**Keragaman genetik puyuh Jepang (*Coturnix japonica*)
berdasarkan analisis sekuen DNA mitokondria gen *Cytochrome-b***
**Genetic diversity of Japanese quails (*Coturnix japonica*) based on complete
sequence of mitochondrial DNA *Cytochrome-b* gene**

Novisa Adimaka, Muhammad Rifki, Ratih Dewanti, dan Muhammad Cahyadi *

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret
Surakarta (57126), Indonesia

Submitted: 28 Maret 2019, Accepted: 16 Juli 2019

ABSTRAK: *Coturnix japonica* merupakan puyuh Jepang yang banyak ditanakkan di Indonesia setelah mengalami proses domestikasi. Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui keragaman genetik puyuh Jepang (*Coturnix japonica*) berdasarkan analisis DNA mitokondria gen Cytochrome b. Penelitian ini menggunakan 12 sampel darah puyuh yang berasal dari dua *Village Breeding Center* (VBC) berbeda yang selanjutnya dilakukan isolasi DNA. DNA puyuh diisolasi dari *whole blood* dengan mengikuti protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). Proses amplifikasi DNA dalam penelitian ini menggunakan primer *forward* dan *reverse primer* yang didesain menggunakan software Primer3. Hasil amplifikasi DNA disekuensing dan kemudian dianalisis menggunakan *software* MEGA 6.0 dan DNAsp v.5. Sebanyak 21 sekuen digunakan terdiri dari 12 sekuen sampel puyuh dan 9 sekuen pembandingan yang diperoleh melalui situs NCBI untuk analisis pohon filogenetik dan untuk mengevaluasi keragaman genetik puyuh Jepang. Hasil analisis sekuen menunjukkan bahwa populasi puyuh Jepang dalam penelitian ini memiliki hubungan kekerabatan dengan *Francolinus pintadeanus* dan *Coturnix chinensis* dengan nilai bootstrap 81%. Jarak genetik di antara puyuh Jepang berkisar 0,000 hingga 0,003. Selain itu, rata-rata jarak genetik puyuh Jepang adalah 0,002 dan rata-rata jarak genetik 21 sekuen adalah 0,067. Nilai Tajima D'test adalah -1.35536 pada sampel puyuh Jepang dan -1,38090 pada seluruh sekuen yang digunakan dalam penelitian ini. Kesimpulan dari penelitian ini adalah puyuh Jepang memiliki keragaman genetik yang rendah berdasarkan analisis DNA mitokondria gen Cytochrome b yang berarti bahwa puyuh Jepang memiliki tingkat evolusi yang rendah.

Kata kunci: *Cytochrome b*; keragaman genetik; puyuh Jepang.

ABSTRACT: *Coturnix japonica* is a Japanese quail which is commonly raised in Indonesia. The aim of the study was to determine the genetic diversity of Japanese quail (*Coturnix japonica*) based on complete sequence of mitochondrial DNA Cytochrome b gene analysis. This study used 12 samples of quail blood collected from two different village breeding centres (VBC) representing black and brown plumage lines. Total DNA genome was isolated from whole blood by following the Wizard® Genomic DNA Purification Kit protocol (Promega, USA). The DNA amplification process in this study was carried out using novel forward and reverse primers using Primer3 software. Additionally, PCR products were sequenced and analysed using MEGA 6.0 and DNAsp v.5 softwares. A total of 21 sequences consists of 12 sequences of quail sample and 9 reference sequences obtained from NCBI website were analyzed to construct phylogenetic tree and to evaluate genetic diversity of Japanese quails. The sequence analysis showed that Japanese quail population in this study had kinship with *Francolinus pintadeanus* and *Coturnix chinensis* with an 81% bootstrap value. The genetic distance among Japanese quails was ranged from 0.000 to 0.003. In addition, the mean of genetic distance for Japanese quail was 0.002 and the mean of genetic distance for 21 samples was 0.067. Tajima D'test values were -1.35536 for Japanese quail population and -1.38090 for whole population used in this study. The conclusion of this study was the Japanese quail had low genetic diversity based on complete sequence of Mitochondrial DNA Cytochrome b gene analysis that mean Japanese quail had low level of evolution.

Keywords: Cytochrome b; genetic diversity; Japanese quail.

*Corresponding Author: mcahyadi@staff.uns.ac.id

PENDAHULUAN

Puyuh (*Coturnix japonica*) merupakan salah satu jenis ternak yang sudah mengalami proses domestikasi (Giuliano and Selph, 2005). Kelebihan ternak puyuh diantaranya adalah memiliki masa pertumbuhan dan umur bertelur yang cepat yaitu pada usia 42 hari. Puyuh memiliki produksi telur yang relatif tinggi yaitu 250-300 butir/tahun (Widyastuti, Mardiaty, dan Saraswati, 2014).

Ternak puyuh mulai dikenal masyarakat Indonesia pada akhir tahun 1979, yaitu di daerah Sumatera, Jawa Barat, Jawa Timur dan Jawa Tengah. Perkembangan puyuh di Indonesia sampai sekarang ini dapat menimbulkan suatu keragaman genetik. Keragaman genetik puyuh dapat diketahui melalui analisis DNA mitokondria (mtDNA) (Hines, 2005).

DNA Mitokondria merupakan materi genetik yang ditemukan pada jaringan hewan serta memiliki pola pewarisan maternal. DNA Mitokondria menjadi bagian dari *cytoplasmic marker* yang secara luas digunakan pada penelitian tingkat populasi yang berfokus pada keragaman genetik. Sejarah dan empiris hewan dapat diketahui dengan menggunakan beberapa gen daerah pada mtDNA salah satunya adalah gen *Cytochrome b* (Avisé, 1994; Avisé, 2000; Wares, 2014).

Gen *Cytochrome b* merupakan gen penyandi protein yang memiliki keunikan yaitu adanya daerah *conserved* atau daerah yang tidak banyak mengalami perubahan atau mutasi basa sehingga dapat diketahui sejarah suatu spesies dan dapat digunakan sebagai penanda genetik. Variasi yang terdapat dalam urutan basa *Cytochrome b* menjadikannya banyak digunakan sebagai pembandingan keragaman genetik antar spesies dalam genus atau famili yang sama (Widayanti dkk., 2006; Wares, 2014; Nishibori *et al.*, 2005). Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui keragaman dan jarak genetik populasi puyuh Jepang (*Coturnix japonica*) dengan menggunakan sekuen pembandingan dari *Na-*

tional Center for Biotechnology Information (NCBI) yang meliputi *Coturnix japonica*, *Coturnix chinensis*, *Tetraogallus tibetanus*, *Tetraogallus himalayensis*, *Francolinus pintadeanus*, *Pavo cristatus*, *Lophura swinhoii* dan *Lophura nycthemera* berdasarkan urutan nukleotida DNA Mitokondria gen *Cytochrome b*.

MATERI DAN METODE

Koleksi sampel

Sampel berupa darah puyuh diperoleh melalui penyembelihan pada 12 ekor puyuh yang terdiri dari enam ekor puyuh warna bulu cokelat dan enam ekor puyuh warna bulu hitam serta berasal dua VBC yang berbeda. Darah puyuh ditampung pada tabung yang berisi EDTA untuk mencegah terjadinya penggumpalan. Selanjutnya, sampel darah disimpan dalam *refrigerator* dengan suhu sekitar 4°C sebelum dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan sesuai dengan prosedur Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) *whole blood*. Tahap awal sebelum isolasi yaitu meja kerja dan peralatan disterilkan terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Kemudian sampel darah dalam tabung EDTA dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* lalu darah diambil sebanyak 20 µl menggunakan *micropipette* dan dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml. Lalu ditambahkan RBC *lysis solution* sebanyak 900 µl serta dihomogenkan dengan cara *inversi* pada *microtube* lima sampai delapan kali. Sampel yang telah dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 20 detik untuk memisahkan cairan supernatan dengan *pellet*. Cairan supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang sehingga hanya menyisakan endapan atau *pellet* di dalam *microtube*. *Pellet* atau endapan yang dihasilkan kemudian di *vortex* selama 5 detik lalu ditambahkan 300 µl *cell lysis solution* dan kembali di *vortex*

selama sepuluh detik. Setelah itu ditambahkan 100 µl protein *precipitation solution* dan kembali di *vortex* selama 20 detik serta dilakukan sentrifugasi selama satu menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Langkah selanjutnya yaitu supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 ml yang baru dengan menggunakan *micropipette* setelah itu ditambahkan isopropanol sebanyak 300 µl. Campuran dihomogenkan dengan cara *inversi* kemudian disentrifugasi selama satu menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Supernatan kemudian dibuang, setelah itu ditambahkan 300 µl ethanol *for analysis* kemudian lakukan *inversi* lagi lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama satu menit. Kemudian supernatan dibuang dan *microtube* ditiriskan di atas lembaran tisu hingga kering (10-15 menit), memastikan terlebih dahulu bahwa jarak antar *microtube* agak berjauhan untuk menghindari kontaminasi. Selanjutnya ditambahkan 100 µl DNA *hydration solution* dan di *vortex* selama lima detik dan langkah terakhir pada tahap isolasi DNA yaitu dilakukan inkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit sehingga diperoleh hasil akhir berupa DNA.

Program Polymerase Chain Reaction (PCR)

Produk PCR diamplifikasi dari fragmen DNA mitokondria *Cytochrome b* dengan sepasang primer (*forward primer*: 5'-TTTGCCCTCACAATCCTAGC-3' dan *reverse primer*: 5'-ATATGGGGTGGGGTTGTTTT-3') yang telah didesain menggunakan *website primer3* (bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). Reaksi PCR dilakukan pada mesin PCR dengan total volume cairan dalam *tube* sebanyak 25 µl yang terdiri dari 1 µl sampel DNA, 12,5 µl *green mix*, 9,5 µl *nuclease free water*, 1 µl *forward primer* dan 1 µl *reverse primer*. Jumlah siklus PCR yang digunakan sebanyak 35 siklus. Proses PCR berjalan dengan *initial denaturation* suhu 95°C selama tiga menit, *denaturation* suhu 95°C selama 15 detik, *annealing* suhu 57°C sela-

ma 30 detik, *extension* suhu 72°C selama 30 detik dan *final extension* suhu 72°C selama tiga menit. Hasil PCR divisualisasikan pada *agarose gel* 2%. Setelah dipastikan hasil PCR yang sesuai, kemudian dilakukan proses *sequencing* oleh PT. Genetika Science Indonesia.

Elektroforesis agarose gel dan gel documentation

Tahap awal elektroforesis adalah penimbangan bubuk *agarose* sebanyak 0,7 gram (1% larutan TAE) atau 1,4 gram (2% larutan TAE). *Agarose* ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik dan dibungkus dengan aluminium foil lalu dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* dan ditambahkan larutan TAE 10X sebanyak 70 ml. *Erlenmeyer* ditutup dengan menggunakan *wrapping plastic* dan diberi lubang-lubang kecil serta dihomogenkan untuk melarutkan *agarose* pada larutan TAE dan dimasukkan ke dalam *microwave* dengan suhu 450°C selama tiga menit. Langkah selanjutnya yaitu, ditambahkan 2 µl EtBr (*Ethidium Bromide*) ke dalam *Erlenmeyer* menggunakan *micropipette* dan diinvert agar EtBr dapat tercampur dengan *agarose gel*. *Erlenmeyer* kemudian dimasukkan ke dalam *microwave* suhu 450°C selama satu menit. Setelah itu, *agarose gel* dituangkan ke dalam cetakan dan ditunggu sampai *agarose gel* mengeras. Setelah *agarose gel* mengeras, *agarose gel* dipindahkan dari cetakan ke dalam mesin elektroforesis dan dituangkan TAE 10X sampai *agarose gel* terendam. Masing-masing sumuran ditambahkan sampel/marker dan *loading dye* dengan perbandingan 5 : 1 (5 µl sampel/marker : 1 µl *loading dye*) kemudian dilakukan *running* elektroforesis selama 45 menit. Setelah selesai proses *running*, maka dilakukan *gel documentation* menggunakan seperangkat mesin *gel documentation* yang terdiri dari komputer dan kamera.

Analisis Data

Hasil *sequencing* yang didapatkan yaitu berupa urutan sekuen yang kemudian dianalisis menggunakan beberapa *software*, seperti MEGA v.6.0. dan DNAsp v.5. *Sequencing* sampel yang telah diperoleh terlebih dahulu dibandingkan dengan urutan mtDNA yang diperoleh melalui GenBank pada *website* NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) dengan dilakukan BLAST untuk memperoleh sekuen pembandingan. Sekuen yang didapatkan kemudian dibersihkan menggunakan *software* Ms. Word dan *notepad* agar dapat dianalisis lebih lanjut dengan MEGA v.6.0. Program MEGA v.6.0 digunakan pada analisis filogenetik puyuh dan analisis jarak genetik untuk membandingkan sekuen yang satu dengan sekuen yang lain. Analisis filogenetik dan jarak genetik menggunakan 21

sekuen yang terdiri dari 12 sekuen puyuh sampel dan sembilan sekuen puyuh pembandingan. Program DNAsp v.5 sebagai analisis statistik *Tajima'D test* untuk melihat tingkat evolusi sampel. Perhitungan jarak genetik berdasarkan model substitusi Kimura-2 parameter model. Analisis pohon filogenetik selanjutnya menggunakan metode *Neighbour Joining* (NJ) dengan analisis *bootstrap* 1.000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA

Hasil isolasi DNA divisualisasikan menggunakan elektroforesis *agarose gel* 1% (Pereira *et al.*, 2011). Hasil visualisasi menunjukkan adanya pita DNA pada kedua belas sampel darah puyuh. Hasil visualisasi isolasi DNA dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1. Visualisasi Isolasi DNA pada *agarose gel* 1%. Lambda marker (M), Sampel Puyuh (N1-N12).

Isolasi DNA menjadi langkah penting dalam proses analisis DNA dimana hasil isolasi DNA akan mempengaruhi hasil amplifikasi DNA pada tahap selanjutnya. Adanya kenampakan pita DNA pada Gambar 4 menunjukkan bahwa proses isolasi yang telah dilakukan berhasil. Salah satu faktor yang mempengaruhi kenampakan pita DNA yaitu banyaknya konsentrasi DNA yang dielektroforesis, semakin jelas/terang kenampakan dari pita DNA maka konsentrasi DNA yang didapat juga semakin tinggi (Mulyani, Purwanto, dan Nurruhwati, 2011; Pereira *et al.*, 2011). DNA yang telah ber-

hasil diisolasi kemudian dilanjutkan dengan proses amplifikasi.

Program *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Proses amplifikasi rantai DNA dua belas sampel DNA puyuh dilakukan dengan 35 siklus. Berdasarkan referensi, jumlah siklus pada umumnya yaitu 20- 40 siklus (Wetton *et al.*, 2002; Bermingham and Luettich, 2003). Produk PCR kemudian diidentifikasi dengan elektroforesis *agarose gel* 2% (Shen *et al.*, 1999). Hasil elektroforesis produk PCR dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2. Visualisasi hasil PCR pada *agarose gel* 2%. Marker 100 bp Bench Top Ladder (M), sampel puyuh (N1-N12).

Hasil visualisasi produk PCR menunjukkan munculnya pita DNA yang jelas dan tidak *smear*. Hal tersebut mengindikasikan bahwa hasil PCR memiliki kualitas yang baik (Noor, Pramono, dan Aziz, 2014). Selain itu, primer yang telah didesain berhasil mengamplifikasi fragmen DNA sesuai target dengan panjang basa 1.417 bp. Pita DNA dari masing-masing sampel pada Gambar 5. berada pada posisi baris yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa sampel

puyuh memiliki tingkat spesifikasi DNA yang tinggi (Shen *et al.*, 1999).

Analisis filogenetik dan jarak genetik

Analisis filogenetik dapat digunakan untuk mengetahui kedekatan serta hubungan genetik antara satu spesies dengan spesies yang lain (Nielsen and Yang, 1998). Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan dua belas sekuen sampel puyuh dan sembilan sekuen perbandingan. Hasil analisis filogenetik dapat dilihat pada Gambar 3.

Gambar 3. Pohon Filogenetik 21 sekuen DNA Mitokondria gen *Cytochrome b*.

Berdasarkan analisis rekonstruksi pohon filogenetik dapat diketahui bahwa 12 sampel puyuh memiliki hubungan kekerabatan dengan *Francolinus pintadeanus* dan *Coturnix chinensis* sebesar 81%. Hal ini menunjukkan bahwa hasil analisis rekon-

struksi pohon filogenetik memiliki tingkat kepercayaan yang tinggi, karena percabangan pohon filogenetik menunjukkan nilai *bootstrap* yang dihasilkan lebih dari 65 (Batubara dkk., 2011). Keadaan tersebut yang menyebabkan *Coturnix japonica*,

Francolinus pintadeanus dan *Coturnix chinensis* masuk dalam haplogrup yang sama, yaitu haplogrup A. Hal ini sesuai dengan pernyataan Liu dan Zhang (2016) yang menyatakan bahwa *Coturnix japonica* dengan *Coturnix chinensis* memiliki tingkat kekerabatan yang dekat sehingga berada pada haplogrup yang sama. Selain itu, Rifki *et al.* (2018) juga menyatakan bahwa, puyuh warna bulu cokelat dan warna bulu hitam yang telah mengalami domestikasi di Indonesia memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan puyuh *Coturnix japonica*.

Uji *bootstrap* dilakukan untuk mengetahui seberapa baik set data model yang digunakan dalam analisis sekuen. Nilai uji *bootstrap* yang didapatkan sebesar 81. Set data yang digunakan dikatakan baik apabila hasil uji *bootstrap* berkisar antara 70-95 (Dharmayanti, 2011). Sekuen sampel puyuh dan sekuen pembandingan dilakukan analisis lebih lanjut berupa analisis jarak genetik. Hasil analisis jarak genetik dapat dilihat pada Tabel 1.

Nilai jarak genetik pada 12 sekuen sampel berkisar antara 0,000-0,003 dan rata-rata sebesar 0,002 sedangkan hasil rata-rata jarak

genetik pada 21 sekuen sebesar 0,067. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada 12 sekuen sampel rata-rata terdapat dua pasang basa yang berbeda dari setiap 1.000 bp, sedangkan pada 21 sekuen rata-rata terdapat 67 bp yang berbeda. Odahara *et al.* (2006) menyatakan bahwa semakin dekat hubungan suatu kekerabatan, maka jarak genetik juga akan semakin dekat. Nilai jarak genetik dari 12 sekuen sampel memiliki jarak genetik yang dekat. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Rifki *et al.* (2018) yang menunjukkan bahwa jarak genetik pada sembilan puyuh *C. coturnix japonica* memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan nilai jarak genetik yang dihasilkan adalah 0,000. Menurut Yuliani, Yuniaty, dan Susanto (2017), jarak genetik dinyatakan dekat apabila nilainya berkisar 0,010-0,099; dinyatakan sedang apabila berkisar 0,100-0,990 dan dinyatakan jauh pada kisaran nilai 1-2. Dua individu atau lebih dikatakan memiliki kedekatan genetik apabila nilai jarak genetik yang dihasilkan tidak lebih dari 0,1 (Nei and Kumar, 2000). Hasil dapat dilihat pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Jarak Genetik Sampel Puyuh dan beberapa spesies burung lain.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1.M		0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
2.A	0.000		0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
3.B	0.001	0.001		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
4.C	0.000	0.000	0.001		0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
5.D	0.000	0.000	0.001	0.000		0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
6.E	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000		0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
7.F	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
8.G	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.003		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
9.H	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002	0.003		0.001	0.001	0.001	0.001	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
10.I	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002		0.001	0.001	0.001	0.010	0.009	0.010	0.002	0.006	0.010	0.010	0.011
11.J	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002		0.000	0.000	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
12.K	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002	0.000		0.000	0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
13.L	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000		0.010	0.009	0.010	0.001	0.006	0.010	0.010	0.011
14.M	0.111	0.111	0.112	0.111	0.111	0.111	0.113	0.112	0.113	0.114	0.111	0.111	0.111		0.010	0.010	0.010	0.010	0.011	0.011	0.011
15.N	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.117	0.118	0.118	0.117	0.116	0.116	0.116	0.126		0.011	0.010	0.010	0.007	0.011	0.011
16.O	0.143	0.143	0.144	0.143	0.143	0.143	0.145	0.144	0.145	0.146	0.143	0.143	0.143	0.142	0.135		0.010	0.010	0.011	0.010	0.010
17.P	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.003	0.004	0.001	0.001	0.001	0.113	0.118	0.145		0.006	0.010	0.011	0.011
18.Q	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.044	0.044	0.044	0.045	0.043	0.043	0.043	0.120	0.119	0.144	0.044		0.010	0.011	0.010
19.R	0.125	0.125	0.126	0.125	0.125	0.125	0.127	0.127	0.127	0.128	0.125	0.125	0.125	0.134	0.057	0.130	0.127	0.130		0.012	0.012
20.S	0.131	0.131	0.132	0.131	0.131	0.131	0.133	0.132	0.133	0.134	0.131	0.131	0.131	0.150	0.147	0.122	0.133	0.134	0.140		0.006
21.T	0.133	0.133	0.134	0.133	0.133	0.133	0.135	0.134	0.135	0.136	0.133	0.133	0.133	0.151	0.148	0.120	0.135	0.131	0.142	0.042	

Keterangan: A-L=sekuen sampel puyuh N1 – N12; M=KX712089.1 *Coturnix japonica*; N=AB073301.1 *C. chinensis*; O=KF027439.1 *Tetraogallus tibetanus*; P=KF444060.1 *Pavo cristatus*; Q=AP003195.2 *C. japonica*; R=EU165707.1 *Francolinus pintadeanus*; S=KR349185.1 *T. himalayensis*; T=KF218954 *Lophura swinhoii*; U=EU417810.1 *L. nycthemera*.

Kedekatan jarak genetik menunjukkan eratnya hubungan genetik antar sekuen yang

ditandai dengan sedikitnya variasi atau perbedaan pasang basa antar sekuen yang

digunakan. Hal ini dapat dikatakan bahwa sekuen yang digunakan memiliki tingkat keragaman rendah (Brisson, Nuzhdinand, and Stern, 2009; Sawitri dan Takandjandji, 2013).

Diversitas genetik

Hasil analisis sekuen menggunakan *software* DNASp menunjukkan bahwa total

sekuen memiliki 494 situs sedangkan pada 12 sekuen sampel terdapat 5 situs. Nilai keragaman sekuen pada total sekuen sebesar 0,0945 sedangkan pada sekuen puyuh senilai 0,0003. Nilai keragaman *haplotype* pada total sekuen sebesar 0,867 sedangkan pada sekuen puyuh sebesar 0,682. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Indeks Polimorfisme dan Diversitas Genetik

Sekuen	N	NHap	S	Pi	Hd	Tajima's D
Total sekuen	21	14	494	0,0945	0,867	-1,38090 [NS] (P>0,10)
Sekuen sampel	12	6	5	0,0003	0,682	-1,35536 [NS] (P>0,10)

Keterangan: N=Jumlah Sekuen; NHap=Jumlah haplotype; S=Jumlah Situs; Pi=Keragaman sekuen; Hd=Keragaman haplotype dan NS=Non signifikan.

Analisis data Tajima's D *test* menunjukkan hasil negatif non signifikan pada seluruh sekuen data dan pada sekuen data sampel puyuh dengan nilai sebesar -1,38090 pada total sekuen dan -1,35536 pada sekuen sampel. Nilai negatif non signifikan mengindikasikan bahwa keragaman genetik pada sekuen yang digunakan rendah. Keragaman genetik yang rendah dapat terjadi melalui proses domestikasi, seleksi dan *breeding* yang matang dan telah dilakukan sejak lama sehingga dapat menimbulkan perubahan frekuensi genetik atau mutasi. Hal-hal tersebut menjadi faktor pendorong evolusi pada suatu populasi (Shen *et al.*, 1999; Handi-wirawan, 2006), dengan demikian dapat dikatakan bahwa keragaman genetik yang rendah menandakan kecilnya tingkat evolusi sehingga sekuen puyuh yang ada sekarang tidak berbeda dengan sekuen puyuh yang ada sebelumnya (Frankham, Ballou, and Briscoe, 2004; Brisson, Nuzhdinand, and Stern, 2009).

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan yaitu keragaman genetik puyuh jepang (*Coturnix japonica*) bernilai rendah berdasarkan analisis DNA Mitokondria gen *cytochrome b*. Keragaman genetik yang rendah menunjukkan tingkat evolusi puyuh yang rendah pula sehingga puyuh

(*C.coturnix japonica*) yang ada sekarang tidak berbeda dengan puyuh yang ada sebelumnya dalam sekuen referensi/sekuen pem-banding.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Sebelas Maret (LPPM-UNS) yang telah mendanai penelitian ini melalui skim hibah Penelitian Unggulan dengan nomor kontrak: 516/UN27.21/PP/2019, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. New York: Chapman and Hall.
- Avise. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Batubara, A., Noor R. R., Farajallah, A., Tiesnamurti, B., dan Doloksaribu, M. 2011. Karakterisasi molekuler enam subpopulasi kambing lokal Indonesia berdasarkan analisis sekuen daerah D-loop DNA mitokondria. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 16(1),

- 49-60. doi: <http://doi.org/10.14334/jitv.v16i1.634>
- Bermingham, N. and Luettich, K. 2003. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Histopathology*, 9(3), 159-164. doi: [https://doi.org/10.1016/S0968-6053\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0968-6053(02)00102-3)
- Brisson, J. A., Nuzhdinand, S. S.V., and Stern, D. L. 2009. Similar patterns of linkage disequilibrium and nucleotide diversity in native and introduced populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Genetics* 10(22), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-22>
- Dharmayanti, N. L. P. I. 2011. Filogenetika molekuler: Metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*, 1(21), 1-10.
- Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2004. *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Giuliano, B. and Selph, J. 2005. Quail fact. Proceedings of the 1st quail management short course. In. Giuliano, B., E. Willcox and A. Willcox. Department of Wildlife Ecology and Conservation Institute of Food and Agricultural Sciences. Florida Cooperative Extension Service, (pp. 9-15). University of Florida, Florida.
- Handiwirawan, E. 2006. Keragaman molekuler dalam suatu populasi. Prosiding Lokakarya Nasional Pengelolaan dan Perlindungan Sumber Daya Genetik di Indonesia: Manfaat Ekonomi untuk Mewujudkan Ketahanan Nasional, 20 Desember 2006: 138-144. Bogor, Indonesia.
- Hines, T. 2005. Past and present bobwhite management in south central Florida. Proceedings of the 1st quail management shortcourse. In. Giuliano, B., E. Willcox and A. Willcox. Department of Wildlife Ecology and Conservation Institute of Food and Agricultural Sciences. Florida Cooperative Extension Service, (pp. 2-8). University of Florida, Florida.
- Liu, G. and Zhang, Y. 2016. Next-generation resequencing the complete mitochondrial genome of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 1(1), 937-938. doi: <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1258343>
- Mulyani, Y., Purwanto, A. dan Nurruhwati, I. 2011. Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (khv) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*, 2(1), 1-16.
- Nei, M., and Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. England, Oxford: Incorporated of the United States of Oxford.
- Nielsen, R. and Yang, Z. 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the *Hiv-1 envelope* gene. *Genetics*, 148 (3), 929-936.
- Nishibori, M., Shimogiri, T., Hayashi, T., and Yasue, H. 2005. Molecular evidence for hybridization of species in the genus *Gallus* except for *Gallus varius*. *Journal of Animal Genetics*, 36(5), 367-375. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01318.x>
- Noor, S., Pramono, H., dan Aziz, S. 2014. Deteksi keragaman spesies bakteri metanogen rumen sapi menggunakan

- kloning gen 16S rRNA dan sekuensing. *Scripta Biologica*, 1(4), 1-8. doi: <https://doi.org/10.20884/1.sb.2014.1.4.43>
- Odahara, S., Chung, H. J., Choi, S. H., Yu S. L., Sasazaki, S., Mannen, H., Park, C. S., and Lee, J. H. 2006. Mitochondrial DNA diversity of Korean native goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(4), 482-485. doi: <https://doi.org/10.5713/ajas.2006.482>
- Pereira, J. C., Chaves, R., Bastos, E., Leitão, A., and Guedes-Pinto, H. 2011. An efficient method for genomic DNA extraction from different molluscs species. *International Journal of Molecular Science*, 12 (11), 8086-8095. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms12118086>
- Rifki, M., Ratih, D., Nuzul, W., and Cahyadi, M. 2018. Phylogenetic study of black and brown Japanese quail in Indonesia based on mitochondrial d-loop sequence. *Journal of Animal Breeding and Genomics*, 2(4), 237-244. doi: <https://doi.org/10.12972/jabng.20180023>
- Sawitri, R., dan Takandjandji, M. 2013. Keragaman genetik dan situs polimorfik trenggiling (*Manis javanica desmarest*, 1822) di penangkaran. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*, 11(1), 1-11. doi: <https://doi.org/10.20886/jphka.2014.11.1.1-11>
- Shen, X. J., Suzuki, H., Tsudzuki, M., Ito, S., and Nakamura, T. 1999. Comparison of *Cytochrome b* region among Chinese painted quail, wild-strain quail, and white broiler chicken based on PCR-RFLP analysis. *Japan Poultry Science Journal*, 36(5), 287-293. doi: <https://doi.org/10.2141/jpsa.36.287>
- Wares, J. P. 2014. Mitochondrial cytochrome b sequence data are not an improvement for species identification in scleractinian corals. *PeerJ*, 2(2), 1-8. doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.564/fig-1>
- Wetton, J. H., Braidley, G. L., Tsang, C. S. F., Roney, C. A., Powell, S. L., and Spriggs, A. C. 2002. Generation of a species-specific DNA sequence library of British mammals. A study by the forensic science service for the joint nature conservation committee and the environment and heritage service, (pp. 1-37). Northern, Ireland.
- Widayanti, R., Solihin, D. D., Sajuthi, D., dan Perwita, D. 2006. Kajian penanda genetik gen Cytochrome b pada tarsius sp. *Jurnal Sain Veteriner*, 24(1), 1-8. doi: <https://doi.org/10.22146/jsv.349>
- Widyastuti, W., Mardiaty, S. M., dan Saraswati, T. R. 2014. Pertumbuhan puyuh (*Coturnix japonica*) setelah pemberian tepung kunyit (*Curcuma longa l.*) pada pakan. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 22(2), 12-20. doi: <https://doi.org/10.14710/baf.v22i2.7813>