

**KAJIAN MOLEKULER DAERAH D-LOOP PARSIAL *Deoxyribonucleic acid* (DNA)  
MITOKONDRIA KUDA (*Equus caballus*) ASLI PRIANGAN**

**MOLECULAR STUDY ON PARTIAL D-LOOP OF MITOCHONDRIAL *Deoxyribonucleic acid* (DNA)  
NATIVE HORSE (*Equus caballus*) OF PRIANGAN**

**Yuriadi<sup>1</sup>, Rini Widayanti<sup>2</sup>, Aris Haryanto<sup>2</sup>, Wayan Tunas Artama<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>2</sup>Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: yuriadi-kuda@yahoo.com

**ABSTRACT**

Priangan horses are one of the three Indonesia natives horses. Samples of five horses were collected from Indramayu and Bandung Regency in West Java Province. Noncoding area (D-loop) of mitochondrial DNA was amplified using 5'-CGCACATTACCCTGGTCTTG-3' as a forward and 5'GAACCAGATGCCAGGTATG-3' as reverse primers. The amplicon was characterised by electrophoresis on 1,2% agarose gel. Amplicon was purified with the GFX Column Purification kitted and sequenced of mtDNA fragment. Analysis of genetic diversity on sequence noncoding area (D-loop) of Priangan horse were carried out by MEGA-version 4. It was concluded that the eleven different nucleotides sites occur on 355 nucleotides. The genetics distance ranged between 0.0% and 15.02% with average of 7.51%. The phylogenetic tree using neighbor joining method based on the sequence of nucleotide partial D-loop could not be used to differentiate priangan horses from *Equus caballus*.

**Keyword:** *Equus caballus*, Morphology, DNA, PCR, D-Loop Mitochondrial

**ABSTRAK**

Kuda priangan adalah salah satu dari tiga kuda lokal asli Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji daerah nonkoding (D-loop) DNA mitokondria kuda asli priangan. Sebanyak lima sampel darah kuda lokal priangan diambil dari wilayah kabupaen Indramayu dan Bandung Jawa Barat. Amplifikasi wilayah nonkoding (D-loop) dilakukan dengan menggunakan primer 5'-CGCACATTACCCTGGTCTTG-3' dan 5'GAACCAGATGCCAGGTATG-3', masing-masing sebagai forward dan reverses primer. Amplicon di karakterisasi secara elektroforesis menggunakan gel agarose 1.2%. Pemurnian amplicon dilakukan dengan kolom kromatografi GFX kemudian dilakukan sequencing untuk menentukan sequen DNA-nya. Keragaman genetik sequen DNA daerah non penyandi (D-loop) parsial kuda priangan dianalisis dengan program MEGA versi 4. Hasil penelitian menunjukkan sebelas posisi nukleotida yang polimorfik pada sekuen D-loop yang terbaca sepanjang 355 nt. Jarak genetik yang dihitung dengan model Kimura dua parameter berkisar antara 0% sampai 15.02% dan rata-rata 7.51%. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa kuda priangan merupakan anggota spesies *Equus caballus*.

**Kata kunci:** *Equus caballus*, Morfologi, DNA, PCR, D-loop mitokondria

**PENDAHULUAN**

Kuda (*Equus caballus*) lokal asli Priangan, kuda tengger dan kuda dieng merupakan nenek moyang

kuda di pulau Jawa. Populasi beberapa jenis kuda secara nasional pada tahun 2008 sebesar 411.464 ekor dan diperkirakan kuda asli Jawa kurang lebih tinggal 52.118 ekor atau 12,6%. Populasi kuda di provinsi Jawa Barat pada tahun 2007 sebanyak dari

15.755 ekor dan pada tahun 2008 turun menjadi 14.087 ekor atau turun 7,29% dan kuda lokal asli Jawa Barat tinggal 1460 ekor atau 10% dari populasi kuda di Jawa Barat (Anonim, 2008). Data tersebut menggambarkan bahwa kuda asli pulau Jawa memiliki resiko kepunahan sehingga pengelolaannya perlu dilakukan secara hati-hati. Sehubungan dengan masalah tersebut perlu dilakukan tindakan untuk meningkatkan jumlah populasi kuda asli Indonesia yang langka ini melalui upaya konservasi secara *in-situ* (konservasi di daerah habitat asalnya) dan *ex-situ* (konservasi di luar daerah habitat asalnya). Konservasi sebagai salah satu cara untuk pelestarian kuda lokal asli Indonesia akan lebih terarah dan berhasil guna apabila karakteristik dan keragaman sumber genetiknya diketahui secara pasti.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji keragaman genetik kuda priangan berdasarkan sekuen D-Loop parsial mitokondria dan diharapkan dapat sebagai penanda genetik kuda priangan terhadap kuda asli Indonesia lainnya, sehingga usaha konservasi kuda asli Indonesia dapat berhasil guna.

Analisis genom mitokondria berupa runutan utuh dari DNA telah dilakukan pada kuda liar dan kuda domestik di Sorraria (Bowling dkk., 2000; Kavar dkk., 1999; Kim dkk., 1999; Oakenfull dan Reader 1998; Oakenfull dkk., 2000 dan Vila dkk., 2000). Terbuka kesempatan untuk mengkaji bagian yang tidak penyandi protein (*D-Loop*) Mitokondria pada kuda lokal asli Indonesia.

Fragmen dalam genom mitokondria banyak digunakan untuk penelitian mengenai hubungan inter spesies (beberapa galur kuda). Penelitian

mengenai perbedaan genetik dan evolusi untuk memperoleh klasifikasi dan perbedaan kuda liar. Hal tersebut mempunyai arti penting dalam usaha konservasi dan penangkaran. Informasi mengenai data evolusi pada kuda liar dan kuda lokal diperoleh melalui analisis DNA mitokondria dengan teknik sekuensing (Bowling dkk., 2000). Fragmen bukan penyandi protein atau D-loop parsial didalam genom mitokondria yang sering dipakai dalam penelaahan beragam genetik dan hubungan kekerabatan diantara spesies hewan karena angka dari polimorfisme nukleotida atau perbedaan runutan yang tinggi pada kedua bagian hipervariabel dari non coding region (Melton, 1999). Daerah *D-loop* ini menarik untuk ditelaah karena dua dari ketiga domainnya memiliki mutasi yang tinggi sehingga runutan basa-basa nukleotidanya terjadi tidak saja pada tingkat inter spesies tetapi juga pada tingkat intra spesies (Widayanti, 2007). Penelaahan *D-loop* banyak dilakukan untuk penelaahan biologi populasi dan evolusi hewan. Sbisa dkk., (1997) Analisis struktur mitokondria daerah *D-loop* pada mamalia, merupakan studi evolusi yang sistematis pada daerah homolog organisme mamalia yang sudah menyebar ke seluruh dunia pada sejak 150 juta tahun yang lalu.

Namun demikian penelaahan keragaman genetik daerah bukan penyandi protein (*D-loop*) pada kuda Indonesia (kuda lokal Priangan di Jawa Barat) belum pernah dilakukan. Pemanfaatan analisis keragaman genetik kuda Indonesia (*Equus caballus*) menggunakan *D-Loop* mitokondria diharapkan dapat membantu dalam melengkapi data yang kurang sehingga dapat membantu usaha konservasi.

## MATERI DAN METODE

Lima ekor kuda dari daerah Kabupaten Bandung Jawa Barat (Banjaran, Kemas, Mojosetro, Bandung, dan Majalaya) digunakan pada penelitian ini. Sebanyak 5 ml darah diambil melalui *vena jugularis* dan diberi antikoagulan EDTA 10%.

Isolasi dan purifikasi DNA menggunakan DNA Isolation Kit (Qiagen). Sampel DNA yang diperoleh disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . DNA dilihat kualitasnya dengan dimigrasikan pada gel agarosa 1,2% dengan menggunakan buffer 1xTBE (89 mM Tris, 89 mM asam borat dan 2 mM EDTA, pH 8,0). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ( $\lambda = 300\text{ nm}$ ) setelah gel diwarnai dengan ethidium bromide (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Primer untuk amplifikasi daerah D-loop menggunakan primer forward yaitu 5'-CGCACATTACCCTGGTCTTG-3' dan reverse 5'GAACCAGATGCCAGGTATG-3'. (Xu dan Arnason, 1994). DNA total hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 50  $\mu\text{l}$  campuran pereaksi PCR terdiri dari 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM dNTPs, 100-300 ng DNA cetakan, 10-20 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq polimerase* beserta bufernya. Amplifikasi tersebut dilakukan dengan mesin GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 2400 (Perkin Elmer) dengan waktu denaturasi awal 5 menit,  $90^{\circ}\text{C}$ , denaturasi 30 detik  $94^{\circ}\text{C}$ , anealing 45 detik  $55^{\circ}\text{C}$ , elongasi 1 menit  $72^{\circ}\text{C}$ , dan terminasi 5 menit  $72^{\circ}\text{C}$ . Amplifikasi dilakukan 35 siklus.

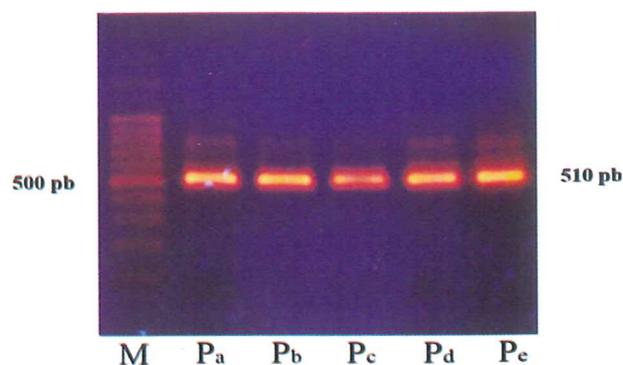
Produk PCR dideteksi pada gel agarosa 1,2% dengan buffer 1xTBE. Penanda DNA dengan ukuran 100 pb digunakan sebagai penunjuk berat molekul.

Produk PCR hasil amplifikasi selanjutnya digunakan sebagai DNA cetakan sekuensing DNA. Kondisi untuk reaksi sekuensing adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selanjutnya diikuti dengan  $94^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik,  $55^{\circ}\text{C}$  selama 45 detik,  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit; reaksi amplifikasi sebanyak 25 siklus kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 5 menit pada  $72^{\circ}\text{C}$ . Sekuensing DNA menggunakan primer Forward serta menggunakan alat sekuensing DNA otomatis *ABI Prism versi 3.4.1* (USA).

Penjajaran berganda sekuen nukleotida *D-loop* parsial dianalisis dengan bantuan perangkat lunak program Clustal W (Thompson dkk., 1995). Analisis hasil berdasar sekuen nukleotida *D-loop* parsial menggunakan perangkat lunak MEGA versi 4.1. Jarak genetik dianalisis dengan metode Kimura dengan dua parameter (Kumar dkk., 2001).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi wilayah nonkoding (*D-loop*) DNA mitokondria dari 5 sampel kuda priangan dapat dilihat pada gambar 1.

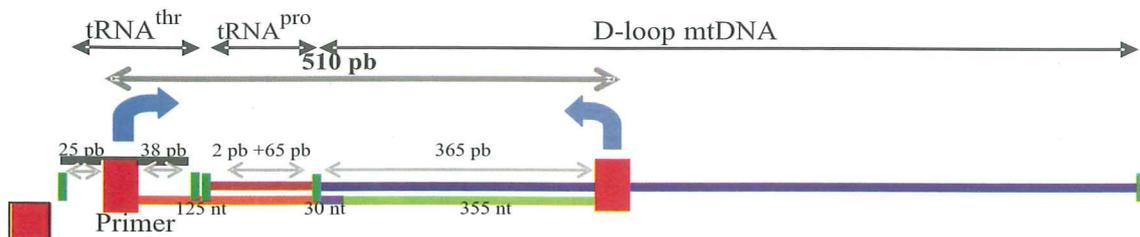


Gambar 1. DNA mitokondria hasil amplifikasi PCR dari 5 sampel kuda Priangan  
Keterangan: M; Marker DNA 500 bp; Pa – Pe; Produk PCR 5 sampel kuda Priangan

Skema runutan basa nukleotida *E. caballus* (*Genebank*, NC\_001640) terhadap wilayah yang diamplifikasi, menunjukkan bahwa penempelan primer EC Loop *Forward* berada 125 pb dibelakang wilayah D-loop mtDNA, tepatnya pada urutan basa ke 15343. Besarnya fragmen DNA yang teramplifikasi pada penelitian setelah diplotkan dengan data runutan DNA mitokondria *E. caballus* masing-masing; 58 pb pada fragmen tRNA<sup>thr</sup>, 2 pb jarak antara fragmen tRNA<sup>thr</sup> dengan tRNA<sup>pro</sup>, 65 pb pada fragmen tRNA<sup>pro</sup> dan sisanya 385 pb pada fragment D-loop mtDNA yang dimulai pada urutan basa nukleotida ke 15469.

Analisis keragaman nukleotida fragmen D-loop sepanjang 510 pb hasil amplifikasi primer ECLoop

*Forward* dan ECLoop *Reverse* setelah dilakukan penentuan runutan DNA menggunakan primer *Forward* dan disejajarkan (*multiple alignment*) dengan runutan genom *E. caballus* dan *E. burchellii* sebagai pembanding luar dari *Genebank* diperoleh 355 pb yang dapat dianalisis, dimulai dari nukleotida ke 15498 dari mtDNA. Bagian yang tidak terbaca sebanyak 125 nukleotida terletak pada ujung 5' primer *Forward* ditambah dengan 30 nukleotida wilayah D-loop *E. burchellii* karena keterbatasan jumlah nukleotida dari data *Genebank*. Skema wilayah D-Loop parsial dan jumlah nukleotida hasil amplifikasi yang dapat dianalisis disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema daerah D-loop dan sebagian hasil pengurutan DNA (berukuran 355 nt) yang dipakai untuk analisis keragaman genetik pada *E. caballus* Priangan.

Jumlah nukleotida dari semua sampel kuda priangan adalah sama setelah dibandingkan dengan *E. caballus*, sedangkan setelah dibandingkan dengan *E. burchellii* jumlahnya berbeda karena adanya delesi 2 nukleotida pada *E. burchellii*. Perbandingan dari 355 nukleotida kuda priangan terhadap basa nukleotida *E. caballus* (*Genebank*), sebanyak 11 nukleotida dikategorikan sebagai situs beragam (9 situs terjadi substitusi transisi dan dua situs terjadi transversasi yaitu pada basa urutan ke 5, 18, 22, 25, 27, 29, 31, 33, 34, 38, dan 39. Kesebelas situs beragam

tersebut tidak dapat digunakan untuk membedakan kuda priangan 1, 2, 3, 4, dan 5 dengan *Equus caballus* pembanding, oleh karena kuda priangan 1 dan 2 memiliki urutan DNA yang sama dengan *Equus caballus* pembanding.

Urutan basa hasil sekuensing (355 nt) kuda priangan dengan *Equus caballus* sebagai pembandingnya disajikan pada tabel 1. Matrik perbedaan nukleotida dan jarak genetik seluruh kuda hasil penelitian dengan spesies pembanding disajikan pada tabel 2.

Tabel 1. Nilai transisi, transversi dan Matrik jarak diantara individu sampel kuda *E. caballus* Priangan, *E. caballus* referensi dan *E. burrchellii* (zebra) sebagai referensi *outgroup*

No.	Sampel	<i>E. caballus</i>	<i>E. burrchellii</i>	Priangan A	Priangan B	Priangan C	Priangan D	Priangan E
1	<i>E. caballus</i> *	-	40/4	1/1	1/1	9/1	9/1	10/2
2	<i>E. burrchellii</i> *	0,1419	-	41/5	41/5	39/5	39/5	40/6
3	Priangan A	0,0057	0,1424	-	0/0	10/0	10/0	11/1
4	Priangan B	0,0057	0,1497	0,0000	-	10/0	10/0	11/0
5	Priangan C	0,0291	0,1424	0,0290	0,0290	-	0/0	1/1
6	Priangan D	0,0291	0,1424	0,0290	0,0290	0,000	-	1/1
7	Priangan E	0,0352	0,1502	0,0351	0,0351	0,0057	0,0057	-

Tabel 1. menunjukkan bahwa polimorfisme dalam bentuk substitusi transisi memiliki nilai kejadian yang lebih besar dibandingkan dengan nilai kejadian substitusi transversi dari kelima sampel yang telah dianalisis. Hal ini sesuai dengan pendapat Kumar dkk., (2001) yang menyatakan bahwa bentuk substitusi yang paling umum terjadi pada spesies hewan yang berbeda dalam satu genus yang sama adalah substitusi transisi, sedangkan proses substitusi tranversi cenderung lebih banyak terjadi pada spesies hewan yang memiliki hubungan kekerabatan yang cukup jauh, seperti dalam satu famili atau ordo.

Pada tabel 1 dapat dilihat, bahwa jarak genetik memberikan kontribusi pada hubungan kekerabatan. Semakin kecil nilai jarak genetik maka semakin dekat hubungan kekerabatannya, sebaliknya semakin besar nilai jarak genetik maka semakin jauh hubungan kekerabatannya. Jarak genetik dari sampel-sampel *E. caballus* berdasarkan runutan nukleotida gen D-loop (355 nt) adalah bahwa jarak paling kecil sebesar 0% yaitu antara *E. caballus* Priangan A dengan *Equus caballus priangan* B dan *E. caballus* priangan C dengan *E. caballus* priangan D, jarak paling besar adalah 15,02% yaitu antara *E. caballus* priangan terhadap *E. burrchellii*. Keadaan ini sangat berbeda dengan pendapat Sbisca dkk.,

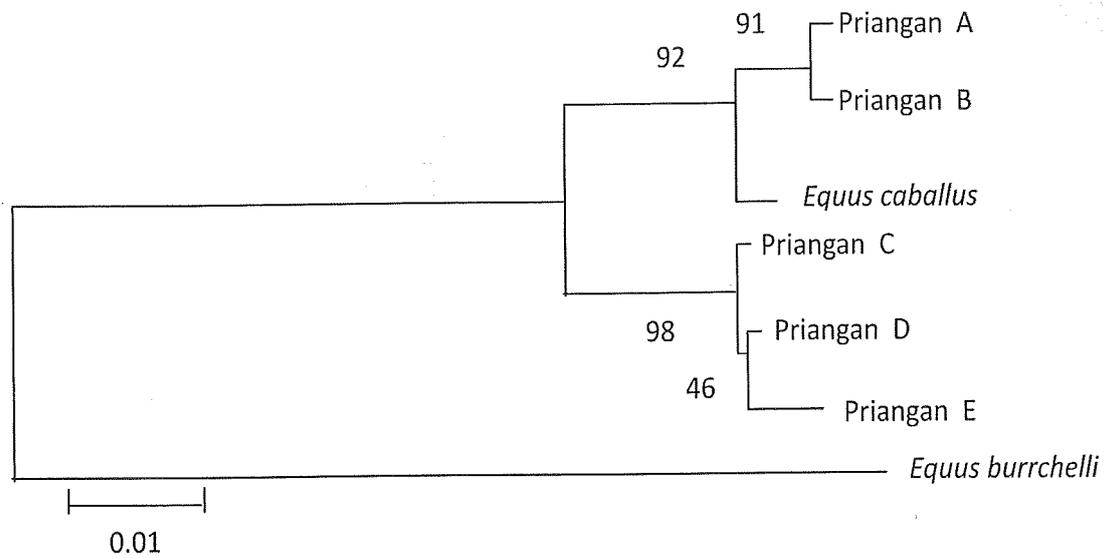
(1997), bahwa daerah D-loop dibagi menjadi tiga domain, domain 1 (berbatasan dengan tRNA<sup>pro</sup>) bersifat variatif, domain 2 (tengah) bersifat konservatif dan domain 3 bersifat variatif. Menurut Hoelzel dkk. di daerah D-loop ditemukan 5 posisi susunan urutan berulang (*repetitive squences*) 1 sampai dengan 5, RS1 dan RS2 berada pada ujung 5'-D-loop, sedang RS3, RS4 dan RS5 berada pada ujung 3' dari D-loop sangat kecil keragamannya, hal ini sama dengan penelitian Widayanti, (2008) pada *Tarsius bancanus*, pada beberapa spesies Tarsius (Widayanti dan Solihin (2007) dan pada kuda tengger (Yuriadi dkk., 2010). Menurut Schmid dkk., (2002), pada *T. bancanus* ditemukan urutan berulang pada posisi RS3 sebanyak 22 pb dengan pengulangan bervariasi dari 4 sampai 15, sedangkan menurut Fumagalli dkk., (1996) ukuran panjang nukleotida D-loop bervariasi disebabkan karena duplikasi atau delesi dari urutan berulang. Jadi kemungkinan apabila pada penelitian ini dilakukan pengurutan nukleotida di RS3 tersebut maka akan dapat membedakan *Equus caballus* dengan kuda priangan.

Pada tabel 1 terlihat, bahwa adanya kesamaan dalam susunan basa maupun proses polimorfisme pada beberapa sampel penelitian, diantaranya adalah sampel kuda priangan A dengan B dan kuda priangan

C dengan D. Pada gambar percabangan filogenik, cabang dengan kode sampel sejajar secara vertikal kesamaan yang terjadi digambarkan dalam bentuk pada Gambar

Tabel 2. Penjajaran berganda nukleotida dari D-loop antara *Equus caballus* priangan dan *Equus burchelli* (Zebra). Ruas ini setara dengan posisi 15498 sampai dengan 15852 dari runutan lengkap mt DNA *Equus caballus*.

<i>Equus caballus</i>	CCT	CAT	GTG	CTA	TGT	CAG	TAT	CAG	ATT	ATA	CCC	CCA	CAT	AAC	ACC	ATA	CCC	ACC	TGA	CAT	[ 60]
Priangan_A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 60]
Priangan_B	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 60]
Priangan_C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 60]
Priangan_D	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 60]
Priangan_E	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 60]
<i>E.burchellii</i>	...	...	..A	...	...	...	...	T.A	.A.	.C.	T.-	.T.	TG.	.GT	.TT	...	.A-	GTT	CA.	...	[ 60]
<i>Equus caballus</i>	GCA	ATA	TCT	TAT	GAA	TGG	CCT	ATG	TAC	GTC	GTG	CAT	TAA	ATT	GTC	TGC	CCC	ATG	AAT	AAT	[120]
Priangan_A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
Priangan_B	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
Priangan_C	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	G..	..T	...	...	...	...	...	...	[120]
Priangan_D	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	G..	..T	...	...	...	...	...	...	[120]
Priangan_E	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	G..	..T	...	...	...	...	...	...	[120]
<i>E.burchellii</i>	AT.	...	C.C	.G.	T..	CAT	...	...	...	A..	...	...	.G	...	..T	...	...	...	...	...	[120]
<i>Equus caballus</i>	AAG	CAT	GTA	CAT	AAT	ATC	ATT	TAT	CTT	ACA	TAA	GTA	CAT	TAT	ATT	ATT	GAT	CGT	GCA	TAC	[180]
Priangan_A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
Priangan_B	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
Priangan_C	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	[180]
Priangan_D	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	[180]
Priangan_E	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	[180]
<i>E.burchellii</i>	...	...	...	...	...	..T	...	..C	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
<i>Equus caballus</i>	CCC	ATC	CAA	GTC	AAA	TCA	TTT	CCA	GTC	AAC	ACG	CAT	ATC	ACA	GCC	CAT	GTT	CCA	CGA	GCT	[240]
Priangan_A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
Priangan_B	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
Priangan_C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C.	...	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	[240]
Priangan_D	...	...	...	...	...	...	...	...	..C.	...	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	[240]
Priangan_E	...	...	...	...	...	...	...	...	..C.	...	...	...	...	...	..A.	...	...	...	...	...	[240]
<i>E.burchellii</i>	...	..T	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A.	..T.	..A.	...	...	...	[240]
<i>Equus caballus</i>	TAA	TCA	CCA	AGC	CGC	GGG	AAA	TCA	GCA	ACC	CTC	CCA	ACT	ACG	TGT	CCC	AAT	CCT	CGC	TCC	[300]
Priangan_A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
Priangan_B	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
Priangan_C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
Priangan_D	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
Priangan_E	...	...	...	...	...	...	...	..C.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
<i>E.burchellii</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	..T.	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
<i>Equus caballus</i>	GGG	CCC	ATC	CAA	ACG	TGG	GGG	TTT	CTA	CAA	TGA	AAC	TAT	ACC	TGG	CAT	CTG	GTT	C	[355]	
Priangan_A	...	...	...	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	[355]	
Priangan_B	...	...	...	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	[355]	
Priangan_C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	[355]	
Priangan_D	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	[355]	
Priangan_E	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	[355]	
<i>E.burchellii</i>	...	...	..T	T..	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[355]



Gambar 3. Filogram menggunakan metode *Neighbor joining* dari nukleotida daerah D-loop Parsial (berukuran 355 nt). *Caballus* Priangan dan *E. burchellii* (Zebra) sebagai pemabanding luar.

Analisis terhadap 355 nukleotida yang menyusun D-loop parsial menggunakan metode *Neighbor joining* dengan pengulangan 1000x. Pada gambar 3 memperlihatkan hubungan kekerabatan antara *E. caballus* priangan, *E. caballus* dan *E. burchellii*. Adapun data runutan nukleotida spesies pemabanding diambil dari *Genebank*. Filogram yang dihasilkan dari nukleotida daerah D-loop yang telah dianalisis memperlihatkan bahwa terdapat 3 cabang filogenik. kuda priangan A dengan kuda priangan B berada dalam satu kelompok bersama-sama dengan *E. caballus* (*Genebank*). Pola kedekatan hubungan ini ditandai dengan nilai *bootstrap* yang tinggi (92%) dan jarak genetik yang kecil dari ketiga sampel tersebut. Pada kelompok kedua, terdapat kuda priangan C, kuda priangan D dan kuda priangan E dengan nilai *bootstrap* sebesar 98%. Sedangkan *E. burchellii* berada dalam kelompok ketiga yang terpisah dengan kelompok kuda priangan. Terbentuknya 3 cabang berbeda pada

filogram di atas memperlihatkan bahwa hubungan kekerabatan antar sampel *E. caballus* priangan hasil penelitian memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat, hal ini dibuktikan dengan nilai mutasi yang sangat rendah, prosentase jarak genetik yang sangat kecil serta berada dalam satu percabangan filogenik yang sangat dekat. Berdasarkan penentuan runutan nukleotida wilayah D-loop yang telah dilakukan maka dikatakan bahwa wilayah ini tidak dapat digunakan untuk membedakan interpesies *E. caballus* priangan Jawa Barat.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa sebelas posisi nukleotida yang polimorfik pada sekuen D-loop yang terbaca sepanjang 355 nt. Jarak genetik yang dihitung dengan model Kimura dua parameter berkisar antara 0% sampai 15.02% dan rata-rata 7.51%. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa kuda priangan merupakan anggota spesies *Equus caballus*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada: Hibah Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada 2008 (PHK A2) yang telah memberikan dana sehingga penelitian sesuai dengan rencana dan saudara Afri Musweri mahasiswa tingkat sarjana FKH-UGM yang telah membantu dalam penelitian ini

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2008. Departemen Pertanian Republik Indonesia. *Populasi Kuda Nasional 2008*. <http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak.html>. Download 19/02/09
- Bowling A.T., Del Valle A., Bowling M. 2000. *A Pedigree Based Study of Mitochondrial D-Loop Dna Sequence variation Among Arabian Horses*. *Anim Genet* 31: 1-7.
- Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L., N. Housser., J. 1986. Origin And Evolution Of Homologous Repeated Sequences in The Mitochondrial DNA controle Region of Shrews. *J. Mol. Biol. Evol.* 13: 31-46
- Kim K-I, Yang Y-H, Lee S-S, Park C., Ma R., Bouzat J.L., Lewin H.A. 1999. *Phylogenetic Relationship of Cheju Horses to Other Horse Breeds as Determined by mtDNA D-Loop Sequence Polymorphis*. *Anim Genet* 30: 102-108.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. 2001. *Molecular evolutionary genetics analysis version 2.0*. Pennsylvania State Univ : Ins of Molecular Evolutionary Genetics.
- Melton T. 1999. *Learn About mitochondria DNA*. Mitotyping Tecnology State College PA.
- Oakenfull E.A., Reader A.O. 1998. *Mitochondrial Control region and 12S rRna Variation in Przewalski's Horse (Equus Przewalskii)*. *Anim Genet* 29: 456-459.
- Oakenfull E.A., Lim H.N., Reader A.O. 2000. *A Survey of equid Mitochondrial DNA: Implications for The Evolution, Genetic Diversity and Conservation of Equus*. *Cons Genet* 1: 341-355.
- Sbisa, E., Tanzariello, F., Reyesw, A., Pesole, G., Saccone, C. 1997. *Mammalian Mithochondrian D-Loop region Structural Analisis Identification of New Conserved Sequence and Their Functional and Evolutionere Implication*. *Gene*. 205: 125-140.
- Thompson J.D., Higgins D.J., Gibson T.J. 1995. CLUSTAL W: Improving The Sensitivity of Progresive Multiple Sequence Alignment Throught Sequences weighting. Position Spesifik Gap penalties and weight matrix chice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673-4680
- Villa, C., Leonard, J.A., Gotherstrom, A., Markland, S., Sanberg, K., Lieden, K., Wayne, R.K., Ellegren, H., 2000. *Widespreads Origin of Domestic Horse Line Ages Sciences*. 29: 474-477
- Widayanti, R. 2007. Kajian Penanda Genetik *Tarsius bancanur* dan *Tarsius spectrum* dengan sekuen D-Loop parsial dari DNA mitokondria. *Biota* 12(3): 10-16.
- Widayanti R., Solihin D.D. 2007. Kajian Penanda Genetik *Tarsius bancanus* dan *Tarsius spectrum* dengan Sekuen D-Loop Parsial dari DNA Mitokondria. *Biota* 12(3).
- Xu X., Arnason U. 1994. The Complete Mitochondrial DNA sequence of the Horse *Equus caballus* Extensive Heteroplasmy of The Controle Region. *Gene* 148(2): 357-362
- Yuriadi, Tabbu, C.R., Widayanti, R., Purwantoro, A. 2010. Kajian Molekuler Daerah D-loop Partial DNA Mitokondria Kuda (*Equus caballus*) Asli Tengger. *J.Vet.* 11(1).