

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Burung Bondol Kalimantan (*Lonchura fuscans*)

Bondol Kalimantan (*Lonchura fuscans*) memiliki ukuran sedang (11 cm) dan berwarna gelap. Perbedaan dengan bondol lain adalah seluruh bulunya berwarna coklat kehitaman. Nama lokal untuk burung ini adalah burung pipit hitam dan nama Internasional adalah *Dusky Munia*. Bagian iris coklat, paruh bawah abu-abu, paruh atas hitam, dan kaki hitam (Mac Kinnon dkk., 2010), yang disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Burung Bondol Kalimantan (*Lonchura fuscans*)
(sumber : Kutilang Indonesia, 2012)

Menurut Daftar Merah IUCN (*International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources*) status burung bondol kalimantan yaitu Resiko Rendah (LC) (Kutilang Indonesia, 2012). Spesies ini menghuni sawah atau sepanjang sungai, pinggir hutan, semak sekunder, dan padang rumput di pedalaman sampai ketinggian 500 mdpl. Berperilaku seperti jenis-jenis burung bondol (pipit) yang lain. Memiliki suara getaran “pii pii” atau “crrup” dan suara rendah “tek-tek” sewaktu terbang.

Penyebaran spesies ini endemik di daerah Kalimantan (Mac Kinnon dkk., 2010).

Menurut Mac Kinnon dkk (2010) taksonomi burung bondol kalimantan adalah sebagai berikut :

Kerajaan : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Aves
Ordo : Passeriformes
Famili : Estrildidae
Genus : *Lonchura*
Spesies : *L. fuscans*

B. Keragaman Genetik

Keragaman genetik dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Perubahan itu mungkin dapat memengaruhi fenotipe suatu organisme yang dapat dipantau dengan mata telanjang atau memengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu (Finkeldey, 2005). Keragaman genetik yang kecil dapat menghambat kemampuan adaptasi dari populasi dalam jangka waktu yang panjang. Keragaman genetik memainkan peran yang sangat penting dalam adaptabilitas suatu spesies karena ketika lingkungan suatu spesies berubah, variasi gen yang kecil diperlukan agar spesies dapat bertahan hidup dan beradaptasi (Salisbury dan Ross, 1995).

Keragaman genetik terjadi apabila terdapat dua alel atau lebih dalam suatu populasi (Nei dan Kumar, 2000). Menurunnya keragaman genetik mampu menurunkan kemampuan adaptasi dalam populasi. Keragaman

genetik memiliki konsekuensi ekologis pada tingkat populasi, komunitas, dan ekosistem, serta dalam beberapa kasus besarnya efek sebanding dengan efek dari keanekaragaman spesies serta menjadi faktor utama proses adaptasi dan bertahan hidup pada populasi alami dari perubahan lingkungan (Hughes dkk., 2008; Reed dan Frankham, 2003).

1. Kemelimpahan Alel dan Keragaman Alel

Kemelimpahan alel (*allelic richness*) merupakan jumlah alel dalam suatu lokus, sedangkan keragaman alel (*Allelic Diversity*) merupakan rerata dari kemelimpahan alel. Kemelimpahan alel lebih sensitif terhadap hilangnya variasi genetik dan memperkirakan potensi evolusi dalam jangka panjang populasi (Allendorf dan Luikart, 2007). Keragaman alel menggambarkan keragaman genetik dalam suatu populasi (Frankham dkk, 2002). Keragaman genetik dapat dilihat dari karakter alel dari suatu lokus tertentu yang merupakan ekspresi dari gen tertentu (Johari dkk., 2007).

C. Isolasi DNA

DNA (Deoxyribose Nucleic Acid) adalah *master molecul* (molekul utama) yang mengkode semua informasi yang dibutuhkan untuk proses metabolisme dalam setiap organisme. DNA ini tersusun atas 3 komponen utama yaitu gula deoksiribosa, basa nitrogen dan fosfat yang tergabung membentuk nukleotida (Istanti, dkk., 1999).

Isolasi DNA merupakan langkah yang tepat untuk mempelajari DNA. Prinsip isolasi DNA ada dua yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Sentrifugasi merupakan teknik untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul komponennya. Molekul yang mempunyai berat molekul yang besar berada di bagian bawah tabung dan molekul ringan akan berada di bagian atas tabung. Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah yaitu supernatan pada bagian atas dan pelet dibagian bawah (Campbell dkk., 2002).

Prinsip dasar isolasi / ekstraksi DNA adalah penghancuran dinding dan membran sel, pemisahan DNA dari debris sel dan purifikasi DNA. Dalam melakukan metode ekstraksi DNA yang digunakan sangat bergantung pada sumber DNA-nya, apakah dari sel atau jaringan, hewan, tumbuhan, atau mikroorganisme (Mustikaningtyas, 2014).

D. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik untuk menggandakan jumlah molekul DNA secara *in vitro*. Menurut Prijanto (1992), PCR adalah cara *in vitro* untuk memperbanyak target sekuen spesifik untuk analisis cepat atau karakterisasi, walaupun materi yang digunakan pada awal pemeriksaan sangat sedikit. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Proses PCR

merupakan proses siklus yang berulang meliputi denaturasi, *annealing*, dan ekstensi oleh *enzim DNA polimerase* (Fatchiyah dan Arumingtyas, 2006).

Komponen- komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); *buffer* PCR; magnesium klorida (MgCl₂) dan enzim polimerase DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Fungsi DNA templat di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Templat DNA ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA templat tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Primer biasanya terdiri dari 10-20 nukleotida dan dirancang berdasarkan daerah konservatif dalam genom tersebut (Suryanto, 2003). Komponen lain adalah dNTPs yang merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat) , dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk

untai baru yang komplementer dengan untai DNA templat. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses PCR diperlukan *buffer* PCR. Fungsi *buffer* adalah untuk menjamin pH medium. Dalam proses PCR juga diperlukan $MgCl_2$ yang bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Enzim polimerase DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim polimerase DNA yang digunakan untuk proses PCR diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik oleh karena itu enzim ini bersifat termostabil sampai suhu $95^{\circ}C$.

Siklus PCR biasanya berlangsung sebanyak 30 - 35 kali (Muladno, 2002). PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan *buffer* yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short*

"target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Newton & Graham, 1994).

E. Mikrosatelit

Salah satu marka molekuler pada tingkat DNA adalah mikrosatelit. Mikrosatelit (runutan nukleotida sederhana, di-, tri- atau tetranukleotida, yang berulang dalam genom adalah segmen dari bahan genetik (DNA), sehingga penggunaannya sebagai marka molekuler akan lebih mencerminkan struktur genetik populasi (Whitton dkk., 1997).

Mikrosatelit merupakan pengulangan basa pendek (1 – 6 nukleotida) yang memiliki keragaman tinggi yang ditemukan pada genom nukleus dari hampir semua takson. Mikrosatelit membantu memahami kebiasaan mutasi, fungsi, evolusi serta distribusi dalam suatu genom spesies pada populasi (Li dkk., 2002).

Mikrosatelit dikenal juga sebagai *simple sequence repeats* (SSR), *variable number tandem repeats* (VNTRs), dan *short tandem repeats* (STR) (Selkoe dan Toonen, 2006). Menurut Beebee dan Rowe (2008), mikrosatelit memiliki polimorfik yang sangat tinggi dibandingkan dengan penanda molekuler lainnya, yang akan sangat berguna dalam menghitung heterozigositas dan homozigositas,

Menurut Selkoe dan Toonen (2006), mikrosatelit menjadi begitu populer karena merupakan lokus tunggal, penanda kodominan yang dengan

efisien dikombinasikan dalam proses *genotyping* untuk membuktikan proses yang cepat dan murah. Beberapa parameter yang sangat sering menggunakan mikrosatelit adalah ukuran populasi, tingkat migrasi dari *panmixia* dan perkiraan kekerabatan dari individu (Selkoe dan Toonen, 2006).

Mikrosatelit pada umumnya bersifat netral yaitu tidak menimbulkan kematian pada individu yang membawa alelnya (Morin dkk., 1997). Satelit-satelit DNA dengan unit ulangan pendek (1-6 bp), yang merupakan tipe umum repetitif DNA kadangkala disebut “satelit ulangan sederhana” atau mikrosatelit (Tautz, 1993).

Melalui pemilihan marka molekuler mikrosatelit yang tidak terpaud satu dengan yang lainnya, marka molekuler mikrosatelit sangat baik untuk mengkaji berbagai parameter genetik populasi seperti diversitas genetik (heterosigositas), kawin acak, dan aliran genetic (Morin dkk., 1997).

Primer disusun dari sintesis oligonukleotida sepanjang 15-32 bp dan primer ini harus mampu mengenali urutan yang akan diamplifikasi. Untuk standar amplifikasi sepasang primer akan mempunyai kisaran pasangan basa sekitar 20 basa panjangnya pada tiap primernya (Fatchiyahdan Arumingtyas, 2006). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sampel burung bondol Kalimantan adalah Promer BF02 dan BF03. Primer BF02 dan BF03 digunakan pada penelitian yodogawa dkk (2003) dan Yuda (2008) untuk mengidentifikasi *Bengalese Finch* yang sebelumnya sudah

berhasil mengkarakterisasi *Javan Munia* dan penelitian Yuda (2008) berhasil mengamplifikasi sampel *Java Sparrow*.

F. *Sexing*

Sexing dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keberadaan betina dan jantan dalam suatu populasi. Lebih dari separuh jenis burung bersifat monomorfik (Dubiec dan Magdalena, 2006). Metode *sexing* terdapat dua cara yaitu secara non molekuler dan molekuler. Salah satu contoh metode *sexing* non molekuler adalah laparoskopi.

Laparoskopi dapat melihat karakteristik fisik saluran reproduksi dan hasilnya dapat langsung dilihat. Gonad burung dewasa lebih mudah divisualisasikan dibanding dengan anakan. Melihat organ kelamin menggunakan metode ini diperlukan sayatan kecil di sisi kiri tubuh burung. Kelemahan utama dari metode ini adalah dibutuhkan anestesi dan resiko pada organ vital (Swengel, 1996).

Penanda yang digunakan adalah gen CHD (*chromohelicase-DNA-binding*) (Griffiths dkk., 1998). Gen CHD mengandung dua intron yang berbeda dalam panjang kromosom Z dan W, terdapat perbedaan antara produk dari kromosom Z dan W pada visualisasi (Dubiec dan Magdalena, 2006). Umumnya, gen CHD-W dan CHD-Z pada betina menghasilkan dua pita, sedangkan dua gen CHD-Z pada jantan menghasilkan satu pita (Quintana dkk., 2008).

Pada burung, pola pewarisan gen terjadi ketika salah satu kromosom dari pasangan kromosom jantan bertemu dengan salah satu kromosom betina. Pasangan kromosom jantan memiliki simbol ZZ, sedangkan betina memiliki simbol ZW (Abdul, 2012). Persilangan antara jantan dan betina pada burung dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Persilangan Kromosom Z dan W pada Burung (Sumber: Abdul (2012))

Gen CHD diidentifikasi oleh primer 2550F-2718R dirancang oleh Fridolfsson & Ellegren (1999) dan primer P2-P8 dirancang oleh Griffiths dkk. (1998) menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Primer digunakan dalam penelitian kali ini antara lain pasangan 2550F-2718R (Fridolfsson dan Ellegren, 1999).