

## Hubungan Keekerabatan Rana Berdasarkan Gen *cyt b* Berbasis *In Silico* sebagai Bukti Adanya Evolusi Molekuler

Nadya Ismi Putri Triesita, Ika Hanifatul Masruroh, Sulistiono, Agus Muji Santoso

Program Studi Pendidikan Biologi, Universitas Nusantara PGRI Kediri

Email: [nadya.ismi20@gmail.com](mailto:nadya.ismi20@gmail.com)

### Abstrak (calibri font 11)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan Rana dengan menggunakan sekuen gen *cyt b* berbasis *in silico* dalam bentuk pohon filogeni. Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif eksploratif dengan mengunduh data gen *cyt b* Rana dari *Genbank* kemudian dipreparasi dengan menggunakan *BioEdit* dan aplikasi *Mega6* untuk mengkonstruksi pohon filogeni. Hasil inventarisasi diperoleh enam sampel Rana dari *Genbank* yaitu *R. dybowskii*, *R. chensinensis*, *R. huanrensis*, *R. omeimontis*, *R. kukunoris*, dan *R. chaochiaoensis*. Terdapat perbedaan urutan basa nukleotida akibat adanya mutasi gen. Pohon filogeni menunjukkan adanya hubungan kekerabatan yang dekat antara keenam sampel yang membentuk dua klaster besar yaitu *R. chensinensis*, *R. kukunoris* dan *R. huanrensis* dalam klaster A; *R. omeimontis* dan *R. chaochiaoensis* dalam klaster B; dan *R. dybowskii* membentuk *out grup*/kelompok luar padahal keenam sampel memiliki genus yang sama. Hal tersebut membuktikan adanya perbedaan sekuen gen *cyt b* yang dipengaruhi oleh beberapa faktor internal dan eksternal. Harapannya penelitian ini dapat menunjukkan bukti adanya evolusi molekuler pada tingkat gen dari beberapa spesies dalam genus yang sama.

### Kata Kunci

kekerabatan, Rana, gen *cyt b*, *in silico*, evolusi molekuler

## PENDAHULUAN

Evolusi adalah proses yang terjadi secara berangsur-angsur dari waktu ke waktu dan dalam jangka waktu yang lama. Evolusi terjadi sebagai akibat dari adanya seleksi alam dan variasi gen suatu spesies sehingga muncul spesies yang baru. Berdasarkan hasil wawancara dengan siswa kelas XII SMAN 5 Kediri beberapa siswa beranggapan bahwa evolusi hanya terjadi apabila terdapat perubahan secara fisik dari generasi ke generasi dalam suatu populasi. Padahal evolusi juga dapat terjadi secara molekuler yaitu di dalam sel. Perubahan sekuen gen DNA dapat mempengaruhi ekspresi gen setiap individu. Inilah yang menjadi dasar evolusi molekuler.

Kajian ilmu evolusi pada masa modern saat ini dapat dijelaskan dalam beberapa aspek dan pendekatan evolusi diantaranya pendekatan genetika populasi, pendekatan evolusi ekologi, evolusi molekuler, sistematik, dan paleontologi. Berbagai pendekatan dalam mengkaji masalah evolusi ini diprediksi akan terus berkembang sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan.

Evolusi molekuler pada dasarnya menjelaskan dinamika perubahan evolusi pada tingkat molekul. Disamping itu untuk mendukung pemahaman tentang proses evolusi dan efek-efek berbagai macam mekanisme molekuler, berakar pada dua disiplin ilmu yaitu genetika populasi

---

dan biologi molekuler. Genetika populasi melengkapi tentang dasar teori untuk proses-proses evolusi, sementara biologi molekuler melengkapi tentang data empirik. Jadi untuk memahami evolusi molekuler sangat diperlukan pengetahuan dasar keduanya yaitu genetika populasi dan biologi molekuler.

Salah satu contoh bukti evolusi molekuler adalah adanya hubungan kekerabatan antar satu spesies dengan spesies lain. Makhluk hidup yang memiliki nilai kemiripan yang tinggi diasumsikan merupakan makhluk hidup yang berkerabat atau berasal dari nenek moyang yang sama. Kekerabatan suatu makhluk hidup dapat ditinjau melalui persamaan morfologi bahkan dalam tingkat genetik untuk melihat keakuratannya. Perbedaan posisi geografis dan kondisi ekologis serta adanya isolasi pada suatu wilayah merupakan faktor penting yang diduga kuat dapat memicu spesifikasi terhadap ekspresi dari gen yang akan menyebabkan munculnya variasi dan diferensiasi karakter antar populasi. Analisis kekerabatan dapat dikaji melalui genom DNA mitokondria (*mtDNA*) (Widayanti, 2006).

Mitokondria merupakan organel sel yang ditemukan di dalam sel manusia. Cara memperoleh *mtDNA* dari sampel biologis dalam jumlah kecil atau dari sampel biologi yang sudah terdegradasi memiliki kesempatan lebih besar dari pada DNA inti karena molekul *mtDNA* terdapat dalam ratusan sampai ribuan kopi dibanding dengan DNA inti yang hanya dua kopi pada setiap selnya. Oleh karena itu otot, tulang, rambut, kulit, darah, dan cairan tubuh lainnya dapat digunakan sebagai sumber materi untuk penentuan lokus *mtDNA* apabila terjadi degenerasi oleh karena peralatan atau karena waktu. Dalam *mtDNA* mengandung 28 gen yaitu 2 gen penyandi ribosom RNA (12S *rRNA* dan 16S *rRNA*); 12 gen penyandi protein masing-masing *NADH dehidogenase* (*ND1*, *ND2*, *ND4*, *ND5*, *ND4L*) *cytochrome c oxydase* (*COX1*, *COX2*, *COX3*), dan *cytochrome b* (*cyt b*), *ATPase* (*ATP6* dan *ATP8*), dan 14 gen penyandi *tRNA* (Widayanti, 2006).

Akhir-akhir ini gen *cyt b* digunakan sebagai alat dalam mempelajari evolusi molekuler dan kedokteran forensik (Nesty *et al.*, 2013). *cyt b* adalah salah satu gen dari *mtDNA* yang banyak digunakan untuk penelitian identifikasi dan hubungan atau filogeni antara spesies dari genus atau famili yang sama. Hal itu disebabkan gen *cyt b* adalah penyandi protein dan merupakan daerah *conserve* atau tidak banyak mengalami perubahan atau mutasi basa sehingga lebih sensitif digunakan sebagai penanda genetik/marka atau barcode untuk identifikasi kemurnian spesies (Wati *et al.*, 2013).

Pesatnya ilmu pengetahuan dibidang biologi molekuler tidak membuat peneliti kehabisan akal untuk mengembangkan berbagai macam cara untuk mengarsipkan *database* yang telah diteliti. Salah satunya dengan menggunggah *database* secara online. Informasi genetik, DNA, RNA, dan protein yang cukup lengkap dari berbagai penelitian berbasis genomik dari penjuru dunia dapat diperoleh dari *Genbank*. Berbagai data dari *Genbank* dapat dimanfaatkan untuk memprediksi suatu kebenaran hipotesis sebelum melakukan penelitian di laboratorium dengan kata lain dapat memecahkan berbagai masalah terkait biologi molekuler secara komputasi yang biasa disebut *in silico*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan *Rana* berdasarkan sekuen gen *cyt b* berbasis *in silico* sebagai contoh dari adanya evolusi molekuler yang terjadi pada tingkat gen dari beberapa spesies dalam satu genus yang sama.

## METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai Mei 2018 di Kampus I Universitas Nusantara PGRI Kediri. Penelitian ini menggunakan metode penelitian diskriptif eksploratif. Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *hardware* berupa perangkat keras laptop Acer Aspire V5 dengan RAM (*Random Acces Memory*) 2 *gygabite* dengan perangkat komputer meliputi CPU, monitor, *keyborad*, dan *mouse* yang terhubung dengan koneksi internet melalui sinyal *wi-fi*. Serta *software* berupa *Microsoft Office Windows 7*, notepad, dan aplikasi editing Sekuens DNA *BioEdit* versi 7.2.5 (Hall, 1999) yang digunakan untuk mengetahui panjang sekuen DNA dalam satuan bp dilanjutkan dengan aplikasi *Mega6* versi 6.06 (Tamura, 2013) untuk mengkonstruksi pohon filogeni Rana. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sekuen gen *cyt b* Rana yang diinventarisasi melalui *Genbank* NCBI dengan laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Didapati enam sampel gen *cyt b* Rana yang telah diinventarisasi yaitu *R. dybowskii*, *R. chensinensis*, *R. huanrensis*, *R. omeimontis*, *R. kukunoris*, dan *R. chaochiaensis*.

Inventarisasi sekuen gen *cyt b* melalui *Genbank* diawali dengan mengakses laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> yang merupakan laman resmi NCBI dengan memasukkan kata kunci Rana, maka akan muncul berbagai gen dari mitokondria dan proteinnnya dan memilih kode CYT B untuk mengunduh data yang diharapkan. File yang telah diunduh dapat dibuka melalui *Notepad* dengan mensejajarkan seluruh sampel yang didapatkan, dan memberi nama sesuai sampel.

Masuk ketahap preparasi DNA menggunakan aplikasi pengolahan data *BioEdit* dengan membuka file sekuen gen *cyt b* Rana dari *Notepad*, maka akan muncul sekuen gen *cyt b* Rana yang telah disejajarkan. Selanjutnya memilih *Accessory Application* → *CAP contig assembly program* → *Run Application*, akan muncul tampilan *Running Application*, menunggu sampai aplikasi selesai memproses. Maka muncul tampilan sekuen gen *cyt b* yang telah dicontig kemudian memotong urutan basa nukleotida yang panjangnya tidak sama. Contig bertujuan untuk merekonstruksi serangkaian DNA yang tumpang tindih.

Konstruksi pohon filogeni dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Mega6*. Diawali dengan membuka aplikasi *Mega6*, membuka file sekuen gen *cyt b* Rana dari aplikasi *BioEdit* dan memilih *Analyze*. Pohon filogeni akan dianalisis dengan memilih *Phylogeny* dan model konstruksi dendogram contohnya seperti metode *UPGMA (Construct/ Test UPGMA Tree)*. Selanjutnya mengganti bootstrap 1000x untuk pengulangan analisis filogeni. Aplikasi akan memproses permintaan, dan muncul tampilan pohon filogeni dari Rana berdasarkan sekuen gen *cyt b*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

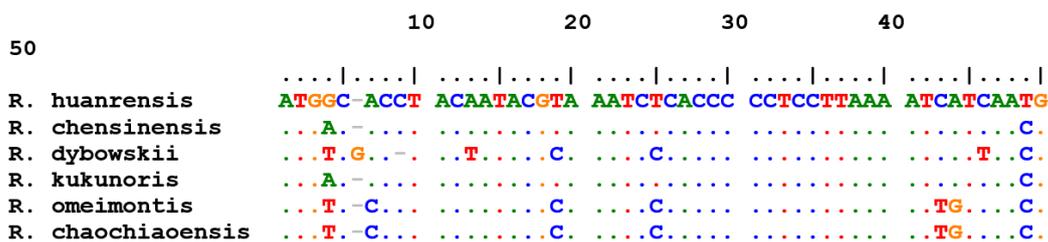
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terdapat enam sampel sekuen gen *cyt b* Rana yang digunakan dalam penelitian ini. Sampel akan dijadikan sebagai dasar untuk analisis hubungan kekerabatan Rana. Sampel Rana memiliki panjang sekuen yang sama yaitu 1143 bp. Setiap sampel memiliki kode akses yang berbeda antara satu spesies dengan spesies yang lain. Berikut keenam sekuen gen *cyt b* Rana yang diinventarisasi dari *Genbank*:

**Tabel 1. Sampel Sekuesn Gen *cyt b* Rana yang dikoleksi dari Genbank**

No	Jenis Rana	Kode Genbank NCBI	Asal Negara
1	<i>R. huanrensis</i>	ID 26375304	China, (Dong et al., 2015)
2	<i>R. chensinensis</i>	ID 18490409	China (Li et al., 2014)

3	<i>R. dybowskii</i>	ID 18490395	China (Li et al., 2014)
4	<i>R. omeimontis</i>	ID 33944093	Unpublished
5	<i>R. kukunoris</i>	ID 33944055	Unpublished
6	<i>R. chaochiaoensis</i>	ID 33944017	Unpublished

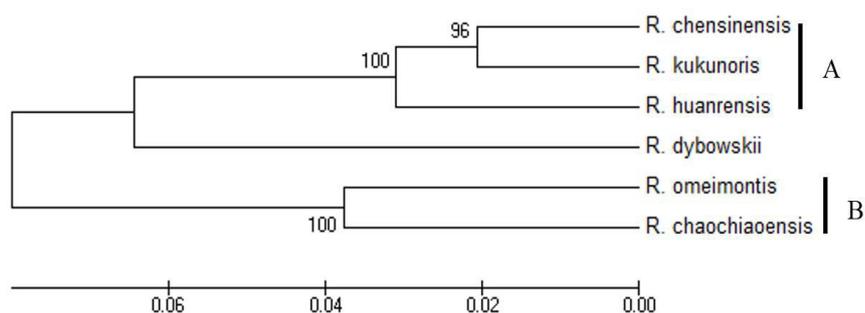
Berdasarkan pensejajaran 1134 nukleotida dari enam sampel gen *cyt b* Rana diketahui terdapat beberapa variasi urutan basa nukleotida *cyt b* Rana dari setiap sekuen. Analisis kekerabatan mengacu pada homologi sekuen gen yang menyebabkan adanya perbedaan basa nukleotida pada gen *cyt b* sehingga dapat digunakan sebagai dasar pembandingan antar spesies. Semakin tinggi tingkat homologinya, semakin dekat kekerabatan antar jenis karena mutasi yang terjadi semakin rendah.



Gambar 1. Potongan Urutan Basa Nukleotida Rana Berdasarkan Gen *cyt b* Berbasis *In Silico*

Sebagai contoh telah ditampilkan 50 bp sekuen gen *cyt b* Rana yang telah disejajarkan (Gambar 1.). Terdapat perbedaan sekuen gen *cyt b* dengan urutan pertama *R. huanrensis*, namun *R. huanrensis* bukan merupakan anecestor (nenek moyang) dalam penelitian ini. Seperti basa nukleotida pada situs keempat, terjadi perbedaan antara keenam basa nukleotida dari masing-masing spesies Rana. *R. huanrensis* memiliki basa G pada situs keempat sedangkan *R. chensinensis* dan *R. kukunoris* mengalami mutasi substitusi transisi dengan adanya perubahan basa nitrogen menjadi A. Sedangkan pada *R. dybowskii*, *R. omeimontis*, dan *R. chaochiaoensis* mengalami mutasi substitusi tranversi dengan adanya perubahan menjadi basa T. Situs ketujuh menunjukkan adanya penambahan (adisi) basa nukleotida pada sekuen gen *cyt b* *R. dybowskii* dengan basa G. Situs kesembilan menunjukkan adanya delesi pada *R. dybowskii* dan tidak terjadi pada sekuen gen *cyt b* Rana yang lainnya memiliki urutan nukleotida C. *R. dybowskii* memiliki jumlah mutasi yang paling banyak dibandingkan dengan spesies Rana yang lainnya bahkan hingga panjang sekuen ke 1143 bp. Sepanjang 50 bp sekuen gen *cyt b* (Gambar 1.), *R. dybowskii* banyak mengalami mutasi substitusi tranversi yaitu pada situs ke 13, 19, 25, dan 46 sedangkan untuk spesies lainnya cenderung memiliki urutan basa nukleotida yang konsisten. Terjadinya mutasi substitusi tranversi dapat mengakibatkan adanya perubahan asam amino yang terbentuk sehingga mempengaruhi ekspresi gen (Nur & Syahrudin, 2016).

Perbedaan urutan basa nukleotida membuktikan adanya perubahan yang terjadi pada gen dari spesies dalam satu genus yang sama. Semakin rendah perbedaan basa nukleotida dari masing-masing spesies akan menunjukkan hubungan kekerabatan yang semakin dekat antar spesies tersebut seperti pada pohon filogeni Rana yang dikonstruksi dengan menggunakan aplikasi *Mega6* sebagai berikut:



Gambar 2. Pohon Filogeni Rana Berbasis In Silico (A=Klaster A; B=Klaster B)

Pohon filogeni yang terbentuk dari enam sampel gen *cyt b* Rana (Gambar 2.) menunjukkan beberapa perbedaan skala. Semakin ke kanan skala menunjukkan nilai yang semakin kecil menandakan variasi basa nukleotida semakin rendah dengan kata lain homologi basa nukleotida yang dimiliki semakin tinggi.

Pohon filogeni Rana yang terbentuk terbagi atas dua klaster (kelompok) yang mencolok. *R. chensinensis*, *R. kukunoris*, dan *R. huanrensis* menempati klaster A; sedangkan *R. omeimontis* dan *R. chaochiaoensis* menempati klaster B. Klaster A didapati *R. chensinensis* memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *R. kukunoris*. Nilai skala menunjukkan angka 0,02 yang menandakan tingginya nilai homologi basa nukleotida dari masing-masing sampel. Penelitian terdahulu menggunakan analisis genom mitokondria dengan metode konstruksi Maximum Likelihood *R. chensinensis* dengan *R. kukunoris* memiliki hubungan kekerabatan yang dekat karena berada dalam satu klaster (Zhou *et al.*, 2017). *R. huanrensis* memiliki hubungan kekerabatan yang cukup dekat dengan *R. chensinensis* dan *R. kukunoris* dengan nilai skala menunjukkan angka 0,03. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Dong *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa *R. chensinensis* dan *R. huanrensis* berada pada satu klaster yang sama ditinjau dari genom mitokondria sehingga diartikan memiliki hubungan kekerabatan yang dekat. *R. chensinensis*, *R. huanrensis*, dan *R. kukunoris* berada dalam satu cabang dalam pohon filogeni (Zhou *et al.*, 2017). Klaster B terdapat *R. omeimontis* dan *R. chaochiaoensis* yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan nilai skala menunjukkan angka 0,038. Zhou *et al.* (2017) juga menyatakan adanya hubungan kekerabatan yang dekat antara *R. omeimontis* dan *R. chaochiaoensis* berdasarkan genom mitokondria menggunakan metode konstruksi Maximum Likelihood.

Terdapat satu spesies yaitu *R. dybowskii* yang membentuk *out grup* (kelompok luar) dengan nilai skala menunjukkan angka 0,065 padahal keenam spesies tersebut berada pada takson genus yang sama yaitu Rana. Hal tersebut terjadi karena *R. dybowskii* memiliki jumlah mutasi yang tinggi dibandingkan dengan kelima spesies Rana lainnya dan membuat *R. dybowskii* membentuk *out grup* pada pohon filogeni karena memiliki kekerabatan yang jauh dengan spesies Rana yang lain.

Perbedaan basa nukleotida gen *cyt b* yang mempengaruhi hubungan kekerabatan Rana dapat terjadi karena beberapa faktor baik faktor internal maupun faktor eksternal. Seperti adanya seleksi alam yang mempengaruhi adanya adaptasi terhadap lingkungan, faktor geografis, migrasi, perkawinan tak acak, hanyutan genetik, mutasi gen, serta rekombinasi dan seleksi (Nur & Syahrudin, 2016). Faktor-faktor tersebut yang mempengaruhi terjadinya evolusi

molekular pada spesies tertentu yang dapat diketahui tanpa harus terekspresi secara langsung pada morfologinya, karena memerlukan waktu yang cukup lama untuk mengetahui ekspresi gen dari hasil mutasi yang dapat diamati pada morfologi individu tertentu. Hal tersebut merupakan salah satu keunggulan dari penelitian *in silico*.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian kekerabatan *Rana* menggunakan gen *cyt b* berbasis *in silico* dapat menunjukkan adanya bukti evolusi secara molekuler yaitu adanya perbedaan urutan basa nukleotida gen *cyt b* *Rana*. Perbedaan urutan basa nukleotida dapat mempengaruhi kekerabatan *Rana* dalam satu genus yang dapat digambarkan dalam sebuah pohon filogeni dengan menggunakan metode konstruksi UPGMA. Perbedaan basa nukleotida gen *cyt b* *Rana* dapat terjadi karena beberapa faktor baik faktor internal maupun faktor eksternal seperti seleksi alam, letak geografis, migrasi, perkawinan tak acak, hanyutan genetik, mutasi gen, serta rekombinasi dan seleksi. Mengungkapkan adanya mutasi pada perbedaan urutan basa nukleotida tanpa harus melihat ekspresi gen pada morfologinya merupakan salah satu keunggulan penelitian dibidang *in silico*.

## DAFTAR RUJUKAN

- Dong. B., Zhou. Y., Yang. B. 2015. The Complete Mitochondrial Genome of the *Rana huanrensis* (Anura: Ranidae). Shenyang: Shenyang Normal University. *The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*.
- Hall. T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows. Carolina: North Carolina University USA. *Jurnal Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Li. J., Lei. G., Fu. C. 2014. Complete Mitochondrial Genomes of Two Brown Frogs, *Rana dybowskii* and *Rana cf. chensinensis* (Anura: Ranidae). Shanghai: Fudan University. *Jurnal Informa Health Care*.
- Nesty. R., Tjong. D.H., Herwina. H. 2013. Variasi Morfometrik Kodok *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799) (Anura: Bufonidae) di Sumatera Barat yang Dipisahkan oleh Bukit Barisan. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 2 (1): 37-42.
- Nur. A., Syahrudin. K. 2016. *Gandum: Peluang Pengembangan di Indonesia* Aplikasi Teknologi Mutasi dalam Pembentukan Varietas Gandum Tropis. Jakarta: Indonesian Agency for Agricultural Research and Development.
- Tamura. K., Stecher. G., Peterson. D., Filipski. A., Kumar. S. 2013. Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Hachioji: Tokyo Metropolitan University Japan. *Jurnal Mol. Bio. Evol.* 30(12): 2725-2729.
- Wati. M., Tjong. D.H. Saifullah. 2013. Studi Fenetik Katak *Rana nicobariensis* Stoliczka, 1870 (Ranidae) di Pulau Siberut dan Daerah Dataran Rendah Sumatera Barat. Padang: STKIP PGRI Sumatera Barat Padang. Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung.
- Widayanti. R. 2006. Kajian Penanda Genetik Gen Cytochrome B dan Daerah D-Loop pada *Tarsius sp.* Bogor: Institut Pertanian Bogor. Disertasi.
- Zhou. Y., Wang. S., Zhu. H., Li. P., Yang. B., Ma. J. 2017. Phylogeny and biogeography of South Chinese brown frogs (Ranidae, Anura). Harbin: Northeast Forestry University. *Jurnal PLoSONE*. 12(4): e0175113.