

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Sifat Monomorfik pada Burung

Berdasarkan Cerit dan Avanus (2007), identifikasi jenis kelamin juga dilakukan berdasar perbedaan morfologi seperti ukuran tubuh dan warna bulu. Teknik ini menemui kendala karena beragamnya karakter morfologi burung akibat perbedaan geografis dan perbedaan antar spesies burung. Kendala lain yaitu banyaknya spesies burung yang bersifat monomorfik, yaitu memiliki kemiripan karakter morfologi antara jantan dan betinanya. Spesies yang dimorfik sekalipun, hanya memiliki sedikit perbedaan yang dapat diamati. Penentuan jenis kelamin berdasarkan kenampakan morfologi, dalam beberapa kasus merupakan hal yang sulit, bahkan mustahil.

Menurut Dubiec (2006), sebagian besar aves merupakan organisme dengan sifat monomorfik. Ornitolog ahli sekalipun terkadang menemui kesulitan dalam menentukan jenis kelamin seekor burung. Contohnya, sekurang-kurangnya 60% dari seluruh ordo Passerine memiliki kenampakan warna yang sama antar jenis kelamin (*sexual monomorphism*). Lebih lanjut menurut Dubiec (2006), kesamaan karakter morfologi pada aves terlihat sangat jelas pada fase anakan burung. Anakan burung yang baru menetas pada hampir seluruh spesies burung, akan sulit ditentukan jenis kelaminnya. Ciri-ciri seksual pada burung akan terlihat beberapa minggu kemudian setelah menetas atau setelah burung tersebut melewati masa pubertas. Hal ini menyebabkan kurangnya data *sex ratio* di alam, karena burung-

burung muda tersebut telah meninggalkan sarangnya sebelum diketahui jenis kelaminnya.

### **B. Identifikasi Jenis Kelamin pada Burung Monomorfik**

Beberapa metode guna menentukan jenis kelamin pada burung sebenarnya telah ditemukan, antara lain metode *vent sexing*, laparoscopi, *steroid sexing*, *karyotyping*, dan teknik-teknik berdasarkan metode DNA (Cerit dan Avanus, 2007). Lebih lanjut menurut Cerit dan Avanus, metode *vent sexing* dipopulerkan oleh Kiyoshi Masui, professor dari Jepang. Seorang ahli *vent sexing* dapat melakukan identifikasi hingga ketepatan 95%. Namun, bagi mereka yang awam mengenai ornitologi, rata-rata hanya dapat melakukan *vent sexing* dengan ketepatan 60-70%. Metode lain berupa laparoscopi memerlukan anestesi guna melihat organ seksual burung berupa testis pada jantan dan ovarium pada betina. Organ seksual tersebut kadang tidak terlihat pada burung usia muda. Metode ini juga beresiko menyebabkan luka pada organ vital burung, dapat menyakitkan bahkan beresiko kematian.

Metode *steroid sexing* memerlukan *faeces* segar guna identifikasi jenis kelamin. Metode ini berdasarkan tingkat Esterogen/Testosterone (E/T) pada *faeces*. Burung betina memiliki rasio E/T yang lebih tinggi dibanding pada jantan, namun kadar hormon pada burung dapat berubah-ubah menurut jenis kelamin dan musim kawinnya. Metode *steroid sexing* dapat dilakukan juga pada telur, kelemahannya hormon yang terdapat pada telur tidak terdistribusi merata. Dilakukan pengamatan dari kromosom Z dan W yang dimiliki burung betina dan dua kromosom Z pada burung jantan dengan menggunakan metode *karyotyping*.

Ukuran kromosom Z lebih besar dari kromosom W. Namun metode ini selain rumit, juga memerlukan waktu yang lama (Cerit dan Avanus, 2007).

DNA dapat menjadi salah satu cara untuk membedakan antara jantan dan betina pada burung yang bersifat monomorfik, namun penanda yang cocok untuk melakukan *molecular sexing* sulit untuk ditemukan. Penanda umum yang dijadikan dasar adalah kromosom W milik betina (ZW), yang tidak dimiliki oleh jantan (ZZ) (Griffiths dkk., 1998). Burung memiliki kebalikan kromosom seks dibandingkan dengan mamalia. Burung betina memiliki heterogametik ZW dan burung jantan dengan heterogametik ZZ (Ellegreen, 1996).

### **C. Identifikasi Jenis Kelamin pada Burung dengan Metode *Molecular Sexing***

*Molecular sexing* berdasarkan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan salah satu pilihan yang menarik karena teknik ini mudah digunakan, cepat, dan hanya memerlukan sedikit sampel DNA. Sampel ini dapat diambil dari selembur bulu atau setetes darah burung (Reddy, 2007). Sampel DNA pada aves, biasanya didapatkan dari darah. Sel darah merah pada burung merupakan sumber DNA nukleus. (Dubiec, 2006). Sampel umumnya disimpan dalam 96% etanol, buffer EDTA atau *Queen's lysis buffer*. *Queen's lysis buffer* terdiri dari 10 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, dan 1% *n-lauroylsarcosine* pH 7,5 (Seutin dkk., 1991). DNA dalam etanol maupun dalam *Queen's lysis buffer* dapat bertahan beberapa tahun pada suhu ruang, atau pada suhu -20 °C sampai -80 °C untuk memperpanjang masa simpan. Sampel darah dalam *buffer* EDTA harus disimpan dalam freezer jika tidak untuk langsung digunakan (Dubiec, 2006).

Gen penanda yang telah ditemukan adalah *Chromobox-helicase-DNA-bin-*

*ding* (CHD) yang terletak di kromosom W pada aves. Gen CHD setidaknya mengandung dua intron yang panjangnya bervariasi pada kromosom Z dan kromosom W. Primer yang paling sering digunakan adalah pasangan primer P2-P8 karena mampu membedakan jenis kelamin berbagai macam spesies burung (Griffiths dkk., 1998). Dubiec (2006) menyarankan penggunaan gen CHD sebagai penanda bagi spesies-spesies burung yang belum pernah diuji jenis kelaminnya dengan teknik molekuler *sexing*. Disebutkan bahwa teknik molekuler *sexing* dengan penanda gen CHD selain akurat, cepat, dan mudah, juga relatif lebih murah dibanding teknik *sexing* lainnya.

Hasil amplifikasi PCR dengan metode *molecular sexing* berdasarkan gen penanda CHD ini akan menunjukkan jenis kelamin sampel berdasarkan jumlah pita yang terbentuk. Dubiec (2006) dalam jurnalnya menyatakan bahwa penentuan jenis kelamin lebih tepat dilakukan dengan menganalisis ukuran panjang basa pita yang teramplifikasi daripada menentukannya hanya dari jumlah pita yang terbentuk. Primer yang digunakan sebaiknya primer yang sesuai untuk spesies yang diuji. Penggunaan primer P2P8 atau 2550F-2718R lebih disarankan jika tidak ada data referensi sebelumnya,

Dubiec (2006) merangkum primer-primernya yang mampu mengidentifikasi gen CHD, yaitu antara lain :

- a. Pasangan primer P2 dengan urutan nukleotida 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' dan primer P8 dengan urutan nukleotida 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'.

- b. Pasangan primer 2550F dengan urutan nukleotida 5'GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3' dan primer 2718R dengan urutan 5'ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'.
- c. Pasangan primer 1237L dengan urutan nukleotida 5'GAGAAACTGTGCAAAACAG-3' dan primer 1272H dengan urutan nukleotida 5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'.

Ketiga pasangan primer yang digunakan telah di desain untuk mengapit fragment gen dalam intron. Umumnya, jantan diindikasikan dengan hasil amplifikasi berupa satu pita, sedangkan betina dua pita, kecuali pada beberapa spesies, pasangan 2550F-2718R hanya memproduksi satu fragmen, baik pada jantan maupun betina. Hal ini karena produk amplifikasi kromosom Z tidak dapat terdeteksi. Hal yang sama juga dapat terjadi dengan pasangan primer P2-P8 karena sekuen DNA kromosom Z lebih pendek dari milik kromosom W yang lebih mudah teramplifikasi. Betina dapat salah teridentifikasi sebagai pejantan pada kasus seperti ini, (Dubiec, 2006).

Berdasarkan penelitian Dawson (2001), dimana Dawson membandingkan hasil *sexing* menggunakan pasangan primer P2-P8 dan 2550F-2718R, tidak semua hasil amplifikasi dengan primer P2-P8 dapat divisualisasi dengan gel agarosa, sehingga digunakan gel poliakrilimida guna visualisasi. Lain halnya dengan hasil pada primer 2550F-2718R, yang dapat divisualisi dengan gel agarosa. Pasangan primer 1237L-1272H mengapit intron yang hampir sama dengan intron yang diapit oleh primer P2-P8, sehingga sarannya sama dengan penggunaan primer P2-P8. Kelebihan primer P2-P8 adalah sudah diujikan

terhadap berbagai jenis burung yang bervariasi sehingga dikenali kelemahannya seperti yang diutarakan di atas. Uji yang dilakukan terhadap primer 2550F-2718R belum sebanyak yang dilakukan kepada primer P2-P8 sehingga ada kemungkinan terdapat kelemahan yang belum terdeteksi.

Sebelas diantara 27 spesies burung yang diuji menggunakan primer P2-P8 oleh Griffith, dkk.(1998), menghasilkan dua buah pita pada sampel betina, sedangkan sisanya hanya terlihat satu pita tunggal baik pada jantan maupun betina. Panjang basanya sendiri berbeda-beda menurut spesies, tetapi pita CHD-W yang terbentuk umumnya akan memiliki ukuran basa yang lebih besar. Contoh lain adalah amplifikasi DNA berbagai jenis burung hering oleh Reddy (2007) memperlihatkan pita tunggal pada sampel jantan yang diindikasikan sebagai CHD-Z berukuran 343 bp. Sampel betina terbentuk pita berukuran 343 bp (Z) dan 386 bp (W). Amplifikasi oleh Dubiec (2006), terhadap DNA *spotted barbtail* (*Premnoplex brunnescens*), memperlihatkan pita tunggal pada jantan berukuran 380 bp. Demikian pula, hanya terbentuk pita tunggal pada betina dengan ukuran 415 bp. Amplifikasi terhadap DNA burung unta hanya menunjukkan satu pita tunggal pada betina, dan pada jantan tidak muncul pita sama sekali.

Pita tunggal pada betina yang dihasilkan oleh primer P2-P8 dikarenakan urutan CHD-Z berukuran lebih kecil daripada urutan CHD-W. Terjadi kesalahan amplifikasi pada kasus ini, yaitu CHD-Z teramplifikasi sebagai CHD-W (Fridolfsson & Ellegren, 1999). Penentuan jenis kelamin secara tepat, dapat dilihat dari ukuran pita yang terbentuk oleh amplifikasi primer P2-P8. Ukuran fragment CHD-Z lebih kecil 10-80 bp dibanding fragment CHD-W (Dawson,

2001). Selisih ukuran yang sangat kecil menyebabkan hasil tidak dapat tervisualisasi dengan baik pada gel agarose. Lebih lanjut, Dawson (2001) menyarankan penggunaan poliakrilimida terhadap hasil amplifikasi dengan primer P2P8. Vali (2002) menggunakan enzim restriksi BshNI yang akan memotong kromosom W. Uji yang dilakukan terhadap *eurasian woodcock* (burung berkik besar) memperlihatkan terbentuknya tiga buah pita pada betina dan satu pita pada jantan.

Bagian intron yang diamplifikasi oleh primer 1237L-1272H hampir sama dengan intron yang diamplifikasi oleh primer P2-P8. Beda ukuran antara pita CHD-Z dan CHD-W yang dihasilkan serupa dengan primer P2-P8, yaitu 10-80 bp dimana CHD-Z berukuran lebih besar. (Port dan Greeney, 2012). Primer ini menghasilkan fragment non-spesifik yang lebih banyak, karena itu Kahn, dkk. (1998) menyarankan penggunaan primer P2-P8 yang telah diuji pada berbagai spesies burung. Penggunaan primer 1237L-1272H oleh Port dan Greeney (2012) terhadap barbtail menghasilkan satu pita berukuran 380 bp pada jantan dan satu pita berukuran 300 bp pada betina.

Primer 2550F-2718R umumnya menghasilkan satu buah pita baik pada betina maupun jantan. Amplifikasi terhadap DNA ayam oleh Fridolfsson & Ellegren (1999), menghasilkan pita CHD-W berukuran 450 bp dan pita CHD-Z berukuran 600 bp. Ukuran ini bervariasi antar spesies, dengan kisaran ukuran 400-450 bp untuk gen CHD-W dan 600-650 bp untuk gen CHD-Z. Sama halnya dengan primer P2P8, beberapa spesies yang diamplifikasi dengan primer 2550F-2718R hanya menghasilkan satu buah pita baik pada jantan maupun betina. Hal

ini karena amplifikasi hanya terjadi terhadap gen *copy* dari kromosom W, sehingga kromosom Z tidak terdeteksi.

Lebih lanjut menurut Fridolfsson & Ellegren (1999), beda ukuran antara fragmen CHD-Z dan CHD-W adalah 150 bp sampai 250 bp dengan pita CHD-W pada betina berukuran lebih kecil. Beda ukuran yang lebih besar menyebabkan pita hasil amplifikasi dengan primer 2550F dan 2718R ini lebih mudah diamati. Contohnya adalah 3 spesies dari berbagai burung *Passerine* yang diamplifikasi oleh Fridolfsson & Ellegren hanya menghasilkan satu pita pada betina, karena tidak ada beda antara intron CHD-Z dan CHD-W. Amplifikasi oleh Port dan Greeney (2012) terhadap Barbtail, juga menghasilkan satu pita pada betina dengan ukuran 475 bp dan satu pita pada jantan dengan ukuran 600 bp atau 700 bp.

#### **D. Burung air**

Burung air adalah jenis burung yang seluruh hidupnya berkaitan dengan daerah perairan. Burung air dapat diartikan sebagai jenis burung yang secara ekologis bergantung pada lahan basah (Elfidasari dan Junarti, 2006). Burung air migran teratur bermigrasi antara Asia Timur, Khatulistiwa dan Australia, menghabiskan waktunya di wilayah lahan basah untuk mencari makan. Burung air juga mempengaruhi struktur komunitas dalam berbagai ekosistem lahan basah tersebut, sebelum kembali ke daerah berbiaknya di belahan bumi utara (Rusia, Asia Timur dan sekitarnya) maupun di belahan bumi selatan, termasuk Australia (Alamsyah dkk., 2007).

Lahan basah yang dimaksud mencakup daerah lahan basah alami dan lahan basah buatan, meliputi hutan mangrove, rawa, dataran berlumpur, danau, tam-

bak, sawah dan lain-lain. (Elfidasari dan Junarti, 2006). Menurut Alamsyah dkk. (2007), lahan basah (*wetlands*) meliputi hutan bakau (*mangrove*), hamparan lumpur (*mudflat*), rawa rumput (*grass swamp*), savana dan rawa herba, danau alam dan buatan, serta lahan basah buatan termasuk persawahan merupakan sumber keanekaragaman hayati yang penting bagi berbagai makhluk hidup dan manusia.

Kehadiran burung air merupakan indikator penting dalam pengkajian mutu dan produktivitas suatu lingkungan lahan basah (Alamsyah dkk., 2007). Kehadiran burung air dapat dijadikan indikator keanekaragaman hayati pada kawasan hutan mangrove. Hal ini berkaitan dengan fungsi daerah tersebut sebagai penunjang aktivitas hidup burung air, yaitu menyediakan tempat berlindung, mencari makan, dan tempat berkembang biak (bersarang). Kawasan hutan mangrove adalah daerah perairan yang memiliki ekosistem produktif serta merupakan daerah peralihan antara lingkungan darat dan lautan. Hutan mangrove berfungsi sebagai pelindung pantai yang dapat mengurangi dan mencegah terjadinya pengikisan daerah pantai. Hutan ini juga berperan dalam mendukung kehidupan fauna di daerah pesisir dan lautan (Davies dkk., 1996).

Pantai Trisik adalah pesisir pantai sepanjang 2,4 km di Pantai Selatan Jawa. Secara administratif, pantai ini terletak di desa Banaran, kecamatan Galur, kabupaten Kulonprogo, Yogyakarta. Pantai Trisik dikenal sebagai lokasi penting untuk pengamatan burung pantai. Pantai Trisik sendiri pertama kali di amati sekitar tahun 1990-an oleh Kutilang Indonesia Birdwatching Club, sekarang Yayasan Kutilang Indonesia (YKI). Pantai Trisik juga menjadi salah satu daerah

studi untuk *surveillance* malaria burung H5N1 di Jawa yang dilakukan oleh Departemen Kehutanan di bawah pengawasan *Indonesian Ornithologist Union* (IdOU) (Taufiqurrahman dkk., 2010).

Posisi pantai ini yang berada di dekat muara sungai Progo membuat kawasan ini sering dikunjungi oleh burung-burung air migran. Banyak jenis burung yang menggunakan Trisik sebagai habitat. Hal ini didukung oleh kawasan Trisik yang menyediakan berbagai tipe habitat bagi burung. Setidaknya ada 5 tipe habitat di Trisik meliputi tepi pantai, laguna, delta sungai (meliputi sungai dan muara sungai), persawahan dan kebun campuran. Setiap tipe habitat menyimpan keanekaragaman jenis burung yang khas dengan karakteristik masing-masing. Ancaman terhadap kelestarian burung di kawasan Trisik antara lain perburuan, konversi lahan menjadi lahan pertanian, serta penambangan pasir kali dan pasir besi. Keberadaan burung memiliki fungsi sebagai indikator perubahan lingkungan, sehingga penting untuk dilestarikan (Nugroho, 2009). Burung pantai yang kerap terlihat di kawasan ini antara lain termasuk Trinil Pantai (*Tringa/Actitis hypoleucos*), Trinil Kaki Merah (*Tringa totanus*), Cerek Jawa (*Charadrius javanicus*), Berkik Kembang Besar (*Rostratula benghalensis*), Kedidi Leher Merah (*Calidris ruficollis*) dan Bambang Kuning (*Ixobrychus sinensis*)

Trinil Pantai (*Tringa/Actitis hypoleucos*) seperti yang dapat dilihat pada Gambar 1. merupakan burung migran, yang berpindah pada musim dingin ke tempat yang lebih hangat. Spesies ini menghuni pinggiran sungai, kolam, rawa, bendungan, pinggiran pantai, dan perairan payau di lokasi yang berlainan pada



Gambar 1. Burung Trinil Pantai  
(Sumber : Kutilang Indonesia, 2012)

musim panas dan musim dingin. Makanan yang dikonsumsi antara lain larva serangga, laba-laba, moluska, udang-udangan, cacing, katak, ikan kecil serta biji-bijian. Trinil Pantai termasuk kategori *least concern* dalam daftar IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) pada tahun 2012 (IUCN, 2013).

Trinil Kaki Merah (*Tringa totanus*) seperti dapat kita lihat pada Gambar 2. memiliki kaki berwarna jingga kemerahan dan bagian pangkal paruh berwarna merah. Trinil Kaki Merah merupakan burung migrasi yang berbiak di Eropa (Juni



Gambar 2. Burung Trinil Kaki merah  
(Sumber : Kutilang Indonesia, 2012)

sampai Oktober) dan pada musim dingin (Februari sampai April) akan bermigrasi ke Asia Tenggara, Afrika dan India. Habitatnya saat bertelur adalah di daerah berlumpur, rawa, pantai, sawah dekat laut, dan tepi pantai atau sungai. Saat musim dingin, burung ini akan berpindah ke daerah pantai berpasir dan berbatu, dan perairan payau. Makanan yang dikonsumsi antara lain serangga, laba-laba, dan cacing. Trinil Kaki Merah tergolong dalam kategori *least concern* dalam daftar IUCN (IUCN, 2013).

Cerek Jawa (*Charadrius javanicus*) merupakan burung berukuran kecil, berparuh pendek, berwarna coklat dan putih. Kenampakannya dapat dilihat pada Gambar 3. Warna jantan dan betina sama. Kepala coklat kemerahan, kaki pucat,



Gambar 3. Burung Cerek Jawa  
(Sumber : Kutilang Indonesia, 2012)

dan garis dan tanpa warna hitam. Warna putih pada kerah belakang biasanya tidak menyambung (Boere, 2006). Cerek Jawa masuk ke dalam kategori *near threatened* dalam daftar IUCN (IUCN, 2013).

Berkik Kembang Besar (*Rostratula benghalensis*) seperti terlihat di Gambar 4, merupakan burung dengan ukuran sedang ( 25 cm), memiliki variasi



Gambar 4. Burung Berkik Kembang Besar  
(Sumber : Kutilang Indonesia, 2012)

bulu yang beragam dan berwarna – warni, dan tubuhnya montok dengan ekor pendek. Terdapat perbedaan warna bulu antara jantan dan betinanya. Pada betina, kepala dan dada berwarna coklat gelap, dengan bulatan putih berbentuk mata dan setrip kuning di tengah mahkota. Punggung dan sayapnya kehijauan, dengan tanda putih berbentuk “V” di atas punggung serta garis putih tebal disekitar bahu sampai tubuh bagian bawah. Jantannya berukuran lebih kecil dengan warna lebih suram, lebih banyak bercak dan sedikit warna kuning (Boere, 2006). Burung ini termasuk omnivora. Makanannya berupa serangga, siput, cacing, udang-udangan serta biji-bijian. Berkik Kembang Besar termasuk golongan *least concern* dalam daftar IUCN (IUCN, 2013).

Kedidi Leher Merah (*Calidris ruficollis*) seperti terlihat pada Gambar 5. berwarna coklat keabu-abuan dengan kaki hitam. Burung ini berbiak di Artik, dan pada musim dingin bermigrasi ke selatan menuju Asia tenggara dan merupakan pengunjung umum dan tetap di seluruh kawasan pesisir Indonesia. Habitatnya adalah di sepanjang pesisir pantai, dan sering terlihat mencari makan di daerah



Gambar 5. Kedidi Leher Merah  
(Sumber : Kutilang Indonesia, 2012)

lumpur sepanjang pantai. Kedidi Leher Merah termasuk golongan *least concern* dalam daftar IUCN (IUCN, 2013).

Bambangan Kuning (*Ixobrychus sinensis*) memiliki warna dominan kuning tua dan hitam seperti terlihat pada Gambar 6. Burung ini merupakan pemakan



Gambar 6. Bambangan Kuning  
(Sumber : Kutilang Indonesia, 2012)

ikan, ketam, kodok, serangga air, yang memiliki habitat di rumpun pandan, buluh di sungai, rawa-rawa, sawah. Bambangan Kuning masuk dalam kategori *least concern* dalam daftar IUCN. (IUCN, 2013).

### E. Metode ekstraksi sampel

Ekstraksi DNA merupakan tahapan yang sangat penting guna tahapan selanjutnya, yaitu dalam hal ini proses amplifikasi dengan primer *molecular sexing*. Ekstraksi merupakan tahapan dalam memisahkan DNA dari komponen sel lain (Sulandari, 2003). Penelitian kali ini menggunakan dua metode ekstraksi, yaitu metode standar PCE (*phenol-chloroform extraction*) dan metode perebusan berdasarkan Quintana dkk. (2008).

Ekstraksi DNA pada organisme eukariot (manusia, hewan dan tumbuhan) dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel, penghilangan protein dan RNA, dan pengendapan DNA lalu pemanenan. Prinsipnya adalah memisahkan DNA dari komponen sel lain. Berbagai teknik ekstraksi telah dikembangkan dari prinsip dasar tersebut menurut jenis sampel dan modifikasi sesuai keperluan. Beberapa metode tersebut antara lain metode standar CTAB (*cetyltrimethyl ammonium bromide*), cara dialisis, ekstraksi *chelex*, ekstraksi silika, metode tanpa fenol, metode standar PCE (*phenol-chloroform extraction*), dan metode perebusan, bahkan telah tersedia *kit* ekstraksi di pasaran yang jenisnya juga beragam. Ekstraksi DNA ini sangat penting guna tahapan selanjutnya, maka proses ekstraksi hendaknya dilakukan dengan hati-hati dan menghindari kontaminan (Sulandari, 2003).

Metode yang digunakan selama ini adalah dengan metode fenol-kloroform. Lebih lanjut menurut Sulandari (2003), secara kimiawi penghancuran sel dapat dilakukan dengan memanfaatkan senyawa kimia seperti EDTA (*ethylenediamine tetraacetic*), dan SDS (*sodium dodecyl sulfat*). EDTA berfungsi sebagai perusak

sel dengan cara mengikat ion magnesium yang berfungsi mempertahankan integritas sel dan mempertahankan aktivitas enzim nuclease yang merusak asam nukleat. SDS merupakan sejenis deterjen yang berfungsi merusak membran sel. Enzim proteinase-K digunakan untuk menghancurkan protein. Kotoran akibat lisis sel kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi. Molekul nukleotida (DNA dan RNA) yang telah dipisahkan dibersihkan dari protein yang masih ada dengan menggunakan phenol. Sebagian kecil RNA juga dapat dibersihkan dalam proses ini. Kloroform sendiri digunakan untuk membersihkan sisa-sisa protein dan polisakarida dari larutan. Enzim RNA-ase digunakan untuk menghancurkan RNA sehingga DNA dapat diisolasi secara utuh. Pemurnian atau purifikasi DNA dapat dilakukan dengan mencampur larutan DNA tersebut dengan NaCl yang berfungsi untuk memekatkan, memisahkan DNA dari larutan, dan mengendapkan DNA sewaktu dicampur dengan ethanol. Proses sentrifugasi dengan kecepatan tinggi akan mengendapkan tepung berwarna putih (DNA) dan menempel di dasar tabung *ependorf*.

Fenol berbahaya karena merupakan asam kuat yang dapat menyebabkan kebakaran serius. Kloroform adalah bahan kimia yang bersifat karsinogen. penggunaan fenol-kloroform mulai dikurangi penggunaannya (Gaaib, 2011) karena resiko gandanya. Quintana dkk., (2008) memakai cara perebusan guna mendapatkan sampel DNA. Sampel ditambahkan larutan NaOH, kemudian dipanaskan dalam waterbath. Berdasarkan Quintana, sexing dengan metode perebusan maupun ekstraksi phenol kloroform memberikan hasil yang sama secara konsisten. *Buffer* yang berupa larutan NaOH (natrium hidroksida)

merupakan larutan basa kuat. Berdasarkan Millar (2000), natrium hidroksida dengan sifat alkalinya, akan menyebabkan larutan menjadi sangat basa. Dalam ekstraksi DNA, suasana basa ini menyebabkan struktur membran maupun dinding sel menjadi longgar, sehingga DNA dapat keluar.

#### **F. Keaslian penelitian**

Penelitian mengenai *molecular sexing* pada burung telah banyak dilakukan. Penelitian antara lain dilakukan oleh Griffiths dkk., (1998) yang berhasil melakukan identifikasi jenis kelamin terhadap 27 dari 28 spesies burung dari ordo yang berbeda-beda menggunakan pasangan primer P2 dan P8. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Kahn dkk., (1998). Zaniar (2002), melakukan penelitian menggunakan pasangan primer P2 dan P8 terhadap Betet Jawa. Penelitian *molecular sexing* di lingkup Atma Jaya Yogyakarta sendiri telah dilakukan oleh Yuda (2008) menggunakan pasangan primer pasangan 2550F dan 2718R terhadap Gelatik Jawa, dan oleh Wirastika (2013) terhadap Jalak Bali dengan tiga pasang primer yaitu pasangan P2 dan P8, pasangan 2550F dan 2718R, serta pasangan 1237L dan 1272H.