

PEMENCILAN MITOKONDRIA DNA (mtDNA) DARIPADA  
BERBERAPA SPESIES BURUNG

ZAITON BT SAPAK



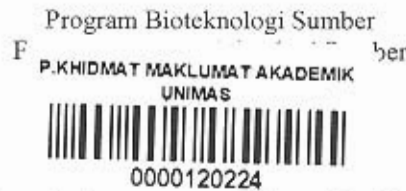
UNIVERSITI MALAYSIA SARAWAK

2003

QH  
603  
M5  
Z21  
2003

## Pemencilan Mitokondria DNA ( mt DNA) daripada beberapa spesies burung

Zaiton Binti Sapak



### ABSTRAK

Kajian molekul ini melibatkan 12 spesies burung yang dikumpul sekitar Universiti Malaysia Sarawak dan Taman hidupan liar Matang, Sarawak. Tujuan utama kajian ini adalah untuk mengaplikasikan kaedah penjujukan mitokondria DNA yang menggunakan penanda gen 16S dalam pengecaman burung di Borneo dan seterusnya membina pokok filogenetik. Pengecaman burung dan pembinaan pokok filogenetik telah wujud iaitu menggunakan kaedah penghibridan DNA yang dilakukan oleh Sibley namun kaedah ini merupakan kaedah lama dan masih belum diaplikasikan untuk spesies-spesies di Borneo. Terdapat tiga langkah penting yang terlibat dalam kajian ini iaitu pemencilan genom DNA daripada sampel darah dan tisu yang menggunakan protokol kit viogene, Polymearse Chain Reaction ( PCR ) untuk membuat salinan DNA dalam kuantiti yang banyak dan penjujukan DNA. Sepanjang tempoh kajian keseluruhan genom DNA telah berjaya dipencilkan daripada 25 sampel darah dan 4 sampel tisu. Sebanyak 23 hasil pemencilan telah diampifikasikan dengan PCR dan dua spesies telah dibuat penjujukan. Panjang rantai bes yang diperlukan dalam penjujukan adalah 500bp hingga 750bp namun hasil yang diperolehi untuk dua spesies yang telah dilakukan penjujukan tidak mencapai sasaran iaitu hanya 200bp sahaja. Walau bagaimanapun kajian ini boleh diteruskan pada masa akan datang kerana didapati kaedah ini berpotensi untuk digunakan dalam menyelesaikan masalah spesies burung yang mengalami krisis identiti seperti spesies Bulbul dan Babbler.

Kata kunci: Mitokondria, Penanda gen 16S, Pengestrakan , Polymerase Chain Reaction, Penjujukan.

### ABSTRACT

*This molecular study involved the collection of 12 different species of birds from UNIMAS and Matang Wild life centre in Sarawak. The aims of this research is to apply the 16S rRNA mtDNA gene marker sequence method in identifying and constructing phylogenetic tree of birds species of Borneo. The identification and construction phylogenetic tree of birds using genetic materials had been earlier done by Sibley with DNA-DNA hybridization method. However, this is an old method and had not been applied to birds in Borneo. This research involved three important steps. First isolation of total genomic DNA from blood and tissue samples, second, the application of PCR to make numerous copies of PCR products using Viogene Kit method, and third is sequencing DNA. In this study, genomic DNA from 25 blood and four tissue samples of selected birds had been successfully extracted. Of these 23 samples were successfully amplified by PCR and two species had been sequence. Unfortunately these two samples did not achieved the target sequence of 500bp to 750bp because only get 200bp. It is recommended that, this research should be continued because it has potential to solve systematic problems especially cryptic species, such as Bulbul and Babbler.*

*Key words: Mitochondria, 16S gene marker, Extraction, Polymerase Chain Reaction, Sequencing.*

## 1.0 Pengenalan

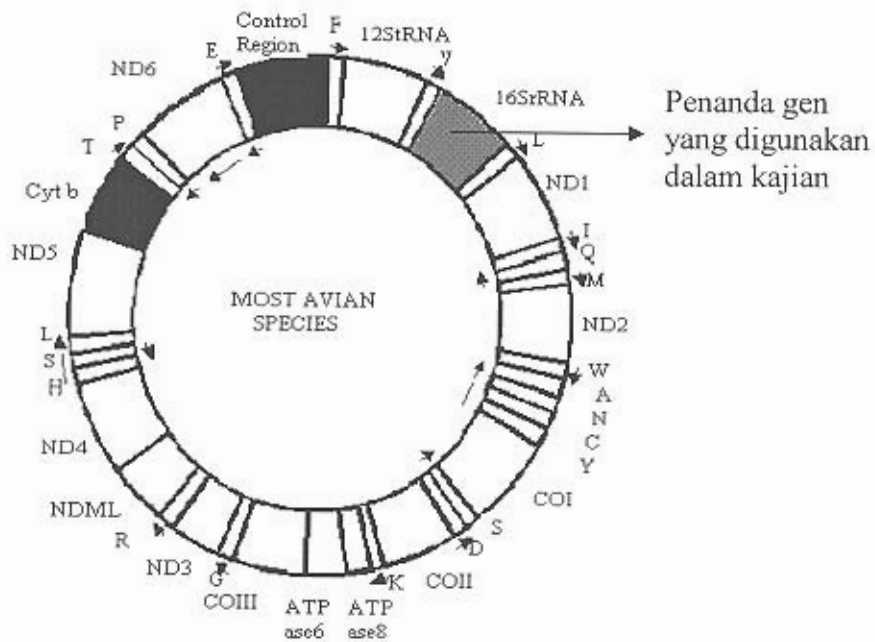
### 1.1 Spesimen Kajian

Kajian ini melibatkan beberapa spesies avifauna yang terdapat di Borneo dengan menggunakan kaedah penjujukan DNA untuk membuat pengecaman yang lebih tepat dan seterusnya membina pokok filogenetik. Taburan avifauna adalah meluas dan mengikut catatan Davison *et.al.*, (1989) terdapat kira-kira 9700 spesies dan hampir 100,000,000,000 individu di dunia. Di Borneo dianggarkan terdapat 358 spesies asal yang mempunyai pelbagai ciri morfologi menarik dan kepentingan kepada persekitaran. Keperluan pengecaman dan pengelasan telah disedari sejak zaman ahlikaji burung seperti Aristotle, Pliny, William Turner dan Pcirre Belon yang menggunakan pengecaman berdasarkan habitat, cara makan dan bahagian morfologi yang penting. Willughby dan Ray (1976), telah menghasilkan satu keadah pengecaman yang berdasarkan pada paruh, kaki, saiz badan dan ciri - ciri anatomi lain yang pada hari ini telah menjadi prinsip asas untuk semua peringkat pengelasan burung (Stresemann, 1975). Pengecaman dan pengelasan berdasarkan ciri- ciri morfologi adakala menimbulkan pedebatan dikalangan ahli kaji burung. Sebagai contoh burung layang-layang (swifts) dan sualo (swallow) yang pada pandangan mata kasar mengatakan mereka adalah spesies yang mempunyai hubungan yang rapat berdasarkan cara makan dan ciri morfologi, namun hasil maklumat genetik menunjukkan hubungan diantara spesies ini adalah jauh. Burung layang-layang lebih berhubung kait dengan burung tukang (nightjar) berbanding sualo dan sualo lebih berkait rapat dengan burung cekup (warbler) dan burung ciak (sparrow). Walau bagaimanapun pada hari ini terdapat tiga cara yang digunakan dalam pengelasan burung iaitu *eclectic* yang membuat pengecaman berdasarkan evolusi, *phenetic* berdasarkan ciri taksonomi dan kaedah terbaru ialah *cladistic* berdasarkan filogenetik (Sibley & Ahlquist, 1990).

Ciri rantai tunggal DNA yang tidak stabil dan perlu berkomplimentari dengan pasangan besnya membentuk rantai ganda dua helik (Doty *et.al.*, 1960 ) telah memberi idea kepada sibley dan Ahliquist (1981) untuk menghasilkan kaedah penghibridan DNA dalam pengecaman spesies burung. Melalui teknik HAP(hydroxyapatite) DNA-DNA hibrid, Sibley dan Ahliquist (1990) telah berjaya menghasilkan 30,054 penghibridan DNA dalam 1209 set eksperimen yang melibatkan 26,554 ekor burung dalam tempoh 11 tahun 5 bulan. Di Borneo, masih belum terdapat kajian genetik digunakan dalam pengelasan dan pengecaman burung. Objektif utama kajian ini adalah untuk mengaplikasikan kaedah penjujukan DNA dalam pengecaman burung. Kaedah penjujukan lebih praktikal berbanding penghibridan DNA memandangkan kewujudan mesin canggih seperti 'Thermal cycler' yang dapat membuat salinan DNA yang banyak dalam masa yang singkat dan penggunaan primer yang boleh mendapatkan jujukan yang spesifik serta mesin ABI PRISM yang dihubungkan dengan kemudahan komputer dapat membuat dan membaca jujukan dengan mudah.

## 1.2 Mitokondria DNA ( mt DNA) burung

mtDNA burung adalah kecil iaitu 16 500 bp sahaja. Ia berbentuk bulat dan tidak mempunyai intron ( Brown *et.al.*,1979). mtDNA diwarisi daripada ibu ( maternal ) tanpa berlaku rekombinasi meiosis dan ia sesuai digunakan dalam kajian evolusi dan penghibridan DNA (Lamb & Avise, 1986). mtDNA mempunyai 13 RNA pengutus (mRNA), 22 RNA pemindah (tRNA) dan 2 RNA ribosom (rRNA) (rujuk Rajah 1). Setiap gen- gen ini mengalami kadar evolusi yang berbeza. Dalam kajian ini salah satu rRNA digunakan sebagai penanda genetik iaitu 16SrRNA. Rasionaliti pemilihan 16SrRNA sebagai penanda genetik kerana pada kawasan ini berlaku kadar evolusi yang perlahan dan mempunyai primer universal untuk burung yang telah dihasilkan iaitu 16S.



Rajah 1: Mitokondria DNA bagi kebanyakan burung.(Mindell *et.al.*,1998)

## 1.3 Objektif kajian

Mengenalpasti perbezaan antara spesies 'cryptic' ( Bulbul dan Babbler ) dan spesies- spesies lain dengan menggunakan kaedah penjujukan DNA dan seterusnya membina pokok filogenetik bagi spesies yang dikaji.

## 2.0 Kaedah

### 2.1 Pengumpulan sampel

Pengumpulan sampel telah dilakukan di dua kawasan iaitu selama dua minggu di kawasan Universiti Malaysia Sarawak (UNIMAS) dan satu minggu di Taman Hidupan Liar Matang, Sarawak. Penangkapan burung dilakukan dengan memasang jaring kabus (*mist-net*) di beberapa lokasi yang mempunyai potensi dan mudah untuk berkerja. Burung-burung yang berjaya ditangkap dikenalpasti dengan merujuk kepada MacKinnon & Phillipps (1993) dan Smythies (1981). Maklumat seperti panjang tibia, ekor, badan dan paruh serta beratnya diukur dan direkod. Sampel darah diperolehi dengan menyuntik menggunakan jarum kecil yang steril pada salur kapilari darah di bahagian sayap. Semasa menyuntik jarum dielakkan masuk ke dalam kapilari kerana kapilari darah burung tidak mempunyai dinding yang tegar dan mudah terlekat pada jarum (Doresstein *et.al.*,1978) jika tidak berhati-hati. Darah dipindahkan ke dalam tiub eppendof dengan menggunakan tiub kapilari 30  $\mu$ l. Bagi mengelak darah bergumpal, larutan penimbal lisis (50mM Tris buffer-pH 8.0, 0.1 M EDTA dan 0.5 % SDS) digunakan. Sampel tisu hanya dikumpul apabila terdapat burung yang mati dan disimpan dalam tiub mengandungi larutan 70% etanol. Semua sampel disimpan dalam keadaan suhu yang rendah iaitu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk mengelak degradasi DNA berlaku.

### 2.2 Pengekstrakan atau pengasingan DNA

Pengekstrakan genom DNA daripada sampel darah atau tisu dilakukan dengan menggunakan Kit Viogene<sup>TM</sup> khas untuk tisu dan darah (Viogene-biotek Corporation, Cat: GG1001). Tujuan pengekstrakan adalah untuk memencil genom DNA dan mengasingkannya daripada protein, tisu, darah, plasma, serum, bakteria dan yis. Dalam kajian ini sampel darah lebih banyak digunakan kerana pengekstrakan DNA burung adalah lebih mudah dilakukan menggunakan sampel darah berbanding tisu (Sibley & Ahlquist,1990). Sebanyak 200 $\mu$ l darah dipipetkan ke dalam tiub 1.5 ml, ditambahkan 20 $\mu$ l Proteinase K dan 200 $\mu$ l larutan penimbal EX. Hasil campuran divortek selama 20 saat sebelum dipindahkan ke dalam 'water bath' pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  selama 20 minit untuk membantu proses lisis berlaku dan pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  selama 10 minit yang bertujuan menyahaktifkan Proteinase K. Kemudian hasil campuran ditambah dengan 210  $\mu$ l etanol (96- 100 %) dan dipindahkan ke dalam tiub baru yang mengandungi kolum genom DNA seterusnya diempar pada kelajuan 8000 rpm selama 2 minit. Melalui proses ini genom DNA akan terperangkap pada kolum. Seterusnya kolum ditambah dengan 500 $\mu$ l larutan pencuci dan diempar pada kelajuan 8000 rpm selama 2 minit. Proses ini diulang dengan kelajuan emparan yang maksimum selama 2 minit untuk menyingkirkan etanol yang terdapat dalam larutan pencuci. Proses terakhir ialah memindahkan kolum dalam tiub baru kemudian dimasukkan 200  $\mu$ l air suling yang steril (ddH<sub>2</sub>O) dalam kolum dan diempar pada kelajuan 8000 rpm selama 2 minit. Selepas pengemparan ini genom DNA yang terperangkap pada kolum akan tersingkir bersama ddH<sub>2</sub>O dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Bagi sampel tisu, kira-kira 30mg digunakan dan perlu dipotong dengan 'scalple' supaya menjadi halus untuk memudahkan tindak balas lisis berlaku seterusnya prosedur pengekstrakan genom DNANYA adalah sama dengan sampel darah.

### 2.3 Gel elektroforesis

Hasil ekstrakan dapat ditentukan sama ada mengandungi genom DNA atau tidak dengan menggunakan kaedah gel elektroforesis. Kaedah ini adalah kaedah yang mudah, cepat dan ringkas (Sambrook *et.al.*,1989). Ketebalan gel yang digunakan dalam kajian ini ialah 1% iaitu 0.5 g serbuk agarose dilarutkan dalam 50ml larutan penimbal 1x TAE dan ditambahkan Etidium bromida ( EtBr). EtBR ditambah untuk membolehkan jalur genom DNA kelihatan dibawah sinar ultra violet ( UV). Semasa gel masih belum membeku ruang-ruang kecil dihasilkan dengan menguna 'comb'. Ruang-ruang ini diperlukan untuk mengisi hasil ekstrakan bersama Gel Loading Dye (GLD) dalam nisbah 5:1  $\mu$ l. Penggunaan GLD adalah untuk memberikan warna pada genom DNA. Kaedah gel elektroforesis ini juga turut digunakan untuk menuliskan produk PCR yang dikenali sebagai kaedah pengestrakan gel.

### 2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hasil ekstrakan yang mengandungi genom DNA diteruskan dengan PCR. Sebanyak 5 $\mu$ l hasil ekstrakan dijadikan sebagai templat dan ditambah dengan 'master mix'. 'Master mix' disediakan dalam tiub 1.5 ml dengan mencampurkan bahan-bahan seperti dalam jadual 1. Pencampuran 'master mix' dilakukan dalam persekitaran yang steril untuk mengelak kontaminasi. Proses PCR dilakukan dengan menggunakan mesin DNA Thermal Cycler Model Gene® PCR System 2400 (Perkin Elmer) dan melibatkan tiga peringkat penting iaitu denaturasi, penyejukan-pelekatan dan pemanjangan. Ketiga-tiga proses ini berlaku pada suhu dan tempoh tertentu seperti dalam rajah 2 dan jumlah kitaran yang digunakan untuk mengamplifikasi atau membuat salinan DNA dengan banyak ialah 30 kitaran. Dalam kajian ini primer yang digunakan ialah 16S yang mempunyai jujukan seperti dalam jadual 2.

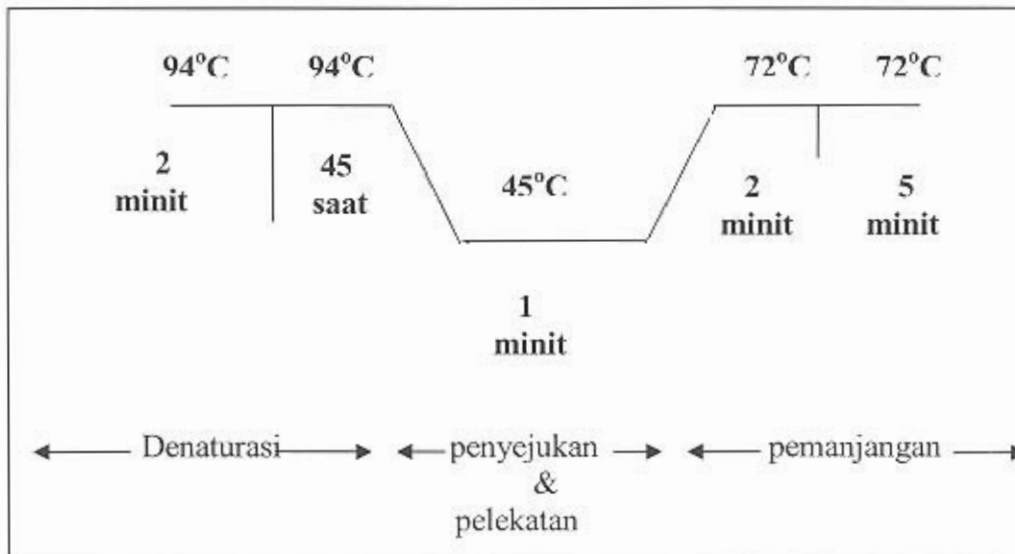
Jadual 1: Bahan-bahan tindak balas dalam PCR.

Bahan	Kuantiti (µl )
10mM larutan penimbal PCR	5
25mM MgCl <sub>2</sub>	2
10mM dNTPs	1
25 pmol/ µl primer Sar (upstream)	2
25 pmol/ µl primer Sbr (downstream)	2
<i>Ultrapure water</i> yang steril	32
<i>Taq polymerase</i>	1
Jumlah campuran	50

Jadual 2: Jujukan primer 16S yang digunakan dalam kajian

Sar (Upstream) : 5'-- 3' cgc- ctg-ttt-aac-acc-at  
 Sbr (Downstream: 5'-- 3' ccg-gtc-tga-act-cag-ata-acg-t.

Anggaran saiz : 500bp -750 bp



Rajah 2: Tempoh dan suhu yang terlibat dalam tiga peringkat penting tindak balas PCR. Tindak balas ini diulang sebanyak 30 kitaran dan mengambil masa lebih kurang tiga jam

## 2.5 Penulenan produk PCR

Setiap sampel PCR dibuat pemeriksaan untuk menentukan kehadiran produk yang kehendaki melalui gel elektroforesis. Panjang bes yang terhasil dapat ditentukan dengan menggunakan penanda DNA, 1 kb. Sampel yang mempunyai produk dengan panjang rantai bes yang diperlukan diguna dalam pengestrakan gel. Tujuan pengestrakan gel dilakukan adalah untuk menulenan produk DNA daripada primer dimer dan mendapatkan produk yang spesifik sahaja iaitu antara 500bp hingga 750 bp. Proses penulenan dilakukan dengan memasukkan produk PCR bersama GLD dalam nisbah kepekatan 5:1 ke dalam ruang khas yang dihasilkan pada gel agarose. Gel yang digunakan dalam proses ini ialah 1% agarose yang ditambah dengan EtBr dan proses elektroforesis dijalankan selama 45 minit pada voltan 102V. Jalur DNA yang terbentuk pada gel dipotong dengan menggunakan 'scalple' yang steril. Langkah ini dilakukan dengan berhati-hati kerana pemotongan dijalankan di bawah sinar UV. Hasil pemotongan dimasukkan ke dalam tiub 1.5 ml dan diekstrak menggunakan Kit viogene<sup>TM</sup> khas untuk ekstrak DNA (Viogene-biotek Corporation, Cat: GG1001). Fragmen gel yang dipotong ditambah dengan 500µl larutan penimbal GEX dan dibiarkan dalam 'water bath' pada suhu 60°C selama 10 hingga 20 minit untuk melarutkan gel. Kemudian semua larutan gel dipindahkan ke dalam tiub yang mempunyai kolom DNA dan diemparkan pada kelajuan maksimum, 13 000 rpm selama 1 minit. Larutan yang terkumpul dalam tiub di bawah kolom DNA dibuang dan DNA yang terperangkap pada kolom dicuci dengan 500 µl larutan basuhan pertama yang diemparkan pada kelajuan yang maksimum selama 1 minit. Melalui kaedah yang sama DNA dicuci dengan 700µl larutan basuhan kedua. Kolom DNA diemparkan semula selama tiga minit untuk menyingkirkan etanol yang terdapat dalam larutan basuhan. DNA yang terperangkap disingkirkan daripada kolom DNA dengan menambahkan 30µl 'ultrapure water'(upH<sub>2</sub>O) ke dalam kolom dan diemparkan selama 1 minit. Hasil ekstrak yang mengandungi DNA disimpan pada suhu -20°C.

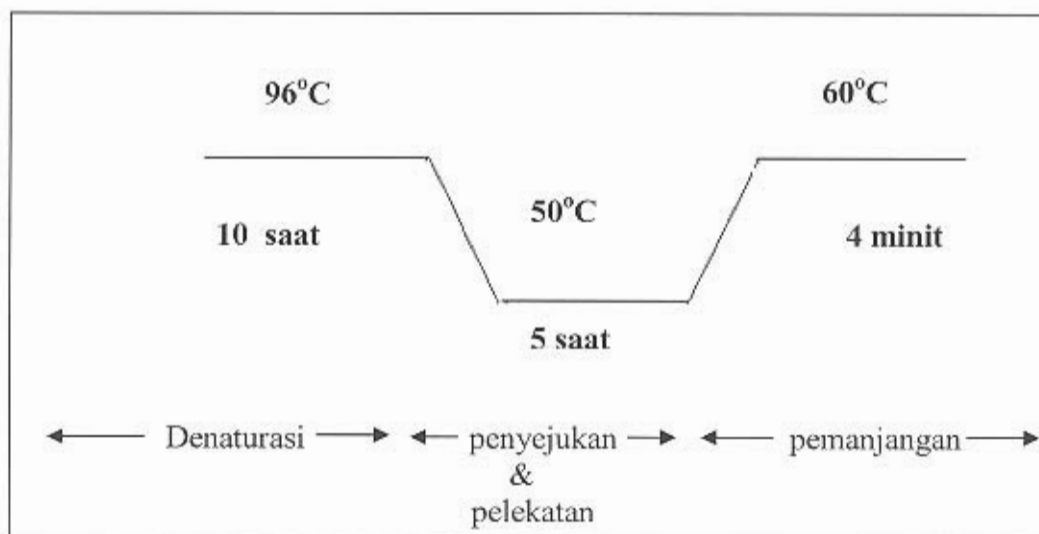
## 2.6 Penjujukan

Sebelum sampel DNA dihantar untuk analisis penjujukan dengan menggunakan mesin ABI PRISM 377, kuantiti DNA digandakan melalui kitaran penjujukan. Kitaran penjujukan dilakukan dengan mesin DNA Thermal Cycler Model Gene® PCR System 2400 (Perkin Elmer) dan menggunakan bahan-bahan seperti dalam jadual 3. DNA yang telah tulen dijadikan sebagai templat dan hanya salah satu primer digunakan sama ada *sar* atau *sbr*. Proses kitaran penjujukan melibatkan tiga peringkat penting dan berlaku pada suhu dan tempoh tertentu seperti ditunjukkan dalam Rajah 3. Jumlah kitaran yang digunakan dalam penjujukan ialah 25 kitaran. Selepas kitaran penjujukan, produk perlu ditulenan dengan kaedah pemendapan etanol/ Natrium acetat. Kesemua hasil iaitu 20µl dipindahkan ke dalam tiub 1.5 ml yang mengandungi 2.0µl, 3 M Natrium acetat (NaOAc) pada pH 4.6 dan 50 µl larutan 95% etanol. Campuran larutan-larutan ini dibiarkan pada suhu bilik selama 15 minit untuk proses pemendapan. Kemudian campuran ini diemparkan pada kelajuan maksimum selama 20 minit, supernatan yang terkumpul dibuang dan pelet dicuci dengan larutan 70% etanol an seterusnya diemparkan sekali lagi pada kelajuan maksimum selama 5 minit. Supernatan dibuang dan pelet di kering pada suhu bilik selama 30 minit.



Jadual 3 : Bahan –bahan dalam kuantiti yang diperlukan untuk proses kitaran penjujukan

Bahan	Kuantiti ( $\mu\text{l}$ )
<i>Big dye</i>	8.0
Templat DNA	2 – 5
Primer 3.2 pmol	2
<i>Deionized Water</i>	x
Jumlah campuran	20



Rajah 3: Tempoh dan suhu yang terlibat dalam tiga peringkat penting proses kitaran penjujukan .

### 3.0 Keputusan

#### 3.1 Persampelan

Sepanjang tempoh persampelan dijalankan iaitu tiga minggu sebanyak 38 sampel telah berjaya dikumpul iaitu 25 sampel darah dan 13 sampel tisu. Dalam kajian ini hanya melibatkan 29 sampel sahaja iaitu 25 sampel darah dan 4 sampel tisu yang merangkumi 12 spesies ( Jadual 4). Bagi mendapatkan data yang persis diperingkat penjujukan setiap spesies diperlukan sekurang-kurangnya dua sampel darah atau tisu daripada individu yang berlainan. Walau bagaimanapun terdapat sampel yang terdiri daripada satu individu. Masalah ini timbul semasa penangkapan burung dijalankan dan dipengaruhi oleh banyak faktor persekitaran seperti kekurangan spesies tersebut dikawasan persampelan, musim tidak sesuai dan jangka masa persampelan yang singkat. Bagi sampel-sampel ini kajian hanya diteruskan diperingkat ekstrakan dan PCR sahaja bagi menjimatkan masa.

Jadual 4: Senarai spesies burung yang terlibat dalam kajian.

Taksonomi	Bilangan
<b>Famili : Alcedinidae</b>	
Rufous- backed kingfisher ( <i>Ceyx rufidorsa</i> )	2
<b>Famili: Capitonidae</b>	
Brown barbet ( <i>Colarhamphus fuliginosus</i> )	2
<b>Famili: Columbidae</b>	
Pink- necked pigeon ( <i>Treron Vernans</i> )	1
<b>Famili: Hirundinidae</b>	
Pacific swallow ( <i>Hirundo tahitica</i> )	1
<b>Famili: Nectariniidae</b>	
Little spiderhunter ( <i>Arachnothera longirostra</i> )	4
Yellow- breasted sunbird ( <i>Nectarinia jugalaris</i> )	1
<b>Famili: Ploceidae</b>	
Dusky munia ( <i>Lonchura fuscans</i> )	5
<b>Famili: Pycnonotidae</b>	
Hairy- backed bulbul ( <i>Tricholestes criniger</i> )	2
Red -eyed bulbul ( <i>Pycnonotus brunneus</i> )	2
Yellow vented bulbul ( <i>Pycnonotus goiavier</i> )	5
<b>Famili: Timaliidae</b>	
Chesnut winged babler ( <i>Stachyris erythroptera</i> )	2
Striped tit- babler ( <i>Macronous gularis</i> )	2