

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Keanekaragaman Jenis Burung

Keanekaragaman spesies burung di suatu wilayah ditentukan oleh beberapa faktor yaitu luas wilayah serta terpencilnya dari habitat lainnya, keanekaragaman dalam tipe habitat tersebut baik kualitas habitat secara umum maupun luas daerah ekoton (MacArthur dan Wilson, 1967; Lack, 1969; Thomas dkk., 1979). Meskipun luas daratan Indonesia hanya menempati 1% dari luas daratan di dunia, namun lebih dari 10% spesies tanaman dan burung di dunia dapat ditemukan di negara Indonesia (Bridlife International, 2017).

Keanekaragaman burung di Indonesia berdasarkan catatan Burung Indonesia terbaru pada tahun 2017 memiliki nilai yang terus bertambah yaitu 1769 jenis burung dibandingkan dari tahun-tahun sebelumnya sebanyak 1672 jenis yang teridentifikasi berada di Tanah Air. Penambahan tersebut sebagian besar merupakan hasil pemisahan jenis yang sudah ada, dikarenakan adanya yaitu perbedaan morfologi, suara ataupun genetik berdasarkan hasil penelitian terbaru (Burung Indonesia, 2017).

Jenis burung endemis yang berada di Indonesia memiliki jumlah yang juga bertambah yakni sebelumnya 427 jenis kini menjadi 512 jenis burung endemik. Sedangkan, jenis sebaran burung yang terbatas teridentifikasi bahwa sebelumnya 395 jenis kini bertambah menjadi 448 jenis burung (Burung Indonesia, 2017).

Menurut Daftar Burung Indonesia (2007), negara Indonesia merupakan negara nomor empat di dunia terkaya akan jumlah spesies burungnya setelah

Columbia, Peru dan Brazil. Jumlah spesies burung yang ditemukan di Indonesia wilayah pulau Jawa memiliki total keseluruhan 507 spesies serta, memiliki jumlah spesies endemik sebanyak 56 spesies dimana 32 spesies diantaranya merupakan burung endemik region atau wilayah.

Daftar ordo dan suku untuk burung yang berada di Indonesia tercatat ada 20 jenis klasifikasi ordo dan 96 jenis klasifikasi suku. Salah satu dari sekian jenis klasifikasi tersebut antara lain ada ordo burung Falconiformes yang terbagi menjadi 2 jenis suku yaitu Acciptridae dan Falconidae maupun, jenis ordo Galiformes yang terbagi menjadi 2 suku yaitu Megapodiidae dan Phasianidae. Berdasarkan keanekaragaman jenis ordo burung suku Phasianidae mempunyai salah satu marga yaitu *Pavo* maupun jenis burung dari suku Acciptridae mempunyai salah satu marga yaitu *Spizaetus* (Daftar Burung Indonesia, 2007).

Burung merak merupakan marga *Pavo* dari klasifikasi suku Phasianidae dalam ordo Galiformes yang mempunyai salah satu ciri yaitu kaki yang kuat sehingga banyak aktivitas yang tergantung pada kakinya (Palita, 2002). Jenis burung Merak Hijau (*Pavo muticus* Linnaeus, 1766) merupakan salah satu jenis burung daratan atau pegunungan yang memiliki persebaran sebagian besar di kawasan Asia Timur dan Asia Selatan, yaitu dari Bangladesh sampai Indochina dan Pulau Jawa (Indonesia) (Delacour 1977; Shanaz dkk., 1995; MacKinnon, 2000; dan Departemen Kehutanan dan Perkebunan, 2000). Keberadaan burung Merak Hijau di Pulau Jawa kini diperkirakan tidak lebih dari 800 ekor (Purwaningsih, 2012).

Burung Merak Hijau (*Pavo muticus* Linnaeus, 1766) merupakan jenis burung langka yang daerah sebaran alaminya di Indonesia terdapat di Pulau Jawa dan statusnya dilindungi oleh undang-undang. Status burung Merak Hijau berdasarkan IUCN (2017) dikategorikan ke dalam *Endangered* (terancam punah). Menurut CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wildlife Fauna and Flora*) dalam Departemen Kehutanan (2006), burung Merak Hijau dikategorikan ke dalam Appendix II, artinya perdagangan jenis burung ini harus dikendalikan, antara lain melalui sistem kuota dan pengawasan.

Di Indonesia memiliki keanekaragaman burung Elang termasuk dalam golongan jenis burung pemangsa (Raptor). Burung jenis Raptor yang berada dalam wilayah Indonesia terdapat tiga famili yang berasal dari ordo Falconiformes yaitu Pandionidae, Accipitridae dan Falconidae (Prawiradilaga dkk., 2003). Burung Raptor memiliki ciri tipe paruh penusuk dan pengoyak (*Piercieng and Tearing Type*) (Verma, 1997).

Menurut Daftar Burung Indonesia (2007), mencatat ada 70 jenis diurnal Raptor yang ada di Indonesia. Jumlah ini lebih sedikit dibandingkan *Ferguson-Less and Christine* (FLC) dalam *Raptors of the World* yang menyebutkan Indonesia hanya memiliki sekitar 76 jenis diurnal raptor. Jenis burung Raptor ada yang penetap, endemik dan bermigrasi. Berdasarkan 70 jenis diurnal Raptor menurut Daftar Burung Indonesia tersebut di antaranya yaitu Elang Jawa (*Spizaetus bartelsi* Stresesmann, 1924) dan Elang Brontok (*Spizaetus cirrhatus* Gmelin, 1788).

Elang Jawa (*Spizaetus bartelsi* Stresesmann, 1924) merupakan jenis elang endemik (penyebaran terbatas) hanya di Pulau Jawa. Perkiraan populasi Elang Jawa saat ini berkisar 108-542 pasang yang tersebar pada habitat hutan di sepanjang Pulau Jawa (Syartinilia, 2008). Salah satu kawasan dengan keberadaan populasi Elang Jawa paling tinggi dengan perkiraan populasi 23-33 pasang berada pada kawasan Gunung Halimun-Salak (Permenhut, 2013).

Burung Elang Jawa memiliki ukuran tubuh besar sekitar 60 cm dengan ciri khas jambul menonjol. Burung Elang Jawa yang telah dewasa memiliki ciri-ciri yaitu berjambul, mahkota dan garis kumis (sungut) berwarna hitam; bagian sisi kepala dan tengkuk merah coklat; punggung dan sayap coklat gelap; ekor coklat bergaris-garis hitam; kerongkongan putih dengan bagian tengah bergaris-garis hitam; bagian bawah dan tapa garis/coretan berwarna keputih-putihan atau kemerah-merahan (Manansang dkk., 1996).

Elang Jawa (*Spizaetus bartelsi* Stresesmann, 1924) termasuk satwa endemik dan langka yang perlu dilestarikan (Manansang dkk., 1996). Menurut IUCN (2017), jenis burung Elang Jawa sudah termasuk kedalam status keterancaman dengan kategori, yaitu :

- *Endangered* (terancam punah) : Jenis yang menghadapi resiko kepunahan tinggi dalam waktu dekat jika tidak ada upaya pelestarian dari manusia.

Burung Raptor jenis Elang Brontok (*Spizaetus cirrhatus*) tersebar luas mulai dari India, Asia Tenggara, Filipina, Sunda Besar dan Nusa Tenggara (MacKonnor dkk., 1998). Di Indonesia sendiri terdapat dua subspecies yaitu *Spizaetus cirrhatus vanheuni* yang penyebarannya ada di pulau simeule dan

*Spzaetus cirrhatus floris* yang tersebar di pegunungan Sumbawa dan Flores, Jawa, Sumatera dan Kalimantan (Prawiradilaga dkk., 2003). Menurut IUCN (2017), spesies burung Elang Brontok termasuk ke dalam kategori *Least Concern* (butuh perhatian) dengan kecenderungan tahun kedepannya terus mengalami penurunan populasi.

Jenis burung Elang Brontok umumnya merupakan jenis penetap. Burung Elang Brontok memiliki ukuran panjang tubuh antara 57-59 cm dengan rentang sayap mencapai 127 – 138 cm, berat tubuh antara 1,3 kg – 1,9 kg. Spesies Elang Brontok menyukai habitat pinggiran hutan, padang rumput, kebun yang berpohon, sumber-sumber air yang ditumbuhi pohon, hutan dekat perkampungan sampai di pinggiran perkotaan (MacKonnon dkk., 1998; Prawiradilaga dkk., 2003). Elang Brontok berukuran besar (70 cm), bertumbuh ramping. Sayap sangat lebar, ekor panjang berbentuk buas, jambul sangat pendek. Terdapat fase gelap, pucat dan peralihan (Basuki dkk., 2005).

## **B. Faktor-Faktor Ancaman Kepunahan**

Keanekaragaman spesies burung yang tinggi di Indonesia sangat di banggakan, namun dalam sisi lain negara Indonesia juga merupakan habitat bagi spesies burung dengan status keterancaman punah. Hal ini diperkuat dengan hasil data yaitu 160 jenis burung diketahui terancam punah yang terdiri dari 92 jenis berstatus Rentan (VU/*Vulnerable*), 40 jenis berstatus Genting (EN/*Endangered*) dan 28 jenis berstatus Kritis (CR/*Critically Endangered*) (Burung Indonesia, 2017).

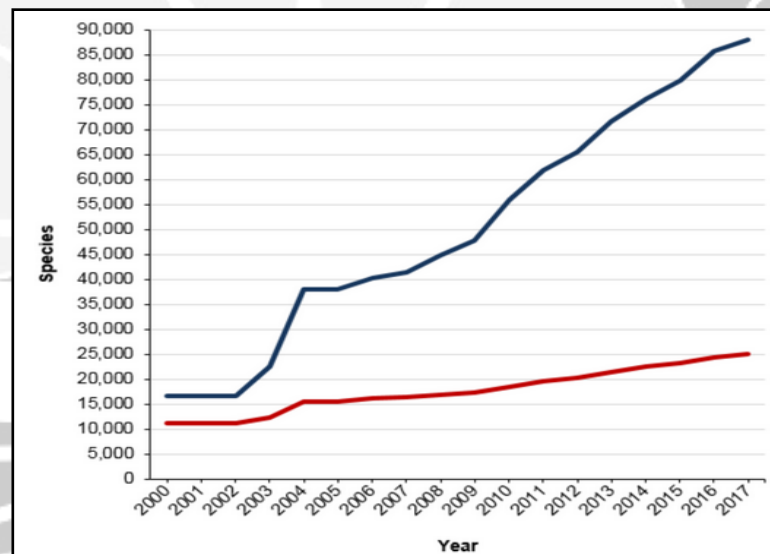
Kajian status keanekaragaman jenis burung di Indonesia tersebut sering dihubungkan dengan baik atau buruknya habitat lingkungan, sehingga burung dijadikan sebagai indikator keseimbangan ekosistem dari suatu wilayah (Endah dan Partasasmita, 2015). Menurut Sujatnika dkk. (1995), jika suatu area memiliki kelimpahan burung yang tinggi, maka bisa menjadi salah satu indikator bahwa kondisi lingkungan baik. Hal ini dikarenakan burung memiliki kemampuan untuk menyebarkan biji, membantu penyerbukan, predator alami satwa lain dan lain-lain.

Populasi burung dapat di kategorikan dalam satwa liar, satwa liar merupakan salah satu mata rantai dalam sebuah rantai makanan. Sebuah rantai makanan terdiri dari produsen (tumbuhan), konsumen (satwa liar), dan dekomposer (zat pengurai) yang tidak dapat di gantikan karena memiliki fungsi masing-masing (Darsono, 1992). Ketika salah satu dari rantai makanan tersebut punah, maka mata rantai lainnya pun dapat terancam punah. Kondisi tersebut dapat mengganggu kelestarian suatu ekosistem. Salah satu masalah yang dapat di timbulkan adalah kelangkaan terhadap salah satu jenis mata rantai tersebut, yaitu satwa liar (Wahono, 2015).

Masalah kepunahan suatu spesies dapat diketahui dengan perhitungan penurunan populasi yaitu jika jumlah individu yang hilang tinggi baik melalui kematian maupun emigrasi dibandingkan jumlah individu yang di dapat rendah baik melalui kelahiran maupun imigrasi (Caughley, 1977). Penurunan populasi burung yang berada di Indonesia menurut Setio dan Takandjandji (2007), di karenakan penurunan kualitas habitat, rendahnya kesadaran

masyarakat tentang konservasi maupun perburuan liar yang berlebihan sehubungan meningkatnya permintaan pasar atau perdagangan akibat lemahnya baik segi pengamanan, pengawasan dan penerapan sanksi hukum.

Faktor minor yang mempengaruhi penurunan populasi burung di sebabkan introduksi predator, kompetitor dengan satwa lain, perubahan iklim dan penyakit telah terbukti turut serta sebagai penyebab berkurangnya populasi burung (Innes dkk., 2009). Menurut IUCN (2017), faktor minor merupakan faktor yang tidak memiliki intensitas kejadiannya terus menerus atau tinggi.



Keterangan : — Total spesies yang di nilai

— Total spesies yang terancam punah

Gambar 1. Grafik Kenaikkan Spesies yang Terancam Punah (IUCN, 2017).

Menurut IUCN (2017), data grafik menunjukkan dari tahun 2000 hingga 2017 adanya peningkatan spesies yang terancam punah setiap tahunnya. Data terbaru pada tahun 2017 jumlah spesies yang terancam punah mencapai 20.000 spesies per jumlah spesies yang di dinilai. Jumlah

tersebut di telusuri berdasarkan faktor penurunan populasi menurut IUCN yang terdiri dari 12 macam penyebab keterancamannya yang terdiri dari faktor mayor/utama yang menyebabkan 50%-90% penurunan populasi spesies dan faktor minor yang menyebabkan kurang dari 50% penurunan populasi spesies.

Berdasarkan rangka pemecahan permasalahan akan status kepunahan satwa liar burung. Kepunahan satwa liar burung yang disebabkan faktor perdagangan maupun predator dapat dilakukan perlindungan seperti kasus penyitaan burung oleh lembaga unit pelaksanaan teknis yang berada di bawah Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan yaitu Balai Konservasi Sumber Daya Alam (BKSDA) (Wahono, 2015).

### **C. Penyakit pada Satwa Liar**

Penyakit merupakan salah satu faktor ancaman penurunan populasi burung yang memberikan kontribusi kecil jika dibandingkan dengan faktor mayor/utama seperti predasi dan kekurangan makanan (Newton, 1998). Dampak dari penyakit dan parasit terhadap penurunan populasi mungkin dapat meningkat dimana adanya interaksi manusia terhadap habitat dan lingkungan serta introduksi burung antarpopulasi (Deem dkk., 2001).

Menurut Aguirre (2009), penyakit pada burung dapat diakibatkan karena infeksi parasit, bakteri atau virus. Contoh parasit yang menginfeksi burung adalah *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, *Plasmodium* (*Malaria unggas*), *Cheilospirura*, *Gymnorhynchus*, *Syngamus trachea*, *Toxoplasma gondii*, *Ectoparasites*, *Atoxoplasma* dan *Babesia*.



*Haemoproteus* spp., *Plasmodium* spp., dan *Leucocytozoon* spp., termasuk marga *Haemosporida* (Weisman dkk., 2007). Lebih dari 120 spesies Haemoprotens diketahui dan paling sering ditemukan pada burung (Swayne dan Fadly, 2003). Parasit darah ini ditemukan di seluruh dunia dan mampu menginfeksi berbagai burung yaitu *gamebrids* (*Galliformes*), burung air (*Anseriformes*), raptors (*Accipitriformes*, *Falconiformes*, *Strigiformes*), burung dara dan merpati (*Columbiformes*) dan burung bertengger atau burung berkicau (*Passeriformes*). Burung yang terinfeksi *Haemoproteus* spp. tidak menghasilkan tanda-tanda klinis yang signifikan (Weisman dkk., 2007).

Burung dapat terinfeksi *Plasmodium* dan *Haemoproteus* secara bersamaan tanpa tanda klinis. Malaria burung disebabkan oleh infeksi parasit Hematozoa (*Plasmodium* spp. dan *Haemoproteus* spp.). Dampak fisiologis malaria burung meliputi anemia berat, hancurnya eritrosit matang, penurunan konsumsi makanan dan tingkat aktivitas, serta kehilangan berat badan bisa mencapai 30% (Atkinson dkk., 2000).

#### a. Malaria Burung

##### 1. *Plasmodium* spp.

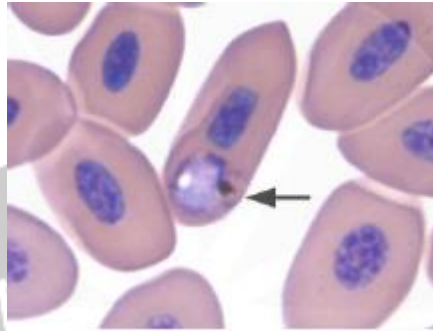
*Plasmodium* pada burung umumnya ditularkan oleh nyamuk *Culex* (Atkison dan van Riper, 1991; Telford dkk., 1997). Mekanisme infeksi dimulai dari nyamuk yang dapat menginokulasi sporozoit masuk ke dalam darah burung melalui sistem retikuloendotelial burung. Setiap sporozoit kemudian berkembang menjadi ribuan merozoit (daur *pra-erythrocytic*). Merozoit pecah dan menyerang sel

inang dan sel endotel atau sel lain dari retikuloendothelial. Merozoit yang pecah pada sel inang dan kemudian masuk ke dalam eritrosit dalam aliran darah, ini mengawali daur *intraerythrocytic*.

Merozoit menggandakan diri dalam sel darah merah, membentuk schizont (*shizogony*) schizont akan pecah, membunuh dan melepaskan merozoit untuk menginfeksi lebih banyak sel darah merah. Selama fase *schizogeny*, parasit hidup pada sitoplasma sel darah merah, mencerna hemoglobin yang menghasilkan butiran pigmen coklat (Atkison dan van Riper, 1991; Telford dkk., 1997).

Daur *intraerythrocytic* berlanjut sampai inang mati atau parasit ditekan oleh kekebalan inang. Setelah daur *intraerythrocytic* dalam eritrosit, beberapa merozoit berkembang menjadi sel-sel seksual (*mikrogametes* dan *makroogametes*) menjadi masing-masing daur baru. Sel seksual tersebut dipelihara dalam sel darah merah sampai dikonsumsi oleh nyamuk yang menghisap darah (Jennings dkk., 2006).

Replikasi *Plasmodium* berlangsung di dalam eritrosit yang bersirkulasi, sedangkan *Hemoproteus* di dalam sel endotel (Atkinson dan Van Riper, 1991; Valkiunas, 1997). Bentuk gametosit *Plasmodium* spp. dalam sel darah merah dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Gametosit *Plasmodium* spp. dalam Sel Darah Merah (↑)  
(Jennings dkk., 2006).

Menurut Permin dan Juhl (2002), mayoritas studi parasit jenis ini biasanya dilakukan pada spesies *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium juxtannucleare*, *Plasmodium durnae*, *Plasmodium lophurae* dan *Plasmodium hermani* yang berkembang dalam peternakan unggas. Beberapa studi juga dilakukan pada *Plasmodium cathemerium*, *Plasmodium rouxi* dan *Plasmodium relictum* (Atkinson dkk., 1995).

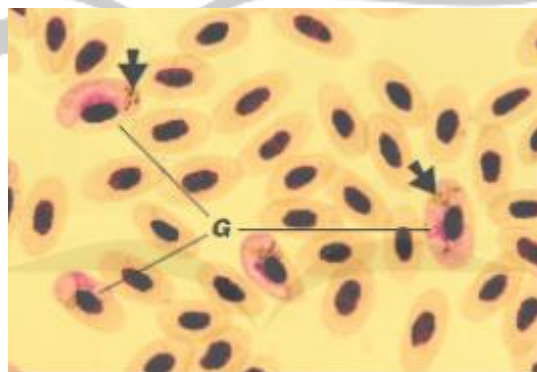
## 2. *Haemoproteus* spp.

*Haemoproteus* spp. adalah protozoa intraseluler parasit hemotropik yang menginfeksi sel darah merah burung, kura-kura dan reptil (Bowman, 2003; Friend dan Franson, 1999). *Haemoproteus* ditularkan oleh serangga penghisap darah termasuk nyamuk genus *Culicoides* (Friend dan Franson, 1999). Penularan tergantung pada kehadiran vektor dan infeksi akan lebih sering pada bulan yang lebih hangat sepanjang tahun seperti iklim tropis di Indonesia (Weisman dkk., 2007).

Tahap infeksi *Haemoproteus* adalah sporozoit yang ada dalam kelenjar liur vektor serangga (Friens dan Franson, 1999). Setelah

vektor serangga menggigit inang baru, sporozoit memasuki aliran darah inang dan menyerang sel-sel endotel pembuluh darah dalam berbagai jaringan pada organ paru-paru, hati dan limpa (Friend dan Franson, 1999; Campbell, 1998). Dalam sel endotel, sporozoit melewati reproduksi aseksual untuk menjadi *schizont* yang kemudian menghasilkan banyak merozoit. Merozoit menembus erosit dan berkembang dewasa menjadi makrogametosit dan mikrogametosit (Eldridge dan Edman, 2000).

Gametosit kemudian dapat dicerna oleh serangga lain penghisap darah yang terjadi siklus reproduksi seksual di *midgut* dari serangga untuk menghasilkan *oocysts*. *Oocysts* pecah dan melepaskan banyak sporozoit yang menyerang kelenjar ludah dan berfungsi sebagai agen infeksi berikutnya (Friens dan Franson, 1999). Bentuk gametosit *Haemoproteus melagridis* dalam sel darah dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Darah yang Terinfeksi *Haemoproteus melagridis* ( ↑  
(Rebecca dan Milton, 1999).

### 3. *Leucocytozoon* spp.

*Leucocytozoonosis* adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit darah *Leucocytozoon* spp. Penyakit ini untuk pertama kali dilaporkan oleh Smith pada tahun 1895 pada sekelompok kalkun yang terserang di Asia bagian timur. *Leucocytozoonosis* telah tersebar di Indonesia yang umumnya disebabkan oleh *Leucocytozoon caulleryi* dan *Leucocytozoon sabrazezi* pada marga burung bersifat endemik (Akoso, 1998).

Menurut Levine (1978), skizon-skizon terdapat pada sel darah merah atau sel darah putih tergantung pada jenis spesiesnya. Meron dalam sel parenkim hati, jantung, ginjal atau organ lain bergantung pada jenisnya. Sejauh yang diketahui, sporozoit dan merozoit mempunyai tiga cincin kutub, tidak ada konoid, dua roptri dan beberapa mikrotubulus subpelikuler.

*Leucocytozoon sabrazezi* mempunyai struktur sporozoit dewasa memanjang kira-kira  $22-24 \times 4-7 \mu\text{m}$  terdapat dalam sel darah merah atau sel darah putih. Sel-sel dewasa berbentuk gelendong, dengan “tanduk-tanduk” sitoplasma panjang, memanjang melebihi parasit kira-kira  $67 \mu\text{m}$  (Levine, 1985). Makrogametosit berbentuk seperti sosis dengan ukuran  $16-24 \times 4-12 \mu\text{m}$ . Mikrogamet berbentuk seperti sosis berukuran  $13,5-24 \times 4-11,5 \mu\text{m}$  (Soekardono dan Partosoedjono, 1986).

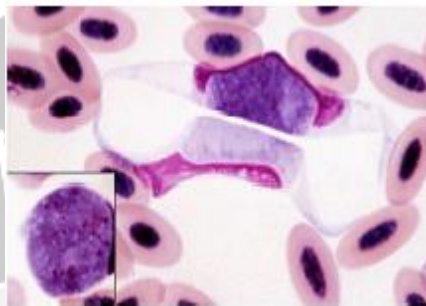
Siklus hidup *Leucocytozoon* spp. dalam stadium skizogoni, sporozoit masuk ke dalam aliran darah melalui gigitan *Culicoides*. Skizon menjadi dewasa dan pecah dengan mengeluarkan merozoit-merozoit. Merozoit masuk ke dalam aliran darah dan proses perkembangan merozoit menjadi mikrogamet dan makrogamet yang terbagi atas lima stadium (Akiba, 1970 dalam Tampubolon, 1992).

Menurut Fallis dan Desser (1997), merozoit yang berada dalam aliran darah akan masuk ke dalam eritrosit dan eritroblast dan berkembang menjadi gametosit yang membutuhkan waktu 48 jam untuk pematangannya. Menurut Levine (1985), menyatakan bahwa gametosit yang berasal dalam eritrosit dan eritroblast ini akan terlihat 14 hari setelah infeksi.

Selanjutnya di pertengahan usus nyamuk dengan cara eksflagelasi dari mikrogamet terbentuk 4-8 mikrogamet dalam beberapa menit, mikrogamet-mikrogamet ini akan membuahi makrogamet-makrogamet untuk membentuk suatu zigot. Zigot dapat bergerak dan dikenal sebagai ookinet (Levine, 1985).

Ookinet-ookinet berada dalam usus tengah 2-6 jam setelah menelan darah terinfeksi dan selanjutnya akan berkembang menjadi ookista yang dapat ditemukan 2-3 hari setelah infeksi serta menyelesaikan perkembangannya dalam waktu 2,5 – 4 hari setelah infeksi. Proses sporogoni untuk menghasilkan sporozoit terjadi di

ookista pada pertengahan dinding usus. Sporozoit-sporozoit hidup dapat ditemukan paling tidak 18 hari setelah infeksi (Levine, 1985).



Gambar 4. *Leucocytozoon* spp. pada Pemeriksaan Ulas Darah (Herley, 2007).

#### **D. Metode Identifikasi Parasit Darah**

Parasit darah spesies *Haemoproteus*, *Plasmodium* dan *Leucocytozoon* memiliki hubungan genetik yang dekat. Deteksi infeksi *Leucocytozoon* dalam darah menggunakan metode molekuler standar sangat sulit dilakukan karena parasit ini memiliki periode hidup yang sangat singkat (Fallis dan Desser, 1997; Valkiunas, 1997). Walaupun sulit dideteksi secara umum parasit *Leucocytozoon* dapat ditemukan pada populasi burung di wilayah yang beriklim sedang di belahan bumi utara (Rintamaki dkk., 1998; Deviche dkk., 2001).

Metode identifikasi parasit darah terus dikembangkan. Metode identifikasi parasit darah yang telah berkembang kini merupakan solusi masalah diatas yaitu ilmu berbasis bidang molekuler yang mengamplifikasi atau memperbanyak DNA parasit darah dengan metode, sebagai berikut:

a. Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Keakuratan dan cepatnya menarik diagnosis sangat penting untuk memerangi parasit darah yang dapat menimbulkan penyakit malaria. Diagnosis malaria dilakukan dengan beberapa metode yaitu pemeriksaan mikroskopis, uji immunoserologis dan pemeriksaan biomolekuler yang berguna untuk mendeteksi *plasmodium* di dalam tubuh (Safar, 2010).

Diagnosis parasit malaria burung dapat dilakukan secara langsung dan tidak langsung. Diagnosis secara langsung dilakukan dengan mengidentifikasi parasit burung dalam darah menggunakan mikroskop atau metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Atkinson, 2005). Metode mikroskopik melalui perwarnaan darah dan metode PCR umum digunakan untuk diagnosis parasit malaria burung (Atkinson dkk., 2001).

Pemeriksaan secara mikroskopis menjadi *gold standart* dalam pemeriksaan labotarium dikarenakan pengerjaanya yang relatif cepat dan murah. Pemeriksaan mikroskopis ini terdiri dari dua yaitu pemeriksaan sediaan darah tebal dan pemeriksaan sediaan darah tipis (Snounou dkk., 1993).

Pemeriksaan sediaan darah tipis lebih khusus bertujuan untuk menemukan dan menentukan spesies serta stadium *Plasmodium* karena morfologi *Plasmodium* terlihat jelas pada sediaan darah tipis dibanding sediaan darah tebal. Tapi bila keadaan parasitemia yang rendah ( $< 40$  p/ $\mu$ l) dan terdeteksi infeksi campuran (*mix*) maka informasi yang akan didapatkan



pemeriksaan mikroskopis sangatlah terbatas. Ditambah pada kasus ragu-ragu dan tidak terlatihnya petugas labotarium maka pemeriksaan mikroskopik akan memakan waktu yang relatif lama dan menghasilkan keterbatasan hasil (Snounou dkk., 1993).

Oleh karena itu, perkembangan metode identifikasi parasit berbasis molekuler dilakukan karena lebih cepat dan akurasi yang tinggi. Salah satu metode biomolekuler yang telah dikembangkan untuk mendeteksi penyakit infeksi seperti parasit darah yaitu metode *Polymerase chain reaction* (PCR) (Lee dkk., 2002).

Menurut Yuwono (2006), PCR adalah suatu metode enzimatis untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen gen. Metode PCR sangat sensitif, sehingga dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA secara spesifik.

Menurut Feldman dkk. (1995), penelitian pertama kali dilakukan identifikasi molekuler *Plasmodium* pada burung-burung di Hawaii, dengan menggunakan gen 18S rRNA dan berbasis teknik PCR. Hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa metode yang dipakai saat itu masih terbatas kemampuannya. Menurut Bensch dkk. (2009), metode tersebut hanya bisa mengidentifikasi kelompok kecil parasit *Plasmodium*.

Penanda molekuler yang dikembangkan setelah itu adalah gen sitokrom-b (*cyt b*) mitokondria (Bensch dkk., 2000). Gen tersebut memiliki

bagian konservatif sehingga memungkinkan untuk perancangan primer yang mampu mengamplifikasi fragmen gen pada genus *Haemoproteus* dan *Plasmodium* (Hellgren dkk., 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Hellgren dkk. (2004), protokol ini banyak dimodifikasi dan menjadi protokol yang paling umum digunakan. Lebih dari 60 publikasi menggunakan gen sitokrom-b parasit hemosporidian ini, bidang kajiannya beragam : taksonomi, sistematika, ekologi, biogeografi dan evolusi parasit malaria burung (Bensch dkk., 2000).

b. Metode *Nested-PCR*

Metode *Nested-PCR* merupakan modifikasi teknik PCR dengan mekanisme kerja dari *Nested-PCR* ini yaitu terdapatnya dua set primer yang digunakan untuk mendukung metode ini. Reaksi pertama menggunakan *outer primer* yaitu sekuens target set kedua dari primer disimpan di dalam sekuens DNA set pertama, lalu reaksi PCR kedua dilakukan dengan *inner primer* atau *nested primer* menggunakan hasil dari produk reaksi yang pertama sebagai target amplifikasi (Yusuf, 2010).

Kelebihan penggunaan dari metode *Nested-PCR* ini dapat meminimalkan kesalahan amplifikasi fragmen DNA dengan menggunakan dua pasang primer. Contoh aplikasi yang menggunakan pendekatan *Nested PCR* antara lain adalah penelitian tentang tingginya tingkat prevalensi malaria burung pada populasi liar gelatik jawa (Yuda, 2009).

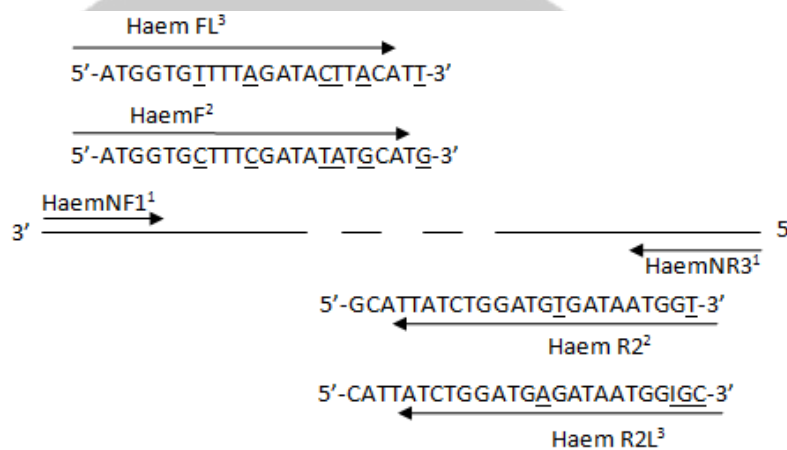
Metode *Nested-PCR* ini menggunakan primer yang di desain dari ujung 5' gen sitokrom b genom mitokondria parasit yang diperoleh dari sekuen avian *Haemoproteus* dan *Plasmodium* (Perkins dan Schall, 2002). Pasangan primer yang mengamplifikasi daerah konservatif dari *Haemoproteus* dan *Plasmodium* sebelumnya telah dikembangkan oleh Lund (Bensch dkk., 2000; Waldenstrom dkk., 2004).

Primer spesifik yang digunakan dalam analisis molekuler untuk identifikasi parasit darah yang menyebabkan penyakit malaria dengan menggunakan primer *forward* jenis Haem NF1 [5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'] dan primer *reverse* jenis Haem NR3 [5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'] yang akan mengamplifikasi mt-DNA pada bagian sitokrom-b parasit darah dari spesies *Haemoproteus* spp., *Plasmodium* spp., dan *Leucocytozoon* spp. yang akan dilakukan teknik PCR (Scaglione dkk., 2016).

Reaksi tahap bersarang *Nested-PCR* dengan primer *forward* Haem F [5'-TGGTGCTTTCGATATATGCATG-3'] dan primer *reverse* Haem R2 [5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'] yang mengamplifikasi mt-DNA pada bagian sitokrom-b parasit darah untuk identifikasi jenis parasit *Plasmodium-Haemoproteus* spp., (Scaglione dkk., 2016).

Reaksi tahap bersarang *Nested-PCR* dengan Primer *forward* Haem FL [5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3'] dan primer *reverse* Haem R2L [5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3'] yang akan mengamplifikasi mt-DNA pada bagian sitokrom-b parasit darah dan untuk

identifikasi jenis parasit *Leucocytozoon* spp., (Scaglione dkk., 2016). Keseluruhan sistemasi proses dari metode *Nested-PCR* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Sistematika Kombinasi Primer yang Berbeda pada *Nested-PCR* (Hellgren dkk., 2004).

Berdasarkan protokol primer Haem F2 dan Haem R2 ataupun primer Haem FL dan Haem R2L akan mengamplifikasi fragmen DNA di sepanjang 480 bp dalam *single-PCR*. Modifikasi metode PCR menjadi *Nested-PCR* (PCR bersarang/bertahap) membuat kinerja dari metode PCR lebih baik dengan meningkat secara signifikan karena *Nested-PCR* memiliki intensitas yang baik untuk mendeteksi infeksi parasit darah walaupun dalam keadaan DNA parasit yang sedikit. Primer untuk reaksi kedua akan terdapat di dalam fragmen DNA primer reaksi pertama yang memiliki fragmen yang lebih besar/panjang yaitu di sekitar 617 bp (Hellgren dkk., 2004).

Hasil metode PCR dan *Nested-PCR* kemudian dilakukan analisa sekuensing. Analisa sekuensing bertujuan untuk memastikan jenis parasit perlu dilakukan sekuensing DNA (Atkinsion dkk., 2001). Analisa sekuensing dapat dilakukan jika hasil produk metode PCR ataupun *Nested-PCR* telah didapatkan

bagian spesifik DNA targetnya yang telah teramplifikasi kemudian disiapkan untuk proses penentuan urutan nukleotida menggunakan DNA *sequencer* (Nuring dkk., 2015).

Data hasil sekuensing kemudian diolah menggunakan program MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*). Hasil Sekuensing yang telah dianalisis ditentukan identifikasi spesiesnya menggunakan proses BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yaitu membandingkan dengan database sekuen DNA pada genbank ([http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)) (Nuring dkk., 2015).

#### **E. Hipotesis**

Berdasarkan beberapa penelitian, peneliti menyimpulkan hipotesis sebagai diantaranya:

1. Tingkat prevalensi pada burung sitaan relatif lebih tinggi dibandingkan dengan burung di alam.
2. Burung Raptor dan Merak Hijau terinfeksi malaria burung dari genus *Haemoproteus*, *Plasmodium*, atau *Leucocytozoon*.