

Optimalisasi Produk PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Pada Analisa Keragaman Genetik Mikrosatelit Burung Kakatua Kecil Jambul Kuning (*Cacatua sulphurea*)

^{1*}I Wayan Rosiana, ²I Gede Widhiantara

^{1,2} Program Studi Biologi, Universitas Dhyana Pura, Jl. Raya Padang Luwih, Dalung, Kuta Utara, Badung, Bali 80361

*email: rosiana_iwayan@yahoo.com

ABSTRAK

Penurunan populasi burung kakatua kecil jambul kuning (*Cacatua sulphurea*) kian mengkhawatirkan. Kajian genetik diperlukan dalam mendukung upaya konservasi eksitu satwa tersebut. Keragaman genetik dapat dianalisa dengan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) namun teknik ini sensitif terhadap beberapa variabel dimana salah satunya adalah suhu *annealing*. Berdasarkan hal ini diperlukan penelitian optimalisasi produk PCR menggunakan primer mikrosatelit. Sampel penelitian diperoleh dari PT. Taman Burung Citra Bali International sebanyak 4 sampel. Ekstraksi DNA menggunakan modifikasi metode Phenol-Kloroform (Sambrook dan Russel, 2001). Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCRx merk Sensoquest menggunakan dua pasang primer mikrosatelit Prob06 dan Prob15§. Campuran untuk proses PCR adalah: PCR Master Mix Solution (i-Taqm) intron biotechnology 9,5 µl, DNA template 2 µl dan primer mikrosatelit 2 µl dengan volume total 13,5µl. Untuk Proses optimasi PCR menggunakan tiga suhu berbeda pada masing masing primer yaitu : suhu *annealing* 60°, 65° dan 70° C pada Prob06 dan suhu 57°, 62° dan 67° C pada Prob15§. Analisis DNA mikrosatelit dilakukan di Laboratorium Serologi dan Molekuler UPT Forensik Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. Pada lokus Prob 06 semua suhu yang digunakan dalam amplifikasi tidak menghasilkan pita-pita alel DNA atau *null allele*. Pada lokus Prob 15 § dengan menggunakan suhu 62°C menghasilkan alel 133 pb serta 137 pb. Pada suhu 57°C tidak menghasilkan pita-pita atau alel DNA dan pada suhu 67°C pita DNA yang dihasilkan berupa pita yang berbentuk *smear*.

Kata Kunci: Produk PCR, suhu *annealing*, burung Kakatua kecil jambul kuning, keragaman genetik.

ABSTRACT

The declining population of the Lesser Crested Cockatoo (Cacatua sulphurea) are increasingly. Genetic studies are needed to support exude conservation. Genetic diversity can be analyzed by PCR (Polymerase Chain Reaction) technique but this technique is sensitive to several variables which is one of them is annealing temperature. So, it is necessary to research the optimization of PCR product using microsatellite primer. This research obtained four samples from PT. Taman Burung Citra Bali International. DNA extraction using modification of Phenol-Chloroform method (Sambrook and Russel, 2001). DNA amplification using the Sensoquest PCRx machine and uses two pairs loci microsatellite primers Prob06 and Prob15§. The mixtures for the PCR process are: PCR Master Mix Solution (i-Taqm) intron biotechnology 9.5 µl, 2 µl DNA template and 2 µl microsatellite primer. The PCR optimization process using three different temperatures in each primary are : 60°, 65° and 70° C at Prob06 and 57°, 62° and 67°C at Prob15§. Microsatellite DNA analysis was conducted at Laboratorium Serologi dan Molekuler UPT Forensik Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. Band DNA are not produce at Prob 06 in all of temperatures used in amplification. At Prob 15§ using 62°C temperature yields an allele of 133 pb and 137 pb. At 57°C temperature does not produce DNA bands or alleles and at a temperature of 67°C DNA bands are smear.

Keywords: PCR product, temperature *annealing*, *Cacatua sulphurea*, Genetic diversity

PENDAHULUAN

Burung kakatua kecil jambul kuning (*Cacatua sulphurea*) merupakan salah satu jenis burung yang mengalami ancaman kepunahan. Satwa yang memiliki daerah penyebaran di wilayah Indonesia bagian timur mulai dari Nusa Penida dan kawasan bioregion Wallacea merupakan satwa yang nilai ekonomisnya sangat tinggi sehingga banyak diminati dan diburu oleh para penggemar burung (Imansyah et al., 2005).

Burung kakatua kecil jambul kuning merupakan satwa liar dari keluarga burung paruh bengkok yang populasinya di alam liar dengan status konservasi terancam punah (PHPA/LIPI/BirdLife IP (1998) di dalam Imansyah et al (2005). Seperti kejadian yang sangat menyedihkan di awal tahun 2015 yaitu sebanyak 21 ekor burung kakatua kecil jambul kuning diselundupkan melalui kapal motor tidar di Tanjung Perak, Surabaya, Jawa Timur dengan memsukkannya ke dalam botol bekas air mineral kemasan (Wahono, 2015).

Upaya konservasi kakatua kecil jambul kuning secara eksitu seperti program penangkaran pada lembaga konservasi memerlukan kajian biologi yang baik. Kajian ini dapat meliputi pakan, usia, perilaku, manajemen kandang hingga data kekerabatan genetik burung. Pada populasi yang kecil, keragaman genetik juga cenderung rendah. Hal ini dapat menjadi ancaman bagi kelangsungan populasi serta upaya penangkaran yang dilakukan. Data kekerabatan genetik diperlukan untuk mengantisipasi hal tersebut (Zein, 2015).

Penelitian dengan menggunakan penanda mikrosatelit pada hewan antara lain penelitian Puja (2006) untuk mengamati karakteristik genetik anjing kintamani dengan menggunakan penanda mikrosatelit. Evaluasi kemurnian genetik sapi bali di Kabupaten Barru menggunakan DNA penciri mikrosatelit lokus INRA035 oleh Mahmud

(2014). Penelitian keragaman genetik burung jalak bali yang dipelihara di Lembaga Konservasi di Bali menggunakan penanda mikrosatelit lokus TH3 dan TH6 (Widhiantara dan Rosiana, 2014).

Ada beberapa kelemahan yang terjadi pada penelitian dengan penanda mikrosatelit sebelumnya yaitu produk amplifikasi yang kurang spesifik sehingga menyulitkan untuk menganalisa variasi genetik. Sebab reaksi dalam proses amplifikasi atau PCR peka terhadap sejumlah parameter meliputi: magnesium klorida, DNA templet, konsentrasi primer, dan suhu *annealing* selama amplifikasi. Seperti penelitian oleh Widhiantara et al., (2015) pada burung kakatua jambul kuning dengan menggunakan penanda mikrosatelit Prob06 dan Prob158 yang menghasilkan produk amplifikasi yang tidak spesifik pada lokus Prob06 sehingga menyulitkan menganalisa variasi genetik burung kakatua jambul kuning. Sehingga lebih lanjut perlu dilakukan percobaan untuk mengoptimalkan produk PCR.

MATERI DAN METODE

Pengambilan sampel darah dilakukan dengan memotong salah satu kuku burung kakatua kecil jambul kuning atau dengan menagambil darah dari pangkal folikel bulu muda. Darah yang diambil sekitar tiga tetes. Sampel darah kemudian dimasukkan pada tabung ekstraksi DNA 1,5 ml yang telah berisi bufer lisis DPZ sebanyak 150 µl.

DNA diekstraksi menggunakan metode fenol-kloroform dari Sambrook dan Russell (2001) yang di modifikasi. Proses amplifikasi PCR menggunakan campuran PCR yang meliputi : PCR Master Mix Solution 9,5 µl, DNA template 2 µl dan primer mikrosatelit 2 µl dengan volume total 13,5 µl. DNA di amplifikasi pada mesin PCR menggunakan dua pasang primer mikrosatelit spesifik Prob06 dan Prob158.

Tabel 1. Primer mikrosatelit Prob06 dan Prob15§

Primer	Sisi	Urutan Basa
Prob06	Reverse	<u>GTTTCTT</u> AGCTGGAATTCCGGGCTC
	Forward	(6-
Prob15§	Reverse	TCAGGTGTCCTGTCTCTGCTTCC
	Forward	(<u>HEX</u>)GTGTCCCAGCCAGACCCAAT

Optimalisasi proses PCR menggunakan modifikasi metode Sambrook dan Russell (2001). Denaturasi DNA pada suhu 95°C selama 5 menit. Proses amplifikasi dilakukan selama 30 siklus dengan rincian: denaturasi suhu 95 °C selama 45 detik, *annealing* menggunakan 3 perlakuan suhu yang berbeda yaitu suhu *annealing time* (dengan perhitungan 4 X jumlah GC ditambah 2 X AT – 5°C) dan suhu berikutnya 5°C dibawah dan 5°C diatas suhu yang diperoleh dari perhitungan 4 X jumlah GC ditambah 2 X AT – 5°C tersebut. Proses selanjutnya dilakukan elongasi DNA pada suhu 72 °C selama 90 detik. Setelah amplifikasi 30 siklus PCR dilakukan pemanjangan DNA akhir tahap akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit. DNA hasil amplifikasi disimpan pada suhu 4 °C dan siap di elektroforesis.

Elektroforesis produk PCR menggunakan *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) 10% selama 90 menit dengan tegangan konstan 110 volt. Visualisasi DNA hasil amplifikasi mikrosatelit Prob 06

dan Prob 15§ menggunakan metode Tegelström (1986) dengan pewarna perak nitrat (AgNO₃).

Hasil optimalisasi produk PCR dipaparkan secara deskriptif melalui analisa secara visual pita-pita DNA yang muncul pada gel elektroforesis. Jarak migrasi pita-pita DNA pada *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) 10% diukur dari ujung sumur gel sampai pita DNA dan hasil pengukuran dianalogikan pada kertas semilog untuk menetapkan panjang DNA hasil amplifikasi mikrosatelit.

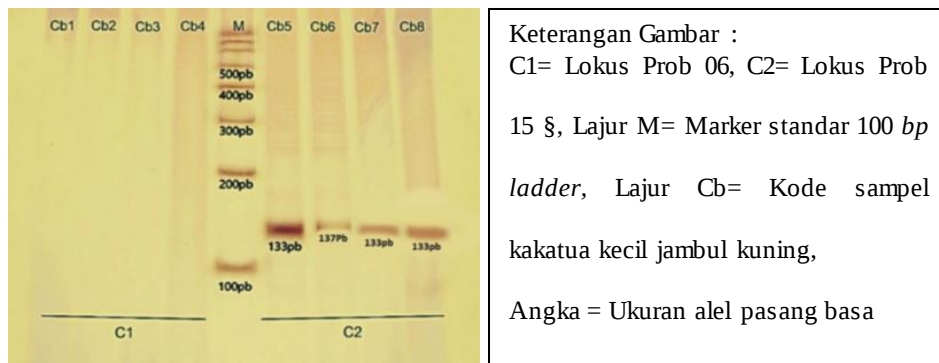
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan sampel sebanyak empat ekor burung kakatua kecil jambul kuning. Semua Burung yang menjadi sampel penelitian ini berasal dari PT. Taman Burung Citra Bali Internasional yang merupakan salah satu lembaga konservasi di Bali. Semua sampel dalam penelitian ini kemudian dikode seperti pada tabel 2 berikut :

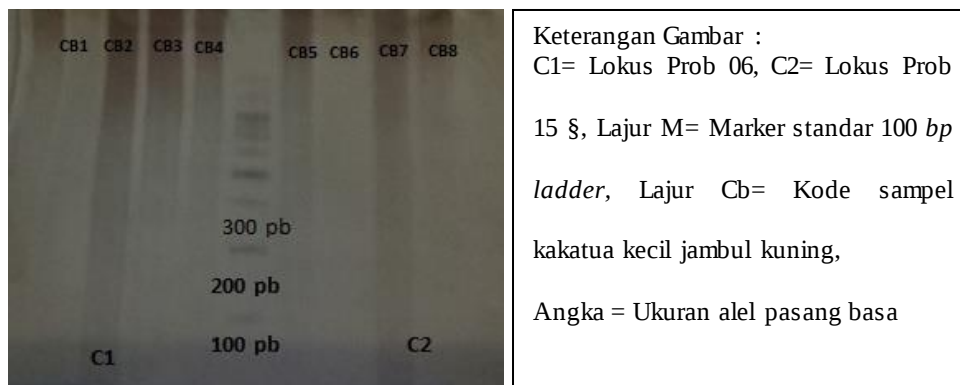
Tabel 2. Sampel Penelitian Burung Kakatua Kecil Jambul Kuning

No	Kode	Riwayat/Sumber Koleksi Burung
1	CB1	Koleksi PT. Taman Burung Citra Bali International
2	CB2	Koleksi PT. Taman Burung Citra Bali International
3	CB3	Koleksi PT. Taman Burung Citra Bali International
4	CB4	Koleksi PT. Taman BurungCitra Bali International

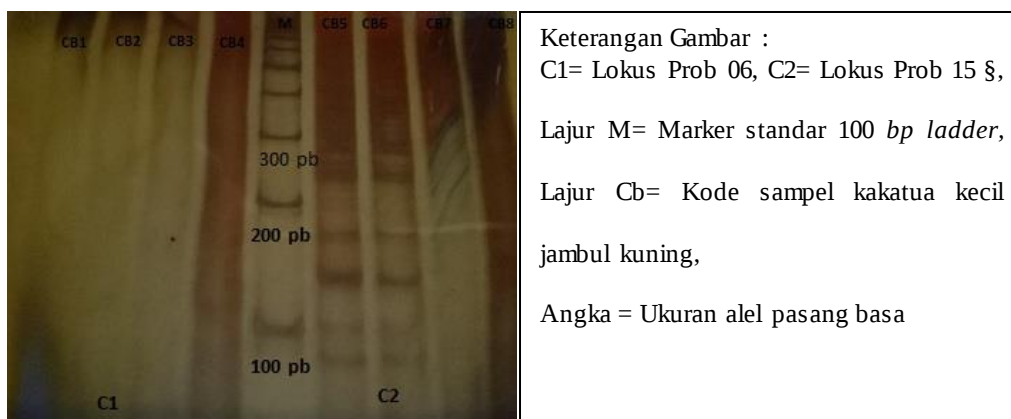
Hasil amplifikasi primer mikrosatelit lokus Prob 06 dan Prob 15§ dapat dilihat seperti berikut:



Gambar 1. Hasil Amplifikasi DNA Mikrosatelit Lokus Prob 06 dan Lokus Prob 15§ Menggunakan Suhu Annealing Time 65 °C (Prob 06) dan 62°C (Prob 15 §)



Gambar 2. Hasil Amplifikasi DNA Mikrosatelit Lokus Prob 06 dan Lokus Prob 15§ Menggunakan Suhu Annealing Time 60 °C (Prob 06) dan 57°C (Prob 15 §)



Gambar 3. Hasil Amplifikasi DNA Mikrosatelit Lokus Prob 06 dan Lokus Prob 15§ Menggunakan Suhu Annealing Time 70 °C (Prob 06) dan 67°C (Prob 15 §)

Dari keseluruhan sampel yang diperoleh dalam penelitian ini, pada suhu *annealing time* (menggunakan rumus $4 \times GC + 2 \times AT - 50$) sampel yang berhasil

teramplifikasi hanya pada Primer Prob 15§ sedangkan pada Primer Prob 06 semua sampel tidak berhasil teramplifikasi. Untuk amplifikasi yang dilakukan pada suhu 50

dibawah ataupun 50 diatas suhu tersebut, kedua proses tersebut tidak menghasilkan DNA target. Tidak munculnya pita DNA pada suhu 50 dibawah ataupun 50 diatas suhu yang diperoleh dari perhitungan $4 \times GC + 2 \times AT - 50$ diperkirakan karena primer mikrosatelit tidak tepat menempel pada area *annealing site* di

DNA template. Hal tersebut menyebabkan tidak berjalannya proses amplifikasi sehingga tidak akan dihasilkan DNA target.

Adapun data jumlah sampel dan sampel yang berhasil teramplifikasi pada penelitian ini bisa dilihat seperti tabel 3 berikut:

Tabel 3 Jumlah Sampel, Sampel Teramplifikasi, dan Jumlah Alel Pada Locus Prob 06 dan Prob 15 §

Sampel & Jumlah Alel	Suhu Annealing					
	65 Prob 06	62 Prob 15§	60 Prob 06	57 Prob 15§	70 Prob 06	67 Prob 15§
Jumlah Sampel	4	4	4	4	4	4
Teramplifikasi	-	4	-	-	-	-
Jumlah Alel	-	2	-	-	-	-

Dari gambar 1 dan tabel 3, pada lokus Prob 06 tidak menghasilkan pita-pita DNA pada semua suhu *annealing time* 600C, 650C dan 700C. Tidak munculnya pita-pita DNA pada lokus tersebut kemungkinan disebabkan oleh mutasi pada sisi *annealing* atau *primer site* pada DNA template baik pada *reverse* ataupun *forward*. Akibat terjadinya mutasi tersebut akan menghasilkan *null* alel pada lokus tersebut. Menurut Wattier et al. (1998) *null* alel pada berbagai lokus mikrosatelit disebabkan oleh mekanisme amflifikasi diferensial yang berdasarkan varian ukuran alel. Karena sifat kompetitif pada proses PCR, alel DNA yang berukuran lebih kecil memiliki peluang lebih besar berhasil di amplifikasi daripada alel yang lebih panjang. Selain itu menurut Gagneux et al., 1997 ; Garcia et al., 1998 *null* alel lebih disebabkan karena kualitas atau kuantitas DNA hasil ekstraksi.

Pada lokus Prob 15§ dari Gambar 5.1 dan tabel 5.2 suhu yang menghasilkan alel hanyalah pada suhu 62 0C. Suhu tersebut merupakan suhu yang diperoleh dari penghitungan rumus $4 \times GC + 2 \times AT - 50C$. Suhu tersebut kemungkinan merupakan *melting temperaure* atau suhu yang paling sesuai digunakan untuk menganalisa ragam alel yang ada pada lokus Prob 15§ dibandingkan dengan dua suhu lain yang digunakan pada penelitian ini. Ketika suhu *annealing time* yang digunakan sesuai, maka primer mikrosatelit akan menempel dengan tepat pada sisi *annealing site* pada DNA template. Menurut Yuwono (2005), setelah

primer menempel, enzim polimerase yang ada pada reagen PCR yang digunakan akan mengkatalisasi proses pemasangan basa nitrogen yang sesuai dengan pasangan basa pada DNA template sehingga menghasilkan DNA yang baru. Proses PCR akan dilanjutkan ke tahap proses *elongation* atau pemanjangan untai DNA dimana semua siklus dilakukan sebanyak 30 kali. Alel DNA yang dihasilkan dapat dilihat seperti gambar 5.1. Dari gambar tersebut pita DNA tampak jelas yang menunjukkan bahwa suhu *annealing time* yang digunakan sudah mendekati sesuai.

Pada suhu 570C yang digunakan pada penelitian ini tidak menghasilkan pita DNA. Hal ini menunjukkan bahwa suhu tersebut sangat tidak sesuai untuk proses penempelan primer. Menurut Hsu et. al (1996) suhu yang lebih rendah dari *melting temperature* menyebabkan primer akan sulit menempel. Tidak menempelnya primer menyebabkan enzim polimerase tidak bisa mengkatalisasi proses PCR sehingga tidak menghasilkan pita DNA. Berbeda dengan suhu 620C, pada suhu 670C pada lokus Prob 15§, hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA namun berbentuk *smear*. Adanya pita DNA dengan bentuk *smear* yang tebal menunjukkan adanya DNA non target yang terbentuk abat dari tidak tepatnya suhu *annealing*.

SIMPULAN DAN SARAN

Adapun kesimpulan dari penelitian ini adalah optimalisasi suhu terbaik untuk proses *polymerase chain reaction* pada analisa

keragaman genetik mikrosatelit burung kakatua kecil jambul kuning (*Cacatua sulphurea*) adalah 620C pada Prob 15§ dan pada Prob 06 suhu terbaik tidak bisa ditentukan karena semua suhu yang digunakan dalam penelitian ini tidak mampu menghasilkan alel yang diduga akibat lokus ini sudah bermutasi sehingga menghasilkan null alel.

Disarankan untuk penelitian sejenis dikemudian hari menggunakan sampel dan primer mikrosatelit yang lebih banyak dari yang digunakan dalam penelitian ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi melalui Anggaran (DIPA) Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan. Serta semua pihak yang mendukung sehingga penelitian berjalan dengan baik.

REFERENSI

- Gagneux, P., C. Boesch., D.S. Woodruff. (1997). Microsatellite Scoring Errors Associated With Noninvasive Genotyping Based on Nuclear DNA Amplified from Shed Hair. *Mol Ecol* 6: 861–868.
- Garcia, F.J., M. Canonne., E. Quillet., F. Bonhomme., B. Chatain. (1998). The Application of Microsatellite Markers to Breeding Programmes in the Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 159: 303–316.
- Hsu, J.T., S. Das dan M. Satish. (1996). Polymerase Chain Reaction Engineering. Bhiopharmacertical Thecnology Institute. Department of Chemical Engineering. Bethlehem: Lehigh University.
- Imansyah, M. J., D.G. Anggoro., N. Yangpatra., A. Hidayat., Y.J. Benu. (2005). Sebaran dan Karakteristik Pohon Sarang Kakatua Jambul Kuning (*Cacatua sulphurea parvula*) di Pulau Komodo, Taman Nasional Komodo. Available at: <https://www.yumpu.com>. Opened: 12.05.2016.
- Puja. (2006). Genetic Characteristics of Kontamani Dogs Using Microsatellite Markers. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*. Volume: 11, No. 3. Hal:181-184.
- Sambrook, J., D.W. Russell. (2001). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 3rd edition. New York. Cold Spring Harbor Lab Pr.
- Tegelström, H. (1986). Mitochondrial DNA in Natural Population: an improved routine for screening of genetic variation based on sensitive silver staining. *Electrophoresis* 7:226-229.
- Wattier, R., C.R. Engel., P. Saumitou-Laprade., M. Valero. (1998). Short Allele Dominance as a Source of Heterozygote Deficiency at Microsatellite Loci: Experimental Evidence at the Dinucleotide
- Wahono, T. (2015). CS File: Penyelundupan Sadis Kakatua Jambul Kuning. Available:<http://sains.kompas.com/read/2015/06/24/21334011/CS.File.Penyelundupan.Sadis.Kakatua.Jambul.Kuning>. Opened : 12.05.2016
- Widhiantara, I. G. dan I. W. Rosiana. (2014). Keragaman Genetik DNA Mikrosatelit Burung Jalak Bali (*Leucopsar rothschildi*). Prosiding Seminar Nasional Biosains I. Program Studi Magister Biologi Universitas Udayana Denpasar
- Widhiantara, I. G., Permatasari, A. A. A. P. dan Rosiana, I. W. (2016). Ragam Alel DNA Mikrosatelit Burung Kakatua Kecil Jambul Kuning (*Cacatua sulphurea*). *Jurnal Virgin* Jilid. 2. Nomor 1.
- Yuwono, T. (2005). *Biologi Molekuler*. Jakarta : Erlangga.
- Zein, S. A. (2015). Faktor Genetik Menjadi Ancaman. Available:<http://lipi.go.id/lipi/media/single/faktor-genetik-menjadi-ancaman/10589> Opened: 12.05.2016