



ISOLASI DAN AMPLIFIKASI mtDNA AYAM HUTAN MERAH DAN AYAM KAMPUNG (*Gallus gallus*) SULAWESI UTARA

Decky D. W. Kamagi
Biologi FMIPA Universitas Negeri Manado
deckykamagi@yahoo.com

ABSTRAK. Penelitian ini bertujuan memperoleh metode yang tepat untuk isolasi dan amplifikasi sekuens gen *cyt b* dan COI mtDNA ayam hutan merah dan ayam kampung (*Gallus gallus*) Sulawesi Utara. Sampel diperoleh dari jaringan otot dari spesimen yang dikumpulkan dari beberapa daerah dan kawasan Sulawesi Utara. Pengumpulan dan preparasi sampel dilakukan dengan perlakuan alkohol 95% dan disimpan dalam suhu dibawah 5⁰C. Isolasi DNA total menggunakan innu PREP DNA micro kit dengan memodifikasi protokol. Amplifikasi gen *cyt b* menggunakan primer umum L14841 dan H15149, sedangkan amplifikasi gen COI menggunakan primer BirdR1 dan BirdF1. Isolasi DNA dan amplifikasi DNA target dikerjakan di Laboratorium Molekuler Universitas Negeri Manado. Hasil yang diperoleh Metode preparasi sampel dan isolasi DNA total ternyata menghasilkan isolat yang berkualitas yang untuk proses amplifikasi DNA target. Preparasi komponen dan kondisi PCR yang dilakukan ternyata berhasil mengamplifikasi kedua gen target pada ayam hutan dan ayam kampung yaitu gen *cyt b* dengan panjang berkisar 400 nukleotida dan COI berkisar 600 nukleotida.

Kata kunci: Isolasi dan amplifikasi, mtDNA, Ayam, Sulawesi Utara

ABSTRAK. Penelitian ini bertujuan memperoleh metode yang tepat untuk isolasi dan amplifikasi sekuens gen *cyt b* dan COI mtDNA ayam hutan merah dan ayam kampung (*Gallus gallus*) Sulawesi Utara. Sampel diperoleh dari jaringan otot dari spesimen yang dikumpulkan dari beberapa daerah dan kawasan Sulawesi Utara. Pengumpulan dan preparasi sampel dilakukan dengan perlakuan alkohol 95% dan disimpan dalam suhu dibawah 5⁰C. Isolasi DNA total menggunakan innu PREP DNA micro kit dengan memodifikasi protokol. Amplifikasi gen *cyt b* menggunakan primer umum L14841 dan H15149, sedangkan amplifikasi gen COI menggunakan primer BirdR1 dan BirdF1. Isolasi DNA dan amplifikasi DNA target dikerjakan di Laboratorium Molekuler Universitas Negeri Manado. Hasil yang diperoleh Metode preparasi sampel dan isolasi DNA total ternyata menghasilkan isolat yang berkualitas yang untuk proses amplifikasi DNA target. Preparasi komponen dan kondisi PCR yang dilakukan ternyata berhasil mengamplifikasi kedua gen target pada ayam hutan dan ayam kampung yaitu gen *cyt b* dengan panjang berkisar 400 nukleotida dan COI berkisar 600 nukleotida.

Kata kunci: Isolasi dan amplifikasi, mtDNA, Ayam, Sulawesi Utara

PENDAHULUAN

Laju perkembangan teknologi telah memberi dampak dalam pengembangan metode dan teknik laboratorium sehingga pekerjaan biologi molekuler seperti mengisolasi DNA, menentukan sekuens basa suatu gen atau sebagian gen menjadi lebih efisien dan efektif, namun demikian pekerjaan itu masih tetap menghadapi tantangan terutama bersangkutan dengan tingkat keberhasilan. Oleh karena itu pekerjaan isolasi sampai ke analisis sekuens DNA seringkali dilakukan berulang-ulang agar sehingga diperoleh hasil maksimal melalui metode dan preparasi yang tepat.

Tahap utama dalam usaha menganalisis DNA adalah bagaimana mengumpulkan DNA dari berbagai organisme yang menarik minat atau menjadi target. Awalnya pekerjaan isolasi DNA butuh waktu yang lama, karena selain proses sangat sulit juga memerlukan sejumlah koleksi DNA yang besar, namun seiring dengan kemajuan teknologi sekarang ini pekerjaan untuk analisis DNA, sampel yang sedikit saja misalnya secuil potongan jaringan yang diambil dari ujung ekor tikus, darah, rambut, kuku bahkan sampel yang telah lama misalnya fosil dapat digunakan sebagai sumber DNA. Ekstraksi DNA dari hewan, tumbuhan ataupun mikroorganisme pada prinsipnya adalah mengeluarkan seluruh kandungan selular ke dalam suatu larutan. Isolasi DNA untuk mikroorganisme pada dasarnya lebih mudah daripada organisme lainnya, karena mikroorganisme misalnya bakteri tidak memiliki tulang, lemak, dan bagian jaringan seperti pada tumbuhan maupun hewan. Biasanya sampel dari hewan dan tumbuhan perlu digerus menjadi potongan-potongan kecil atau ditambahkan enzim degradatif sebelum diproses lebih lanjut. Secara manual berbagai protokol ekstraksi DNA telah banyak dijelaskan baik untuk prokariotik maupun eukariotik mulai dari sampel sel dan jaringan spesifik (Sambrook *et al.* 1989). Sekarang ini

pekerjaan ekstraksi DNA dari berbagai sampel telah dipermudah dengan dijualnya berbagai kit ekstraksi DNA siap pakai dengan berbagai merek dan berbagai keunggulan serta telah disiapkan dengan paket untuk masing-masing jenis sampel, sehingga keberhasilan pekerjaan ekstraksi DNA dari berbagai sampel dan untuk kepentingan luas (genomik, DNA mitokondria dan DNA virus) dapat dilaksanakan dengan cepat dan relatif lebih murah.

Tujuan utama ekstraksi DNA adalah untuk mendapatkan DNA dengan kualitas baik, artinya DNA yang kita ekstraksi itu dalam tingkat kemurnian yang tinggi, karena DNA yang berkualitas atau murni adalah esensial untuk keberhasilan percobaan, terutama dalam proses amplifikasi DNA melalui PCR (*polymerase chain reaction*), karena sisa-sisa sel dan protein dapat menghambat proses amplifikasi DNA. Jadi kunci proses ekstraksi DNA adalah mendapatkan DNA dengan tingkat kemurnian yang tinggi, sehingga pekerjaan lebih lanjut seperti amplifikasi DNA dan sekuensing menjadi efisien dan efektif.

Preparasi isolasi dan amplifikasi gen-gen mtDNA pada ayam hutan merah (jenis liar) dan ayam kampung di Sulawesi Utara dipandang perlu dikaji karena Ayam (*Gallus gallus*) memiliki variasi jenis dan morfologis paling besar di antara spesies yang ada di bumi. Ayam tersebar dan mudah ditemukan di beberapa daerah di Indonesia. Ayam dengan berbagai ras dan kelebihan mereka dapat dijumpai hampir di semua tempat. Ayam pedaging, ayam petelur, ayam kampung, ayam untuk adu ketangkasan memiliki sifat yang khas sebagai hasil domestifikasi, persilangan dan pemuliaan (*breeding*) dan pengembangan keragaman genetik. Proses domestifikasi, persilangan dan pemuliaan dan pengembangan keragaman bermula dari sumber genetik utama, yaitu dari ras ayam hutan yang ditemukan di beberapa wilayah biogeografi.

Ayam hutan merah adalah nenek moyang dari ayam domestik, dan tersebar di Asia tenggara yaitu: Sumatera, Jawa sampai ke Bali, Sulawesi, Filipina, Malaysia, India, Pakistan, Thailand. Ayam hutan merah adalah sebagai nenek moyang utama dari seluruh ayam domestik, didukung beberapa bukti meliputi: temuan arkeologis di lembah Indus, Hebei China, yang diperkirakan hidup pada awal 5400 BC (West dan Zhou, 1988), bukti molekuler berupa sekuens *region control* mitokondria (Fumihito *et al.* 1996) dan data mikrosatelit dari berbagai populasi ayam yang ada.

Analisis karakteristik sekuens gen-gen mitokondria ayam (*Gallus gallus*) jenis liar yang ada di Sulawesi Utara sekarang ini masih terbatas. Isolasi gen target yaitu gen-gen mtDNA pada ayam akan menjadi pembuka jalan untuk kepentingan analisis karakter sekuens gen target tersebut. Menemukan metode yang tepat mengisolasi mtDNA akan mempermudah memperoleh isolat, dan selanjutnya dapat ditindaklanjuti melalui amplifikasi gen melalui PCR, dan pada akhirnya disekuensing untuk mendapat profil sekuens yang dapat digunakan untuk pengungkapan variasi genetik secara molekuler.

METODE

Pengambilan dan Preparasi Sampel

Sampel dikumpulkan dari beberapa jaringan otot dan dipreparasi dengan perlakuan alkohol 95% dan disimpan dalam temperatur dibawah 5⁰C.

Ekstraksi DNA

DNA total diekstraksi menggunakan *innuPREPDNA micro Kit*. Protokol isolasi berdasarkan petunjuk manual dalam kit, dengan modifikasi tertentu.

Amplifikasi Gen Target

Amplifikasi masing-masing gen target menggunakan primer L 14841 dan H 15149 untuk gen *cyt b* dan Bird R1 dan BirdF1

untuk gen COI. Preparasi komponen dan kondisi PCR dilakukan berdasarkan komponen dan kondisi PCR secara umum dengan modifikasi pada beberapa tahapan tertentu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Sampel

Spesimen Ayam hutan merah dan Ayam kampung telah diperoleh dari beberapa lokasi di daerah Sulawesi Utara, kawasan Kab. Minahasa dan Kep. Sangihe. Sampel diperoleh dari sayatan jaringan otot bagian dada beberapa spesimen. Sampel yang diperoleh diberi perlakuan dengan larutan alkohol 95%, dan setiap 4 jam larutan alkohol yang digunakan untuk merendam diganti baru. Sampel tiap spesimen disimpan dalam suhu rendah minimal 5⁰C dibawah titik nol, dan dalam keadaan tanpa larutan alkohol.

Preparasi Isolasi DNA Total

Isolasi DNA total menempuh cara berdasarkan petunjuk manual seperti yang tertera pada protokol kit yang tersedia, namun dengan modifikasi tertentu. Tahapan isolasi DNA total standar sesuai protokol pada kit ditunjukkan pada Tabel 1.

Modifikasi perlakuan yang telah dilakukan pada tahapan isolasi DNA total dari protokol kit yang tersedia ditunjukkan pada Tabel 2.

Amplifikasi Gen Target

Preparasi komponen dan kondisi PCR untuk mengamplifikasi kedua gen target yaitu gen *cyt b* dan gen COI dilakukan dengan cara yang sama yaitu mengikuti cara seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 1. Tahapan isolasi DNA standar dalam protokol kit

Tahapan	Protokol pada Kit
Ukuran	• Sempel maksimal 5 mg
Lysis	• 200 µl TLS dan 20 µl PK • vortex 5 detik • inkubasi 50°C:30 menit • sentrifuge 10.000 x g (12.000 rpm):1 menit
Binding DNA to spin filter	• 200 µl TBS • vortex 15 detik • sentrifuge 10.000 x g (12.000 rpm)
Washing	• 400 µl HS • 10.000 x g (12.000 rpm):30 detik • 750 µl MS • sentrifuge 10.000 x g (12.000 rpm):30 detik
Remove Ethanol	• Sentrifuse dengan kec. maksimal: 2 menit
Elution	• 50 – 100 µl elution buffer • inkubasi 1 menit • sentrifuge 6.000 x g (8.000 rpm)

Tabel 2. Modifikasi Perlakuan pada Tahapan isolasi DNA

Tahapan	Protokol yang digunakan
Materi	• sampel 3 mg*
Lysis	• 250 µl TLS dan 25 µl PK* • vortex 5 detik • inkubasi 50°C: 3 jam • sentrifuge 10.000 x g (12.000 rpm): 1 menit
Binding DNA to spin filter	• 200 µl TBS • vortex 15 detik • 10.000 x g (12.000 rpm)
Washing	• 400 µl HS • 10.000 x g (12.000 rpm): 1 menit • 750 µl MS • 10.000 x g (14.000 rpm):2 menit
Remove Ethanol	• sentrifuge 14.800 rpm: 2 menit*
Elution	• 100 µl elution buffer • inkubasi 15 menit* • sentrifuge 10.000 x g (12.000 rpm): 1 menit*

Catatan: Tahapan protokol yang diberi tanda *asterix* adalah modifikasi perlakuan.

Tabel 3. Komponen Reaksi PCR

Komponen PCR	Konsentrasi	Volume
DNA template	-	2 µL
ddH ₂ O	-	34 µL
PCR Mix	5 X	10 µL
MgCl ₂	1.5 Mm	1.5 µL
dNTPs	20 Mm	1.5 µL
Primer forward (L)	10 pmol µL ⁻¹	2 µL
Primer reverse (H)	10 pmol µL ⁻¹	2 µL
Tag DNA polymerase	4 – 6 U µL ⁻¹	2 µL

Pengukuran Konsentrasi amplicon mtDNA

Hasil pengukuran masing-masing amplicon mtDNA melalui *Gene Quant Pro*, yaitu suatu alat pengukuran konsentrasi DNA yang menggunakan *spectrophotometer* absorbansi ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ditunjukkan pada Tabel 5 dan Tabel 6.

Tabel 4. Kondisi Reaksi PCR

Banyaknya siklus	Durasi (menit)	Temperatur °C	Tahap
35	2	95	Denaturasi awal
	0.5	95	Denaturasi
	0.5	52	Annealing
	0.5	72	Elongasi
	1	72	Pasca elongasi

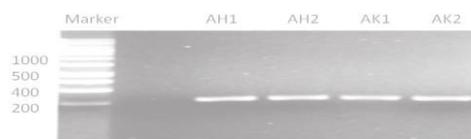
Tabel 5. Hasil pengukuran amplicon gen *cyt b*

Spesimen	Sampel	Rasio λ260/λ280	Konsentrasi
Ayam hutan merah	1	1,857	46,0
	2	1,877	101
Ayam Kampung	1	1,875	83,3
	2	1,883	187

Tabel 6. Hasil pengukuran amplicon gen COI

Spesimen	Sampel	Rasio λ260/λ280	Konsentrasi
Ayam hutan merah	1	1,807	75,8
	2	1,877	101
Ayam Kampung	1	1,880	135
	2	1,822	87,4

Hasil pengukuran amplicon masing-masing gen target melalui elektroforesis gel agarosa 1,5% ditunjukkan pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Separasi amplicon gen *cyt b* pada gel agarosa 1,5%

AH1= Ayam hutan AH2 =Ayam hutan, AK1 =Ayam kampung dan AK2 = Ayam kampung



Gambar 2. Separasi amplicon gen COI pada gel agarosa 1,5%

AH1= Ayam hutan AH2 =Ayam hutan, AK1 =Ayam kampung dan AK2 = Ayam kampung

Hasil separasi dari proses elektroforesis menunjukkan bahwa amplicon gen target gen *cyt b* (Gambar 1) memiliki panjang berkisar 200 – 400 pasang basa dan hal ini sesuai dengan amplicon yang diharapkan berdasarkan sepasang primer yang digunakan. Begitu pula dengan amplicon gen target COI, di mana gen tersebut memiliki panjang berkisar 500– 600 pasang basa (Gambar 2), sesuai dengan pemanjangan yang diharapkan dari primer yang digunakan. Preparasi sampel yang dilakukan dengan perlakuan alkohol teknis 95% ternyata memberikan hasil yang efektif dalam proses isolasi DNA. Keberhasilan preparasi sampel dengan menggunakan alkohol teknis 95%, diduga karena kandungan air yang terdapat pada sampel spesimen dapat diabsorpsi oleh alkohol sehingga kadar air menjadi rendah. Oleh karena itu perlakuan spesimen sampel untuk preparasi isolasi, kandungan air dalam sampel sebaiknya dalam rendah, sehingga konsentrasi komponen reaksi isolasi DNA menjadi relatif stabil dan reaksinya maksimal. Md-Zain *et al.* (2010) juga menghadapi persoalan yang sama ketika menggunakan sampel yang telah diawetkan dengan formalin. Dengan demikian dalam preparasi sampel, kadar air sampel spesimen perlu diperhatikan.

Isolasi DNA total dengan menggunakan kit ekstraksi *innuPREP DNA Micro Kit*, memberikan hasil yang optimal walaupun dengan ukuran sampel yang relatif sedikit. Kendala dengan keterbatasan sampel dapat teratasi karena protokol kit tersebut hanya memerlukan ketersediaan spesimen sampel yang relatif lebih sedikit dibandingkan dengan menggunakan kit lainnya. Protokol kit yang digunakan juga telah dimodifikasi sedemikian rupa sehingga hasil yang diperoleh optimal. Tahapan dalam protokol yang dimodifikasi terutama pada tahap lisis, di mana takaran larutan pelisis TLS dan PK ditingkatkan menjadi 250 µl dan 25 µl dan

selain itu waktu inkubasi dilakukan lebih lama yaitu sampai 3 jam. Perlakuan dengan meningkatkan takaran larutan pelisis dan lama inkubasi, ternyata memberikan kesempatan untuk larutan pelisis bekerja secara maksimal.

Running PCR untuk kedua gen target dilakukan beberapa kali dengan memodifikasi komponen dan kondisi reaksi sehingga diperoleh hasil yang optimal. Hasil optimasi komponen dan kondisi PCR untuk gen *cyt b*, sedikit berbeda dari yang pernah dilakukan oleh peneliti lain, misalnya Md-Zain *et al.*, (2010) dan Widayanti dkk, (2004). Perbedaan itu terletak pada preparasi sampel yang digunakan dan karena selain kit PCR, juga mesin PCR yang digunakan berbeda. Sementara itu komponen dan kondisi PCR untuk amplifikasi gen COI, tidak jauh berbeda dengan apa yang dilakukan oleh beberapa peneliti lain seperti Desjardins dan Morais, 1990, namun ditemukan perbedaan terkait dengan primer yang digunakan dan juga jenis sampel, karena jenis sampel yang digunakan mereka berupa jaringan darah, jadi pendekatan preparasinya tentu berbeda. Namun demikian, preparasi amplifikasi gen *cyt b* maupun gen COI, pada prinsipnya tidak jauh berbeda.

Berdasarkan pemeriksaan melalui pengukuran kemurnian konsentrasi amplicon dengan *spectrophotometer* absorban ultraviolet dan uji elektroforesis dapat dipastikan bahwa kedua gen target yaitu gen *cyt b* dan gen COI telah teramplifikasi secara tepat sesuai dengan primer digunakan. Panjang nukleotida gen *cyt b* yang diamplifikasi secara parsial mencapai 400 pasang basa, sedangkan panjang nukleotida gen COI yang diamplifikasi mencapai 600 pasang basa. Keberhasilan inisiasi dalam pemanjangan sekuens kedua gen target tersebut sesuai dengan panjang nukleotida yang diharapkan dari penggunaan kedua pasang primer masing-masing gen tersebut. Amplifikasi gen *cyt b* mitokondria oleh

primer umum yaitu L 14841 dan H 15149 (Kocher, 1998) ternyata dapat juga digunakan untuk amplifikasi gen *cyt b* pada ayam. Beberapa penelitian lain juga telah melakukannya pada primata, seperti yang dilakukan oleh Widayanti dkk. (2004). Widayanti dkk. (2004) berhasil mengamplifikasi gen *cyt b* *C. bancanus* secara parsial dengan panjang mencapai 287 nt, di mana hasil ini tidak jauh berbeda dengan yang diperoleh. Dengan demikian dapat dipastikan bahwa primer umum L 14841 dan H 15149, dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen *cyt b* secara parsial pada hewan, secara khusus pada ayam. Keberhasilan amplifikasi gen COI pada ayam, pada dasarnya tidak diragukan karena primer yang digunakan memang telah banyak digunakan pada hewan terutama kelompok burung. Amplifikasi gen COI oleh primer yang digunakan mencapai 600 pasang basa, ternyata sesuai dengan harapan, tidak jauh berbeda dengan hasil yang diperoleh H. Sawai *et al.* 2010 pada ayam jenis lainnya.

Sekarang yang menjadi persoalan adalah apakah ampikon yang diperoleh itu benar-benar gen target? Persoalan ini sudah tentu akan menjadi jelas ketika penelitian ini dilanjutkan yaitu apabila ampikon tersebut dilanjutkan untuk disekuensing.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat direkomendasikan bahwa: Metode perlakuan dalam rangka preparasi sampel untuk isolasi DNA total, dan penggunaan kit isolasi dapat digunakan untuk mendapatkan isolat DNA total pada ayam hutan merah dan ayam kampung. Modifikasi preparasi komponen dan kondisi PCR yang dilakukan ternyata dapat mengamplifikasi kedua gen target yaitu gen *cyt b* dan COI pada ayam hutan merah dan ayam kampung.

DAFTAR PUSTAKA

Desjardins, P., & R. Morais. (1990). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial

- genome. *Journal of Molecular Biology* 212: 599-634.
- Fumihito A. et al. (1996). Evolution Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, pp. 6792-6795,
- Hayashi, J. I., Tagashira, Y., & Yoshida, M. C. (1985), Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Experimental Cell Research*. 160: 387-395.
- Md-Zain, B. M. *et al.* (2010), Phylogenetic position of *Tarsius bancanus* based on partial cytochrome b DNA sequences, *Journal of Biological Science* 10 (4):348-354.
- Sawai, H. *et al.* (2010). The Origin and Genetic Variation of Domestic Chickens with Special Reference to Junglefowls *Gallus g. gallus* and *G. varius*. *PLoS ONE* www.plosone.org. Vol. 5. Issue 5.
- Sambrook & Russel. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Third Edition. New York: Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,
- Widayanti R., D. Duryadi Solihin, D. Sajuthi, R.R. Dyah Perwitasari, (2004), Kajian penanda genetik gen cytochrome B pada *Tarsius sp.*, *Jurnal Sain veterary*. Vol. 24 No. 1:1-8.
- West B. & Zhou B. (1988) Did chickens go north? New evidence for domestication. *Journal of Archaeological Science* 15, 515–33