teman mahasiswa angkatan 2016 Program Studi Magister Pendidikan IPA yang telah membantu untuk penelitian ini. Semoga penelitian ini dapat menjadi sumbangan yang bermanfaat dan mendorong lahirnya karya ilmiah yang lebih baik dikemudian hari.

Referensi

- Ahmad, Z. (2014). Strategi seleksi tempat bertelur burung mamoa (*eulipoa wallacei* gray, 1860) di kecamatan galela. *Jurnal Ilmiah Biogenesis*, 2 (2), 79-88.
- Arikunto, S. (2002). *Prosedur penelitian suatu pendekatan praktik*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Birks, S.M. & Edwards, S.V. (2002). A phylogeny of the megapodes (aves: megapodiidae) based on nuclear and mitochondrial dna sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2 (3), 408-421.
- Butchart, S.H.M. (1998). *The status of maleo in western central sulawesi*. unpublished preliminary report.
- Chalikian, T.V., Völker, J., Plum, G.E. & Breslauer, K.J. (1999). [A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterization by calorimetric and volumetric techniques](#). *Proceedings of The National Academy of Science USA*, (pp.7853-7858).
- Coates, J.B., Gardner, D., & Bishop, D.K. (2000). *Panduan lapangan burung-*

- burung di kawasan wallacea. bogor: birdlife international-indonesia programme & dove publication pty.*
- Gunawan, H. (1995). Strategi pelestarian burung maleo (*macrocephalon maleo* sal. muller 1846). *Rimba Sulawesi* 1 (2), 7-12.
- Harris, B.R., Birks, M.S., & Leach, D.A. (2014). Incubator birds: biogeographical origins and evolution of underground nesting in megapodes (Galliformes: Megapodiidae). *Journal of Biogeography* 4 (1), 2045-2056
- Holmes, D., & Phillips, K. (1999). *Burung-burung di Sulawesi*. Bogor: Puslitbang Biologi LIPI.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). (2013). *Macrocephalon maleo*. Diakses April 2, 2018, <http://www.iucnredlist.org/details/22678576/0>.
- Irmawati. (2003). Perubahan keragaman genetik ikan kerapu tikus (*cromileptes altivelis*) generasi pertama pada stock hatchery. Tesis master tidak diterbitkan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Isaksson, J., Acharya, S., Barman, J., Cheruku, P. & Chattopadhyaya, J. (2004). "Single-stranded adenine-rich DNA and RNA retain structural characteristics of their respected double-stranded conformations and show directional differences in stacking pattern". *Biochemistry*, 43 (51), 15996–6010.
- Kimball, R.T., Edward, L.B., Keith B., Rauri, C.K.B., Michael, J.B., Jena L, C., Shannon J. H., Kin-Lan ., John H., Victoria H, Torres., Wallace H., Christopher J. H., , Ben D. M., Kathleen J.M., William S. M., Sushma R., Frederick H. S., Jordan V. S., Christopher C. W., Tamaki Y. (2009). A well-tested set of primers to amplify regions spread across the avian genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 50, 654-660.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Priyanka, R.P & Muralidharan. (2014). interferons and interferon therapy. *J. Pharm. Sci. & Res* 6 (12), 400-403
- Prychitko, T.M. & William, S.M. (1997). The utility of DNA sequences of an intron from the *firinogen* gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 8, 193-2004.
- Qiamp. (2015). *DNA mini and blood mini handbook fourth edition*. Diakses April 30, 2017, from <http://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=6789a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>.
- Shapiro, L.H., & Dumbacher, J.P. (2001). Adenylate kinase intron 5: a new nuclear focus for avian systematics. *The Auk*, 118, 248–255.
- Sudjana, N & Rivai, A. (2002). *Media pengajaran*. Bandung: Sinar Baru Algesindo.
- Supriatna, J. (2008). *Melestarikan alam indonesia*. jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. dan Meyer, W. (1994). *DNA fingerprinting in plants and fungi*. london: CRC Press.
- Whitten, A.J., Mustafa, M., & Henderson, G.S. (1987). *Ekologi sulawesi*. yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Yuriadi. (2009). Kajian molekuler daerah d-loop parsial *deoxyribonucleid acid* (dna) mitokondria kuda (*equus caballus*) dari priangan. *Jurnal Sains Veteriner*, 27 (2), 67-74.