

JURNAL

**MOLECULAR SEXING PADA ELANG JAWA (*Nisaetus bartelsi* Stresemann, 1924) dan ELANG BRONTOK (*Nisaetus cirrhatus* Gmelin, 1788)
HASIL SITAAN BKSDA DI YOGYAKARTA**

Disusun oleh:

Lince Ria Sitohang

NPM : 130801420



UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
YOGYAKARTA
2017

Molecular Sexing Pada Elang Jawa (*Nisaetus bartelsi* Stresemann, 1924) dan Elang Brontok (*Nisaetus cirrhatus* Gmelin, 1788) Hasil Sitaan BKSDA Di Yogyakarta

Molecular Sexing Of Java Hawk Eagle (*Nisaetus bartelsi* Stresemann, 1924) and Changeable Hawk Eagle (*Nisaetus cirrhatus* Gmelin, 1788) Confiscated from Yogyakarta Natural Resources Conservation Center

Lince Ria Sitohang^{1,*}, Pramana Yuda¹, E. Mursyanti¹
Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta
*lincesitohang18@gmail.com

Intisari

Penentuan jenis kelamin pada burung Elang Jawa (*Nisaetus bartelsi* Stresemann, 1924) dan Elang Brontok (*Nisaetus cirrhatus* Gmelin, 1788) sangat penting dalam program konservasi dan pembiakan untuk meningkatkan populasi di habitatnya. Penentuan jenis kelamin sangat sulit karena burung ini termasuk burung monomorfik, sehingga perlu pendekatan molekuler untuk menentukan jenis kelamin. Tujuan penelitian ini untuk menentukan jenis kelamin Elang Jawa dan Elang Brontok yang berasal dari hasil sitaan Balai Konservasi Sumberdaya Alam (BKSDA) di Kota Yogyakarta dengan metode *molecular sexing*, mengetahui primer yang paling efektif untuk mengidentifikasi jenis kelamin dan karakterisasi sekuen gen *CHD-W* dan gen *CHD-Z*. Penelitian ini menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan Taq polimerase *Direct Animal* dan *Hot Start*. Primer yang digunakan sejumlah empat pasang, yaitu primer P2/P8, primer 2550F/2718R, primer 1237L/1272H, dan primer 2561/2728, yang mengamplifikasi gen *CHD* (*chromo helicase DNA binding*).

Sampel DNA diperoleh dari 6 individu, yaitu dua sampel Elang Jawa, dan empat sampel Elang Brontok. Berdasarkan penelitian yang dilakukan diperoleh hasil bahwa *molecular sexing* dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis kelamin Elang Jawa dan Elang Brontok berdasarkan gen *CHD* dengan hasil empat sampel berupa individu betina dan dua sampel berupa individu jantan. Primer yang paling efektif untuk mengidentifikasi jenis kelamin adalah pasangan primer 2550F/2718R dan primer 2561/2728 yang mengamplifikasi 100% sampel ditunjukkan dengan adanya pita DNA tunggal (ZZ) pada jantan dan adanya pita DNA ganda (ZW) pada betina. Ukuran gen *CHD* menggunakan primer 2550F/2718R memiliki ukuran DNA pada kromosom *CHD-Z* dengan panjang 372 – 490 bp, dan *CHD-W* dengan panjang 640 – 758 bp serta ukuran gen *CHD* menggunakan primer 2550F/2718R memiliki ukuran DNA pada kromosom *CHD-Z* dengan panjang 638 – 725 bp dan *CHD-W* dengan panjang 444 – 450 bp.

Abstract

Determination of sex in Javan hawk eagle (*Nisaetus bartelsi* Stresemann, 1924) dan Elang Brontok (*Nisaetus cirrhatus* Gmelin, 1788) very important in conservation programs, and breeding to increase population in their habitats. Determination of sex is very difficult because this bird includes monomorphic birds, so it needs a molecular sexing to determine the sex. The purpose of this study was to determine sex Javan hawk eagle (*Nisaetus bartelsi*) and Changeable hawk eagle (*Nisaetus cirrhatus*) confiscated from Yogyakarta natural resources conservation center with molecular sexing method, determine the most effective primer to identification the sex and characterization sequences of *CHD-W* and *CHD-Z*. Primer used of four pairs, primer P2/P8, primer 2550F/2718R, primer 1237L/1272H, and primer 2561/2728, which amplifies *CHD* gene (*chromo helicase DNA binding*).

DNA samples were obtained from six individuals, two samples of Javan hawk eagle and four samples of Changeable hawk eagle. Based on the research, it was found that molecular sexing can be used to identification sex of the Javan hawk eagle and Changeable hawk eagle based on *CHD* gene with the result of four samples in the form of individual female and two individual male samples. The most effective primers for identification sex are primer pair 2550F/2718R and primer 2561/2728 which amplifies 100% samples were demonstrated in the presence of a single DNA (*ZZ*) in males and the presence of double DNA (*ZW*) in females. *CHD* gene size using primer 2550F/2718R DNA size on chromosome *CHD-Z* with length 372 - 490 bp, and *CHD-W* with length 640 - 758 bp and *CHD* gene size using primer 2550F/2718R DNA size on *CHD-Z* chromosome with length 638 - 725 bp and *CHD-W* with length 444 - 450 bp.

PENDAHULUAN

Burung Elang (termasuk semua jenis dari Famili Accipitridae) telah dinyatakan sebagai burung yang dilindungi oleh undang-undang di Indonesia. Elang Jawa berada pada status *Endangered* (genting/terancam) menurut kriteria *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), yaitu jenis yang menghadapi resiko kepunahan tinggi dalam waktu dekat jika tidak ada upaya pelestarian dari manusia. Sementara itu, Elang Brontok berada pada status *low risk* (resiko rendah), yaitu jenis yang menghadapi resiko kepunahan yang rendah, namun beberapa sub populasi menghadapi ancaman kepunahan lokal (BirdLife International, 2001).

Kerusakan lingkungan dan perdagangan satwa secara ilegal merupakan faktor utama yang mengancam punahnya spesies burung. Sozer dkk (1999), mengatakan bahwa Elang merupakan salah satu spesies yang sekarang sangat jarang ditemukan di habitat alami di Indonesia. Sebaran burung Elang dalam beberapa tahun terakhir sudah terfragmentasi. Diperkirakan saat ini habitat Elang yang tersisa hanya 10% dari luas sebaran sebelumnya dan ada peningkatan ancaman terhadap populasinya. Minimnya populasi bisa membuat burung ini berpindah ke tempat yang lebih tinggi atau melakukan perpindahan sangkar. Hal ini jelas berpengaruh terhadap tingkat kenyamanan burung dalam berkembangbiak. Kualitas habitat yang tidak memadai dipastikan menjadi penyebab kemampuan berbiak yang rendah.

Perburuan liar di alam untuk diperdagangkan sebagai hewan peliharaan, maupun dalam bentuk hewan yang sudah diawetkan dapat mengancam kelestarian burung ini di alam. Kelangkaan burung ini membuat manusia ingin memelihara burung ini seolah menjadi kebanggaan tersendiri dan kehadirannya menjadikan harga burung ini menjadi tinggi. Memelihara burung sebagai hewan peliharaan merupakan hobi yang sangat populer dan sudah meluas di Indonesia (Jepson dan Ladle, 2005). Perdagangan hewan secara ilegal ini membuat populasi Elang cenderung semakin menurun. Penggunaan media sosial telah merubah metode perdagangan di Indonesia, dan hal ini memperluas jangkauan penjualan satwaliar dilindungi seperti raptor. Perdagangan raptor paling banyak terjadi pada bulan Juli dan Agustus dimana hal ini berkaitan dengan musim berbiak di sarang (Gunawan dkk., 2017). Untuk menghentikan kecenderungan ini dan mengamankan kawasan habitat burung ini pemerintah mengupayakan perlindungan hukum melalui UU No.5 Tahun 1990 dan No. 7 Tahun 1999 (Noerdjito dan Maryanto, 2001). Telah adanya larangan yang mengatur mengenai perdagangan satwa yang dilindungi menjadi dasar bagi penegak hukum terhadap pelaksanaan tugasnya dalam menangani kasus perdagangan liar. Akan tetapi penegak hukum tidak dapat bekerja sendiri karena setelahnya penegak hukum membutuhkan bantuan dari lembaga konservasi untuk merawat satwa hasil sitaan pemerintah dalam kasus perdagangan satwa yang dilindungi.

Pemerintah telah memiliki satu lembaga khusus untuk menindak lanjuti perdagangan satwa yang dilindungi, yaitu Balai Konservasi Sumberdaya Alam (BKSDA) sebagai satu badan lembaga pemerintah yang bertanggung jawab untuk mengatasi masalah konservasi hewan langka. Salah satu kegiatan BKSDA adalah menyita satwa langka hidup yang diperdagangkan. Penyitaan satwa juga dilakukan pada individu yang memelihara secara illegal, kemudian mengkarantina satwa tersebut di satu pusat konservasi. Satwa sitaan akan dilepas kembali ke alamnya jika telah memenuhi syarat pelepasliaran yang baik. Sebelum pelepasliaran, analisis molekuler dibutuhkan untuk mengetahui secara pasti jenis kelamin satwa hasil sitaan karena secara morfologi sulit dibedakan antara betina dan jantan terutama Elang Jawa dan Elang yang bergenus sama (Dubiec, 2006). Penelitian mengenai penentuan jenis kelamin Elang Jawa dan Elang Brontok ini penting dilakukan karena terkait dalam program konservasi (pelepasliaran). Kepentingan manajemen dan konservasi spesies burung mengenai jenis kelamin penting kaitannya dengan kepentingan perbandingan jenis kelamin (*sex ratio*). *Sex ratio* yang seimbang dalam populasi yang kecil penting bagi manajemen dan konservasi terhadap spesies yang terancam. Keberhasilan identifikasi jenis kelamin secara tepat akan memberikan kontribusi terhadap keberhasilan kepentingan tersebut (Cerit dan Avanus, 2007).

Beberapa metode penentuan jenis kelamin burung telah ditemukan seperti *vent sexing*, *laparoscopi*, *sexing steroid*, dan *karyotyping*. Metode-metode tersebut merupakan metode digunakan dalam menentukan jenis kelamin pada burung yang bersifat monomorfik. Namun, metode ini memakan waktu yang lama dan mahal. Beberapa dari metode tersebut dapat menyakitkan dan bahkan mengakibatkan kematian pada burung (Dubiec, 2006). Kemajuan teknologi di bidang molekuler menjadi pilihan untuk mengidentifikasi jenis kelamin burung. Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu pilihan yang menarik, karena teknik ini mudah digunakan, cepat dan hanya memerlukan sedikit sampel DNA (Reddy, 2007). PCR sering digunakan dalam *molecular sexing* dikarenakan

metodenya yang efektif, tepat serta cepat dalam melakukan *sexing*. PCR juga memiliki sensitifitas yang tinggi (Reddy dkk., 2007).

Gen yang umum digunakan dalam penentuan jenis kelamin burung ialah Gen *CHD* (*Chromo Helicase DNA binding*) (Dubiec, 2006). Berbagai macam primer untuk amplifikasi segmen intron gen *CHD* juga telah dikembangkan. Segmen gen *CHD* digunakan sebagai marker dalam menentukan jenis kelamin karena memiliki ukuran yang nyata antara kedua jenis kelamin (Morinha dkk., 2012). Primer yang sering digunakan identifikasi jenis kelamin burung yaitu P2/P8 (Griffith dkk., 1998), 2550F/2718R (Fridolfson dan Ellegren, 1999), 1237L/127H (Khan dkk., 1998), dan 2561/2728. Penelitian ini menggunakan keempat (4) pasangan primer tersebut bertujuan untuk komparasi efektivitas primer dalam mengidentifikasi jenis kelamin pada Elang Jawa dan Elang Brontok. Aplikasi primer-perimer tersebut menunjukkan bahwa efektivitas primer tergantung pada spesies atau kelompok spesies tertentu. Terbukti pada burung Jalak Bali primer yang paling efektif mengidentifikasi jenis kelamin yakni primer P2/P8 (Wirastika, 2013). Pada burung air primer yang paling efektif mengidentifikasi jenis kelamin yakni primer 1237L/1272H (Wulansari dkk., 2013), dan pada beberapa jenis burung di Indonesia termasuk Famili Accipitridae primer yang paling efektif mengidentifikasi jenis kelamin yakni primer 2550F/2718R (Sulandari dan Zein, 2012).

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microtube* 1,5 ml; 2 ml, *PCR tube*, tip (*blue, yellow, white*), rak mikrotip, rak *microtube*, mikropipet, inkubator, elektroforesis horizontal, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, neraca digital, gunting, *razor blade*, amplop sampel, parafilm, plastik zip, plastik *wrap*, aluminium foil, *NanoDrop™ Spectrophotometer*, *vortex*, *spin down*, *sentrifuge*, *mini sentrifuge*, *waterbath*, *microwave*, *Thermocycler*, *freezer*, *refrigerator*, *cool box*, *Laminar Air Flow (LAF)*, *tray*, *UltraSlim LED Illuminator*, *comb*, *tube stand*,

autoclave, filter columb, packaged paper, Gel Documentation system, glove dan tissue. Beberapa program dan layanan *online* antara lain MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), Chomas, data *online* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), dan BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beberapa sampel darah burung Elang Jawa dan Elang Brontok dari BKSDA Yogyakarta dalam kertas saring, *Thermo Scientific Phire Animal Tissue Direct PCR kit, double destilate water, SYBR Safe Gel Stain, dNTPs, serbuk agarosa, TAE 1x, binding solution buffer, washing solution buffer, TE, primer forward, primer reverse, loading dye, DNA ladder 100 bp, alkohol 70%, label dan ke empat (4) pasangan primer yang digunakan, yaitu P2/P8, 2550F/2718R, 1237L/1272H, dan 2561/2728 dapat dilihat 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'GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'	Fridolfsson dan Ellegren (1999)
2718R	5'ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'	
1237L	5'GAGAAACTGTGCAAAACAG-3'	Kahn dkk., (1998)
1272H	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'	
2561	-	Wajjwalku
2728	-	

Tahap Penelitian

1. DNA Release

Sampel pada kertas saring dipotong menggunakan *razor blade* steril seluas 1 mm, kemudian dimasukkan ke dalam *mikrotube*. Selanjutnya, ditambahkan *dillution buffer* sebanyak 20 µl untuk reagen pengenceran dan *DNA release additive* sebanyak 0,5 µl untuk pelepasan DNA dari sampel kertas saring.

Microtube di *vortex* sesaat dan di *spin down*. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 2 sampai 5 menit, setelah itu diinkubasi pada suhu 98°C selama 2 menit. Sampel dilakukan *spin down* sesaat, kemudian supernatan disimpan pada suhu -20°C. Pada saat supernatan digunakan sebagai DNA *template* untuk proses amplifikasi dilakukan pengenceran 1:10 menggunakan *Tris-EDTA buffer solution*.

2. Uji Kuantitatif

Uji kuantitatif DNA/RNA menggunakan *NanoDrop™ Spectrophotometer*. Tingkat kemurnian DNA berkorelasi dengan kualitasnya. Tingkat kemurnian DNA dapat diukur dengan cara menghitung rasio antara nilai OD₂₆₀ dan OD₂₈₀ (*optical density*) pada sampel DNA yang diukur pada spektrofotometer. DNA dikatakan murni/berkualitas jika nilai rasio OD₂₆₀/OD₂₈₀ berkisar antara 1,8 – 2,0 (Mulanono, 2002). Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA dengan langkah awal yakni menyambungkan instrumen ke sumber listrik. Tekan tombol '*power*' untuk memulai. Tombol '*select sampel*' dipilih sebagai halaman menu, kemudian pilih dsDNA karena sampel yang digunakan berupa *double strand* DNA. Tekan tombol '*start measurement*' pada menu untuk memulai pengukuran. Pengukuran diawali dengan menambahkan 1 µl *destilated water* sebagai blanko. Selanjutnya, pengukuran pada masing-masing sampel dilakukan dengan penambahan 1 µl DNA sampel. Kemurnian DNA dapat terlihat dari perbandingan absorbansi A₂₆₀/A₂₈₀.

3. Amplifikasi DNA

Masing-masing *tube* PCR yang digunakan diberi label sesuai dengan kode sampel elang, kontrol positif (*Tyto alba*) dan kontrol negatif (*destilated water*). Komposisi master mix dengan *Direct Taq Animal DNA Polymerase* seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Master mix *Direct Taq Animal DNA Polymerase*

Reagen	Volume 1x Reaksi
<i>Destilated Water</i> (DW)	3,3 µl
2X PCR Buffer	5 µl
Primer F (10 µM)	0,25 µl
Primer R (10 µM)	0,25 µl
Phire Animal Tissue <i>Direct</i> PCR Kit (1U)	0,2 µl
Sampel DNA	1 µl
Total volume PCR Mix	10 µl

Setiap larutan PCR dicampurkan dengan hati-hati menggunakan pipet dengan teknik *up and down*. PCR tube dimasukkan ke dalam mesin *thermocycler* dengan dilakukan pengaturan sesuai dengan protokol dari masing-masing primer. Protokol siklus PCR seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. *Thermalcycler Temperature Setting*

Tahap Siklus	Suhu (°C)	Durasi
<i>Pre-Denaturation</i>	98	5 menit
Cycle (40x)	<i>Denaturation</i>	98
	<i>Annealing</i>	Ta*
	<i>Extension</i>	72
<i>Final Extension</i>	72	1 menit
<i>Hold</i>	4	∞

Keterangan: Ta Primer P2+P8 dan 2561+2728 : 56°C, Primer 2550+2718 dan 1237+1272 : 53°C

Visualisasi hasil PCR di elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5% dengan buffer TAE 1x. *Running* dilakukan dengan 100 volt selama 30 menit. DNA ladder (ukuran 100 bp) sebanyak 3 µl ditambahkan ke dalam gel agarosa. DNA sampel elang, DNA kontrol *Tyto alba*, dan DNA kontrol negatif sebanyak 3 µl ditambahkan *loading dye* 2 µl yang kemudian dimasukkan ke masing-masing sumuran. Hasil elektroforesis dilihat menggunakan GelDoc.

4. Identifikasi Jenis Kelamin

Jenis kelamin diidentifikasi berdasarkan hasil amplifikasi secara visual dengan GelDoc. Sampel dinyatakan positif apabila hasil visualisasi sampel

tersebut terbentuk pita yang jelas, dan sesuai dengan kontrol positif dengan ukuran sesuai PCR produk masing-masing primer. Sampel dinyatakan negatif apabila hasil visualisasi sampel tersebut tidak terbentuk pita dan pita yang ukurannya tidak spesifik dengan kontrol positif. Berdasarkan visualisasi produk amplifikasi gen *CHD* pada semua sampel ditunjukkan dengan adanya pita DNA tunggal (*CHD-Z*) pada jantan dan adanya pita DNA ganda (*CHD-Z* dan *CHD-W*) pada betina (Griffiths dkk., 1998).

5. Sekuensing

Sekuensing dilakukan bertujuan untuk mengetahui urutan nukleotida gen *CHD-Z* dan *CHD-W*. Sampel sekuen sebanyak 3 sampel yakni Elang Jawa (betina), Elang Brontok (jantan) dan (betina), dipilih sebagai perwakilan individu dan spesies. Preparasi sekuensing terlebih dahulu dilakukan running amplifikasi PCR menggunakan Taq Hot Start dari produk PCR. Purifikasi dilakukan menggunakan *Gel Elution Kit*. Sampel dan primer yang akan disekuensing dibungkus dengan parafilm, dimasukkan dalam plastik zip dan dikirimkan ke *First Base Laboratories*, Malaysia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi, diperoleh hasil seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Kosentrasi dan Kuantitas DNA

Sampel	Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA (ng/ μ l)	A260
EJ 01	1,39	153,3	3,006
EB 01	1,15	138,7	2,775
EB 02	1,09	115,2	2,305
EB 03	1,12	116,6	2,333
EJ 02	1,16	272,6	5,471
EB 04	1,81	91,2	1,825

*Keterangan: EJ : Elang Jawa, EB : Elang Brontok

Berdasarkan hasil kemurnian DNA menunjukkan ada tidaknya kontaminasi RNA atau protein pada DNA hasil isolasi. Data Tabel 4 menunjukkan bahwa hasil

isolasi memiliki kisaran kemurnian yang kurang dari 1,8. Konsentrasi DNA yang masih tinggi pada tiap sampel bisa dilakukan pengenceran atau dilusi dengan perbandingan 1:10 agar dapat digunakan beberapa kali lagi.

A. Analisis Molekuler DNA Elang Jawa dan Elang Brontok dengan Berbagai – Macam Primer

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil analisis molekuler dengan bermacam-macam primer, sebagai berikut:

1. Primer P2/P8



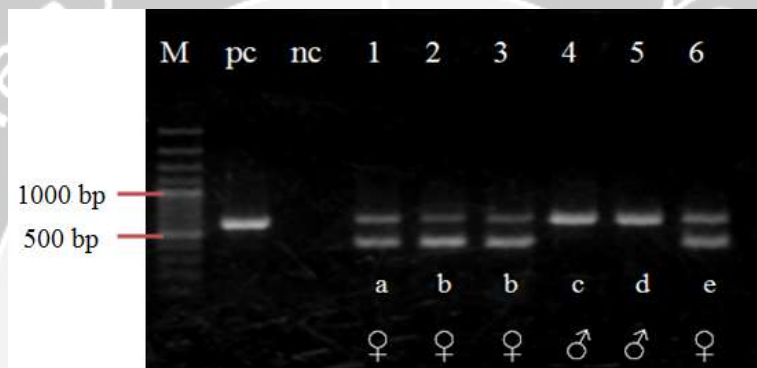
Gambar 1. Hasil Visualisasi Produk PCR Sampel dengan Primer P2/P8.

Ket. 1-6: sampel burung, nc: *destilated water*, pc: *Tyto alba*, M: DNA ladder (100 bp), a: 450 bp, b: 455 bp, c: 444 bp, dan d: 438 bp.

Hasil visualisasi (Gambar 1) produk PCR sampel elang menunjukkan bahwa produk PCR menggunakan primer P2/P8 menunjukkan adanya pita yang terbentuk pada Elang Jawa 01 memiliki ukuran 450 bp, Elang Brontok 01 memiliki ukuran 455 bp, Elang Brontok 02, 03, dan Elang Jawa 02 memiliki ukuran 444 bp, dan Elang Brontok 04 memiliki ukuran 438 bp. Namun, primer P2/P8 tidak dapat mengidentifikasi jenis kelamin burung Elang Jawa dan Elang Brontok karena pada saat proses visualisasi hanya menghasilkan satu untai pita, kasus yang sama terjadi pada penelitian Sulandari dan Zein (2012) yang menyatakan bahwa kromosom Z dan W belum terpisah secara baik. Semua sampel dan kontrol positif teramplifikasi, sedangkan negatif kontrol (*destilated water*)

tidak teramplifikasi. Ukuran dari hasil amplifikasi memiliki panjang, yaitu 395 - 455 bp. Ukuran yang didapat menunjukkan perbedaan dengan penelitian yang dilakukan Wirastika (2013) pada burung Jalak Bali, yaitu ukuran *CHD-Z* memiliki panjang 351 bp, dan *CHD-W* memiliki panjang 393 bp serta pada penelitian Wulansari dkk., (2013) pada jenis burung air yang memiliki ukuran *CHD-Z* memiliki panjang 308 - 368 bp, dan *CHD-W* memiliki panjang 325 - 402 bp.

2. Primer 2561/2728



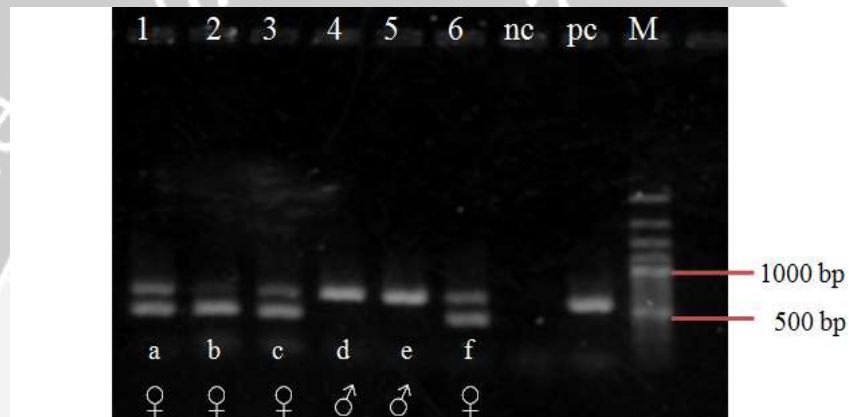
Gambar 2. Hasil Visualisasi Produk PCR Sampel dengan Primer 2561/2728.

Ket. 1-6: sampel burung, nc: *destilated water*, pc: *Tyto alba*, M: DNA ladder (100 bp), a: 716 bp dan 444 bp, b: 725 bp dan 444 bp, c: 708 bp, d: 700 bp, e: 725 bp dan 450 bp.

Hasil visualisasi (Gambar 2) produk PCR menggunakan primer 2561/2728 menunjukkan hasil positif karena saat proses visualisasi menghasilkan dua pola pita (kromosom Z dan W) yang terpisah dengan baik. Hasil positif terdiri dari dua individu jantan dan empat individu betina. Semua sampel dan kontrol positif teramplifikasi dengan primer 2561/2728, sedangkan negatif kontrol tidak teramplifikasi. Ukuran kromosom Z dan W yang terlihat dari hasil visualisasi, yaitu Elang Jawa 01 memiliki ukuran *CHD-Z* 716 bp dan *CHD-W* 444 bp, Elang Brontok 01 dan 02 memiliki ukuran *CHD-Z* 725 bp dan *CHD-W* 444 bp, Elang Brontok 03 memiliki ukuran *CHD-Z* 708 bp, Elang Jawa 02 memiliki ukuran *CHD-Z* 700 bp, dan Elang Brontok 04 memiliki ukuran *CHD-Z* 725 bp dan *CHD-W* 450 bp. Hasil yang didapat menunjukkan kesesuaian dengan penelitian yang

dilakukan oleh Sulandari dan Zein (2012) pada Famili yang sama. Informasi mengenai sekuen primer 2561/2728 belum ditemukan sehingga perbedaan fragmen spesifik Z dan W belum dapat diketahui. Berdasarkan hasil amplifikasi primer 2561/2728 dapat disimpulkan bahwa primer ini efektif dalam mengidentifikasi jenis kelamin Elang Jawa dan Elang Brontok.

3. Primer 2550F/2718R



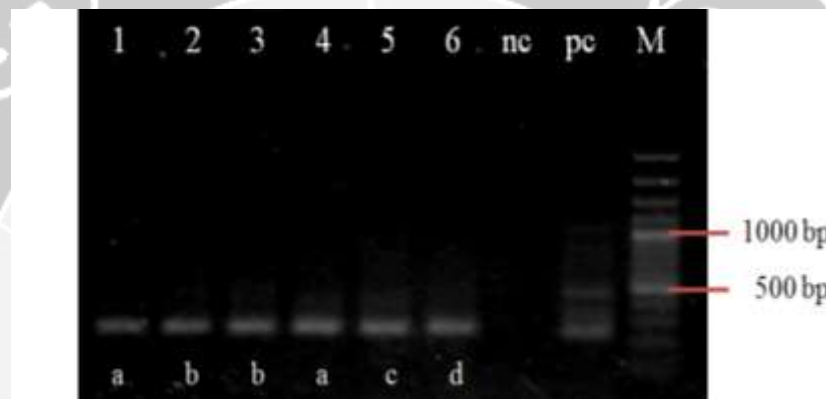
Gambar 3. Hasil Visualisasi Produk PCR Sampel dengan Primer 2550F/2718R.

Ket. 1-6: sampel burung, nc: *destilated water*, pc: *Tyto alba*, M: DNA ladder (100 bp), a: 758 bp dan 481 bp, b: 758 bp dan 490 bp, c: 733 bp, dan 454 bp, d: 690 bp, e: 640 bp, dan f: 640 bp dan 372 bp.

Hasil visualisasi (Gambar 3) produk PCR menggunakan primer 2550F/2718R juga menunjukkan hasil positif, terbentuk dua pola pita saat proses visualisasi teridentifikasi dua individu jantan dan empat individu betina dengan jarak kromosom Z dan W yang saling berdekatan, walaupun jarak antara kromosom Z dan W terlihat berdekatan tetapi masih dapat membedakan individu jantan dan betina dengan baik. Pita pertama hasil amplifikasi primer 2550F/2718R menunjukkan kromosom Elang Jawa 01 memiliki ukuran *CHD-Z* 758 bp dan *CHD-W* 481 bp, Elang Brontok 01 memiliki ukuran *CHD-Z* 758 bp dan *CHD-W* 490 bp, Elang Brontok 02 memiliki ukuran *CHD-Z* 733 bp dan *CHD-W* 454 bp, Elang Brontok 03 memiliki ukuran *CHD-Z* 690 bp, Elang Jawa 02 memiliki ukuran *CHD-Z* 640 bp, dan Elang Brontok 04 memiliki ukuran *CHD-Z* 640 bp dan

CHD-W 372 bp. Ukuran yang didapat menunjukkan tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Wirastika (2013), yaitu ukuran *CHD-Z* memiliki panjang 495 bp, dan *CHD-W* memiliki panjang 679 bp. Ukuran ini juga sesuai dengan penelitian Sulandari dan Zein (2012), dengan ukuran *CHD-Z* dan *CHD-W* memiliki panjang 400 – 600 bp. Sehingga disimpulkan primer 2550F/2718R dapat mengidentifikasi jenis kelamin Elang Jawa dan Elang Brontok.

4. Primer 1237L/1272H



Gambar 4. Hasil Visualisasi Produk PCR Sampel dengan Primer 1237L/1272H.

Ket. 1-6: sampel burung, nc: *destilated water*, pc: *Tyto alba*, M: DNA ladder (100 bp), a: 482 bp, b: 471 bp, c: 467 bp, dan d: 478 bp.

Hasil amplifikasi dengan primer 1237L/1272H menunjukkan hasil yang positif pada proses amplifikasinya. Namun, primer 1237L/1272H tidak dapat mengidentifikasi jenis kelamin pada Elang Jawa dan Elang Brontok karena pada saat proses visualisasi hanya menghasilkan satu untai pita dengan ukuran pada Elang Jawa 01 dan Elang Brontok 03 memiliki ukuran 482 bp, Elang Brontok 01, dan Elang Brontok 02 memiliki ukuran 471 bp, Elang Jawa 02 memiliki ukuran 467 bp dan Elang Brontok 04 memiliki ukuran 478 bp (Gambar 4), kasus yang sama terjadi pada penelitian Sulandari dan Zein (2012) menyatakan bahwa kromosom Z dan W belum terpisah secara baik. Terjadi persamaan hasil amplifikasi primer 1237L/1272H dan primer P2/P8 yang tidak dapat mengidentifikasi jenis kelamin burung Elang Jawa dan Elang Brontok. Jika hasil

amplifikasi primer P2/P8 dan 1237L/1272H dibandingkan dengan hasil amplifikasi pada primer 2561/2728 dan 2550F/2718R yang menghasilkan dua pola pita memperkuat dugaan bahwa kromosom Z dan W belum terpisah secara baik atau ukurannya yang tidak jauh berbeda. Guna visualisasi yang lebih baik dapat meningkatkan persentase gel agarosa, penggunaan gel poliakrilamid yang memiliki tingkat resolusi lebih tinggi sehingga jika panjang molekul DNA yang berbeda bisa di deteksi, atau enzim restriksi guna memotong kromosom W yang ditambahkan terakhir pada campuran reaksi. Ghorpade dkk., (2012) menggunakan enzim *Bam*HI dan *Rsa*I terhadap *Gyps vultures* sehingga terbentuknya tiga buah pita pada betina.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian *molecular sexing* pada Elang Jawa dan Elang Brontok hasil sitaan BKSDA di Yogyakarta, diperoleh simpulan bahwa

1. Penentuan jenis kelamin berhasil dilakukan pada Elang Jawa dan Elang Brontok. Hasil positif terdiri dari empat individu betina dan dua individu jantan dengan menggunakan primer 2561/2728 dan 2550F/2718R.
2. Primer 2561/2728 dan 2550F/2718R merupakan pasangan primer yang paling efektif dalam mengidentifikasi jenis kelamin Elang Jawa dan Elang Brontok karena pita *CHD-Z* dan *CHD-W* lebih mudah dibedakan. Primer 2561/2728 pada Elang Jawa 01 memiliki ukuran *CHD-Z* 716 bp dan *CHD-W* 444 bp, Elang Brontok 01 dan 02 memiliki ukuran *CHD-Z* 725 bp dan *CHD-W* 444 bp, Elang Brontok 03 memiliki ukuran *CHD-Z* 708 bp, Elang Jawa 02 memiliki ukuran *CHD-Z* 700 bp, dan Elang Brontok 04 memiliki ukuran *CHD-Z* 725 bp dan *CHD-W* 450 bp. Primer 2550F/2718R pada Elang Jawa 01 memiliki ukuran *CHD-Z* 758 bp dan *CHD-W* 481 bp, Elang Brontok 01 memiliki ukuran *CHD-Z* 758 bp dan *CHD-W* 490 bp, Elang Brontok 02 memiliki ukuran *CHD-Z* 733 bp dan *CHD-W* 454 bp, Elang Brontok 03 memiliki ukuran *CHD-Z* 690 bp, Elang Jawa 02 memiliki ukuran *CHD-Z* 640 bp, dan Elang Brontok 04 memiliki ukuran *CHD-Z*

640 bp dan *CHD-W* 372 bp. Primer P2/P8 dan 1237L/1272H tidak dapat mengidentifikasi jenis kelamin Elang Jawa dan Elang Brontok karena hanya menunjukkan satu pita.

Saran

Berdasarkan penelitian ini sebaiknya ada hal yang harus diperbaiki untuk penelitian berikutnya, yaitu

1. Disarankan adanya kontrol positif betina dan jantan untuk mengurangi kesalahan identifikasi jenis kelamin, berguna untuk visualisasi yang lebih baik.
2. Pada primer P2/P8 dan 1237L/1272H guna visualisasi yang lebih baik disarankan meningkatkan persentase gel agarosa sampai 2% atau reaksi dilanjutkan dengan penambahan enzim restriksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Dubiec, A. 2006. Molecular Techniques for Sex Identification In Birds. *Biological Lett.* 43 (1): 3.12.
- Fridolfson, A-K., dan Ellegren, H. 1999. A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 30: 116-121.
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., dan Dawson, R. J. G. 1998. A DNA Test to Sex Most Birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Gunawan, Pardidi, A., dan Noske, R. A. 2017. The Illegal Trade of Indonesian Raptors Through Social Media. *Kukila* 20: 1-11.
- Ito, H., Yamaji, A. S., dan Abe, M. 2003. Sex Identification by Alternative Polymerase Chain Reaction Methods in Falconiformes. *Zoological Science*, 20: 339-344.
- Khan, N. W., John, J. S., dan Quinn, T. W. 1998. Chromosome-specific Intron size Differences in The Avian *CHD* Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds. *Journal of the American Ornithologists Union* 15: 1074-1078.
- Noerdjito, M., dan Maryanto, I. 2001, Jenis-Jenis Hayati yang Dilindungi Perundang-undangan Indonesia. Balitbang Zoologi dan Puslitbang Biologi-LIPI. The Nature Conservancy and USAID. Cibinong, Indonesia.

- Sozer, R., Nijman, V., dan Setiawan, I. 1999. Panduan Identifikasi Elang Jawa (*Spiezatus bartelsi*) Seri Pendidikan Konservasi Keanekaragaman Hayati. *Proyek Konservasi Keanekaragaman Hayati*. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor.
- Sulandari, S., dan Zein, M. S. A. 2012. Application of Two Molecular Sexing Methods for Indonesian Bird Species: Implication for Captive Breeding Programs in Indonesia. *Hayati Journal of Bioscience*, 19 (4): 183-190.
- Wirastika, P. I. P., Yuda, I. P., dan Zahida, F. 2015. Sex Determination of Bali Starling (*Leucopsar rothschildi*) Using Molecular Sexing. *Journal KnE Life Sciences*, 2 (1): 114-118.
- Wulansari, W., Yuda, P., Zahida, F. 2013. Uji Efektifitas Gen *CHD* Sebagai Penanda Molekuler untuk Identifikasi Jenis Kelamin pada Burung Air. *Jurnal Biologi* 1-8.