

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Identifikasi Jenis Kelamin Burung

Kelompok Aves sebagian besar memiliki sifat monomorfik yaitu sulit dibedakan secara morfologi antara individu jantan dan betina sehingga hal ini menyebabkan penentuan jenis kelamin secara morfologi sulit dilakukan (Cerit dan Avanus, 2007). Menurut Griffiths *et al.* (1998), lebih dari 50% spesies burung didunia pada karakter morfologi eksternalnya bersifat identik. Pada burung dimorfik, burung dewasa memperlihatkan karakteristik yang berbeda antara jantan dan betina, sehingga penentuan jenis kelaminnya dapat dilakukan dengan mudah. Karakteristik ini seringkali sulit diamati atau bahkan tidak ada pada anakan burung (Ellegren dan Sheldon, 1997).

Burung gereja (*Passer domesticus*) merupakan salah satu contoh burung dari bangsa Passeriformes yang bersifat dimorfik, yang didasari pada karakter sekunder seksual meliputi ukuran tubuh, warna bulu, garis mata, bentuk paruh bentuk sayap, dan bentuk ekor. Akan tetapi pada burung yang bersifat monomorfik dan secara seksual belum dewasa, sulit dilakukan identifikasi jenis kelaminnya (Ellegren dan Sheldon, 1997). Terdapat dua metode untuk mengidentifikasi jenis kelamin pada burung yang bersifat monomorfik, yaitu secara *non-molecular* dan *molecular*.

B. Identifikasi Jenis Kelamin Burung Secara *Non-Molecular*

Metode yang dapat digunakan untuk identifikasi jenis kelamin burung secara *non-molecular* yaitu *vent sexing*, *laparoscopy*, *sexing steroid*, dan *karyotyping*.

1. *Vent sexing*

Vent sexing, dilakukan dengan pengamatan pada area kloaka untuk mengidentifikasi jenis kelamin antara jantan dan betina. Pada individu jantan biasanya terdapat tonjolan seperti jerawat atau lubang jarum berwarna kuning, putih dan hitam. Sedangkan pada individu betina tidak memiliki tonjolan namun memiliki ovarium yang berbentuk V. Metode ini memiliki kekurangan yaitu kesulitan dalam membedakan tonjolan yang sangat kecil sehingga memerlukan seorang ahli yang berpengalaman dan terlatih (Bramwell, 2003).

2. *Laparoscopy (Surgical Sexing)*

Metode ini dilakukan dengan membuat sayatan kecil di sisi tubuh burung, sehingga organ kelamin dapat terlihat dengan laparoskop atau otoscope. Metode ini dapat dilakukan dengan melihat langsung karakteristik fisik dari saluran reproduksi. Kekurangan dari metode ini yaitu membutuhkan anastesi yang dapat mengakibatkan resiko cedera yang tinggi pada organ kelamin bahkan dapat mengakibatkan kematian pada burung (Swengel, 1996)

3. Sexing steroid (*Faecal steroid sexing*)

Sexing steroid yaitu metode penentuan jenis kelamin dengan melakukan pengujian konsentrasi yang dilakukan untuk hormon esterogen/testosteron (E/T) yang terdapat pada feses. Pada burung betina rasio E/T lebih tinggi dibandingkan dengan burung jantan. Kekurangan pada metode ini yaitu saat musim kawin rasio hormon menjadi tinggi, namun saat bukan musim kawin rasio hormon menjadi rendah, hal ini tentu menjadi bias ketika melakukan identifikasi pada saat bukan musim kawin. Hasil yang baik hanya akan didapat saat musim kawin berlangsung (Swengel, 1996).

4. Karyotyping

Karyotyping, dilakukan dengan membedakan ukuran kromosom Z dan W. Pada umumnya kromosom Z lebih besar dari pada kromosom W. Metode ini dilakukan dengan cara mengisolasi kromosom dan kariotipe yang diperoleh dari isolasi sel darah atau bulu pada burung. Kekurangan metode ini yaitu sebagian besar kromosom dari burung merupakan mikrokromosom sehingga sangat sulit dilakukan perhitungan untuk mendapat hasil yang akurat (Archawaranon, 2004). Selain itu menurut Christidis (1985) hanya orang yang sudah terlatih dan berpengalaman yang dapat dengan mudah mendapat hasil yang akurat, selain itu prosedur yang dilakukan terlalu memakan waktu.

C. Identifikasi Jenis Kelamin Burung Secara *Molecular*

Metode identifikasi jenis kelamin burung secara *molecular* dapat dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan *Loop-Mediated Isothermal Amplification*

1. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

.PCR merupakan teknik yang dalam prosesnya menggunakan beberapa suhu (multitermal) dibantu dengan enzim *Taq Polymerase*. Pasangan primer yang dibuat untuk metode PCR berdasarkan variasi ukuran intron untuk membedakan antara protein *chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*), *CHD-Z* dan *CHD-W* (Dubiec dan Zagalska-Neubauer, 2006).

Gen penanda *CHD* adalah gen yang terdapat pada kromosom W dan Z pada Aves. Gen tersebut mempunyai dua intron yang panjangnya bervariasi pada kromosom Z dan kromosom W. Gen tersebut dapat digunakan untuk menentukan jenis kelamin secara *molecular* (Griffiths *et al.*, 1998). Burung betina memiliki dua gen *CHD* yakni gen *CHD-W* dan *CHD-Z*, sedangkan pada jantan hanya terdapat gen *CHD-Z* (Griffiths *et al.*, 1998). Menurut Ellegren (1996) penanda umum yang dijadikan dasar adalah kromosom W milik betina (ZW), yang tidak dimiliki oleh jantan (ZZ) (Griffiths *et al.*, 1998). Kelompok Aves memiliki kebalikan kromosom seks dibandingkan dengan mamalia. Burung betina memiliki heterogametik ZW dan burung jantan dengan heterogametik ZZ (Ellegren, 1996).

Primer pada PCR umumnya urutan oligonukleotida yang berukuran pendek (biasanya 15-30 basa) yang akan menempel pada DNA cetakan di tempat spesifik. Fungsi primer dalam PCR adalah untuk mengawali (*startingpoint*) suatu reaksi amplifikasi. PCR pada umumnya terdiri dari sepasang primer yaitu *forward* dan *reverse*.

Identifikasi jenis kelamin burung dengan metode PCR yang pernah dilakukan di Indonesia salah satunya oleh Sitohang (2017) yaitu pada burung elang jawa (*Nisaetus bartelsi*) dan elang brontok (*N. Cirrhatus*) dengan menggunakan primer 2550/2718, P2/P8, 1237/1272, dan 2561/2728. Penentuan jenis kelamin lainnya di Indonesia juga dilakukan oleh Khaerunnisa (2012) pada *Gallus gallus domesticus*, *Coturnix c. japonica* (puyuh Jepang), *Anas platyrnchos* (itik), *Columba livia* (merpati), *Gracula religosa robusta*, *Cacatua moluccensis* (kakatua Maluku), dan *C. sulphurea* (kakatua kecil jambul kuning), dengan menggunakan primer 2550/2718, dan P2/P8.

Penelitian lainnya yaitu oleh Krisdianti (2018) melihat efektifitas primer P2/P8, 1237/1272, 2550/2718, dan 2561/2728 untuk identifikasi jenis kelamin pada bangsa Passeriformes. Pada penelitian ini primer yang paling baik adalah 2550/2718, P2/P8, dan 25502718.

2. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) yaitu metode baru dalam mengamplifikasi DNA yang dikembangkan pada tahun 2000. Metode ini hanya menggunakan satu suhu (isothermal) inkubasi

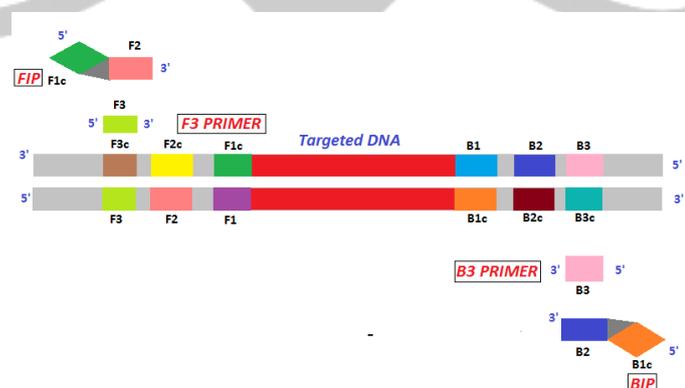
dalam mengamplifikasi DNA sehingga tidak memerlukan mesin *thermo cycler* (Tomita *et al.*, 2008).

LAMP akan mengamplifikasi sekuen target pada suhu konstan yakni pada suhu antara 60-65⁰C. Teknik LAMP menggunakan empat primer yaitu (FIP, F3, BIP dan B3) atau enam primer (FIP, F3, LF, BIP, B3 dan LB) dan enzim polimerase (*Bst DNA Polymerase*) yang diperoleh dari *Baccilus stearothermophilus* yang memiliki fungsi sebagai pemindah untai DNA dalam replikasi. Empat primer atau enam primer yang berbeda tersebut berfungsi untuk mengidentifikasi enam area berbeda pada gen target, sehingga spesifisitasnya akan meningkat. Lama waktu yang diperlukan dalam reaksi LAMP sekitar 30 menit sampai 60 menit. Hal ini merupakan waktu reaksi yang singkat karena penambahan sepasang primer yang di sebut “loop primer” akan meningkatkan kecepatan reaksi dan meningkatkan jumlah DNA yang di amplifikasi (Notomi *et al.*, 2000).

Menurut Eiken (2006) desain primer yang baik dan stabil dapat dilihat dari energi bebasnya yaitu dengan nilai -4 kcal/mol atau lebih. Selanjutnya primer LAMP yang baik yaitu memiliki TM masing-masing untuk setiap region yaitu untuk F1c dan B1c sekitar 65⁰C, F2,B2,F3,B3 sekitar 60⁰C, dan untuk primer loop yaitu 65⁰C. Parameter yang lain yang sering diperhatikan adalah komposisi basa CG primer, yaitu dengan nilai di antara 50% - 60% untuk menghasilkan primer yang baik. Eiken (2006) juga menyatakan bahwa

jarang antara sequens primer juga perlu diperhatikan, seperti untuk jarak F2 ke akhir dari B2 yaitu antara basa ke 120 dan basa 160, selanjutnya untuk jarak antara akhir 5' dari F2 dan akhir sekuens 5' F1 adalah pada basa ke 40 dan basa ke 60 dan jarak antara F2 dan F3 diantara 0 sampai 60 basa.

Menurut Notomi *et al.* (2000) prinsip LAMP adalah mengamplifikasi fragmen DNA dengan mekanisme sintesis dan pemisahan rantai DNA secara otomatis oleh DNA polimerase. Penelitian ini menggunakan 4 buah primer yang mengenal daerah spesifik dengan 3 daerah di masing-masing ujung fragmen DNA-nya. Primer tersebut adalah *Forward Inner Primer* (FIP) yang terdiri atas sekuen komplementer F1 diujung 5', *linker* TTTT dan sekuen F2 diujung 3'. *Forward Outer Primer* (F3) merupakan sekuen F3. *Backward Inner Primer* (BIP) yang terdiri atas sekuen komplementer B1 di ujung 5', *linker* TTTT dan sekuen B2 di ujung 3'. *Backward Outer Primer* (B3) merupakan sekuen B3 yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Jenis primer yang digunakan pada LAMP

Menurut Notomi *et al.* (2000), reaksi LAMP terdiri dari 3 tahap yaitu tahap produksi material (*starting material producing*), tahap amplifikasi siklus (*cycling amplification step*), tahap perpanjangan dan siklus berulang (*elongation and recycling step*).

Notomi *et al.* (2000), menyatakan bahwa primer yang dirancang untuk LAMP sangat spesifik sehingga ketika ingin melakukan identifikasi jenis kelamin harus dilakukan desain primer lagi untuk spesies yang ingin diketahui jenis kelaminnya, akan tetapi pada tahun 2017 Cuadros *et al.* membuktikan bahwa primer dari satu spesies dapat mengamplifikasi dan mengidentifikasi jenis kelamin spesies lain yang berada dalam satu bangsa, hal ini disebabkan karena menurut antara spesies dalam satu bangsa memiliki basa yang mirip`

D. Passeriformes

Bangsa Passeriformes atau yang disebut *Passerin* yang juga dikenal sebagai burung pengicau (*perching birds*) merupakan bangsa burung terbesar dengan keanekaragaman mencapai 59% yang mewakili setengah dari spesies burung yang ada saat ini (Baker *et al.*, 1999). Passeriformes memiliki kurang lebih 5.300 spesies burung dari total 10.000 spesies burung yang ada saat ini. Menurut jumlah Passeriformes di Australia dan Selandia Baru mencapai 382 dalam 39 suku.

Spesies Passeriformes yang terkecil yaitu *Psaltria exilis* dengan total panjang 8cm dan terbesar yaitu *corax principalis* dengan total panjang 64 cm dan bobot tubuh 1,7 kg (Higgins *et al.*, 2001). Burung ini tersebar

diseluruh dunia kecuali benua Antartika dan memiliki keanekaragaman paling tinggi (Edwards dan Harshman, 2008).

Burung yang termasuk dalam bangsa Passeriformes adalah salah satu burung yang paling mudah ditemui karena persebarannya yang luas.. Menurut Price dan Birch, (1996), kurang lebih 60% spieces yang termasuk dalam burung Passeriformes atau *Passerin* merupakan monomorfik secara seksual berdasarkan warnanya. Selain itu, perbedaan yang terlalu sedikit pada anakan burung Passeriformes yang bersifat dimorfik secara seksual menyebabkan sulitnya dilakukan identifikasi jenis kelamin. Hal ini menyebabkan kurangnya data mengenai *sex ratio* di alam, terlebih saat burung-burung muda tersebut akan meninggalkan sarangnya sebelum diketahui jenis kelaminnya.

Salah satu marga didalam bangsa Passeriformes ini adalah marga *Pycnonotus* dari suku *Pycnonotidae* yang terdiri dari 45 speies, yang diantaranya hidup berkelompok dan berbagi sumber makanan, serta sering dijumpai di lahan pertanian, hutan sekunder dan hutan yang terdegradasi . Nama internasional dari burung marga ini adalah Bulbul atau dalam Bahasa Indonseia sering disebut dengan jenis cucak-cucakan (Kamtaeja *et al.*, 2012). Bulbul (jenis cucak-cucakan) tersebar luas di wilayah Asia, terutama Asia Selatan dan Asia Utara yang memiliki hutan tropis dan memiliki keanekaragaman vegetasi yang tinggi (Fishpool dan Tobias, 2005).

Persebaran burung dari marga *Pycnonotus* dapat dijumpai di Indonesia yaitu di daerah Sumatra, Kalimantan, Jawa, dan Bali adalah jenis cucak kutilang (*P. aurigaster*), merbah cerucuk (*P. goiavier*), cucak rowo (*P. zeylanicus*), cucak gunung (*P. bimaculatus*), cucak kuricang (*P. atriceps*) dan jenis lainnya (Ayat, 2011). Tiga spesies yang digunakan dalam penelitian ini dua diantaranya dapat ditemukan di pasaran dengan harga yang murah. Spesies yang digunakan yaitu cucak kutilang (*P. aurigaster*), merbah cerucuk (*P. goiavier*), dan cucak rowo (*P. zeylanicus*).

E. Hipotesis

1. Metode amplifikasi PCR dan LAMP mampu mengidentifikasi jenis kelamin burung Passeriformes pada semua individu sampel
2. Metode amplifikasi menggunakan PCR merupakan metode yang efektif untuk identifikasi jenis kelamin secara molekuler pada bangsa Passeriformes dengan presentase 100%
3. Primer yang dirancang dari jenis *Passer montanus* dapat digunakan untuk amplifikasi jenis spesies lain pada bangsa Passeriformes .