

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Maleo sekanwor (*Macrocephalon maleo*)

Maleo sekanwor merupakan Megapodiidae endemik Sulawesi dengan bulu hitam, kulit wajah kuning, paruh oranye kemerahan serta “mahkota” (macrocephalon) berwarna biru dan memiliki panjang 55–60 cm; mahkota ini lebih kecil pada maleo betina dibanding maleo jantan tetapi fungsi mahkota ini belum diketahui hingga sekarang. Maleo umumnya bersarang di hutan dataran rendah, hutan pengunungan (1065 mdpl) serta lahan basah seperti tepian danau atau sungai dan daerah pesisir; ketika menemukan tempat yang tepat, maleo akan bersarang secara berkelompok (Alto, 2006). Aves nokturnal yang pemalu ini makan buah–buahan yang jatuh, kacang–kacangan, biji–bijian, siput, cacing dan serangga (MacKinnon, 1981). *International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) (2021) memperkirakan bahwa ekspektansi hidup maleo adalah 10 tahun 8 bulan tetapi sudah dapat beranak saat mencapai usia 2 tahun.

Selain mengerami telurnya di dalam tanah, aves monogamous ini hanya bertelur 30 butir setahun dalam rentang 8–12 hari (Dekker, 1990) atau 12–13 hari (MacKinnon, 1981) pada bulan Oktober–April. Menetasnya telur–telur ini dipengaruhi oleh cuaca, kelembaban (1,6–45%) dan suhu tanah (32–38°C). Umumnya telur menetas dalam rentang 53–63 hari setelah itu; tetapi pada cuaca yang lebih dingin, metabolisme dalam telur akan melambat sehingga menunda menetasnya telur. Ketika

keluar, anakan maleo menggali ke permukaan dengan mata tertutup, kaki di atas kepala selama 1–2 hari kemudian terbang ke pohon terdekat untuk makan (Alto, 2006).

Maraknya pengambilan telur maleo oleh warga untuk dikonsumsi maupun dijual karena bobotnya 4–5 kali berat telur ayam menjadi salah satu ancaman keberadaan maleo. Maleo memiliki area bertelur komunal (5–10 telur per sarang) agar telurnya tidak dimangsa oleh predator tetapi dengan berkurangnya populasi maleo, taktik ini tidak akan bekerja; karena itu, maleo memerlukan hutan perawan yang cukup besar dan terhubung dengan area bertelur mereka. Selain fragmentasi habitat akibat deforestasi, perburuan maleo dewasa juga menjadi ancaman maleo (Rusiyantono *et al.*, 2011).

Maleo sendiri telah ditetapkan sebagai satwa dilindungi berdasar peraturan pemerintah nomor 7 tahun 1999 tentang Pengawetan Jenis Tumbuhan dan Satwa, tidak boleh ditangkap dan diperdagangkan (*Appendix 1*) berdasar *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna dan Flora* (CITES) (Setiawan, 2020) serta spesies *Critically Endangered* atau terancam punah oleh *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) (IUCN, 2021). Populasi maleo terus menurun dari tahun ke tahun. Pada 2021, jumlah individu dewasa maleo ada 8000–14000 ekor (IUCN, 2021) namun telah banyak usaha konservasi yang dilakukan pada tahun–tahun belakangan.

B. Sumber DNA

DNA dapat diisolasi dari substansi yang mengandung sel; contohnya darah, saliva, jaringan, tulang, gigi, rambut, kuku, bulu, feses, membran cangkang telur dan lain sebagainya. Kriteria sumber DNA yang baik adalah bebas dari kontaminan seperti protein dan RNA, memiliki cukup kandungan DNA dan aktivitas DNase rendah. Penyimpanan sampel DNA juga harus diperhatikan agar tercipta kondisi yang menghambat kerja enzim nuklease (Buwono *et al.*, 2018). Sampel sebaiknya disimpan pada suhu kulkas, dibungkus plastik dan tidak dibiarkan terlalu lama agar tidak beku sebelum isolasi tetapi apabila memang diperlukan penyimpanan sampel jangka panjang.

Sumber DNA perlu diberi perlakuan terpisah, antara lain menyimpan pada suhu -80°C , sampel direndam ke dalam nitrogen cair setelah itu disimpan pada suhu -80°C untuk mencegah degradasi asam nukleat pada DNA dan liofilisasi (*freeze drying*) (Maftuchah *et al.*, 2014). Seiring perkembangan bidang molekuler, penyimpanan sampel DNA mampu dilakukan dengan blok parafin dan formalin. Perlakuan sampel saat akan digunakan juga penting. *Freezing* dan *thawing* berulang menunjukkan adanya degradasi DNA sehingga penting untuk menjaga suhu sampel karena suhu mengubah panjang persistensi DNA dan mempengaruhi interaksi antara DNA dengan protein kromosom sehingga terbentuk struktur kromatin (Driessen *et al.*, 2014).

Seiring perkembangan pengetahuan, telur tidak hanya digunakan sebagai bahan pangan tetapi juga dapat digunakan untuk rekonstruksi ekologi dan biologi dari jutaan tahun yang lalu maupun spesies yang telah punah (Green dan Scharlemann, 2003). Telur juga menjadi sarana non-invasif dalam mempelajari spesies modern tertentu tanpa mengganggu hewan hidup, terlebih lagi apabila hewan yang menjadi bahan studi adalah hewan pemalu atau dilindungi. Selain itu, analisis menggunakan sampel cangkang telur tidak memerlukan penghancuran material dalam jumlah besar sehingga efektif apabila jumlah sampel terbatas (Norell *et al.*, 1995). Telur maleo dapat dilihat seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Telur Maleo(Clare,2005).

Cangkang telur aves terbuat dari kalsium karbonat (CaCO_3) dengan matriks organik serat protein di seluruh bagiannya, sehingga cocok untuk pengawetan dalam waktu yang lama. Selain itu, terdapat pori-pori

kulit telur di sepanjang batas kalsium karbonat untuk menyediakan mekanisme pertukaran gas saat telur dierami. Pori ini dilindungi oleh kutikula transparan di bagian luar cangkang agar kontaminan tidak masuk. Umumnya, telur burung mengandung sekitar 95% bahan anorganik, 3,5% bahan organik, dan 1,5% air (Von Schirnding *et al.*, 1982). Matriks organik intrakristalin diawetkan secara relatif baik dalam sistem tertutup bahkan pada suhu tinggi sehingga cocok untuk analisis DNA maupun asam amino (Miller *et al.*, 1992).

Menurut Hirsch (1983), terdapat 3 jenis cangkang telur yaitu lunak, lentur dan kaku. Cangkang telur lunak dimiliki oleh ular dan kadal; cangkang tipe ini terbuat dari membran organik tanpa lapisan kalsium yang tersusun rapi. Cangkang telur lentur dimiliki oleh penyu. Cangkang telur jenis ini, walaupun lentur memiliki lapisan kalsium yang lebih tebal dan tertata.

Cangkang telur kaku adalah yang paling umum ditemukan karena memiliki lapisan kalsium yang terdiri dari kristal yang saling mengunci sehingga tidak mudah terdegradasi. Kura-kura, beberapa jenis tokek, buaya, burung dan dinosaurus memiliki jenis cangkang telur ini. Jika dibandingkan dengan telur bercangkang lunak, komponen organik telur bercangkang kaku sanget sedikit. Materi organik ini tereduksi menjadi membran tipis di dalam cangkang dan jaringan halus serat kolagen dibawah lapisan kalsium (Hirsch, 1983). Aves umumnya meninggalkan

cangkang setelah menetas sehingga dapat menjadi alternatif sampel analisis DNA pada aves (Trimbos *et al.*, 2009).

C. Metode Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah salah satu tahap awal sebelum dilakukannya analisis DNA. Berdasar definisinya sendiri, isolasi adalah teknik pemisahan untuk memperoleh senyawa yang dimurnikan sehingga dapat juga disebut pemurnian; sementara ekstraksi adalah proses memindahkan satu atau lebih senyawa yang diinginkan (analit) dari sampel (matriks) menggunakan pelarut ke tempat terpisah secara fisik dimana proses lanjutan dapat dilakukan. Dalam memurnikan senyawa, serangkaian ekstraksi dapat dilakukan untuk menghilangkan zat asing atau pengotor (Carson *et al.*, 2019).

Ekstraksi DNA memiliki dua tujuan yaitu efisiensi dan kemurnian hasil ekstraksi (Goodwin *et al.*, 2007). CTAB atau *Catationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide* adalah deterjen yang umumnya dipakai sebagai antiseptik tetapi juga banyak dimanfaatkan untuk isolasi DNA tumbuhan tetapi kini banyak juga digunakan untuk isolasi DNA moluska (Arseneau *et al.*, 2017; Chakraborty *et al.*, 2020; Mishra *et al.*, 2019; Panova *et al.*, 2016), crustacea (Athanasio *et al.*, 2016), ikan (Mirimin dan Roodt-Wilding, 2015), artropoda dan lain-lain (Schiebelhut *et al.*, 2017). Deterjen ini adalah agen kationik kuat yang mampu melisiskan sel karena konsentrasi garamnya yang tinggi. DNA membentuk kompleks tidak larut yang stabil dengan CTAB pada

konsentrasi garam $\geq 0,5$ M namun saat konsentrasi NaCl diatas 1 M, NaCl berikatan dengan protein dan polisakarida yang akan terlihat dengan terbentuknya kristal putih sementara DNA tetap larut dalam air. Konsentrasi tinggi inilah yang membuat CTAB mampu melarutkan dinding sel tanaman, membran lipid, berikatan dengan polisakarida dan mendenaturasi protein atau metabolit sekunder secara bersamaan (Surzycki, 2000).

CTAB juga merupakan penghambat DNase yang sangat baik karena membentuk ikatan CTAB : protein yang secara enzimatik tidak aktif. CTAB digunakan pada konsentrasi antara 1%–10% dalam pemurnian DNA dari tanaman dan bakteri. CTAB kemudian dipresipitasi dalam etanol 70% tetapi mengendap apabila suhu di bawah 15°C . Selain tidak ramah lingkungan, kelemahan lain dari penggunaannya adalah kelarutannya yang buruk dalam air (10% b/v pada suhu kamar) dan viskositas tinggi (Surzycki, 2000).

Arsenau *et al* (2017) mendapat rasio 260/280 diantara 1,9–2 dan konsentrasi DNA moluska rata–rata $5\ \mu\text{g}$ dengan modifikasi CTAB. Chakraborty *et al* (2020) mendapat 82% kesuksesan dari 23 sampel (gastropoda dan moluska) yang di ekstraksi dengan metode CTAB berdasar rasio 260/280nya ($\geq 1,9$). Mishra *et al* (2019) mendapat konsentrasi DNA *Balanus sp* sebesar $45\ \mu\text{g}$ dan rasio 260/280 diantara 1,8–1,9 dengan ekstraksi CTAB. Athanasio *et al* (2016) mendapat konsentrasi DNA *Daphnia* sebesar 3–9 ng/ μg dari 3 metode

homogenisasi berbeda. Mirimin dan Roodt-Wilding (2015), berhasil mengekstraksi 32,725 ng/ μ l DNA *Argyosomus japonicus* dengan rentang rasio 260/280 sebesar 1,9–2 dengan metode CTAB; sementara pada penelitiannya, Yuda dan Saputra (2021) mampu mengisolasi rata-rata 267,5 ng/ μ l DNA dengan rata-rata rasio 260/280 sebesar 1,850 dari 24 sampel membran cangkang telur maleo menggunakan gSYNC™ *DNA Extraction Kit*.

gSYNC™ *DNA Extraction Kit* adalah alat isolasi DNA dari *Geneaid* yang dapat mengisolasi DNA genomik dan mitokondrial dari virus, darah (segar maupun beku), jaringan, *formalin-fixed paraffin-embedded tissue* (FFPE), cairan ketuban, serangga serta sperma dalam satu kit yang nyaman. *Kit* ekstraksi DNA ini menggunakan Proteinase K dan garam chaotropik untuk melisiskan sel dan mendegradasi protein, memungkinkan DNA untuk berikatan dengan matriks serat kaca pada kolom *spin* setelah itu kontaminan dihilangkan menggunakan *Wash Buffer*; DNA genom yang telah dimurnikan dielusi dengan garam *Elution Buffer*, Tris-EDTA buffer atau air. Keseluruhan prosedur dapat diselesaikan dalam waktu 20 menit tanpa ekstraksi fenol/kloroform atau pengendapan alkohol. DNA yang dimurnikan (sekitar 20–30 kb) cocok untuk digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) atau reaksi enzimatik lainnya. Satu kotak gSYNC™ *DNA Extraction Kit* berisi buffer, proteinase K, *wash buffer*, *elution buffer*, *column*, *collection tube*, *elution tube*, *micropestle* dan *user manual* (Harini et al., 2019).

D. Kualitas DNA

Pilihan analisis molekuler yang dilakukan akan menentukan jumlah dan jenis jaringan yang dibutuhkan serta metode penyimpanan yang digunakan dalam pengumpulan lapangan. Jika sekuensing PCR akan digunakan, penyimpanan sampel cukup dibekukan dalam *freezer*. Namun, umumnya direkomendasikan untuk memaksimalkan sebanyak mungkin jumlah maupun jenis jaringan yang dikoleksi serta menggunakan *cryopreservation* (Zhang dan Hewitt, 1998).

Kualitas DNA dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu suhu inkubasi, lamanya inkubasi dan kemurnian DNA (Walker dan Rapley, 2008). Suhu inkubasi yang terlalu tinggi akan merusak DNA sementara suhu yang terlalu rendah tidak akan menghancurkan organel sel. Apabila diinkubasi terlalu lama akan merusak DNA namun apabila terlalu singkat maka organel tidak dapat hancur. Gabungan suhu dan lamanya inkubasi harus tepat agar mendapat sampel DNA dengan kualitas yang baik (Maftuchah *et al.*, 2014).

Selain suhu dan lamanya inkubasi, kualitas DNA juga ditentukan dari kemurnian dengan rasio absorbansi dan ketebalan pita gel elektroforesis. Kemurnian DNA diukur dengan menghitung rasio absorbansi 260/280 setelah dilakukan pengujian dengan spektrofotometer. Rasio 260/280 DNA agar terkualifikasi “murni” adalah 1,8–2 di bawah 1,8 menandakan kontaminasi RNA sementara di atas 2 mengindikasikan kontaminasi protein (Maftuchah *et al.*, 2014).

Beberapa faktor yang mempengaruhi rasio absorbansi adalah pH, keenceran sampel dan kontaminan. pH yang terlalu asam menurunkan rasio sebanyak 0,2–0,3 karena turunnya sensitivitas spektrofotometer sementara pH yang terlalu basa dapat menaikkan rasio sebanyak 0,2–0,3. Terlalu banyak pengeceran akan mengurangi konsentrasi DNA sehingga absorbansinya juga rendah. Kontaminan seperti protein, selain dapat terabsorpsi pada 280 nm, memiliki asam amino dengan cincin aromatik sehingga mempengaruhi absorbansi pada 280 nm (Maftuchah *et al.*, 2014).

Elektroforesis gel agarose adalah salah satu metode pemisahan molekul DNA berdasar berat molekulnya dan ada banyak cara membaca *band* yang terbentuk tetapi pita-pita ini juga dapat memperkirakan kemurnian fragmen DNA sampel. *Smearing* mengindikasikan kontaminasi RNA dan degradasi DNA. *Faint band* menandakan berat molekul yang rendah sementara *no band* berarti DNA terdenaturasi sepenuhnya atau tidak terdeteksi adanya DNA (Jacob *et al.*, 2018).

E. Analisis DNA

Analisis DNA merupakan teknik interpretasi sekuen genetik dan dapat digunakan untuk berbagai kebutuhan; seiring berkembangnya teknologi sains, banyak genom DNA tumbuhan, hewan maupun manusia yang telah dipetakan. Beberapa metode analisis DNA antara lain *molecular sexing*, *DNA barcoding*, *sequencing*, oligonukleotida spesifik alel dan lain-lain.

DNA *Barcoding* adalah metode identifikasi spesies menggunakan sebagian kecil DNA. Selain itu DNA *barcoding* juga dilakukan untuk mendapatkan sekuen DNA pendek (*barcode*) suatu spesies dan mengetahui filogeni beberapa spesies sehingga dapat memberi informasi yang akurat tentang kekerabatan antar spesies. Sekuens *barcode* dari spesies tidak diketahui dibandingkan dengan referensi sekuen dari spesies yang diketahui. Jika sekuens dari spesies tidak dikenal cocok dengan sekuens pada referensi, spesies tersebut telah diidentifikasi. Sekuens *barcode* baru menyiratkan temuan spesies baru. Sekuens *barcode* DNA memberikan dukungan besar untuk domain ilmiah yang tak terhitung banyaknya seperti epidemiologi, ekologi, biomedis, biologi evolusioner, biogeografi, biologi konservasi serta bio-industri (Suriya *et al.*, 2018).

Untuk menangani jumlah sampel yang besar, DNA *barcoding* adalah teknik yang paling efektif dari segi waktu dan biaya. DNA *barcoding* juga digunakan dalam isolasi dan identifikasi spesies yang tidak diketahui, deteksi organisme yang dipatenkan dalam agrobioteknologi, baik untuk melindungi hak kekayaan intelektual sumber daya hayati atau untuk sertifikasi organisme sumber, analisis diet dan industri makanan, mencegah perburuan spesies yang terancam punah dan perdagangan ilegal sehingga DNA *barcoding* juga memainkan peran penting dalam penegakan hukum lingkungan. Keuntungan utama dari DNA *barcoding* adalah memperoleh volume besar data molekuler.

Hal ini sangat berguna dalam menentukan identitas organisme yang rusak (Suriya *et al.*, 2018).

F. Cytochrome C Oxydase Subuanalinit 1

COI (*Cytochrome C Oxydase Subanalit 1*) adalah salah satu subunit enzim *Cytochrome C Oxidase* (CCO). CCO terdiri dari 13 subunit protein dan mengandung tiga ion tembaga, zink, magnesium serta dua kelompok heme. Enzim ini berfungsi sebagai konstituen terminal rantai transpor elektron di bagian dalam membran mitokondria; tempat CCO akan mereduksi oksigen menjadi air sehingga memungkinkan produksi ATP (Robinson dan Winge, 2010). Karena berperan penting dalam fosforilasi oksidatif sehingga mutasi *COI* dapat menyebabkan berbagai macam komplikasi; pada manusia sendiri, penyakit yang disebabkan oleh mutasi *COI* antara lain *Leber's hereditary optic neuropathy* (LHON) (Brown *et al.*, 1992), *acquired idiopathic sideroblastic anemia* (Gattermann *et al.*, 1997), *Mitochondrial Complex IV deficiency* (MT-C4D) (Varlamov *et al.*, 2002), *Colorectal cancer* (CRC) (Namslauer dan Brzezinski, 2009) dan *Recurrent myoglobinuria mitochondrial* (RM-MT) (Kollberg *et al.*, 2005). Sekuen *COI* maleo dapat dilihat seperti pada Gambar 2.

5'-TGAAGTATTCTACCAACCACAAAGACATTGGCACCTTATATTTAATTTTTTCGGTACATGAGCCGGTATAATTGGA-3'
 3'-TACAGTTGGGTCATAGCTTGATCATCCATCTTATCCAACCTACGTTGGATGGCTGCATCATGGTCAAATCCGATTC-5'

5'-ACAGCACTAAGCCTCCTAATCCGCGCAGAAGCTCGGTCAACCCGGGACCCTTTTAGGAGACGACCAAATCTACAACG-3'
 3'-ATAGGCATAGCAGGAATCCACGACGATACACAGACTACCCCGACGCCTATACAATATGAAGCATGATATCCTGTA-5'

5'-TAATCGTCACCGCCCATGCCTTTGTAATAATCTTCTTCATAGTGATGCCATTATAATCGGCGGATTGGGAACTGA-3'
 3'-TCGGGTCTATAATCTCCATAACAGCCGTAATCATGGTAATATTTCATCGTCTGAGAAGCCTTCTCAGCAAAACGCAAA-5'

5'-CTAGTCCCCTTATAATCGGCGCCCCAGACATGGCATTCCCACGCATAAACCACATAAGCTTCTGGCTCCTCCCCC-3'
 3'-GTCCTACAACCCGAATTGATCGCCACTAACATCGAATGAATCCACGGTTGTCCACCCCATACCACACCTCGAAGA-5'

Gambar 2. Sekuen *COI* Maleo

Awalnya *COI* digunakan untuk *barcoding* lepidoptera tetapi menyebar ke spesies invertebrata, ikan, amfibi, reptil, burung, dan mamalia. Fragmen 650 bp gen *COI* DNA mitokondria telah diakui sebagai 'barcode standar' karena tingkat mutasinya cukup cepat untuk membedakan spesies yang berkerabat dekat dan juga karena sekuennya terjaga diantara spesies. Variasi nukleotida *COI* cukup efisien untuk menunjukkan kekerabatan antar spesies namun variasi intraspesifik telah dilaporkan kurang dari 10% (Nagarajan et al., 2020). Primer yang digunakan adalah *COIF* dan *COIR* (Lijtmaer et al., 2012).

G. Hipotesis

Modifikasi CTAB menghasilkan kualitas DNA yang layak untuk analisis molekuler dari kondisi sampel dengan tingkat kontaminasi tinggi dan kesegaran sampel tidak optimal meskipun belum pernah dicoba untuk isolasi DNA aves (Arseneau et al., 2017; Athanasio et al., 2016; Chakraborty et al., 2020; Mirimin dan Roodt-Wilding, 2015; Mishra et al., 2019).