

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia memiliki kekayaan alam yang tinggi. Data menunjukkan terdapat 28.000 spesies tumbuhan, 350.000 spesies binatang dan 10.000 spesies mikrobial (Astirin, 2000). Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman spesies burung yang tinggi. Menurut *BirdLife International* (2017) di Indonesia terdapat sebanyak 1771 spesies burung dan sebanyak 493 merupakan spesies burung endemik. Terdapat sebanyak 86 spesies burung termasuk ke dalam kategori *Vulnerable* (rentan), 41 spesies tergolong ke dalam *Endangered* (terancam), dan 28 spesies burung yang termasuk dalam kriteria *Critically endangered* (kritis) (BirdLife International, 2004).

Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia Nomo P.20 Tahun 2018 menyatakan bahwa seluruh spesies burung dari suku Accipitridae telah dinyatakan sebagai spesies yang dilindungi. Beberapa spesies dari suku tersebut antara lain Elang Alap Jambul (*Accipiter trivirgatus*), Elang Brontok (*Nisaetus cirrhatus*), Elang Jawa (*Nisaetus bartelsi*), Elang Bido (*Spilornis cheela*), Sikep Madu Asia (*Pernis ptyohincus*) dan Elang Laut Perut Putih (*Haliaeetus leucogaster*) (Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia, 2018). Beberapa spesies tersebut yang menjadi fokus dalam penelitian ini merupakan spesies yang jumlahnya terus menurun akibat berkurangnya habitat, perburuan liar dan perdagangan ilegal (Basuki *et al.*, 2007)

Burung-burung pada suku Accipitridae pada umumnya bersifat monomorfik, antara jantan dan betina sulit dibedakan secara langsung. Pengetahuan tentang jenis kelamin suatu individu diperlukan untuk mengetahui keseimbangan rasio jenis kelamin pada populasi. Informasi tersebut penting dalam pengelolaan konservasi spesies yang terancam punah (Cerit dan Avanus, 2007b), seperti pada spesies dari suku Accipitridae. Penentuan jenis kelamin juga penting untuk penangkaran suatu spesies burung monomorfik, hal ini menjadi masalah bagi para *breeder* karena tidak yakin dengan jenis kelamin burung yang diidentifikasi secara morfologi (Cerit dan Avanus, 2007a)

Terdapat beberapa metode penentuan jenis kelamin untuk burung monomorfik seperti *laparoscopi*, *vent sexing*, *sexing steroid* dan *karyotyping* (Cerit dan Avanus, 2007b). Namun metode-metode tersebut memiliki kelemahan seperti membutuhkan waktu yang lama, akurasi rendah dan mahal, selain itu beberapa metode tersebut dapat menyakitkan dan menyebabkan kematian pada burung (Cerit dan Avanus, 2007b). Saat ini telah ditemukan metode *molecular sexing* yang dapat menutupi kelemahan dari metode-metode tersebut. *Molecular sexing* adalah metode identifikasi jenis kelamin pada burung dengan teknik molekuler (Dubiec dan Zagalska-Neubauer, 2006)

Molecular sexing yang saat ini banyak menggunakan metode berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hal ini dikarenakan PCR dapat mengidentifikasi jenis kelamin secara tepat serta cepat dan efektif serta memiliki sensitifitas tinggi (Reddy *et al.*, 2007). Namun PCR memiliki kelemahan seperti membutuhkan mesin pengatur suhu seperti *thermal cyclers*

yang harganya cukup mahal. Kelemahan yang lain yaitu hasil PCR tidak dapat divisualisasikan secara langsung, untuk melihat hasil amplifikasi harus diproses dengan elektroforesis dan dilihat dengan *gel documentation* (Parida *et al.*, 2015).

Guna menjawab masalah tersebut maka *molecular sexing* dengan *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) dikembangkan. LAMP merupakan metode amplifikasi yang sederhana menggunakan peralatan yang mudah serta reaksi LAMP terjadi dalam waktu yang relatif singkat. Kelebihan lain yaitu hasil visualisasi amplifikasi dapat diamati langsung pada *microtube*. Namun LAMP juga memiliki kelemahan yaitu sangat sensitif kontaminasi dan membutuhkan banyak optimasi seperti optimasi reagen, waktu, suhu dan primer hal ini disebabkan oleh masih terbatasnya penelitian penggunaan LAMP untuk identifikasi jenis kelamin (Lee, 2017).

Penelitian *molecular sexing* menggunakan LAMP pernah dilakukan hanya di beberapa negara seperti di Israel (Centeno-Cuadros *et al.*, 2017), di Taiwan (Chan *et al.*, 2012) dan di Korea Selatan. Penelitian tentang *molecular sexing* menggunakan metode LAMP belum pernah dilakukan di Indonesia, metode ini baru digunakan untuk identifikasi parasit darah pada Elang Brontok (*Niasetus cirrhatus*) (Yuda, 2014), oleh karena itu penelitian ini perlu dilakukan di Indonesia. Hal lain yang melatarbelakangi penelitian ini adalah perlu membandingkan metode PCR atau LAMP yang efektif untuk *molecular sexing* agar penentuan jenis kelamin dapat dilakukan secara tepat, cepat dan akurat.

Primer spesifik untuk identifikasi jenis kelamin telah dirancang oleh Cuadros dkk., (2016) dengan nama ACCIW untuk amplifikasi gen *CHD-W* dan ACCIZ untuk amplifikasi gen *CHD-Z*, primer ini dirancang dari spesies *Griffon Vulture (Gyps fulvus)* dari suku Accipitridae dan terbukti dapat mengidentifikasi jenis kelamin pada spesies lain dalam satu suku Accipitridae yaitu *Egyptian Vulture (Neophron percnopterus)*, dan *Black Kite (Milvus migrans)*. Keberhasilan primer tersebut dalam mengidentifikasi jenis kelamin dari kedua spesies lain dikarenakan kedua spesies tersebut masih dalam satu suku Accipitridae sehingga spesies tersebut kekerabatannya relatif dekat maka perbedaan genetiknya tidak terlalu tinggi dan sekuen primernya cocok karena sekuen nuklotidanya relatif terkonservasi dengan baik (Centeno-Cuadros *et al.*, 2017). Keberhasilan primer tersebut dalam mengamplifikasi kedua spesies lain dalam satu suku Accipitridae maka perlu pula dilakukan optimasi untuk jenis-jenis lain dari suku Accipitridae yang ada di Indonesia dan untuk membuktikan primer tersebut dapat digunakan untuk seluruh spesies pada suku Accipitridae.

B. Keaslian Penelitian

Penelitian identifikasi jenis kelamin secara molekuler menggunakan PCR pernah dilakukan oleh (Sitohang, 2017). Sampel yang digunakan yaitu sebanyak 6 sampel yaitu 2 sampel Elang Jawa dan 4 sampel Elang Brontok. Penelitian ini menggunakan empat pasang primer yaitu primer P2/P8, primer 2550F/2718R, primer 1237L/1272H, dan primer 2561/2728. Hasilnya diperoleh 4 sampel individu betina dan 2 sampel individu jantan dengan primer

yang paling efektif adalah pasangan primer 2550F/2718R dan primer 2561/2728 yang dapat mengamplifikasi sebesar 100%.

Molecular sexing menggunakan PCR lainnya pernah dilakukan oleh (Helander *et al.*, 2007) pada spesies Elang Ekor Putih (*Haliaeetus albicilla*). Primer yang digunakan adalah pasangan primer 2550F/2718R (Fridolfsson dan Ellegren, 1999) untuk mengamplifikasi intron dalam gen *CHD1* pada kromosom Z dan W. Tujuan dari penelitian ini untuk mengevaluasi keakuratan metode identifikasi jenis kelamin untuk Elang Ekor Putih berdasarkan morfologi dan berdasarkan *molecular sexing*. Hasil menunjukkan bahwa dengan metode PCR pasangan primer tersebut mampu mengidentifikasi jenis kelamin sebesar 96%.

Penelitian tentang *molecular sexing* menggunakan metode LAMP pada burung masih terbatas. Penelitian tentang *molecular sexing* pernah dilakukan oleh Centeno-Cuadros (2017) yang mengidentifikasi jenis kelamin pada 3 spesies raptor yaitu Griffon Vulture (*Gyps fulvus*), Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus*), dan Black Kite (*Milvus migrans*). Primer yang digunakan ACCIW dan ACCIZ, kondisi optimum amplifikasi pada primer ACCIW terjadi pada suhu 64°C selama 80 menit dan pada primer ACCIZ kondisi optimum terjadi pada suhu 59°C selama 80 menit. Hasil diketahui bahwa metode LAMP dapat membedakan jenis kelamin dengan hasil diperoleh sebanyak 4 individu jantan dan 4 individu betina (Centeno-Cuadros *et al.*, 2017).

Molecular sexing dengan menggunakan metode amplifikasi LAMP pernah dilakukan pada anak ayam (Kim *et al.*, 2015). DNA diekstraksi dari sampel

darah anak ayam Leghorn dan Korea. Digunakan 2 set primer terdiri dari empat primer amplifikasi isothermal di masing-masing, untuk mengamplifikasi urutan spesifik jenis kelamin betina (HUR0417) gen PKCIW. Hasil menunjukkan bahwa sampel betina menunjukkan amplifikasi gen PKCIW yang signifikan. Selain itu, metode LAMP ini menghasilkan hasil kurang dari 1 jam. Penelitian ini menunjukkan bahwa metode *molecular sexing* berbasis LAMP merupakan metode yang sensitif, akurat, dan hemat waktu untuk mengidentifikasi jenis kelamin pada anak ayam di usia dini dibandingkan dengan metode sexing konvensional seperti lapraskopi, *sexing steroid*, *karyotyping*, dan *vent sexing*.

Penelitian lain tentang *molecular sexing* menggunakan metode LAMP dilakukan oleh Chan dkk., pada tahun 2012 pada suku Columbidae jenis *Columba livia*. Tujuan penelitian ini untuk merancang sepasang primer, satu primer untuk menargetkan Gen ribosom 18S RNA dan primer yang lain untuk menargetkan gen spesifik betina, hal ini berfungsi untuk menentukan jenis kelamin individu *Columba livia*. Primer yang digunakan adalah Sex (F3, B3, FIP, BIP) dan 18S (F3, B3, FIP, BIP). Secara keseluruhan, kondisi LAMP optimal untuk penentuan jenis kelamin pada suhu 60⁰C dengan penambahan 8 mM MgSO₄, 1,2 mM dNTPs, 0.6M betaine, 0.2 μM outer primer (F3/B3), 2,4 μM inner primer (FIP/BIP) dan 4 U *Bst polymerase*. Hasilnya diperoleh 8 individu betina dan 8 individu jantan (Chan *et al.*, 2012).

C. Rumusan Masalah Penelitian

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana kemampuan LAMP dan PCR dalam mengidentifikasi jenis kelamin pada suku Accipitridae?
2. Apakah primer LAMP yang dirancang dari spesies Griffon Vulture (*Gyps fulvus*) dan Elang Brontok (*Nisaetus cirrhatus*) dapat digunakan untuk spesies-spesies yang lain dari suku Accipitridae di Indonesia?

D. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui kemampuan LAMP dan PCR dalam mengidentifikasi jenis kelamin pada suku Accipitridae.
2. Menguji kemampuan primer LAMP yang dirancang dari Elang Brontok (*Nisaetus cirrhatus*) dan Griffon Vulture (*Gyps fulvus*) untuk amplifikasi spesies-spesies yang lain dari suku Accipitridae di Indonesia.

E. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini berupa pengetahuan mengenai kemampuan metode amplifikasi LAMP dan PCR untuk *molecular sexing* burung suku Accipitridae serta pengetahuan tentang metode penentuan jenis kelamin yang tepat, cepat, dan mudah dilakukan.