

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Faktor-Faktor Penyebab Penurunan Populasi

Menurut Caughley (1977), Caughley dan Gunn (1996) dalam laporan Innes (2009), penurunan populasi berpotensi terhadap kepunahan jika jumlah individu yang hilang baik melalui kematian maupun emigrasi jauh lebih tinggi daripada jumlah individu yang didapat melalui kelahiran dan imigrasi. Habitat yang hilang dan rusak merupakan penyebab utama penurunan populasi satwa burung, namun penyebab lainnya dalam skala yang lebih kecil juga turut serta mengurangi populasi dengan mengurangi jumlah individu di dalam populasi.

Perburuan yang berlebihan, introduksi predator, kompetitor, perubahan iklim dan penyakit telah terbukti turut serta menyebabkan berkurangnya populasi burung (Innes, 2009). Contohnya adalah New Zealand, New Zealand merupakan daerah yang terkenal dengan sejarah kehilangan spesies burung. Sejak kedatangan manusia, New Zealand kehilangan sepertiga dari spesies burung asli, 41% adalah burung endemik. Kehilangan terbesar terjadi di *North Island* yaitu sebesar 52% dan *South Island* sebesar 47% yang merupakan tempat predator mamalia dan kompetitor diintroduksi (Holdaway dkk., 2001; Worthy & Holdaway, 2002).

Penurunan populasi burung di Indonesia menurut Setio dan Takandjandji (2007), selain disebabkan oleh penurunan kualitas habitat juga disebabkan oleh perburuan liar yang berlebihan sehubungan meningkatnya permintaan pasar, lemahnya pengamanan, pengawasan, penerapan sanksi hukum, serta rendahnya

kesadaran masyarakat tentang konservasi, turut mengakibatkan penurunan populasi burung.

Parasit dan penyakit memberikan kontribusi kecil terhadap penurunan populasi burung di seluruh dunia jika dibandingkan dengan predasi dan kekurangan makanan (Newton, 1998). Dampak dari parasit dan penyakit terhadap penurunan populasi mungkin meningkat akibat interaksi manusia terhadap habitat dan lingkungan dikombinasikan dengan translokasi (introduksi) burung antarpopulasi (Deem dkk., 2001). Contohnya adalah kepunahan burung di Hawaii, yaitu malaria burung yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium relictum capistranae* mengurangi jumlah burung asli yang mendiami hutan-hutan di Hawaii di bawah ketinggian 1500 m (van Riper dkk., 1986).

B. Malaria Burung

Hemosporidia penyebab malaria burung adalah kelompok mikroskopik intraselular parasit protozoa yang ditemukan dalam sel darah dan jaringan dari inang unggas. *Plasmodium* dan *Haemoproteus* (Filum: Apicomplexa; Bangsa: Haemosporida; Suku: Plasmodiidae) umumnya ditemukan pada burung liar, menginfeksi spesies yang sangat rentan dan menyebabkan kematian pada kelompok yang sudah tua (Atkinson & van Riper, 1991). Hemosporidia disebarkan dari burung yang terinfeksi ke burung yang tidak terinfeksi melalui perantaraan vektor serangga seperti beberapa jenis *biting flies*, nyamuk, *ceratopogonid flies (sand flies)* dan *louse flies* (Atkinson, 1993).

1. *Plasmodium* spp.

Plasmodium yang menginfeksi burung memiliki morfologi dan ciri-ciri perkembangan yang sama dengan parasit dari Marga *Haemoproteus* dan *Leucocytozoon* tapi dibedakan karena adanya reproduksi aseksual (merogony) pada eritrosit yang beredar dalam darah (Atkinson dkk., 2008). *Plasmodium* disebarkan oleh nyamuk betina, umumnya dari Marga *Culex* tersebar di seluruh daerah di dunia kecuali di Antartika, dan memiliki kisaran inang yang luas. Infeksi *plasmodium* dilaporkan terjadi pada semua Bangsa burung dengan pengecualian pada Struthioniformes (*ostriches*), Coliiformes (*mousebirds*), dan Trogoniformes (*trogons* dan *quetzals*) sedangkan keanekaragaman *Plasmodium* paling besar ditemukan dari Bangsa Galliformes, Columbiformes, dan Passeriformes (Valkiunas, 2005). Gambar nyamuk *Culex pipiens* disajikan pada Gambar 1.



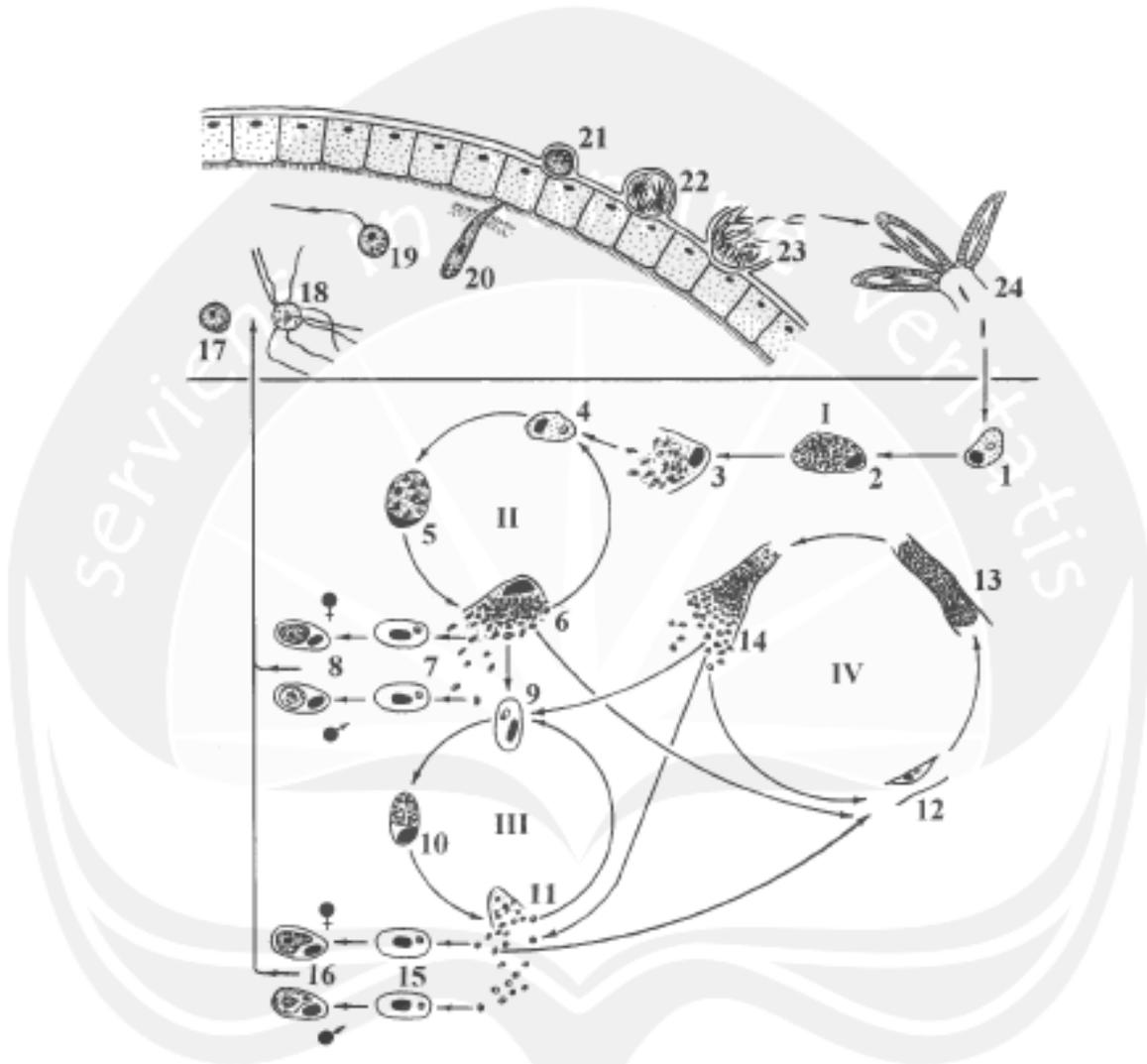
Gambar 1. Nyamuk *Culex pipien* (Sumber: Gutsevich dkk., 1970).
Keterangan : Vektor parasit *Plasmodium* spp.

Daur hidup *Plasmodium* diketahui dari percobaan yang dilakukan oleh Clay Haff dan kawan-kawannya ketika menginfeksi *Plasmodium gallinaceum* pada ayam dan beberapa burung (Atkinson dkk., 2008). Daur ini dimulai ketika infeksi sporozoites diinokulasi oleh vektor nyamuk ke inang yang rentan (Huff & Coulston, 1944). Sporozoites kemudian menyerang macrophages dan fibroblast burung, menjalani generasi awal dari reproduksi aseksual (merogony) sebagai cryptozoites. Cryptozoites menjadi dewasa dalam waktu kira-kira 36-48 jam dan melepaskan ovoid merozoites yang menyerang sel-sel lymphoid sistem macrophages di otak, getah bening, ginjal, paru-paru, dan jaringan hati untuk memulai generasi kedua dari merogony yaitu sebagai metacryptozoites (Valkiunas, 2005).

Metacryptozoites dewasa melepaskan merozoites yang mampu menyerang eritrosit yang beredar dalam darah dan sel-sel endothelium kapiler organ-organ utama tubuh. Metacryptozoites yang pertama dari merogony menjalani tahap infeksi *preerythrocytic*. Merozoites yang terus sampai generasi ketiga dari merogony di jaringan tetap inang disebut phanerozoites. Segera sesudah menyerang sel-sel endothelium kapiler dan memulai reproduksi aseksual, merogony menjadi *exoerythrocytic* meront (Valkiunas, 2005).

Menurut Valkiunas (2005), merozoit yang terlepas dari *exoerythrocytic* meronts dapat menyerang eritrosit yang beredar dalam darah atau menyerang kembali sel-sel endothelium untuk melanjutkan generasi tambahan merogony di dalam jaringan tetap. Merozoites yang menyerang eritrosit kemudian menjadi merogony dan berkembang selama 24-48 jam menjadi meronts dewasa yang

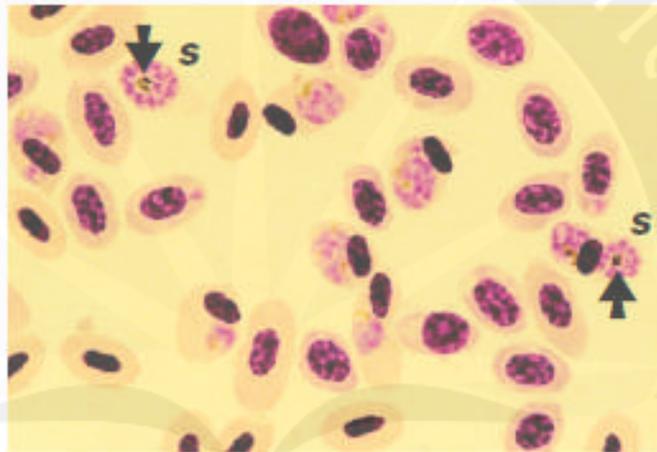
mengandung 8-32 ovoid merozoites atau *gametocytes* yang bersifat infeksi terhadap vektor nyamuk. Daur hidup parasit malaria disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Daur hidup *Plasmodium relictum* (Sumber: Valkiunas, 2005).

Keterangan : Bagian atas di dalam vektor; bagian bawah di dalam burung: I, II – *exoerythrocytic* merogony pertama; III – *erythrocytic* merogony; IV – *exoerythrocytic* merogony kedua; 1 – sporozoite di sel reticuloendothelial; 2, 3 – *cryptozoites*; 4 – merozoite dalam *macrophage*; 5, 6 – *metacryptozoites*; 7 – merozoites dalam *erythrocyte*; 8 – *gametocytes*; 9 – merozoite dalam *erythrocyte*; 10, 11 – *erythrocytic* meronts; 12 – merozoite dalam sel endothelial kapiler; 13, 14 – *phanerozoites*; 15 – merozoites dalam eritrosit; 16 – *gametocytes*; 17 – *macrogamete*; 18 – *exflagellasi* *microgametes*; 19 – fertilisasi *macrogamete*; 20 – *ookinete* menembus membran *peritrophic*; 21 – *oocyst* muda; 22, 23 – *sporogony*; 24 – *sporozoites* dalam kelenjar ludah vektor.

Menurut Valkiunas (2005), burung yang telah terinfeksi malaria menunjukkan gejala anemia, lesu, *anorexic*, bulu-bulu yang berdiri dan bahkan *hematocrits* yang turun sampai 50%. Semua anggota dari Marga *Plasmodium* membentuk granula berwarna coklat keemasan atau pigmen hitam pada hemoglobin inang yang diserang. Darah burung yang terinfeksi *Plasmodium* di sajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Darah terinfeksi *Plasmodium relictum*
(Sumber: Rebecca & Milton, 1999)

Keterangan : Tahapan aseksual, schizonts (S). Granula ditunjukkan panah hitam.

2. *Haemoproteus* spp.

Haemoproteus tersebar luas pada daerah beriklim sedang dan tropis (Valkiunas, 2005). Luasnya penyebaran *Haemoproteus* kemungkinan besar disebabkan oleh kemampuan vektor yaitu *biting midges* (Diptera: Ceratopogonidae) (Gambar 4) dan *hippoboscid flies* (Hippoboscidae) (Gambar 5) untuk dapat hidup pada habitat yang berbeda-beda (Greiner dkk., 1975).



Gambar 4. *Biting midges*
(Sumber: Gutsevich, 1973)



Gambar 5. *Hippoboscid flies*
(Sumber: Krylov, 1994)

Keterangan : Vektor parasit *Haemoproteus* spp.

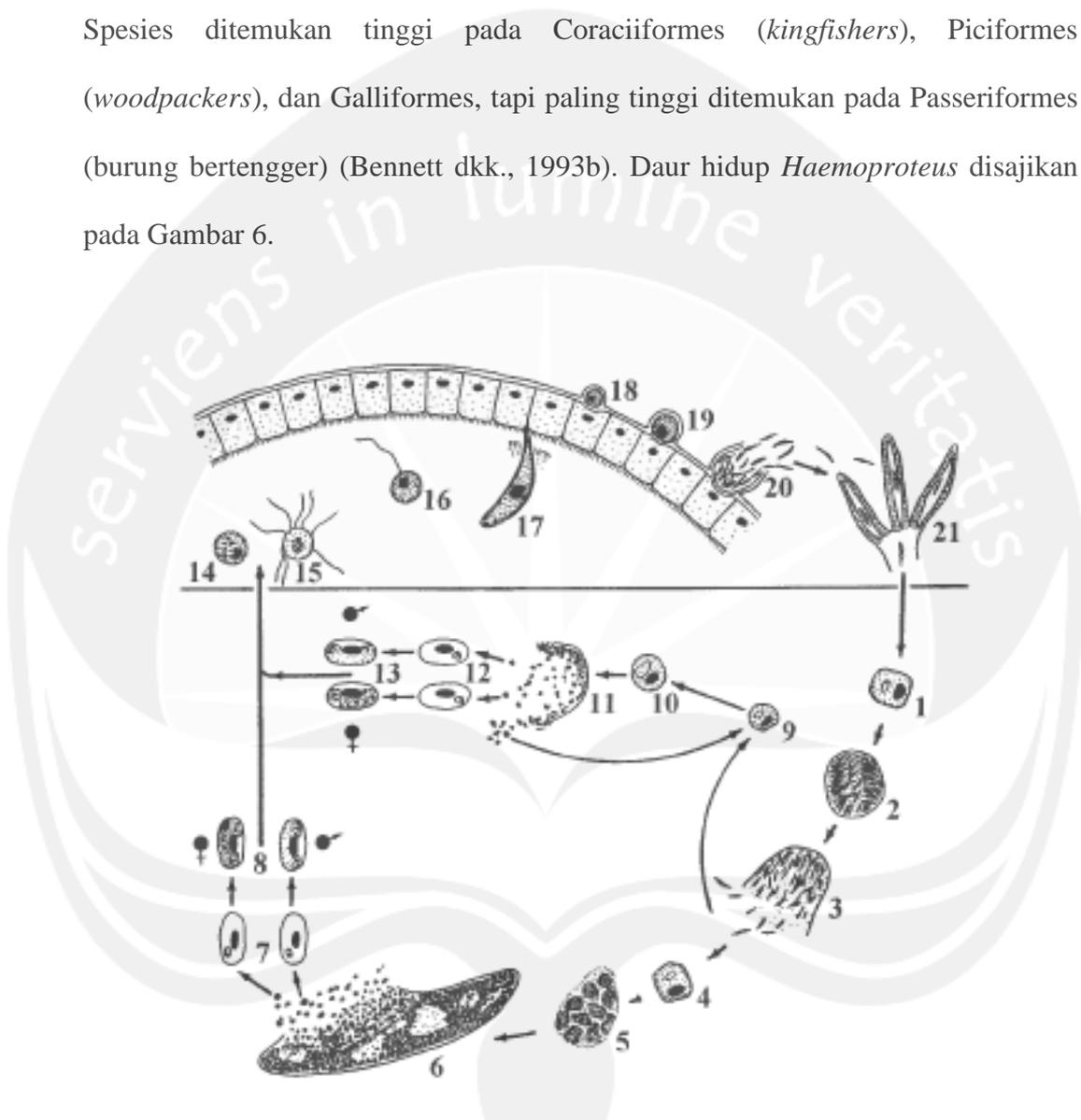
Daur hidup *Haemoproteus* terdiri dari reproduksi seksual (gametogenesis dan fertilisasi) dan aseksual (sporogony) di dalam vektor dan reproduksi aseksual (merogony) pada burung inang (Valkiunas, 2005). Daur seksual terjadi ketika darah yang mengandung parasit yang telah matang secara seksual yakni makrogamet betina dan mikrogamet jantan terambil oleh vektor dari inang yang telah terinfeksi. Tahap seksual menjadi gametogenesis dan fertilisasi terjadi di dalam perut vektor dan memproduksi zigot motil yang disebut ookynete. Ookynete kemudian menembus dinding perut dan berkembang di lapisan dasar perut (lamina basal) sebagai spherical oocysts selama daur aseksual sporogonic. Oocysts kemudian pecah dan melepaskan sporozoites ke dalam haemocoel serangga. Sporozoites yang terlepas menyerang kelenjar ludah dan keluar melalui saluran ludah (*salivary duct*) selama proses makan vektor (Atkinson dkk., 2008).

Sporozoites terinjeksi ke dalam sirkulasi darah burung oleh vektor selama proses makan, mengawali perkembangan dari *exoerythrocytic* meronts. Meronts seringkali ditemukan banyak terdapat di paru-paru dan dalam jumlah lebih sedikit

pada hati, limpa, ginjal, jantung, *skeletal musculature* dan organ-organ lainnya. Selama perkembangannya, meronts dapat terbagi menjadi beberapa bagian yang terpisah (cytomeres) dan mengandung beberapa nuclei. Beberapa spesies megalomeronts berkembang di sel-sel endothelial dari kapiler darah dan di myofibroblast dari *skeletal musculature* dan otot jantung. Megalomeronts secara signifikan berukuran lebih besar dari meronts yang terdapat di paru-paru. Jumlah generasi dari *exoerythrocytic* meronts yang mengawali penampakan *gametocytes* tidak pernah kurang dari dua. Paling tidak dua generasi *exoerythrocytic* meronts dari *H. mansoni* berkembang di *skeletal musculature* dan otot jantung (Valkiunas, 2005).

Generasi pertama dari meronts berkembang di endothelium kapiler darah dan endothelium myofibroblasts. Meronts kemudian mencapai diameter 20 μm dan memproduksi merozoites yang diperpanjang kira-kira 5 sampai 6 μm . Perkembangan dari generasi pertama meronts selesai ketika mendekati 5 hari setelah infeksi. Merozoites yang diperpanjang menginduksi merogony kedua pada sel-sel endothelial kapiler darah, endothelial myofibroblasts dan peningkatan jumlah meronts pada sel-sel *reticular* di limpa. Meronts generasi kedua (megalomeronts) mencapai tahap dewasa kira-kira 17 hari setelah infeksi dan memiliki beberapa merozoites bentuk bundar dengan diameter kira-kira 1 μm . Merozoites yang berkembang di megalomeronts melakukan penetrasi ke dalam eritrosit dan berkembang menjadi *gametocytes* yang siap menginfeksi vektor pemakan darah berikutnya (Valkiunas, 2005).

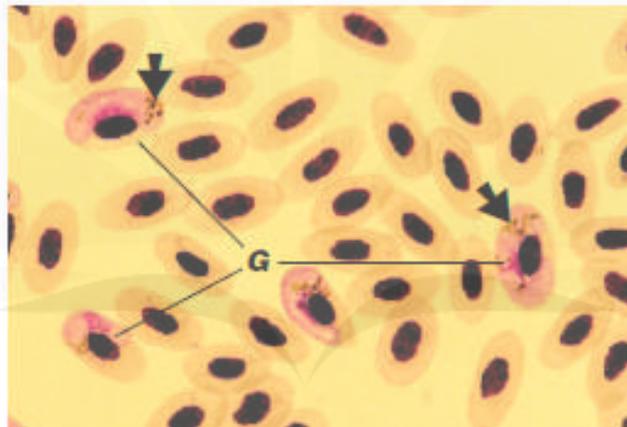
Lebih dari 130 Spesies *Haemoproteus* dilaporkan telah menginfeksi 72 Suku burung (Peirce, 2005; Valkiunas, 2005). Keanekaragaman morfologi dan Spesies ditemukan tinggi pada Coraciiformes (*kingfishers*), Piciformes (*woodpeckers*), dan Galliformes, tapi paling tinggi ditemukan pada Passeriformes (burung bertengger) (Bennett dkk., 1993b). Daur hidup *Haemoproteus* disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Daur hidup *Haemoproteus mansonii* (Sumber: Valkiunas, 2005).

Keterangan : Bagian atas di dalam vektor; bagian bawah dalam burung: 1 – sporozoite dalam sel endothelial; 2, 3 – *exoerythrocytic* meronts generasi pertama dengan merozoites menjulur; 4 – merozoite dalam sel endothelial; 5, 6 – megalomeronts dewasa bertumbuh dalam otot *skeletal*; 7 – merozoites dalam eritrosit; 8 – *gametocytes* dewasa; 9 – merozoite dalam sel endothelialreticulo pada limpa; 10, 11 – meronts dewasa dan sedang bertumbuh dalam limpa; 12 – merozoites dalam eritrosit; 13 – *gametocytes* dewasa; 14 – *macrogamete*; 15 – exflagellasi *microgametes*; 16 – fertilisasi *macrogamete*; 17 – ookinete menembus membran *peritrophic*; 18 – oocyst muda ; 19, 20 – sporogony; 21 – sporozoites dalam kelenjar luda vektor.

Haemoproteus dilaporkan tidak ditemukan di banyak burung berbangsa primitif, tapi sangat umum dijumpai pada Passeriformes. Beberapa perbedaan ini secara jelas berhubungan dengan kelimpahan dan distribusi vektor. Prevalensinya rendah pada burung laut dan burung pantai. Kondisi ini disebabkan karena keterbatasan jelajah lalat *hippoboscid* atau *ceratopogonid* (Mendes dkk., 2005), dan mungkin juga berhubungan dengan perbedaan resistensi dan immunitas inang (Ricklefs, 1992; Sol dkk., 2003). Gambar darah terinfeksi *Haemoproteus* dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Darah terinfeksi *Haemoproteus meleagridis*.
(Sumber: Rebecca & Milton, 1999)

Keterangan : *Gametocytes* (G) berisi satu nukleus merah muda. Granula pigment hitam atau coklat keemasan ditunjuk panah hitam.

C. Metode Deteksi Malaria Burung

Diagnosis parasit malaria burung dapat dilakukan secara langsung dan tidak langsung. Diagnosis secara langsung dilakukan dengan mengidentifikasi parasit malaria burung dalam darah menggunakan mikroskop atau dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Diagnosis secara tidak langsung dilakukan

dengan mengidentifikasi keberadaan antibody di dalam tubuh burung menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) atau *Western Blotting*. Diagnosis secara tidak langsung jarang digunakan untuk penelitian prevalensi malaria burung karena tidak mampu untuk mengidentifikasi keberadaan parasit malaria burung pada burung yang belum membentuk antibodi di dalam tubuh (Atkinson, 2005).

Metode mikroskopik melalui pewarnaan darah dan metode PCR umum digunakan untuk diagnosis parasit malaria burung. Penggunaan Metode mikroskopik dalam diagnosis parasit malaria burung dinilai kurang memberikan hasil yang maksimal karena metode ini sangat sulit untuk mendeteksi keberadaan parasit dengan intensitas yang rendah. Sedangkan metode PCR dinilai lebih sensitif karena hanya mengamplifikasi bagian spesifik DNA parasit, namun demikian untuk memastikan jenis parasit perlu dilakukan sekuensing DNA (Atkinson dkk., 2001).

1. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Penelitian parasit malaria, haemosporidian mengalami peningkatan dalam 10 tahun belakangan terutama penelitian menyangkut ekologi dan evolusi. Hal ini dikarenakan penemuan teknologi yang memudahkan peneliti untuk mempelajari parasit malaria burung. Teknologi tersebut adalah menggunakan teknik PCR dari sampel DNA darah burung (Bensch dkk., 2009).

Menurut Yuwono (2006), PCR adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens 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 spesifik.

Metode PCR dapat melipatgandakan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit (Yuwono, 2006). Empat komponen utama pada proses PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) oligonukleotida *primer*, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (25 – 25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polymerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi rantai DNA. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa *buffer* (Yuwono, 2006).

Reaksi melipatgandakan suatu fragmen DNA dimulai dengan melakukan denaturasi DNA *template* (cetakan) sehingga rantai DNA yang berantai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan panas ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$) selama 1 – 2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ sehingga *primer* akan “menempel” (*annealing*) pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. *Primer* akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen *primer*. Menurut Yuwono (2006), proses *annealing* biasanya dilakukan selama 1 – 2 menit. Suhu inkubasi kemudian dinaikkan menjadi $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 1,5 menit, pada suhu ini DNA polymerase akan melakukan proses polimerisasi rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada pada daerah cetakan. DNA rantai ganda yang terbentuk selanjutnya akan

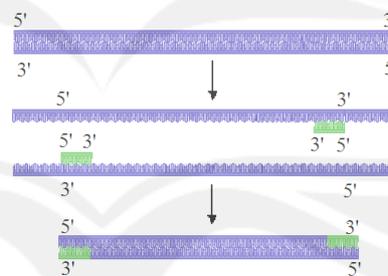
didenaturasi lagi dengan menaikkan suhu inkubasi menjadi 95 °C. Rantai DNA yang baru terbentuk selanjutnya akan berfungsi sebagai cetakan bagi reaksi polimerisasi berikut.

Reaksi-reaksi diulang sampai 25 – 30 kali (siklus). Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target di dalam campuran reaksi, akan tetapi, pada umumnya konsentrasi DNA polimerisasi *Taq* menjadi terbatas setelah 25 – 30 siklus amplifikasi (Sambrook dkk., 1989).

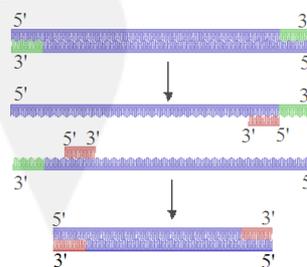
2. *Nested* PCR

Nested PCR merupakan variasi dari PCR yang menggunakan 2 pasang *primer* untuk mengamplifikasi fragmen DNA. Tahapan skematis *nested* PCR disajikan pada Gambar 8.

PCR tahap 1



PCR tahap 2



Gambar 8. Skema proses *nested* PCR.

(Sumber: Wheeler R., 2005. Telah dimodifikasi)

Keterangan : *Primer* pertama berwarna hijau; *nested primer* berwarna merah.

Pasangan *primer* pertama mengamplifikasi fragmen DNA dengan cara kerja yang mirip dengan PCR pada umumnya sedangkan pasangan *primer* kedua atau *nested primer* akan mengamplifikasi fragmen DNA dari produk PCR pertama sehingga hasil fragmen yang diperoleh lebih pendek dari yang pertama (Anonim, 2009). Kelebihan menggunakan *nested PCR* adalah jika terdapat fragmen yang salah teramplifikasi maka kemungkinan bagian tersebut diamplifikasi untuk kedua kalinya oleh *primer* yang kedua sangat rendah, oleh karena itu *nested PCR* lebih spesifik dalam melakukan amplifikasi.

Beberapa contoh aplikasi penelitian malaria burung menggunakan pendekatan *nested PCR* antara lain, penelitian untuk mendeteksi sporozoit parasit Hemosporidian di peripheral darah burung liar (Valkiunas dkk., 2005), penelitian tentang ancaman potensial malaria burung terhadap pingwin Galapagos (*Spheniscus mendiculus*) (Miller dkk., 2001), kemudian penelitian koamplifikasi fragmen DNA parasit *Leucocytozoon* (Cosgrove dkk., 2006), serta perbandingan identifikasi Hemosporidian menggunakan analisis morfologi dan molekuler yang dilakukan oleh Martinsen dan kawan-kawan (Martinsen dkk., 2006). Penelitian di Indonesia yang juga menggunakan metode *nested PCR* antara lain penelitian untuk mengetahui tingkat prevalensi malaria burung pada populasi liar Gelatik Jawa (*Padda oryzativa*) (Yuda, 2009) dan prevalensi malaria Burung Madu Sriganti (*Cinnyris jugularis*) (Rakan, 2010).

3. Gen Sitokrom *b*

Rangkaian informasi genetik yang terkandung di dalam DNA mitokondria dilaporkan dapat menggambarkan karakteristik suatu populasi, filogenetik dan memungkinkan untuk merekonstruksi sejarah evolusi (Avice dkk., 1987; Espin, 1992; Lessinger dkk., 2000). Gen sitokrom *b* merupakan salah satu gen yang terdapat di dalam genom mitokondria yang banyak digunakan untuk analisis molekuler. Gen sitokrom *b*, berisi perkembangan posisi kodon yang cepat dan yang lambat, sehingga terdapat bagian yang bersifat konservatif dan bagian yang berubah-ubah (Farias dkk., 2001). Menurut Esposti dkk. (1993), gen sitokrom *b* dapat dipertimbangkan sebagai salah satu gen yang paling berguna untuk penelitian filogenetik.

Protokol PCR pertama yang menjadi dasar penelitian parasit malaria burung (Feldman dkk., 1995), adalah protokol yang didisain untuk amplifikasi parasit *Plasmodium* dari burung-burung di Hawaii menggunakan primer 18S rRNA. Namun protokol ini secara umum tidak digunakan lagi karena hanya mampu mengenali kelompok kecil parasit *Plasmodium* (Bensch dkk., 2009).

Setelah diketahui bahwa gen sitokrom *b* dari genom mitokondria parasit Apicomplexa memiliki bagian konservatif untuk konstruksi tempat primer dengan bagian DNA yang berubah-ubah antara daerah konservatif yang membuatnya cocok untuk deteksi dan identifikasi kekerabatan antara *Haemoproteus* dan *Plasmodium* (Waldenstrom dkk., 2004), maka protokol PCR untuk penelitian parasit malaria burung mulai menggunakan *primer* untuk amplifikasi gen sitokrom *b*.

Protokol PCR yang menggunakan *primer* gen sitokrom *b* dari DNA mitokondria dipublikasikan pertama kali oleh Bensch dkk., (2000). Protokol ini bersama dengan protokol yang telah sedikit dimodifikasi (Hellgren dkk., 2004; Waldenstrom dkk., 2004) merupakan protokol yang paling umum digunakan. Lebih dari 60 publikasi berikutnya telah menggunakan gen sitokrom *b* parasit hemosporidian untuk mempelajari Taxonomi, Sistematika, Ekologi, Biogeografi dan Evolusi parasit malaria burung (Bensch dkk., 2009).

4. Desain *Primer*

Primer didisain dari ujung 5' gen sitokrom *b* genom mitokondria parasit yang diperoleh dari sekuen avian *Haemoproteus* dan *Plasmodium* (Perkins & Schall, 2002). Pasangan *primer* yang mengamplifikasi daerah konservatif dari *Haemoproteus* dan *Plasmodium* sebelumnya telah dikembangkan oleh Lund (Bensch dkk., 2000; Waldenstrom dkk., 2004). Dalam protokol asli (Bensch dkk., 2000), *primer* HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') dan HaemR₂ (5'-CGATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') digunakan untuk mengamplifikasi 480-bp fragmen dengan *single* PCR. Performa dari PCR ini meningkat secara signifikan, terutama untuk mendeteksi infeksi *Plasmodium* yang memiliki intensitas rendah dengan cara memperpanjang *single* PCR menjadi *nested* PCR. *Primer* HaemNF₁ (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') dan HaemNR₃ (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') digunakan untuk mengawali amplifikasi fragmen dengan panjang 617-bp (termasuk *primer*), yang kemudian dilanjutkan dengan *primer* HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3')

dan HaemR₂ (5'CGATTATCTGGAGTGATAATGGT-3') pada tahap PCR selanjutnya (Hellgren, 2004).

5. Ekstraksi DNA Metode *Phenol Chloroform*

Cara klasik dan masih sering digunakan untuk ekstraksi DNA adalah menggunakan larutan fenol atau terutama gabungan antara fenol dan kloroform. Menurut Dale dan Schantz (2003) fenol dan kloroform tidak dapat larut dalam air, oleh karena itu akan terdapat dua lapisan (fase) ketika menggunakan fenol dan kloroform dalam ekstraksi sel. Mengguncangkan campuran dengan cepat menyebabkan protein terdenaturasi dan terpresipitasi pada interfase. Ekstraksi menggunakan fenol dengan pH netral atau *buffer* basa (alkali) menyebabkan asam nukleat (DNA dan RNA) tertinggal pada fase cair, sebaliknya jika ekstraksi dengan fenol suasana asam maka, DNA akan tersekat di fase organik dan RNA pada fase cair. Fenol secara alami bersifat asam sehingga menyeimbangkannya dengan air atau dengan menggunakan *buffer* asam menciptakan kondisi yang sesuai (Dale & Schantz, 2003).

6. Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul bermuatan melalui medium larutan atau *gel* dalam pengaruh medan listrik. Molekul yang bermuatan jika diletakkan di medan listrik maka molekul tersebut akan bergerak ke medan elektroda yang berlawanan, molekul asam nukleat bermuatan negatif sehingga akan bergerak menuju ke kutub positif (anoda). *Gel* memiliki jaringan pori-pori yang kompleks, kecepatan gerak molekul asam nukleat ditentukan oleh

kemampuan molekul menembus jaring-jaring *gel*. Ukuran jarak efektif *gel* ditentukan oleh komposisinya. *Gel* agarosa digunakan untuk memisahkan asam nukleat yang lebih besar dari beberapa ratus pasangan basa, mengurangi konsentrasi agarosa untuk pemisahan fragmen besar dan meningkatkannya untuk fragmen kecil (Dale & Schantz, 2003).

Menurut Dale dan Schantz (2003), elektroforesis *gel* agarosa dapat digunakan untuk menganalisis kualitas *sample* asam nukleat, terutama menentukan ukuran fragmen DNA hasil restriksi dan juga produk PCR, untuk itu kalibrasi *gel* perlu dilakukan dengan cara *running* standar *marker* yang telah diketahui ukurannya. Standar *marker* yang digunakan merupakan hasil pemotongan DNA bakteriofage lambda oleh enzim restriksi *hindIII*. Hasil *running* standar *marker* menunjukkan ukuran fragmen DNA. Terdapat hubungan linier antara logaritma dari ukuran fragmen DNA dan jarak pergerakannya, dengan melakukan kalibrasi grafik estimasi ukuran fragmen DNA bisa diketahui (Dale & Schantz, 2003).

D. Burung Bondol Jawa (*Lonchura leucogastroides*)

Bondol jawa (*Lonchura leucogastroides*) bertubuh padat berukuran kecil (11 cm), berat 9-10 gr, berwarna coklat hitam dan putih. Tubuh bagian atas coklat tidak berburik, muka dan bagian dada atas hitam bagian samping perut dan bagian rusuk putih bagian bawah ekor coklat gelap. Bondol Jawa (*Lonchura leucogastroides*) dibedakan dari *L. leucogastra* karena tidak terpulas burik pucat di punggung, tidak mempunyai warna kuning pada bagian ekor, kontras tajam antara dada hitam perut putih dan rusuk putih bukan coklat. Iris dan paruh

berwarna coklat, kaki abu-abu (MacKinnon, 1993). Gambar burung Bondol Jawa disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Burung Bondol Jawa (*Lonchura leucogastroides*)
(Sumber: Maruly, 2011)

Keterangan : Bondol Jawa (*Lonchura leucogastroides*) pantai Trisik.

Taksonomi Bondol Jawa (*Lonchura leucogastroides*) adalah sebagai berikut (Gill dkk., 2006),

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Aves
Bangsa	: Passeriformes
Suku	: Estrildidae
Marga	: <i>Lonchura</i>
Jenis	: <i>Lonchura leucogastroides</i> (Horsfield & Moore, 1858)
Nama Daerah	: Bondol Jawa, Javan Munia

Penyebaran meliputi Singapura, Sumatera Selatan, Jawa, Bali dan Lombok. Bondol Jawa (*Lonchura leucogastroides*) di daerah Jawa dan Bali umum ditemui dan tersebar luas sampai ketinggian 1.500 meter di atas permukaan laut, mengunjungi daerah garapan dan padang rumput alami, membentuk kelompok pada masa panen padi tetapi biasanya hidup berpasangan atau dalam kelompok kecil. Bondol Jawa (*Lonchura leucogastroides*) makan di permukaan tanah atau mengambil biji dari bulir rumput, menghabiskan banyak waktu dengan bersiul dan membersihkan bulunya di pohon-pohon besar. Sarang berbentuk bola berongga longgar terbuat dari potongan rumput dan bahan lain, diletakkan cukup tinggi di atas pohon di antara benalu, ketiak tangkai palem atau tempat tertutup lainnya. Berbiak sepanjang tahun. Telur empat atau lima butir berwarna putih (MacKinnon, 1993).

Penelitian tentang malaria burung dari Marga *Lonchura* pernah dilakukan di Hawaii yaitu dari jenis *Lonchura Malacca* dan *Lonchura punctulata* oleh Atkinson dan Utzurrum (2010), dari hasil penelitian diketahui bahwa prevalensi malaria burung pada *Lonchura Malacca* sebesar 33,3 % dan *Lonchura punctulata* sebesar 21,7 %. Hasil penelitian lain yang dilakukan di India oleh Istiaq dkk., (2007) menunjukkan bahwa dari 11 burung *Lonchura punctulata* yang ditangkap hanya 1 individu positif terinfeksi parasit malaria burung (prevalensi 9,09 %), empat burung *Lonchura Malacca* yang ditangkap hanya 1 positif terinfeksi parasit malaria burung (prevalensi 25 %), satu burung *Lonchura malabrica* yang berhasil ditangkap tidak ditemukan parasit malaria burung (prevalensi 0%).