

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Konservasi Burung

Menurut Alikodra (1990), konservasi sumber daya alam adalah kegiatan yang meliputi perlindungan, pengawetan, pemeliharaan, rehabilitasi, introduksi, dan pengembangan. Tujuan konservasi adalah dapat menjamin kelangsungan hidup satwa liar, dan terjaminnya masyarakat untuk memanfaatkannya baik langsung atau pun tidak langsung berdasarkan prinsip kelestarian.

Konservasi sumber daya alam hayati menurut UU No.5 Tahun 1990 dan No. 7 Tahun 1999 adalah pengelolaan sumber daya alam hayati yang pemanfaatannya dilakukan secara bijaksana untuk menjamin kesinambungan persediaannya dengan tetap memelihara dan meningkatkan kualitas keanekaragaman dan nilainya (Noerdjito dan Maryanto, 2001).

a. Faktor-faktor Ancaman

Kerusakan hutan yang terjadi pada kawasan hutan di Indonesia disebabkan oleh berbagai faktor yang sebagian besar dikarenakan oleh aktivitas manusia termasuk perusakan dan fragmentasi habitat, polusi dan penggunaan pestisida, dan sebagian lainnya dikarenakan bencana alam (Bildstein dkk., 1998). Pertumbuhan penduduk yang tidak seimbang dengan persediaan lahan akan mendorong terjadinya penjarahan pada kawasan hutan (Indriyanto, 2008). Ancaman terhadap burung terbagi menjadi dua bentuk, yaitu gangguan secara langsung dan gangguan secara

tidak langsung. Gangguan secara langsung terhadap burung yaitu dengan membunuh burung untuk bahan awetan, bahan makanan, bulu, dan olahraga berburu. Gangguan secara tidak langsung adalah perubahan atau modifikasi lingkungan alami oleh manusia menjadi lahan pertanian, perkebunan, perkotaan, jalan raya, dan industri (Welty 1982: Utama 2011). Perdagangan satwa secara ilegal membuat populasi elang cenderung semakin menurun. Perdagangan raptor telah meluas dan sekarang tampaknya terjadi hampir di setiap kota di Indonesia. Perdagangan raptor banyak menggunakan media sosial yang membuat jangkauan penjualan satwaliar dilindungi semakin luas. Perdagangan satwaliar terutama raptor banyak terjadi pada bulan Juli dan Agustus dimana berkaitan dengan musim berbiak yang sebagian besar raptor diambil pada saat masih disarang. Perdagangan raptor secara media sosial merupakan ancaman yang serius karena lebih sulit dikendalikan dari pada pasar tradisional (Gunawan dkk., 2017).

b. Upaya Konservasi

Untuk menghentikan kecenderungan menurunnya populasi burung dan mengamankan kawasan habitat bagi jenis ini pemerintah mengupayakan perlindungan hukum melalui UU No. 5 Tahun 1990 tentang Konservasi Sumber Daya Hayati dan Ekosistemnya, No. 7 Tahun 1999 tentang Pengawetan Jenis Tumbuhan dan Satwa dan No. 8 Tahun 1999 tentang Pemanfaatan Jenis Tumbuhan dan Satwa Liar. Akan tetapi perlindungan hukum tidaklah cukup untuk menjaga keberadaan jenis ini dari ancaman yang menjadi faktor penyebab penurunan populasinya di alam tanpa

dibarengi upaya lainnya seperti penyitaan satwa dari perdagangan satwa secara ilegal. Penegak hukum membutuhkan lembaga konservasi dalam kegiatan penangkaran untuk merawat satwa hasil sitaan. Kegiatan penangkaran dapat dilakukan oleh lembaga konservasi baik pemerintah maupun swasta. Lembaga konservasi akan mengkarantina satwa hasil sitaan, kemudian akan dilepas kembali ke alamnya jika telah memenuhi syarat pelepasliaran yang baik.

Upaya penyelamatan di Indonesia semakin meningkat karena tingkat ancaman terhadap keberadaan jenis juga semakin tinggi dan tidak terkendali terutama dari perdagangan satwa liar. Beberapa kegiatan dalam upaya penyelamatan jenis telah dan sedang dilakukan dengan melakukan penyitaan jenis-jenis ini dari perdagangan satwa. Upaya ini merupakan salah satu penegakan hukum dan wujud perlindungan terhadap satwa-satwa yang dilindungi.

c. Burung Pemangsa

Burung pemangsa (raptor) merupakan burung yang mendapatkan makanan dengan cara berburu dan memangsa hewan lain dengan cara terbang dan menggunakan kemampuan indera yang dimilikinya. Burung pemangsa memiliki tubuh yang berbeda dengan burung pada umumnya, cakar dan paruh yang dimiliki relatif lebih besar yang berguna untuk membunuh dan membantu memudahkan untuk memakan mangsanya.

Menurut Pangesti (2009), Indonesia memiliki keanekaragaman 1530 spesies jenis burung tersebar di 7 (tujuh) wilayah zoogeografi.

Wilayah tersebut ialah Sumatera (6000 spesies), Jawa (498 spesies), Sulawesi (380 spesies), Kalimantan (479 spesies), Maluku (344 spesies), Nusa Tenggara (398 spesies), dan Irian Jaya (647 spesies). Menurut Mackinnon dkk., (1998) pengelompokkan jenis burung didasarkan pada tipe habitat yang diakui terbagi menjadi tiga kelompok, yaitu burung mangrove, burung pantai dan burung terestial.

Burung elang merupakan pemangsa diurnal. Elang berperan sebagai predator utama dalam rantai makanan suatu ekosistem, elang merupakan spesies kunci dalam mengontrol jumlah populasi mangsa. Sehingga secara tidak langsung burung ini berperan sebagai penyeimbang ekosistem (Mangunjaya, 2005). Jenis elang yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

1. Elang Jawa (*Nisaetus bartelsi* Stresemann, 1924)

Elang Jawa merupakan spesies endemik di Pulau Jawa. Saat ini status konservasi Elang Jawa terancam punah. Elang Jawa memiliki ukuran tubuh yang sedang sampai ukuran besar dan berbadan langsing, total panjang badannya mencapai 60 cm sampai 70 cm dihitung dari ujung ekor hingga ujung paruhnya serta dengan berat sekitar 2,5 kg. Elang betina serupa dengan Elang Jawa jantan, hanya Elang Jawa betina berukuran lebih besar dari yang jantan (Sozer dkk., 1999).



Gambar 1. *Nisaetus bartelsi* (BirdLife Internasional, 2001).

Elang Jawa memiliki kepala yang berwarna coklat hampir kemerahan, memiliki jambul tinggi yang terdiri dari 2 – 4 bulu dengan panjang bisa mencapai 12 cm. Punggung serta sayap berwarna coklat gelap, sedangkan ekornya berwarna coklat dengan garis yang berwarna hitam, bagian bawah tubuh agak putih dengan coret coklat. Burung muda dapat dibedakan dengan burung dewasa, yakni burung muda pada bagian bawahnya berwarna putih tanpa coretan coklat (Mc-Kinnon, 1990).

Penyebaran Elang Jawa ditunjukkan oleh jumlah lokasi kehadiran tercatat pada 66 lokasi diseluruh pulau Jawa dengan jumlah populasi yang berbeda-beda pada setiap lokasi. Elang Jawa terkonsentrasi di daerah yang memiliki hutan yang masih baik dan luas. Habitat Elang Jawa, yaitu hutan hujan tropis (Sozer dkk., 1999).

Perilaku makan dan berburu biasanya dilakukan di tempat bertenggernya di dalam hutan atau terbang rendah di atas tajuk kemudian terbang turun ke dalam dedaunan. Mangsanya terdiri dari mamalia pohon berukuran kecil sampai sedang seperti tupai pohon,

bajing, kelelawar, ayam, dan jenis reptilia. Perilaku kawin burung ini teramati dibulan Juli dan Agustus namun masa bertelur lebih banyak antara bulan Januari hingga Juni. Umumnya bertelur hanya satu butir, dengan masa inkubasi atau mengerami sekitar 44 hari sampai 48 hari (Sozer dkk., 1999).

Anakan Elang Jawa mempunyai bulu lengkap dan mulai terbang pada umur 60 hari sampai 70 hari, tetapi masih tinggal disekitar sarang hingga beberapa bulan. Pasangan Elang Jawa dapat bertelur kembali pada satu musim kawin bila anaknya mati atau diambil, tetapi dapat pula terjadi bahwa pasangan Elang Jawa tidak mengalami masa berbiak lagi selama setahun penuh atau bahkan lebih. Elang Jawa mulai berbiak pada fase bulu belum dewasa dan diperkirakan pada umur 4 tahun (Sozer dkk., 1999).

2. Elang Brontok (*Nisaetus cirrhatus* Gmelin, 1788)

Elang Brontok adalah satwa Indonesia yang dilindungi (Saaroni dkk., 2000; Basuki dkk., 2005), namun penyempitan habitat, perburuan, dan perdagangan ilegal, membuat keberadaannya di alam terus menurun (Crosby, 2003; Basuki dkk. 2005). Burung Elang Brontok memiliki warna coklat tua pada bagian punggungnya, berwarna putih pada bagian perut dan penutup sayap bawah. Bagian kepala burung elang remaja lebih pucat, sayap terlihat lebih sempit, dan garis-garis pada ekor tidak begitu nampak. Dalam membedakan antara Elang Brontok jantan dan betina dirasa agak sulit. Ini karena warna pada tubuh jantan dan betina yang

relatif sama. Biasanya untuk membedakannya dilihat dari ukuran besar postur tubuh. Untuk Elang Brontok betina mempunyai ukuran tubuh yang lebih besar dibandingkan ukuran tubuh jantan. Panjang tubuh burung Elang Brontok sekitar 60-80 cm (Coates dan Bishop, 2000).



Gambar 2. *Nisaetus cirrhatus* (BirdLife Internasional, 2001)

Habitat Elang Brontok mulai dari hutan, padang rumput, kebun, perkebunan teh, sumber air yang dikelilingi pohon, bahkan hutan yang ada di dekat perkampungan. Musim kawin Elang Brontok yaitu saat bulan April hingga Agustus atau Oktober. Hanya bertelur sebutir dan jarang sekali dua butir atau lebih. Makanan Elang Brontok antara lain mamalia kecil, reptil, dan beberapa jenis Aves berukuran kecil (Coates dan Bishop 2000).

B. Metode Identifikasi Jenis Kelamin

Identifikasi jenis kelamin burung dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu secara molekuler dan secara non molekuler. Identifikasi jenis kelamin secara non molekuler, yaitu *autosexing*, *karyotyping*, *steroid sexing* pada feses dan laparoskopi. Identifikasi jenis kelamin secara molekuler

umumnya menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan penanda genetik khusus jenis kelamin (Cerit dan Avanis, 2007). Metode analisis berbasis PCR dijabarkan sebagai berikut.

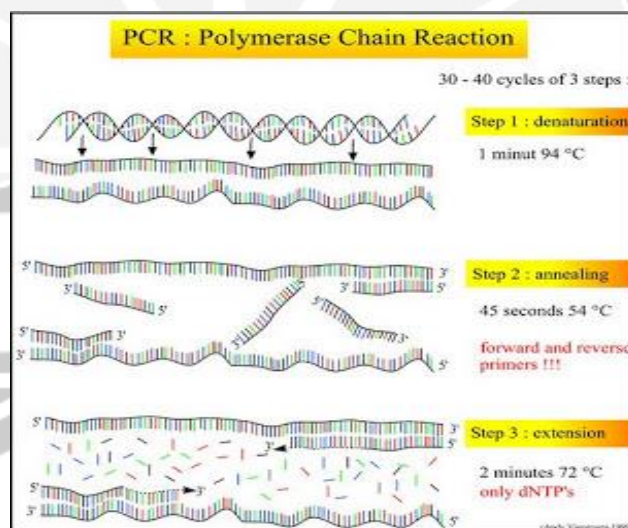
a. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode yang paling populer. Teknik PCR mampu membuat target yaitu asam nukleat lebih dari satu miliar kali lipat dari sampel DNA yang sangat sedikit atau dalam batas untuk deteksi. Prinsip kerja PCR yaitu memperbanyak segmen spesifik DNA yang diawali dengan perlekatan dNTP dalam reaksi termal mengikuti acuan primer (Russel, 1994). Kelebihan PCR yaitu efisien, spesifitas dan keakuratannya. PCR juga dapat mendeteksi DNA yang sudah terdegradasi dalam kandungan yang sangat sedikit. Salah satu kelemahan PCR adalah tidak dapat memberikan informasi adanya gen pembawa toksin, kerusakan gen, dan mutasi gen (Handayani, 2012).

Perbanyakan asam nukleat yang dilakukan sangat spesifik, ditentukan dengan spesifikasi primer melalui hibridisasi yang sesuai dengan DNA target yang akan diperbanyak. Metode PCR membutuhkan tiga bahan utama dalam mengamplifikasi DNA, yaitu enzim polimerase, basa nukleotida, dan primer. Enzim polimerase yang bertugas untuk membentuk untaian molekuler yang panjang dengan menyatukan sumber basa nukleotida (dNTPs) sesuai dengan DNA cetakan dan primer yang bertugas untuk memberikan lokasi spesifik yang akan digandakan oleh DNA

polimerase. Menurut (Lakowicz, 1983), proses utama dalam metode PCR terdiri dari tiga (3) tahap berurutan (Gambar 3), yakni:

1. *Denaturasi* (pemisahan), proses pemisahan rantai DNA acuan *double heliks* menjadi *single heliks* dikarenakan suhu tinggi 94°C setiap 1 menit.
2. *Annealing* (penempelan), adalah proses penempelan pasangan primer pada DNA target yang memiliki basa yang komplemen pada suhu 54°C setiap 45 detik.
3. *Extension* adalah proses pemanjangan utas primer atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh DNA polymerase pada suhu 72°C setiap 2 menit.



Gambar 3. Siklus *Polymerase Chain Reaction* Melalui 3 Tahap (Lakowicz, 1983).

Metode PCR pada umumnya membutuhkan template DNA yang sudah di isolasi terlebih dahulu. Saat ini sudah dikembangkan komponen PCR yang bisa menggunakan material DNA tanpa di ekstrasi, salah satunya yaitu *direct animal*. *Direct* PCR merupakan metode amplifikasi dari sampel mentah tanpa purifikasi. Metode ini lebih sederhana dan efisien. Sampel

yang digunakan dalam metode ini tidak hanya sampel darah segar tetapi juga dapat digunakan pada sampel darah beku yang telah disimpan pada suhu -20°C (McCusker dkk., 1992).

b. Gen *CHD* (*chromo-helicase DNA binding*)

Molekuler marker untuk penentuan jenis kelamin (*sexing*) pada burung adalah Gen *CHD* (*chromo-helicase DNA binding*). *CHD* merupakan suatu gen penanda jenis kelamin pada Aves. Gen *CHD* berada di kromosom Z dan W, yang terdiri dari *CHD-Z* (berada pada kromosom Z) dan *CHD-W* (berada pada kromosom W) (Dubiec, 2006). Aves mempunyai kromosom *sex* yang berbeda dibandingkan dengan mamalia. Sifat heterogametik pada burung dimiliki oleh betina (ZW), sedangkan jantan merupakan homogametik (ZZ) (Ellergren, 1996). Gen *CHD* dapat menunjukkan perbedaan antara alel Z dan W pada betina. Perbedaan ini terjadi karena adanya keterpautan (*linkage*) antara posisi gen *CHD* dengan kromosom kelamin pada Aves (kromosom W dan Z) (Griffiths dkk., 1998).

Gen *CHD* terdiri dari dua intron yang berlokasi diantara fragmen-fragmen yang berubah dengan sangat lambat yakni intron pada kromosom W berbeda panjangnya dengan intron pada kromosom Z. Pasangan primer yang digunakan dalam penentuan jenis kelamin yang sudah dirancang untuk membatasi fragmen gen dalam intron. Hal tersebut yang menyebabkan terdapatnya perbedaan pada produk dari kromosom W

dan Z dalam gel. Sehingga dapat diidentifikasi bahwa jantan dengan pita tunggal dan betina dengan pita ganda (Dubiec, 2006).

Primer yang umum digunakan untuk identifikasi jenis kelamin (*sexing*) pada burung, yaitu primer P2/P8, 2550F/2718R, 1237L/1272H dan 2561/2728. Perbedaan yang terdapat pada ke empat pasangan primer ini adalah setiap masing-masing primer menggandakan sekuen ditempat yang berbeda. Pasangan primer tersebut akan mengamplifikasi gen *CHD* yang terdapat pada kromosom Z dan kromosom W. Primer merupakan oligonukleotida yang berukuran pendek (15-30 basa) yang akan menempel pada DNA cetakan di tempat spesifik. Primer terdiri dari dua jenis masing-masing standar, yaitu primer *forward* dan primer *reverse* (Pelt-Verkuil dkk., 2008).

Terkait pada pasangan primer yang sama beberapa penelitian yang telah dilakukan di Indonesia, yaitu penelitian Wirastika dkk (2015) membandingkan efektivitas primer P2/P8, 2550F/2718R, dan 1237L/127H untuk identifikasi jenis kelamin burung Jalak Bali. Hasilnya hanya primer P2/P8 yang paling efektif mengidentifikasi jenis kelamin pada burung Jalak Bali, dan penelitian Wulansari dkk., (2013) juga melakukan komparasi efektivitas antara primer P2/P8, 2550F/2718R, dan 1237L/127H untuk identifikasi jenis kelamin burung air. Hasilnya hanya primer 1237L/1272H yang paling efektif mengidentifikasi jenis kelamin pada burung air. Pada penelitian ini, proses amplifikasi menggunakan

empat pasang primer yang mengamplifikasi gen *CHD*. Urutan basa primer yang digunakan seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Urutan Basa Primer Identifikasi Jenis Kelamin Burung Elang Jawa dan Elang Brontok

Primer	Urutan Basa	Sumber
P2	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	Griffiths dkk., (1998)
P8	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'	
2550F	5'-GTTACTGATTTCGTCTACGAGA-3'	Fridolfsson dan Ellegren (1999)
2718R	5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'	
1237L	5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3'	Kahn dkk., (1998)
1272H	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'	
2561	-	Wajjwalku
2728	-	

C. Uji Kuantitatif dan Kualitatif

Pengukuran molekul DNA dapat dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Uji ini dilakukan menggunakan *NanoDrop™ Spectrophotometer*. DNA murni dapat menyerap cahaya ultraviolet, dikarenakan adanya basa purin dan pirimidin. Pita ganda DNA/RNA akan menyerap cahaya ultraviolet pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein akan menyerap cahaya pada 280 nm, sehingga kemurnian DNA/RNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi nilai absorbansi 280 nm, maka nilai kemurnian DNA/RNA berkisar 1,8 - 2,0 (Padmadi, 2009). Menurut Devereux dan Wilkinson (2004) rasio $OD_{260}/OD_{280} < 1,8$ menunjukkan adanya kontaminasi protein atau fenol pada hasil ekstraksi. Khosravinia dkk., (2007) juga menjelaskan bahwa DNA dikatakan terkontaminasi RNA jika nilai rasio $OD_{260}/OD_{280} > 2,0$.

Uji kualitatif DNA merupakan metode yang digunakan untuk identifikasi, purifikasi dan pemisahan fragmen DNA. Metode ini dilakukan dengan menggunakan gel agarosa. Molekul-molekul tersebut akan bermigrasi melalui gel agarosa dipengaruhi oleh faktor konsentrasi bubuk agarosa, arus listrik, suhu, ukuran, dan konformasi molekul DNA.

Elektroforesis DNA merupakan suatu teknik yang mengukur laju perpindahan/pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Elektroforesis dibedakan menjadi 2 tipe, yakni vertikal dan horizontal. Elektroforesis vertikal digunakan untuk analisis pita DNA dan protein, sedangkan elektroforesis horizontal digunakan hanya untuk analisis pita DNA (Westermeier, 2005).

Prinsip elektroforesis adalah setiap molekul biologis memiliki muatan listrik yang besarnya bervariasi tergantung pada jenis molekulnya. Molekul DNA bermuatan negatif, sehingga di dalam medan listrik molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak/bermigrasi melalui matriks gel menuju kutub positif (anoda). Semakin besar ukuran molekulnya, maka semakin rendah laju migrasinya (Rahayu dan Nugroho, 2015).

D. Sekuensing

Informasi genetik makhluk hidup terletak pada DNA, untuk mengetahui informasi tersebut perlu dilakukannya sekuensing DNA atau pengurutan DNA. Sekuensing nukleotida merupakan teknik yang digunakan untuk menentukan urutan nukleotida secara langsung dari suatu fragmen DNA. Sekuensing DNA akan menghasilkan sekuens DNA yang digambarkan sebagai

urutan abjad lambang nukleotida penyusun DNA yakni AGTC (Hanjani, 2003).

Terdapat dua metode sekuensing yang dapat digunakan, yaitu Maxam-Gilbert dan Sanger. Metode Maxam-Gilbert ialah metode dengan pendekatan kimiawi, sedangkan metode Sanger ialah metode dengan pendekatan enzimatik. Metode sekuensing Maxam-Gilbert menghasilkan output rendah jika dibandingkan dengan metode Sanger (Dorado dkk., 2017).

Setiap percobaan melalui Maxam-Gilbert hanya menghasilkan beberapa pembacaan sampai sekitar 1000 basa nukleotida per gel jalur, tergantung pada teknologi spesifik yang digunakan. Artinya, biasa digunakan untuk mengurutkan pembesaran asam nukleat yang sangat pendek. Namun, pendekatan ini dapat di tingkatkan dan dioptimalkan, dapat diperbaiki dari waktu ke waktu dengan mesin semi otomatis yang mampu melakukan sekuensing genom besar sekalipun (Dorado dkk., 2017).

Metode Sanger merupakan metode sekuensing yang jauh lebih praktis. Metode ini dikenal sebagai metode penghentian rantai, yakni teknik sekuensing DNA berdasarkan penggabungan selektif deoxynucleotia yang diakhiri dengan rantai DNA polimerase selama replikasi DNA *in vitro*. Metode ini merupakan metode sekuensing yang paling banyak digunakan, kurang lebih 25 tahun sebelum digantikan metode pengurutan generasi berikutnya (NGS) (Li and Zhou, 2015).

Metode Sanger memerlukan DNA untai tunggal, primer yang sesuai, DNA polimerase, deoksi nukleotida tri fosfat normal (dNTPs), dan dideoksi

nukleotida tri fosfat modifikasi (ddNTPs) yang menghentikan proses perbanyakan nukleotida. Teknisnya, ddNTPs ini kekurangan bagian ujung 3'-OH yang diperlukan untuk pembentukan fosfodiester antara satu nukleotida dengan nukleotida berikutnya. Keberadaan ddNTPs mengakibatkan pengakhiran proses polimerisasi (perpanjangan untai DNA terhenti) (Li dan Zhou, 2015).

Kehadiran ddNTPs menghasilkan beberapa rantai polinukleotida berbeda, yakni empat reaksi sekuensing terpisah yang berisi keempat standar dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP), DNA polimerase dan hanya satu dari empat ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, atau ddTTP) untuk setiap reaksi. Setelah satu putaran pemanjangan template DNA, fragmen DNA yang terbentuk didenaturasi dan dipisahkan berdasarkan ukuran menggunakan elektroforesis gel dengan masing-masing dari empat reaksi di salah satu dari empat jalur terpisah. Selanjutnya, pita DNA divisualisasi dengan sinar ultraviolet atau autoradiografi, dan urutan DNA dapat langsung membacakan gambar gel (Li dan Zhou, 2015).

Prinsip dasar DNA sekuensing, yakni menggunakan metode PCR sebagai pijakannya. DNA yang ditentukan urutan basa AGCT-nya akan dijadikan cetakan untuk kemudian diamplifikasi menggunakan enzim dan bahan-bahan yang mirip dengan reaksi PCR, namun ada penambahan beberapa pereaksi tertentu. Proses ini dinamakan *cycle sequencing*. Seperti yang dijelaskan oleh Lakowicz (1983) perbedaan *cycle sequencing* dan PCR biasa yakni:

1. Primer yang digunakan hanya satu untuk satu arah pembacaan, tidak dua (sepasang) seperti PCR biasa.
2. ddNTPs (dideoksi nukleotida tri phospat) adalah modifikasi dari dNTPs dengan menghilangkan gugus '3-OH pada ribosa.

E. Hipotesis

1. Jenis kelamin Elang Jawa dan Elang Brontok hasil sitaan BKSDA Yogyakarta dapat diketahui berdasarkan *molecular sexing*.
2. Primer P2/P8, 2550F/2718R, 1237L/1272H, dan 2561/2728 efektif untuk mengidentifikasi jenis kelamin Elang Jawa dan Elang Brontok berdasarkan ukuran gen *CHD-W* dan gen *CHD-Z* yang dihasilkan menggunakan metode PCR.