

IDENTITAS MOLEKULER TUJUH JENIS RANGKONG (AVES: BUCEROTIDAE) INDONESIA BERDASARKAN GEN COI DAN Cyt b DNA MITOKONDRIA¹



Jarulis², Dedy Duryadi Solihin³, Ani Mardiasuti⁴, Lilik Budi Prasetyo⁴

² Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Bengkulu

³ Departemen Biologi, FMIPA, IPB

⁴ Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata, FAHUTAN, IPB
e-mail: jarulis@unib.ac.id

ABSTRACT

*Molecular identity based on mitochondrial DNA COI and cytochrome b genes is very useful in identifying of Indonesian hornbill. We sequenced the DNA barcode of seven hornbill species using the mitochondrial DNA COI and cytochrome b genes to explore their genetic variation, identity, distance, and phylogenetic. Thirty-one blood samples for COI and 26 samples for cytochrome b from seven hornbill species were isolated and analyzed. Slight variation was observed within species based on both genes. In contrary, fairly significant difference was shown within the genus and family level. These seven Indonesian hornbill species were then divided into two groups, namely Group I consisted of *Aceros cassidix*, *Rhyticeros plicatus*, *R. undulatus*, *Buceros rhinoceros*, and *B. bicornis*, while Group II was occupied by *Anthracoceros albirostris* and *A. malayanus*; both groups with genetic distance 5.90% in COI gene and 15.5% for cytochrome b gene. COI and cytochrome b sequence genes from these seven hornbill species are novel for identifying Indonesian hornbills. We encourage its use as quick species identification, applied to prevent illegal poaching, and conservation management.*

Keywords: COI, Cytochrome b, hornbills, molecular taxonomy, phylogenetic.

PENDAHULUAN

Rangkong (Aves: Bucerotidae) merupakan burung bertubuh besar dan memiliki kemampuan terbang cukup jauh. Burung ini memakan buah-buahan, serangga, dan sebagai pemencar biji tumbuhan di hutan (Kitamura *et al.* 2008). Seluruh jenis (13 jenis) rangkong di Indonesia termasuk jenis dilindungi (Sukmantoro *et al.* 2007).

Penamaan jenis burung rangkong hingga saat ini masih menggunakan karakter morfologi. Penggunaan karakter morfologi untuk identifikasi jenis memiliki kelemahan, terutama bagi jenis-jenis yang tidak mempunyai karakter spesifik. Pada burung rangkong, terdapat variasi nama pada beberapa jenis yang ada di dunia. Jenis-jenis yang memiliki variasi nama tersebut antara lain *Aceros comatus* dan *Berenicornis comatus*, *Aceros* spp. dan *Rhyticeros* spp., dan *Buceros vigil* dan *Rhinoplax vigil* (Kemp 1988; Sukmantoro *et al.* 2007; Viseshakul *et al.* 2011; Gonzales *et al.* 2013; Poonswad *et al.* 2013). Umumnya autor tersebut kecuali Viseshakul *et al.* (2011) dan Gonzales *et al.* (2013) menggunakan karakter morfologi dalam penamaan jenis. Masalah ini dapat diselesaikan dengan uji molekuler, sehingga identitas definitif rangkong Indonesia diketahui dengan pasti.

Marka molekuler yang umum digunakan untuk penciri jenis hewan adalah gen *cytochrome oxidase sub unit I* (COI) dan *cytochrome b* (Cyt b) DNA mitokondria. Gen COI mempunyai sifat-sifat yang memenuhi persyaratan untuk DNA barcode hewan dengan panjang 648 pb (Hebert *et al.* 2003). Gen Cyt b merupakan salah satu gen penyandi protein di dalam genom mitokondria yang banyak digunakan untuk meneliti hubungan spesies dari

¹Makalah Konferensi Peneliti dan Pemerhati Burung Indonesia ke-5, Padang 28-29 Januari 2019

genus atau famili yang sama. Penelitian ini bertujuan menentukan karakter molekuler penciri spesies tujuh jenis rangkong Indonesia berdasarkan gen COI dan Cyt b.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari September 2015 sampai Desember 2017. Sampel darah rangkong diambil dari koleksi hidup Taman Safari Indonesia (TSI), Taman Margasatwa Ragunan (TMR), dan Taman Mini Indonesia Indah (TMII). Analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) IPB.

Koleksi Sampel dan Isolasi DNA Total

Sampel darah ($\pm 0.5-1.0$ ml) diambil dari tujuh jenis rangkong melalui vena ulnaris, terdiri atas 31 sampel gen COI dan 26 gen Cyt b, dan dipreservasi dengan etanol. Pengambilan sampel darah berpedoman pada dokumen persetujuan komisi etik hewan IPB Nomor 39-2106 IPB tahun 2016. Tiga sekuen gen COI (NC015085, HM755883, dan NC015087) dan 8 sekuen gen Cyt b (KC754783, AF346938, AF346939, AF346940, KJ456173, NC015085, HM755883, dan NC015087) diunduh dari GenBank sebagai *out group*. Sampel darah (15-25 mg) dicuci 3-5 kali dengan *Tris-EDTA buffer* (low TE). Isolasi DNA total dilakukan menggunakan Kit *Dneasy® Blood and Tissue Kit* cat no 69504 (50) berdasarkan prosedur *Spin-Column Protocol* Qiagen dengan modifikasi.

Amplifikasi DNA dan Sekuensing

Replikasi DNA target pada gen COI dan Cyt b dilakukan melalui proses amplifikasi menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Primer dibuat menggunakan program Primer3 (<http://bio-info.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>) secara *online* berdasarkan penjejakan runutan gen COI (*Aceros waldeni*, NC01508) dan Cyt b (*Aceros corrugatus*, HM755883) dari GenBank. Runutan nukleotida pasangan primer COI terdiri atas COIBuceF 5'-TCAACTAACCACAAAGACATCGGCAC-3' dan COI- BuceR 5'-ACGTGTGAGATAATTCCAAAGCCTG-3' dengan produk PCR 746 pb. Pasangan primer gen Cyt terdiri atas CytBBuceF 5'-CCCACC CGCTACTAAAAACA -3' dan CytBBuceR 5'-CCCCTAGTTGTTGG GGATT-3' dengan produk PCR 849 pb.

Campuran bahan amplifikasi (total 25 μ l) terdiri atas 5 μ l DNA *template*, masing-masing 1.0 μ l primer *forward* dan *reverse*, 6.8 μ l ddH₂O, 5.0 μ l 5x *buffer* Qs, 5.0 μ l 5x *enhancer* Qs, 1.0 μ l dNTP, dan 0.2 μ l *taq polymerase*. Kondisi mesin PCR saat amplifikasi gen COI dan Cyt b relatif sama kecuali suhu *annealing*. Pada tahap predenaturasi suhu PCR adalah 95 °C selama 5 menit, denaturasi 94 °C 1 menit, *annealing* 60 °C 45 menit (gen COI) dan 58 °C 45 menit (gen Cyt b), elongasi 72 °C 1 menit, ekstensi 72 °C 6 menit, dan pendinginan 4 °C 10 menit. Jumlah siklus tahap denaturasi-elongasi adalah 35 kali. DNA hasil amplifikasi dimigrasikan pada gel *agarose* 1.2% di dalam larutan TBE 1x menggunakan elektroforesis. Produk PCR yang menunjukkan pita tunggal dikirim ke perusahaan 1st Base Malaysia untuk sekuensing.

Analisis Data

Runutan nukleotida (*forward* dan *reverse*) hasil sekuensing diedit dengan cara disejajarkan (*alignment*) menggunakan Clustal W program MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Perangkat lunak BIOEDIT versi 7.0.9 digunakan untuk mengedit sekuen gen COI dan Cyt b, serta visualisasi elektrogram dan urutan basa nukleotidanya. Sekuen gen COI dimasukkan ke dalam *Barcoding of Life Database* (BoLD System) pada website

¹Makalah Konferensi Peneliti dan Pemerhati Burung Indonesia ke-5, Padang 28-29 Januari 2019

<http://www.barcodinglife.org> dan Cyt b ke dalam *Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide* (BLASTn) pada website <https://ncbi.nlm.nih.gov> untuk melihat kemiripan sampel yang diuji. Jarak genetik antar individu, jenis, dan genus dihitung menggunakan metode Kimura 2-parameter (K2P), dan pohon filogeni direkonstruksi menggunakan model *Neighbor-Joining* (NJ) dengan ulangan 1000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi spesies berdasarkan gen COI dan Cyt b

Identifikasi spesies rangkong dilakukan dengan melihat kemiripan sekuen gen COI dan Cyt b yang didapatkan dengan data BoLD System (COI) dan BLASTn (Cyt b). Tabel 1 menunjukkan kemiripan dan identitas kedua gen tersebut dengan data sekuen yang ada. Hasil identifikasi gen COI 7 jenis rangkong Indonesia dengan rangkong lainnya di dunia menunjukkan kemiripan antara 91.5% dan 92.98%, dan tidak satupun jenis Indonesia mirip >97% dengan jenis hasil identifikasi. Nilai *identity* hasil BLASTn gen Cyt b berkisar antara 87.0% dan 99.0% dengan *query cover* 87.0% - 99.0%. Jenis yang teridentifikasi menggunakan Cyt b sama dengan jenis yang diuji.

Tabel 1 Spesies yang memiliki kemiripan tertinggi menurut hasil identifikasi BoLD System (gen COI) dan BLASTn (gen Cyt b) terhadap rangkong Indonesia

Spesies	Kode	Hasil BoLD System		Hasil BLASTn			
		Spesies	Similaritas (%)	Query cover (%)	Identitas (%)	Spesies	Kode akses
<i>A. malayamus</i>	AM1RG	<i>P. panini</i>	91.51	90	96	<i>A. malayamus</i>	KC754783.1
<i>A. malayamus</i>	AM2RG	<i>P. panini</i>	91.51	-	-	-	-
<i>A. malayamus</i>	AM1TM	<i>P. panini</i>	91.67	90	96	<i>A. malayamus</i>	KC754783.1
<i>A. malayamus</i>	AM1TS	<i>P. panini</i>	91.05	90	96	<i>A. malayamus</i>	KC754783.1
<i>A. albirostris</i>	AA1RG	<i>A. coronatus</i>	92.04	99	87	<i>A. albirostris</i>	GU257912.1
<i>A. albirostris</i>	AA1TM	<i>A. coronatus</i>	92.04	99	88	<i>A. albirostris</i>	GU257912.1
<i>A. albirostris</i>	AA2TM	<i>A. coronatus</i>	92.04	99	87	<i>A. albirostris</i>	GU257912.1
<i>A. albirostris</i>	AA3TM	<i>A. coronatus</i>	91.90	99	87	<i>A. albirostris</i>	GU257912.1
<i>A. albirostris</i>	AA5TS	<i>A. coronatus</i>	91.77	99	88	<i>A. albirostris</i>	GU257912.1
<i>A. albirostris</i>	AA11TS	<i>A. coronatus</i>	91.90	99	87	<i>A. albirostris</i>	GU257912.1
<i>Aceros cassidix</i>	AC1RG	<i>P. panini</i>	92.56	87	99	<i>A. cassidix</i>	AF346938.1
<i>A. cassidix</i>	AC1TS	<i>P. panini</i>	92.75	89	99	<i>A. cassidix</i>	AF346938.1
<i>A. cassidix</i>	AC2TS	<i>P. panini</i>	92.44	88	99	<i>A. cassidix</i>	AF346938.1
<i>B. rhinoceros</i>	BR1TM	<i>P. panini</i>	91.94	99	93	<i>B. rhinoceros</i>	GU257919.1
<i>B. rhinoceros</i>	BR2TM	<i>P. panini</i>	92.08	99	93	<i>B. rhinoceros</i>	GU257919.1
<i>B. rhinoceros</i>	BR1RG	<i>P. panini</i>	92.08	99	93	<i>B. rhinoceros</i>	GU257919.1
<i>B. rhinoceros</i>	BR2TS	<i>P. panini</i>	91.67	99	93	<i>B. rhinoceros</i>	GU257919.1
<i>B. rhinoceros</i>	BR6TS	-	-	99	93	<i>B. rhinoceros</i>	GU257919.1
<i>B. rhinoceros</i>	BR9TS	-	-	99	92	<i>B. rhinoceros</i>	GU257919.1
<i>B. rhinoceros</i>	BR10TS	-	-	99	92	<i>B. rhinoceros</i>	GU257919.1
<i>B. bicornis</i>	BB1RG	<i>P. panini</i>	91.67	97	91	<i>B. bicornis</i>	GU257920.1
<i>R. undulatus</i>	RU1TM	<i>P. panini</i>	92.58	98	99	<i>R. undulatus</i>	KJ456173.1
<i>R. undulatus</i>	RU2TM	<i>P. panini</i>	92.58	98	99	<i>R. undulatus</i>	KJ456173.1
<i>R. undulatus</i>	RU3TM	<i>P. panini</i>	92.71	-	-	-	-
<i>R. undulatus</i>	RU4TM	<i>P. panini</i>	92.75	-	-	-	-
<i>R. undulatus</i>	RU5TM	<i>P. panini</i>	92.75	-	-	-	-
<i>R. undulatus</i>	RU6TM	<i>P. panini</i>	92.71	-	-	-	-
<i>R. undulatus</i>	RU7TM	<i>P. panini</i>	92.75	-	-	-	-
<i>R. undulatus</i>	RU5TS	<i>P. panini</i>	92.59	99	98	<i>R. undulatus</i>	KJ456173.1
<i>R. plicatus</i>	RP1RG	<i>P. panini</i>	92.98	88	99	<i>A (R). cassidix</i>	AF346940.1
<i>R. plicatus</i>	RP1TM	<i>P. panini</i>	92.71	-	-	-	-
<i>R. plicatus</i>	RP2TM	<i>P. panini</i>	92.98	87	99	<i>A (R). cassidix</i>	AF346940.1
<i>R. plicatus</i>	RP1TS	<i>P. panini</i>	92.85	88	99	<i>A (R). cassidix</i>	AF346940.1
<i>R. plicatus</i>	RP3TS	<i>P. panini</i>	92.85	-	-	-	-

Keterangan: (-) sekuensing tidak dilakukan.

Semua jenis rangkong Indonesia yang diidentifikasi menggunakan gen COI dan Cyt b memiliki kemiripan <97.0%, kecuali hasil BLASTn *Aceros cassidix* (99.0%) dan *Rhyticeros undulatus* (99.0%) (Tabel 1). Berdasarkan nilai similaritas gen COI diketahui

¹Makalah Konferensi Peneliti dan Pemerhati Burung Indonesia ke-5, Padang 28-29 Januari 2019

bahwa 7 jenis rangkong Indonesia berbeda nama jenisnya dengan 2 jenis rangkong lainnya, yaitu *Penelopides panini* dan *A. coronatus* dengan nilai perbedaan 8.5 - 7.2%. Angka perbedaan ini diatas ambang (*threshold*) pembeda antar jenis hewan sebesar >3% (Hebert *et al.* 2003). Hasil ini menunjukkan sekuen nukleotida gen COI tujuh jenis rangkong yang diteliti merupakan data baru dan dapat digunakan sebagai acuan dalam mengidentifikasi rangkong Indonesia. Hasil BLASTn gen Cyt b 7 jenis rangkong Indonesia menunjukkan nilai identitas bervariasi (Tabel 1). Lima jenis memiliki nilai kemiripan <97.0% dan dua jenis lainnya >97.0% dengan spesies yang sama pada *database* NCBI. Beberapa sampel memiliki nilai *query cover* ≤90.0%. Rendahnya nilai *query cover* tersebut dapat menyebabkan berkurangnya tingkat kemiripan antar jenis yang dibandingkan.

Variasi nukleotida gen COI dan Cyt b DNA Mitokondria

Variasi nukleotida, tipe mutasi, dan komposisi basa nukleotida tingkat genus dan famili burung rangkong ditunjukkan pada Tabel 2. Pada Tabel 2 terlihat bahwa gen COI lebih konservatif (*conserve*) dibandingkan gen Cyt b. Hal ini diketahui dari jumlah situs konservatif gen COI, yaitu 638 pb (85.52%) dan situs bervariasi 108 pb (14.48%) dari 746 pb. Pada gen Cyt b, situs konservatif 592 pb (69.73%) dan situs bervariasi 257 pb (30.27%).

Basa nukleotida yang mengalami mutasi baik tipe mutasi transisi maupun mutasi transversal lebih rendah pada gen COI. Jumlah nukleotida yang mengalami mutasi transisi pada gen COI adalah 21 basa dan mutasi transversal hanya 8 basa. Pada gen Cyt b, jumlah basa yang mengalami mutasi transisi 70 basa dan mutasi transversal 22 basa. Komposisi basa tertinggi pada gen COI dan Cyt b tampak sama, yaitu sitosin (C) yang masing-masing secara berurutan 31.0% dan 34.49%. Jumlah basa nukleotida paling rendah untuk kedua gen juga sama.

Tabel 2 Situs konservatif dan bervariasi, tipe mutasi, dan komposisi basa nukleotida gen COI dan Cyt b tujuh jenis rangkong Indonesia

Taksa	n	Situs konservatif	Bervariasi		Total situs bervariasi	si			sv			R	Komposisi basa			
			Pi	s		1 ^a	2 nd	3 rd	1 ^a	2 nd	3 rd		A	T	G	C
Gen COI																
Genus																
<i>Anthracoeros</i>	10	712	24	10	34	3	0	6	1	1	2	2.3	26.7	25.7	15.6	31.9
<i>Aceros</i>	3	737	0	9	9	1	1	1	1	0	2	0.8	26.8	27.2	16.4	29.6
<i>Rhyticeros</i>	13	730	11	5	16	2	0	3	1	0	1	3.7	26.7	26.1	16.5	30.8
<i>Buceros</i>	5	727	2	17	19	1	0	2	2	0	2	0.6	27.0	25.7	16.3	31.0
Family																
Bucerotidae	31	638	79	29	108	4	1	16	2	1	6	2.5	26.8	26.0	16.2	31.0
Gen Cyt b																
Genus																
<i>Anthracoeros</i>	9	746	97	6	103	4	20	9	4	9	4	2.0	28.5	24.1	13.4	34.0
<i>Aceros</i>	3	841	0	8	8	1	1	1	1	1	1	1.8	28.0	21.8	13.6	36.6
<i>Rhyticeros</i>	6	818	21	10	31	2	5	2	2	2	2	1.6	27.2	21.9	14.5	36.3
<i>Buceros</i>	8	765	21	63	84	2	11	7	1	4	2	3.0	27.9	24.6	13.4	34.1
Family																
Bucerotidae	26	592	228	29	257	8	47	15	4	14	4	2.9	28.0	23.5	13.7	34.9

Keterangan: n= jumlah sampel, tidak termasuk sampel dari GenBank, Pi= situs parsimoni-informasi, s= situs singleton, si= pasangan basa substitusi transisi, sv= pasangan basa substitusi transversal, 1^a, 2nd, dan 3rd= urutan kodon, R= rasio si/sv, A=Adenin, T=Timin, G=Guanin, C=Sitosin.

Gen COI dan Cyt b umum digunakan untuk kajian taksonomi hewan, baik pada tingkat intra maupun interspesies. Gen COI sering digunakan untuk *barcode* spesies. Panjang sekuen gen COI yang digunakan untuk barcoding spesies berkisar antara setengah dari panjang total gen COI dan terletak di bagian pangkal sekuen dari semua jenis hewan

(Sammler *et al.* 2011; Gonzales *et al.* 2013). Bahkan, sekuen yang pendek sekalipun (109-208 pb) juga sangat berguna dalam mengidentifikasi spesies (Hajibabaei *et al.* 2006). Dalam penelitian kami, panjang sekuen gen COI yang berhasil diamplifikasi 746 pb dan gen Cyt 849 pb. Sekuen gen COI yang didapatkan lebih panjang dibandingkan hasil sebelumnya (Hajibabaei *et al.* 2006), dan lebih pendek dari gen COI Kakatua (807 pb) (Astuti dan Sulandari 2010). Sedangkan gen Cyt b lebih pendek dibandingkan penelitian sebelumnya. Panjang sekuen penuh gen Cyt b *A. waldeni* dan *P. panini* berturut-turut 1136 pb dan 1140 pb (Sammler *et al.* 2011), *A. corrugatus* 1142 pb (Pacheco *et al.* 2011), dan pada 13 jenis rangkong asal Thailand 1143 (Viseshakul *et al.* 2011). Pada *A. cassidix* panjang gen Cyt b parsial yang dilaporkan Gonzales *et al.* (2013) 927 pb, dan pada 27 jenis Kakatua 907 pb (Astuti *et al.* 2006).

Polimorfisme Gen COI dan Cyt b

Hasil penyejajaran runutan nukleotida gen COI dan Cyt b 7 jenis rangkong menunjukkan adanya situs pembeda (nukleotida spesifik) antar jenis. *Single nucleotide polymorphism* (SNP) antar jenis rangkong ditunjukkan pada Tabel 3 (COI) dan Tabel 4 (Cyt b). Pada gen COI, situs nukleotida yang berbeda (29 situs) terdapat antara situs 84 dan 718. *Aceros cassidix* merupakan jenis yang memiliki nukleotida spesifik paling banyak dibandingkan 6 jenis lainnya, disusul *Anthracoseros malayanus* dan

Tabel 3 SNP antar jenis famili Bucerotidae berdasarkan gen COI panjang 746 pb

Spesies (Kode)	Situs basa nukleotida																												
	8	9	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	7	7
NC015085*	C	T	A	T	A	C	C	G	T	C	G	C	T	C	C	A	C	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	C	C
AM1RG	-	C	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM2RG	-	C	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM17M	-	C	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM17S	-	C	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA1RG	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA17M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA27M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA37M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA57S	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA117S	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR17M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR27M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR1RG	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR27S	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BB1RG	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AC1RG	T	T	-	C	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AC17S	T	T	-	C	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AC27S	T	T	-	C	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RU17M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RU27M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RU37M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RU47M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RU57M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RU67M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RU77M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RU57S	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP1RG	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP17M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP27M	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP17S	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP37S	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: * = Data GenBank. Angka di bawah nama situs basa nukleotida adalah nomor situs tiap basa nukleotida yang telah berubah berdasarkan penyejajaran gen COI. Situs nomor satu pada penyejajaran dalam penelitian ini ekuivalen dengan situs nomor 28 pada sekuen penuh gen COI *Aceros waldeni* (Accession NC01508).

A. albirostris, dan yang paling sedikit adalah *Buceros rhinoceros* dan *Rhyticeros undulatus*. Jumlah nukleotida spesifik antar jenis berdasarkan gen Cyt b lebih banyak dibandingkan gen COI. Nukleotida spesifik (89 situs) masing-masing jenis berdasarkan

gen Cyt b panjang 849 pb ditemukan antara situs 18 dan 847. Jenis dengan situs nukleotida spesifik terbanyak adalah *Anthracosceros malayanus* (26 situs) dan paling sedikit *R. plicatus* (5 situs) dan *Aceros cassidix* (5 situs).

Temuan nukleotida spesifik pada sekuen gen COI dan Cyt b mtDNA 7 jenis rangkong dalam penelitian ini menunjukkan adanya variasi basa nukleotida antar jenis. Variasi di dalam sekuen gen COI biasanya dapat digunakan untuk membedakan jenis yang memiliki kekerabatan dekat untuk semua taksa kecuali kelompok Cnidaria (Hebert *et al.* 2003). Keragaman sekuen gen COI mtDNA pada panjang 648 pb dapat berfungsi untuk *barcode* jenis hewan. Tiap jenis mempunyai sekuen nukleotida spesifik dengan hanya sedikit perbedaan intraspesies (Waugh 2007).

Jarak Genetik Interspesies Berdasarkan Gen COI dan Cyt b

Tujuh jenis rangkong Indonesia terpisah secara genetik berdasarkan gen COI dan Cyt b DNA mitokondria. Rataan jarak genetik antar jenis rangkong berdasarkan gen COI lebih rendah dibandingkan gen Cyt b (Tabel 5). Rata-rata jarak genetik intraspesies pada gen COI antara 0.002 (0.2%) dan 0.008 (0.8%), interspesies 0.045 (4.5%), dan intergenus 0.046 (4.6%). Jarak genetik intraspesies gen COI yang didapatkan lebih rendah dibandingkan studi-studi sebelumnya (Astuti dan Sulandari 2010). Jarak genetik intraspesies biasanya kurang dari 1% dan sangat jarang mendekati 2% (Waugh 2007). Jarak genetik interspesies berdasarkan gen COI telah memenuhi syarat ambang batas pemisahan spesies (>3%) (Yoo *et al.* 2006; Waugh 2007). Namun jarak genetik intergenus lebih rendah dari penelitian Yoo *et al.* (2006) pada burung-burung Korea (13.8%).

Pada gen Cyt b rata-rata jarak genetik intraspesies berkisar antara 0.003 (0.3%) dan 0.008 (0.8%), interspesies 0.121 (12.1%), dan intergenus 0.148 (14.8%). Jarak genetik interspesies yang ditemukan ini hampir sama dengan jarak genetik Kakatua (13.0%) (Astuti *et al.* 2006) dan pada 59 jenis rangkong (17.0%) (Gonzales *et al.* 2013).

Kekerabatan Antar Spesies

Pohon filogeni yang direkonstruksi berdasarkan gen COI dan Cyt b menunjukkan tujuh jenis rangkong yang diteliti terbagi ke dalam dua group utama (Gambar 1). Group I terdiri atas 5 jenis (*Aceros cassidix*, *Rhyticeros plicatus*, *R. undulatus*, *Buceros rhinoceros*, dan *B. bicornis*) dan Group II ditempati 2 jenis (*A. malayanus* dan *A. albirostris*). Kedua group tersebut terpisah dengan jarak genetik 0.059 (5.9%) pada gen COI dan 0.155 (15.5%) gen Cyt b. Tujuh jenis rangkong Indonesia terpisah jelas dengan *outgroup*.

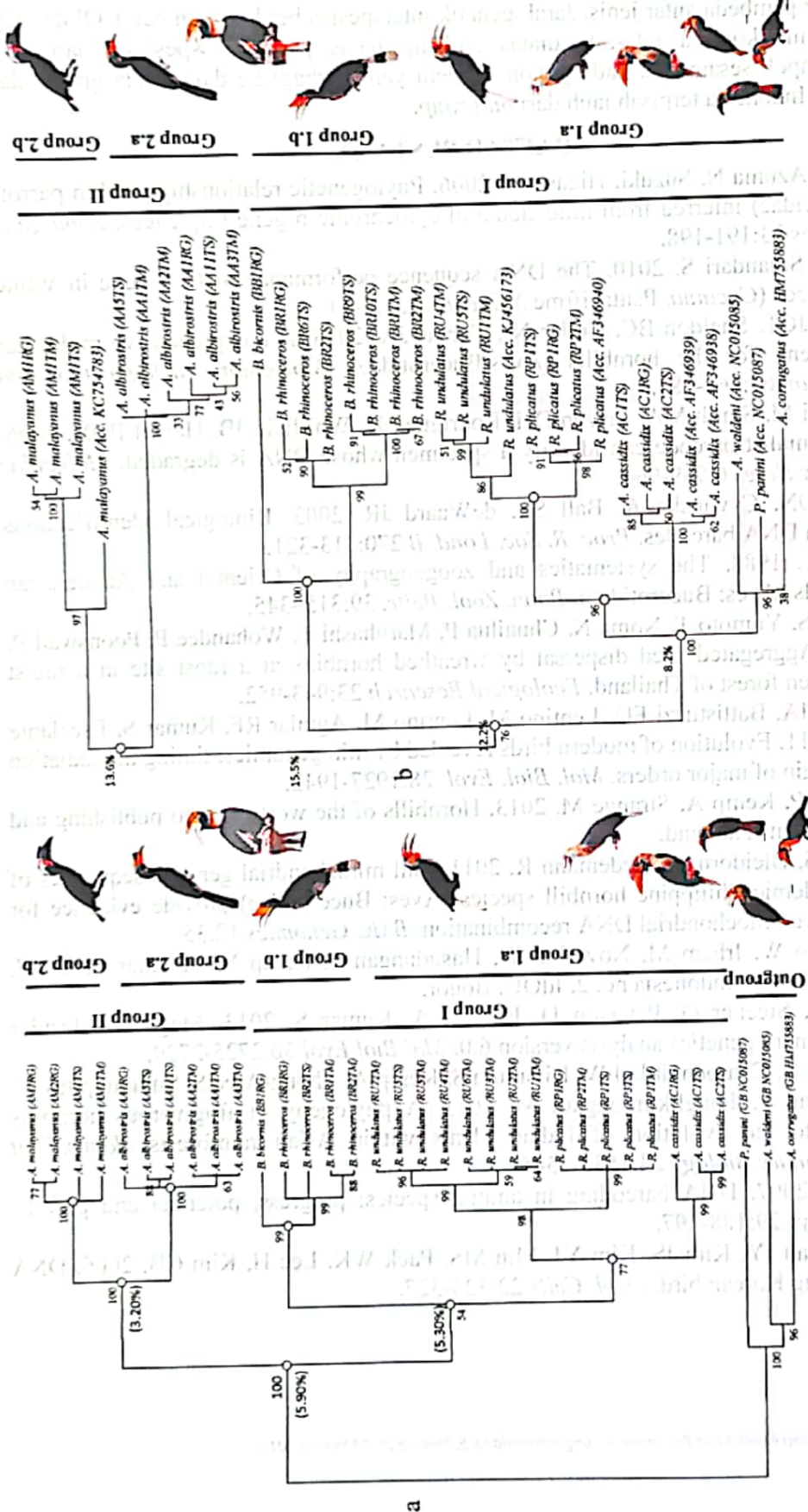
Tujuh jenis rangkong tampak pada pohon filogeni mengelompok sesamanya dengan jarak genetik rata-rata >3.0%. Penelitian ini membuktikan bahwa gen COI dan Cyt b mampu membedakan intra dan interspesies, serta intergenus tujuh jenis rangkong Indonesia. Sekuen gen COI (648 pb) sangat berpotensi dan telah sukses digunakan untuk mengidentifikasi hewan pada tingkat spesies hewan (*species barcode*) (Hebert *et al.* 2003). Cabang pada pohon filogenetik mewakili hubungan antar unit yang menggambarkan hubungan keturunan dengan leluhur, sedangkan panjang cabang menggambarkan jumlah perubahan evolusioner yang terjadi antara dua nodus.

¹Makalah Konferensi Peneliti dan Pemerhati Burung Indonesia ke-5, Padang 28-29 Januari 2019

Tabel 4 SNP antar jenis famili Duceroiidae berdasarkan gen Cyt b panjang 849 pb

Spesies (Kode)	Situs basa nukleotida																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
HM75	A	C	C	A	T	C	C	A	C	C	C	G	T	C	T	A	C	A	A	C	G	T	C	C	C
AMRG
AMTM
AMTS
AMUS
AA3M	A	.	C	.	C	.	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	C	.
AA3TM	A	.	C	.	C	.	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	C	.
AA3RG	A	.	C	.	C	.	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	C	.
AA1TS	A	.	C	.	C	.	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	C	.
AA1TM	A	.	C	.	C	.	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	A	.	C	.	A	.	C	.
BB1RG	C	.	.	.	C	.	.	A	.	T	.	A	.	T	.	A	.	T	.	A	.	T	.	A	.
BR6TS
BR6TS
BR6TS
BR1OTS
BR1TM
BR2TM
BR2TM
RUSTS
RUITM
RPTIS
RPTM
RPTM
ACTIS
AC1RG
AC1TS

Keterangan: Angka di bawah nama spesies menunjukkan posisi nukleotida, adalah nomor situs untuk spesies. Nomor menunjukkan alignment gen Cyt b panjang 849 pb. Situs pertama pada alignment kami ditunjukkan dengan nomor ant-ke-23 sekuen nukleotida. *Aceras eogriguae* GenBank (HM755883).



Gambar 1. Pohon filogeni rangkong menggunakan model Neighbor-Joining berdasarkan gen COI panjang 746 pb (a) dan Cyt b panjang 849 pb (b). Foto outgroup (Poonswad et al. 2013).

SIMPULAN

Tujuh jenis rangkong Indonesia memiliki nukleotida spesifik sebagai karakter molekuler pembeda antar jenis. Jarak genetik interspesies berdasarkan gen COI dan Cyt b DNA mitokondria rata-rata diatas ambang batas pembeda spesies. Tiap jenis mengelompok sesamanya pada pohon filogeni yang terbagi ke dalam dua group, dan rangkong Indonesia terpisah jauh dari *outgroup*.

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti D, Azuma N, Suzuki, Higashi S. 2006. Phylogenetic relationships within parrots (Psittacidae) inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Zoological Sciences* 23:191-198.
- Astuti D, Sulandari S. 2010. The DNA sequence performance of COI gene in White Cockatoos (*Cacatua*, Psittaciformes). *Treubia*. 37:1-14.
- Gonzales JCT, Sheldon BC, Collar NJ, Tobias JA. 2013. A comprehensive molecular phylogeny for the hornbills (Aves: Bucerotidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67:468-483.
- Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 6:959-964.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270:313-321.
- Kemp AC. 1988. The systematics and zoogeography of Oriental and Australasian hornbills (Aves: Bucerotidae). *Bonn. Zool. Beitr.* 39:315-345.
- Kitamura S, Yumoto T, Noma N, Chuailua P, Maruhashi T, Wohandee P, Poonswad P. 2008. Aggregated seed dispersal by wreathed hornbills at a roost site in a moist evergreen forest of Thailand. *Ecological Research* 23:943-952.
- Pacheco MA, Battistuzzi FU, Lentino M, Lentino M, Aguilar RF, Kumar S, Escalante AA. 2011. Evolution of modern birds revealed by mitogenomics: timing the radiation and origin of major orders. *Mol. Biol. Evol.* 28:1927-1942.
- Poonswad P, Kemp A, Strange M. 2013. Hornbills of the world. Draco publishing and distribution. Thailand.
- Sammler S, Bleidorn C, Tiedemann R. 2011. Full mitochondrial genome sequences of two endemic Philippine hornbill species (Aves: Bucerotidae) provide evidence for pervasive mitochondrial DNA recombination. *BMC Genomics* 12:35.
- Sukmantoro W, Irham M, Novarino W, Hasudungan F, Kemp N, Muchtar M. 2007. Daftar Burung Indonesia no. 2. IdOU, Bogor.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.
- Viseshakul N, Charoennitikul W, Kitamura S, Kemp A, Thong-Aree S, Surapunpitak Y, Poonswad P, Ponglikitmongkol M. 2011. A phylogeny of frugivorous hornbills linked to the evolution of Indian plants within Asian rainforests. *Journal of Evolutionary Biology* 24:1533-1545.
- Waugh J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*. 29:188-197.
- Yoo HS, Eah JY, Kim JS, Kim YJ, Min MS, Paek WK, Lee H, Kim CB. 2006. DNA barcoding Korean birds. *Mol. Cells* 22:323-327.