

Uji Efektifitas Gen CHD Sebagai Penanda Molekuler untuk Identifikasi Jenis Kelamin pada Burung Air

Effectiveness Test of CHD Gene as A Molecular Marker for Sex Identification on Waterbirds

Wahyu Wulansari, Pramana Yuda dan Felicia Zahida
Fakultas Teknobiologi, UAJY, Jl. Babarsari 44 Yogyakarta;
Email: pramyd@staff.uajy.ac.id

INTISARI

Molecular sexing berbasis DNA dapat digunakan untuk mengetahui jenis kelamin secara cepat, tepat, dan murah. Gen penanda CHD (*chromo-helicase-DNA-binding*) umumnya menghasilkan dua pita pada betina (ZW), dan satu pita pada jantan, tetapi Dubiec (2006), menyatakan penentuan jenis kelamin lebih tepat dilakukan dengan menganalisis ukuran pita. Seiring perkembangannya, terdapat alternatif metode ekstraksi tanpa fenol-kloroform, dan beberapa alternatif primer bagi *molecular sexing*. Primer-primer yang telah digunakan untuk amplifikasi gen CHD antara lain pasangan P2-P8 (Griffiths dkk., 1998), 1237L-1272H (Khan dkk., 1998), serta 2550F-2718R (Fridolfson & Ellegren, 1999). Penelitian ini bertujuan menentukan primer yang paling efektif untuk mengidentifikasi jenis kelamin burung air dan membandingkan metode ekstraksi yang lebih efektif. Penelitian dilakukan pada Februari sampai Juni 2013 di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Atma Jaya Yogyakarta (UAJY). Dua kali ekstraksi dilakukan dengan metode PCE standar dan perebusan. Hasil ekstraksi divisualisasi pada agarose 0,8%, 100 V, selama 20 menit, dan dibandingkan. Hasil menunjukkan ekstraksi perebusan kurang efektif dibanding metode PCE standar. Hasil positif diamplifikasi dengan primer P2-P8, 1237L-1272H, dan 2550F-2718R, kemudian divisualisasi pada agarose 4%, 100 V, selama 90 menit. Panjang basa pita dihitung dengan grafik semilog guna identifikasi jenis kelamin. Rasio keberhasilan primer P2-P8 sebesar 87%, primer 1237L-1272H sebesar 100%, dan primer 2550F-2718R sebesar 87%. Pasangan primer P2-P8 membentuk CHD-Z berukuran 307-356 bp dan CHD-W berukuran 337-384 bp. Pasangan primer 1237L-1272H membentuk CHD-Z berukuran 249-259 bp dan CHD-W berukuran 262-283 bp. Pasangan primer 2550F-2718R membentuk CHD-Z berukuran 533-643 bp dan CHD-W berukuran 338-446 bp. Kesalahan identifikasi terjadi pada hasil amplifikasi primer P2-P8 sebanyak 2 sampel dan primer 1237L-1272H 4 sampel. Kesalahan terjadi karena pita sulit dibedakan sebagai gen CHD-W atau CHD-Z. Pasangan primer 2550F-2718R efektif guna identifikasi dengan kesalahan identifikasi paling minim.

Kata Kunci : *Molecular sexing*, gen CHD, ekstraksi, primer, efektif, burung air.

ABSTRACT

DNA-based molecular sexing is an alternative method to determine the sex of birds in the faster, accurate, and cheaper. CHD marker genes (*Chromo-helicase-DNA-binding*) generally amplified into two bands in females (ZW), and a single band in males. There also boiling method as an alternative extraction method to decrease the use of Phenol-chloroform. Dubiec (2006), states sex determination is more precisely done by analyzing the length of bands. P2-P8 (Griffiths et al, 1998), 2550F-2718R (Fridolfson & Ellegren, 1999), and 1237L-1272H (Khan et al, 1998) are pairs of primers that have been widely used. This study aims to determine the most effective primer and comparing the PCE and boiling method. The study was conducted in February until June 2013 in the Laboratory of Molecular Biology University of Atma Jaya Yogyakarta (UAJY). The DNA extraction performed by standard PCE and boiling method, then visualized on 0.8% agarose, 100 V, for 20 minutes. The results showed boiling method is less effective than the standard PCE. Samples then amplified with primers P2-P8, 1237L-1272H, and 2550F-2718R, then visualized on 4% agarose, 100 V, for 90 minutes. Length of the bands then calculated using semilog graph for gender identification. As result, P2-P8 success to amplify 87% of the sample,

1237L-1272H success to amplify 100% of the sample, and 2550F-2718R success to amplify 87% of the sample. Identification error occurred on the amplification by P2-P8 on 2 samples and primer 1237L-1272H on 4 samples. The error occurs because of the size of the band formed are difficult to be distinguished as CHD-W or CHD-Z. Primer pair 2550F-2718R is effective to identify the sex of the waterbirds with the most minimal misidentification. P2P8 form a CHD-Z 307-356 bp sized and CHD-W 337-384 bp sized. Primer 1237L-1272H form a CHD-Z 249-259 bp sized and CHD-W 262-283 bp sized. Primer pair 2550F-2718R form measuring 533-643 CHD-Z and CHD-W bp sized 338-446 bp.

Keywords : Molecular sexing, CHD genes , extraction, primer, effective, waterbirds.

PENDAHULUAN

Lebih dari separuh jenis burung bersifat monomorfik (Dubiec, 2006). *Molecular sexing* berdasarkan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan metode yang tepat, cepat dan efektif untuk melakukan *sexing* (Reddy, 2007). Penanda yang digunakan adalah gen CHD (*chromo-helicase-DNA-binding*) (Griffiths dkk., 1998). Umumnya, gen CHD-W dan CHD-Z pada betina menghasilkan dua pita, sedangkan dua gen CHD-Z pada jantan menghasilkan satu pita (Quintana dkk., 2008). Beberapa spesies hanya menghasilkan satu pita pada betina karena tidak terdeteksinya salah satu gen. Dubiec (2006), menyatakan penentuan jenis kelamin lebih tepat dilakukan dengan menganalisis ukuran panjang basa pita. Primer-primer digunakan dalam penelitian kali ini antara lain pasangan P2-P8 (Griffiths dkk., 1998), 2550F-2718R (Fridolfson dan Ellegren, 1999), serta 1237L-1272H (Khan dkk., 1998).

Metode PCE (*Phenol Chloroform Extraction*) umum digunakan, tetapi beresiko karena menggunakan fenol dan kloroform. Karena resiko gandanya, penggunaan fenol-kloroform mulai dikurangi penggunaannya (Gaaib, 2011). Tahun 2008, Quintana dkk. menggunakan metode perebusan dengan NaOH. Burung air secara ekologis bergantung pada lahan basah (Elfidasari dan Junarti, 2006). Kehadiran burung air merupakan indikator penting dalam pengkajian mutu dan produktivitas suatu lingkungan lahan basah. (Alamsyah dkk., 2007).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan membandingkan kualitas DNA hasil ekstraksi metode perebusan dengan metode standar PCE (*phenol-chloroform extraction*) dan menentukan primer molekuler yang paling efektif untuk mengidentifikasi jenis kelamin burung air. Hasil penelitian diharapkan dapat memberi informasi mengenai metode yang sesuai dalam melakukan identifikasi jenis kelamin terhadap spesies burung air di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah *tube stand*, tabung mikro, timbangan, *centrifuge*, *microwave*, *freezer*, *waterbath*, *tips*, *vortex*, *spin down*, sendok kimia, *gel tray*, sisir, bak elektroforesis, *gel doc*, *thermocycler*, *glove*, gelas beker, masker, gelas ukur.

Bahan-bahan yang digunakan adalah *parafilm*, NaOH, *lysis buffer* (tris HCL pH 8, EDTA, SDS), *Phenol-Chloroform-Isoamyl*, etanol, proteinase-K, Tris-HCl 1M pH=8, TE buffer pH=7.6 *reaction buffer* (50 mM KCl; 10 mM trisHCl pH 9; 0,1% Triton X-100) 1,5 mM MgCl₂; *goldview*, *loading dye*, *agarose gel*, *DNA ladder*, ddH₂O, *DreamTaqTM Green PCR Master Mix* Fermentas, primer P2-P8, 2550F-2718R, serta 1237L- 1272H. Sampel darah burung Trinil Pantai (*Tringa hypoleucos*), Trinil Kaki Merah (*Tringa totanus*), Cerek Jawa (*Charadrius javanicus*), Berkik Kembang Besar (*Rostratula benghalensis*), dan Kedidi Leher Merah (*Calidris ruficollis*). Sampel darah disimpan dalam *Queen's lysis buffer* pada 4°C. Beberapa sampel merupakan hasil ekstraksi tahun 2009, disimpan dalam ddH₂O pada 4°C.

Tahap Penelitian dan Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan dalam tiga langkah yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, dan visualisasi untuk mengetahui hasil amplifikasi

1. Ekstraksi DNA

a. Metode standar *Phenol-Chloroform Extraction*

Sampel ditambah 20 µl proteinase-K dan 700 µl buffer ekstraksi, diinkubasi semalam suhu 37°C. Sampel ditambahkan 700 µl *Phenol-Chloroform-Isoamyl* dan diletakkan dalam es 10 menit. Sampel disentrifugasi lalu ambil *supernatant* yang terbentuk dan dipindah ke tabung mikro yang baru. Ditambahkan 600 µl *Chloroform-Isoamyl* pada *supernatant* dan diletakkan dalam es 5 menit, kemudian disentrifugasi 15.000 rpm selama 2 menit. *Supernatant* dipindah ke tabung mikro baru, ditambahkan ethanol 95% dua kali volume *supernatant* dan 20 µl NaCl. Sampel diinkubasi di es 10 menit, disentrifugasi 20 menit. *Supernatant* dibuang, ditambahkan

700 µl ethanol 70%, dan disentrifugasi 2 menit. *Supernatant* dibuang dan tabung mikro dikeringkan dalam eksikator. Ditambahkan ddH₂O 50 µl, dan disimpan dalam *freezer* sampai hendak digunakan.

b. Metode perebusan berdasarkan Quintana dkk. (2008)

Sampel 25 µl ditambahkan 200 µl NaOH 50 mM, dipanaskan 10 menit dalam waterbath suhu 100°C. Larutan sampel diambil 100 µl dan dinetralkan dengan 100 µl Tris-HCl 1M pH = 8, yang dilarutkan 1:1 dalam TE *buffer* pH = 7.6 (TE), dan disimpan dalam ddH₂O pada suhu 4°C sampai tahap analisis PCR.

2. Kuantifikasi hasil ekstraksi

Hasil ekstraksi dielektroforesis dengan gel agarose 0,8% dalam tegangan listrik 100 V selama 20 menit. Hasil dilihat menggunakan *Gel Logic 200 Imaging system*.

3. Amplifikasi DNA

Total volume reaksi 25 µl terdiri dari 12,5 µl *DreamTaqTM Green PCR Master Mix*, 1µl primer (*forward* dan *reverse*), 1µl template DNA, dan 9,5 µl ddH₂O. Sampel diamplifikasi dengan primer P2-P8, primer 1237L-1272H, dan primer 2550F-2718R dalam tahapan sesuai optimasi oleh Wirastika (2013) seperti dalam Tabel 1.

Tabel 1. Tahapan dalam Program PCR bagi masing-masing pasangan primer.

Tahapan	Primer 1237L-1272H		Primer P2-P8		Primer 2550F-2718R		Keterangan
	Suhu(°C)	Waktu	Suhu(°C)	Waktu	Suhu (°C)	Waktu	
Pra denaturasi	92	2 menit	94	5 menit	95	5 menit	
Denaturasi	92	30 detik	94	30 detik	95	30 detik	40 siklus
Annealing	57	45 detik	48	45 detik	42	40 detik	
Extension	72	45 detik	72	45 detik	72	30 detik	
Final	72	5 menit	72	5 menit	72	5 menit	

(Sumber: Wirastika, 2013)

4. Kuantifikasi hasil amplifikasi

Hasil amplifikasi dielektroforesis dengan gel agarose 4%, tegangan listrik 100 V selama 90 menit. Hasil dilihat menggunakan *Gel Logic 200 Imaging system*.

5. Pengukuran Panjang Basa Pita DNA

Dibuat grafik semi-log dengan *Microsoft Excel 2007*. Dihitung panjang basa berdasar persamaan grafik. Jarak migrasi sebagai koordinatX, panjang basa koordinat Y.

6. Identifikasi Jenis Kelamin

Identifikasi jenis kelamin berdasarkan pada jumlah serta ukuran pita.

7. Evaluasi Efektifitas Primer

Efektifitas ditentukan dari kemampuan dalam mengidentifikasi jenis kelamin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi DNA dan Kuantifikasi Hasil Ekstraksi

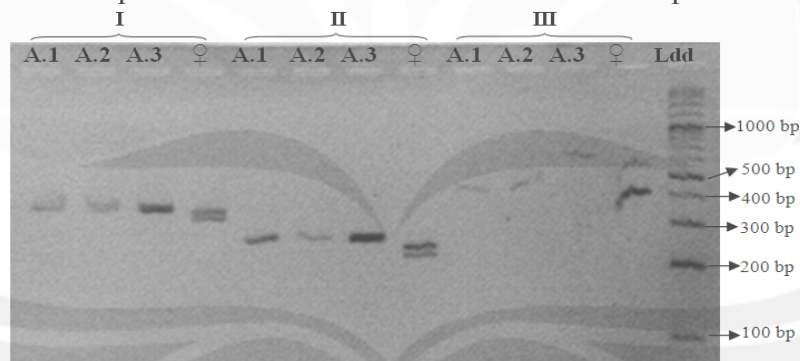
Ekstraksi PCE menunjukkan hasil positif pada keseluruhan sampel. Hanya 5 dari 15 sampel ekstraksi penggodokan menunjukkan hasil positif dimana terjadi smear. Hasil ekstraksi metode PCE standar lebih baik. Reagen PCE memiliki fungsi spesifik guna ekstraksi DNA.

B. Amplifikasi DNA

Amplifikasi dilakukan tanpa modifikasi suhu. Suhu sesuai rujukan terhadap Wirastika (2013) optimal bagi *DreamTaqTM Green PCR Master Mix* yang digunakan.

C. Kuantifikasi Hasil Amplifikasi

DNA genom hasil ekstraksi perebusan tidak teramplifikasi dengan baik karena tidak menunjukkan pita. Visualisasi hasil amplifikasi DNA genom sumber ekstraksi PCE menunjukkan variasi jumlah dan ukuran pita. Visualisasi Trinil Kaki Merah terlihat pada Gambar 1.



Gambar 18. Visualisasi hasil amplifikasi DNA Trinil Kaki Merah

Keterangan : P= primer P2-P8, 12= primer 1237L-1272H, 25= primer 2550F-2718R. D.1, D.2, D.3= cerek jawa, ♂= kontrol ayam jantan, ♀= kontrol ayam betina, Ldd= DNA ladder 100 bp

D. Pengukuran Panjang Basa

Terbentuk grafik bagi masing-masing gel. Panjang basa dihitung, dan dibandingkan dengan kontrol ayam. Hasil pengukuran sampel kontrol ayam dapat dilihat di Tabel 4.

E. Identifikasi Jenis Kelamin

Hasil identifikasi jenis kelamin keseluruhan sampel dapat dilihat pada Tabel 6.

F. Evaluasi Efektifitas Primer

Rasio keberhasilan primer P2-P8 adalah 87%, primer 1237L-1272H sebesar 100%. Dan primer 2550F-2718R sebesar 87%. Primer 1237L-1272H, dengan rasio keberhasilan 100% memiliki kesalahan identifikasi terhadap 4 sampel. Terdapat kesalahan identifikasi terhadap 2

Tabel 4. Kisaran ukuran pita CHD-Z dan CHD-W dari kontrol positif

Primer					
P2-P8		1237L- 1272H		2550F&2718R	
CHD-Z	CHD-W	CHD-Z	CHD-W	CHD-Z	CHD-W
308-368 bp	325-402 bp	231-243 bp	247-284 bp	496-762 bp	387-437 bp

Tabel 6. Hasil penghitungan ukuran basa dan identifikasi jenis kelamin terhadap lima jenis sampel burung air berdasarkan grafik semilog

Sampel	Primer											
	P2-P8				1237L- 1272H				2550&2718			
	Kode sampel	CHD-Z (bp)	CHD-W (bp)	Jenis kelamin	Kode sampel	CHD-Z (bp)	CHD-W (bp)	Jenis kelamin	Kode sampel	CHD-Z (bp)	CHD-W (bp)	Jenis kelamin
A. Trinil kaki merah	P.A2	-	352	Betina	12.A2	-	271	Betina	25.A2	-	340	Betina
	P.A3	-	357	Betina	12.A3	-	264	Betina	25.A3	-	338	Betina
	P.A4	-	359	Betina(*)	12.A4	252	-	Jantan	25.A4	562	-	Jantan
A. Berkik kembang besar	P.B1	-	384	Betina	12.B1	-	269	Betina	25.B1	643	401	Betina
	P.B2	-	-	-	12.B2	254	277	Betina	25.B2	-	-	-
	P.B3	-	373	Betina(*)	12.B3	-	269	Betina(*)	25.B3	634	-	Jantan
B. Cerek jawa	P.D1	-	-	-	12.D1	-	263	Betina	25.D1	-	-	-
	P.D2	325	-	Jantan	12.D2	-	263	Betina(*)	25.D2	533	-	Jantan
	P.D3	328	-	Jantan	12.D3	-	270	Betina(*)	25.D3	533	-	Jantan
C. Trinil pantai	P.E1	332	-	Jantan	12.E1	257	-	Jantan	25.E1	608	-	Jantan
	P.E2	332	357	Betina	12.E2	-	272	Betina	25.E2	-	381	Betina
D. Kedidi leher merah	P.E4	356	-	Jantan	12.E4	-	262	Betina(*)	25.E4	603	-	Jantan
	P.F1	307	337	Betina	12.F1	249	263	Betina	25.F1	-	446	Betina
	P.F2	319	351	Betina	12.F2	259	283	Betina	25.F2	-	424	Betina
	P.F3	320	358	Betina	12.F3	251	266	Betina	25.F3	-	427	Betina

Keterangan : (*)= kesalahan identifikasi

sampel oleh primer P2-P8. Tidak terdapat kesalahan identifikasi oleh primer 2550F-2718R. Kesalahan identifikasi oleh primer P2-P8 dan 1237L-1272H terjadi karena tidak munculnya pita ganda, serta kecilnya selisih ukuran pada pita CHD-Z dan CHD-W sehingga menyulitkan identifikasi pita tunggal sebagai pita CHD-Z atau pita CHD-W. Pita yang terbentuk oleh 2550F-2718R mudah dibedakan karena selisih panjang basanya besar.

Pergerakan pita DNA selama proses elektroforesis dapat dipengaruhi oleh tidak konsentrasi gel agarose dan tinggi voltase tidak merata, konformasi DNA, pewarna dan komposisi buffer (Windiaastika, 2012). Dengan kondisi yang dibuat sama (elektroforesis dengan konsentrasi agarose 4%, voltase 100 V selama 90 menit), bisa terjadi perbedaan kondisi pada masing-masing sumuran.

Hasil menunjukkan primer 2550F-2718R efektif guna identifikasi jenis kelamin burung air. Pita yang terbentuk oleh pasangan primer 2550F-2718R lebih mudah diamati. Primer P2-P8 efektif bagi Trinil Pantai dan Kedidi Leher Merah dengan terbentuknya dua pita pada betina. Primer 1237L-1272H efektif bagi Berkik Kembang Besar dan Kedidi Leher Merah. Kesalahan identifikasi primer P2-P8 lebih minim dibanding primer 1237L-1272H.

Disarankan adanya kontrol positif betina dalam penggunaan pasangan primer P2-P8 dan primer 1237L-1272H untuk mengurangi kesalahan identifikasi. Guna visualisasi yang lebih baik, gel poliakrilimida dapat digunakan (Dawson, 2001). Alternatif lain adalah penggunaan enzim restriksi guna memotong kromosom W. Vali (2002) menggunakan enzim BshNI terhadap Burung Berkik Besar sehingga terbentuknya tiga buah pita pada betina.

SIMPULAN

Primer 2550F-2718R efektif dalam mengidentifikasi jenis kelamin burung air karena pita CHD-Z dan CHD-W mudah dibedakan. Kesalahan identifikasi primer P2-P8 dan 1237L-1272H karena pita sulit dibedakan. Penggunaan ekstraksi metode perebusan kurang efektif.

SARAN

Penggunaan primer 2550F-2718R guna identifikasi jenis kelamin burung air.

Penggunaan primer P2-P8 lebih disarankan dibanding pasangan primer 1237L-1272H.

Penggunaan metode PCE (*Phenol Chloroform Extraction*) standar lebih disarankan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alamsyah H., A. Christianingsih, A. Fahrudin, N. Hidayatullah, A. Maulana, S. Purnama, S. Saputro, A.M. Tampubolon, B. Wicaksana, L.W. Sin, W. Novarino. 2007. Pedoman Pemantauan Flu Burung pada Satwa Burung. Yayasan Kutilang Indonesia. Jakarta.
- Dawson, A.D., Steven D. Fiona MH, Andrew PK, Ian L.J. & Terry B. 2001. A Critique of avian CHD-based Molekuler Sexing Protocols Illustrated by a Z-chromosom polymorphism detected in auklets. *Molecular Ecology Notes* 1, 201-204.
- Dubiec A., Magdalena Z.N., 2006. Molecular Techniques For Sex Identification In Birds. *Biological Lett.* 2006, 43(1): 3.12.
- Fridolfsson A-K, dan Ellegren H, 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avi. Bio.* 116-121.
- Gaaib, J.N., Adnan F. Nassief, dan Akeel H. Al-Assi. 2011. Simple Salting-out Method for Genomic DNA Extraction from Whole Blood. *Tikrit Journal of Pure Science* 16 (2) 2011 ISSN: 1813 – 1662.
- Griffiths R, Mike C.D., Kate Orr, dan Robert JGD, 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology.* 7: 1071-1075.
- Kahn N. W., John J. S., Quinn T. W. 1998. Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk* 115(4):1074-1078, 1998.
- Quintana, F., Gabriela C.L, Gustavo S. 2008. A Cheap and Quick Method for DNA-based Sexing of Birds. *Waterbirds* 31 (3) :485-488.
- Reddy, A. Vibhu Prakash dan S Shiveji. 2007. A Rapid, non-invasive, PCR-based method for Identification of Sex of the Endangered Old World Vultures–Implications for Captive Breeding Programmes. *Current Science*, 92(5).
- Vali U. 2002. Molecular Sexing of Eurasian Woodcock *Scolopax rusticola* . *Wader Study Group Bull.* 98: 48.
- Windiaastika, Gati. 2012. Metode Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarose. Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan Surabaya. Surabaya.
- Wirastika, P. I. P., 2013. Penggunaan Metode Molekuler Sexing untuk Penentuan Jenis Kelamin Burung Jalak Bali (*Leucopsar rothschildi*). *Skripsi.* Fakultas Teknobiologi UAJY. Yogyakarta. Tidak diterbitkan.
- Yuda, P. 2008. Conservation Genetic of the Java Sparrow (*Padda oryzivora*) and an Analysis of it's Viability. *Thesis.* School of Marine and Tropical Biology. James Cook University. Australia.
- Zaniar, F. 2002 . Penggunaan Penanda Molekuler untuk Penentuan Jenis kelamin Burung Betet Jawa. *Skripsi.* Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB . Bogor . Tidak diterbitkan.