

© 2004 Margareta Rahayuningsih
Makalah Pribadi Falsafah Sains (PPS 702)
Sekolah Pasca Sarjana / S3
Institut Pertanian Bogor
November 2004

Posted: 28 November 2004

Dosen:
Prof Dr Ir Rudy C Tarumingkeng, M F (Penanggung Jawab)
Prof. Dr. Ir. Zahrial Coto, M.Sc
Dr. Ir. Hardjanto, M.S

PENENTUAN JENIS KELAMIN BURUNG KEPODANG (*Oriolus chinensis maculatus* L.) DENGAN TEKNIK PCR (*Polymerase Chain Reaction*) MENGGUNAKAN PRIMER SEXING

Oleh:

Margareta Rahayuningsih

E061040021/IPK

eta_sigid@yahoo.com

PENDAHULUAN

Burung kepodang berasal dari daratan China dan penyebarannya mulai dari India, Asia Tenggara, kepulauan Philipina, termasuk Indonesia yang meliputi Sumatra, Jawa, Bali, Kalimantan, Sulawesi dan Nusa Tenggara. Burung ini hidup di hutan-hutan terutama di daerah tropis dan sedikit di daerah sub tropis dan biasanya hidup berpasangan. Di pulau Jawa dan Bali burung kepodang sering disebut dengan kepodang emas (MacKinnon, 1990).

Dengan ukuran tubuh yang relatif besar, penampilannya yang cukup menawan, dan warna bulunya yang mencolok, kepodang menarik perhatian orang untuk dijadikan burung piaraan. Disamping itu adanya kepercayaan yang berkembang di kalangan masyarakat Jawa bahwa untuk mendapatkan seorang anak yang cantik atau tampan, disarankan bagi ibu-ibu yang sedang hamil untuk makan daging burung

kepodang. Tidaklah mengherankan kalau jenis burung ini sering menjadi sasaran penangkapan atau perburuan. Akibatnya populasi kepodang di alam terus menerus berkurang bahkan dapat dikatakan semakin langka keberadaannya pada habitatnya di alam. Selain itu akibat kerusakan dan perusakan habitat oleh faktor alami maupun ulah manusia, serta pencemaran lingkungan semakin mengakibatkan menurunnya populasi kepodang.

Burung kepodang merupakan bagian dari keanekaragaman hayati yang harus dijaga kelestariannya dari kepunahan. Oleh karena itu perlu adanya usaha konservasi baik yang dilakukan di alam maupun dalam penangkaran. Konservasi di alam atau lebih dikenal konservasi *in-situ* merupakan cara melindungi jenis-jenis burung tertentu untuk hidup bebas di alam, terhindar dari gangguan manusia. Kawasan tempat hidup jenis burung itu harus dilindungi. Konservasi *in-situ* semakin sulit dilakukan, karena banyaknya gangguan seperti predator maupun ulah manusia sendiri. Yang sering dibicarakan akhir-akhir ini adalah penangkaran (*ex-situ*) sebagai upaya efektif untuk melestarikan jenis hewan yang sudah mulai langka di habitat alaminya, misalnya di kebun binatang, suaka marga satwa, dan taman nasional.

Dalam kegiatan penangkaran salah satu usaha di dalam pengembang biakan adalah penentuan jenis kelamin. Karena penentuan jenis kelamin merupakan suatu hal yang sangat penting agar hewan tersebut dapat dijodohkan dengan benar. Pada dasarnya ada dua metode penentuan jenis kelamin, yaitu penentuan jenis kelamin dengan pembedahan dan tanpa pembedahan. Higdon (1989) mengatakan bahwa penentuan jenis kelamin dengan metode pembedahan kurang menguntungkan, karena mempunyai resiko yang besar terutama bagi burung yang alergi terhadap pembiusan selama proses pembedahan sehingga menyebabkan kematian. Penentuan jenis kelamin tanpa pembedahan dapat dilakukan antara lain dengan pengamatan morfologi, penentuan kadar hormon, profil protein plasma darah, pengamatan kromosom, dan analisis DNA.

Burung kepodang merupakan salah satu jenis burung yang sulit dibedakan antara jantan dan betinanya berdasarkan bentuk fisiknya. Ada pendapat yang mengatakan bahwa untuk membedakan antara burung jantan dan betina terletak

pada kecerahan warna bulunya. Warna bulu burung jantan lebih cerah daripada warna bulu burung betina (Chasen, 1935 dalam Van Balen dan Ismu, 1993).

Penelitian mengenai karakter morfologi, kajian barbulae, dan kadar hormon testosteron burung kepodang untuk membedakan jenis kelaminnya telah dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengamatan karakter morfologi dengan menggunakan uji t ternyata tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara burung jantan dan betina (Rahayuningsih, 2001). Sedangkan apa yang dikatakan Elisa (1990) pada pengamatan karakter morfologi juga tidak terlihat adanya perbedaan, baik burung jantan maupun betina memiliki warna paruh yang sama, yaitu merah muda. Pada pengamatan kajian barbulae meskipun menunjukkan adanya perbedaan nyata (uji t) antara burung jantan dan betina tetapi ternyata terlalu rumit dan membutuhkan waktu yang cukup lama. Dalam penentuan kadar hormon burung kepodang untuk membedakan jenis kelamin jantan dan betina juga menunjukkan tidak semua sampel darah burung terdeteksi (Rahayuningsih, 2002). Oleh karena itu masih perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mengetahui metode lain yang lebih cepat, tepat, dan akurat, salah satunya dengan menggunakan analisis DNA.

Penentuan jenis kelamin berdasarkan analisis DNA belum banyak diketahui dan dilakukan. Sulandari (1999) meneliti DNA *sexing* dari 109 sampel darah beberapa jenis burung (terutama burung paruh bengkok) di Indonesia dengan menggunakan analisis DNA-teknik PCR. Dalam penelitian tersebut digunakan *primer sexing* P2 dan P8. Hasil penelitian menunjukkan 90 sampel dapat dibedakan jenis kelaminnya., 14 sampel tidak dapat teramplifikasi, dan 5 sampel tidak dapat dibedakan

Dari beberapa hasil penelitian di atas maka perlu dilakukan penelitian penentuan jenis kelamin burung kepodang berdasarkan analisis DNA teknik PCR menggunakan *primer sexing* sehingga dapat digunakan untuk menunjang penelitian sebelumnya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui analisis DNA teknik PCR dengan menggunakan *primer sexing* dalam menentukan jenis kelamin burung kepodang sehingga diharapkan dapat membantu usaha penangkaran, yang berarti membantu usaha konservasi.

TINJAUAN PUSTAKA

Deskripsi dan Klasifikasi

Burung kepodang berukuran sedang dengan panjang sekitar 26 cm, warna bulu kuning keemasan, warna hitam disekitar mata melingkar sampai ke tengkuk, bulu sayap dan ekor berwarna hitam, tubuh bagian bawah keputih-putihan dengan burik hitam, iris merah, bentuk paruh meruncing dan sedikit melengkung ke bawah, ukuran panjang paruh kurang lebih 3 cm, kaki hitam (Mackinnon, 1990 dan King *et al*, 1975).

Pada habitatnya di alam bebas biasanya burung ini hidup berpasangan atau dalam kelompok kecil. Hidup di pohon-pohon , tetapi akan turun cukup rendah untuk mencari makan. Di Jawa masa berbiak pada musim kemarau, yaitu bulan Februari-Juni dan tercatat pula bersarang dalam bulan Agustus-Desember. Setiap kali bertelur sebanyak 2 butir, berwarna putih dengan sedikit bintik-bintik coklat, diletakkan pada sarang yang berbentuk cawan (Mackinnon, 1990).

Burung kepodang (di Jawa dan Bali) termasuk dalam famili Oriolidae, Ordo Passeriformes, Superordo Neognathae, subkelas Neornithes, kelas Aves, subphylum Vertebrata, dan phylum Chordata (Colbert, 1980 dan Mackinnon, 1990) .

Burung ini banyak digemari orang karena warnanya yang indah dan suaranya yang merdu. Sesudah ditentukan sebagai maskot propinsi Jawa Tengah pada tahun 1991, berbagai masalah mengenai pelestarian burung ini di alam mulai timbul. Burung ini makin diminati orang untuk dipelihara dalam sangkar hanya untuk status gengsi saja , khususnya di propinsi tersebut banyak kepodang yang ditangkap secara besar-besaran, didorong harga pasaran yang melonjak sejak nominasinya itu . Walaupun belum diadakan inventarisasi, tetapi sudah ada informasi yang menyebutkan bahwa jumlah kepodang makin menurun di alam sebagai akibat penangkapan berlebihan (Van Balen dan Ismu S, 1993).

Analisis DNA-Teknik PCR

Dengan adanya perkembangan teknologi analisis DNA penentuan jenis kelamin burung dapat dilakukan pada tingkat molekuler, salah satunya melalui teknik

PCR (Polymerase Chain Reaction). PCR adalah suatu teknik dengan bantuan *primer* dan *enzim DNA polymerase* yang dapat mengidentifikasi segmen molekul DNA tertentu di dalam genom dan dapat menggandakan segmen DNA tersebut dalam jumlah besar. Penggandaan tersebut dilakukan agar molekul DNA dapat divisualisasikan dan dianalisis lebih lanjut.

Secara ringkas prinsip PCR dapat dijelaskan sebagai berikut: pada suhu 94-95⁰ C DNA mengalami denaturasi sehingga strukturnya berubah dari DNA untai ganda menjadi DNA tunggal. Waktu yang diperlukan untuk proses ini sekitar 30 detik. Apabila DNA target mengandung banyak nukleotida G/C maka suhu dapat ditingkatkan (Sulandari dkk, 2003).

Pada suhu berkisar 50-60⁰ C primer forward runutan nukleotidanya berkomplemen dengan salah satu untai tunggal akan menempel pada posisi komplemennya, demikian juga primer reservenya akan menempel pada untai tunggal lainnya. Setelah kedua primer menempel pada posisi masing-masing, enzim tag polymerase mulai mensintesis molekul DNA baru yang dimulai dari ujung 3''-nya masing-masing primer. Sintesa molekul DNA baru ini terjadi pada suhu 72⁰ C , proses ini disebut juga ekstension (elongasi) (Muladno, 2002).

Kecepatan penyusunan nukleotida diperkirakan antara 35-100 nukleotida perdetik, tergantung buffer, pH, konsentrasi, garam, dan molekul DNA target. Umumnya setelah proses siklus PCR selesai, ditambah post elongasi selama 5 – 10 menit pada tempertur 72⁰ C agar semua hasil PCR berbentuk untai ganda. Ketiga tahapan tersebut merupakan satu siklus thermal, dan banyaknya siklus yang dilakukan tergantung pada banyaknya produk PCR yang diinginkan (biasanya sekitar 35 – 45 siklus). Jumlah fragmen DNA yang diamplifikasi adalah 2ⁿ dimana n adalah banyaknya siklus thermal (Sulandari dkk, 2003).

Sulandari (1999) menyebutkan bahwa melalui teknik PCR, penentuan jenis kelamin burung dapat dilakukan secara cepat karena hanya dengan waktu ± 8 jam hasilnya dapat segera diketahui. Hasil PCR yang diperoleh juga dapat dikatakan akurat karena penentuan jenis kelamin dilakukan langsung pada tingkat molekul DNA yang merupakan unit terkecil dari kehidupan organisme.

Griffiths dan Tiwari dalam Sulandari (1999) merupakan orang pertama yang menemukan teknik tersebut dan diketahui hanya pada burung yang memiliki

kromosom W (analog dengan kromosom Y pada mammal). Dengan menggunakan primer ganda (P2 dan P8) dengan teknik PCR gen tersebut dapat muncul dan dapat digunakan dalam sexing burung (semua jenis anggota kelas Aves) kecuali ordo Ratites. Setelah PCR, DNA akan teramplifikasi dan dalam gel elektroforesis akan terlihat bahwa pada jenis kelamin betina memiliki dua pita, sedangkan pada jenis kelamin jantan hanya memiliki satu pita .

MATERI DAN METODE

Proses analisis DNA dilakukan di Laboratorium Genetika-Biologi LIPI Bogor pada bulan Oktober 2003. Dalam penelitian ini digunakan 4 ekor burung kepodang (*Oriolus chinensis maculatus* L.).

Sampel darah diambil dari vena sayap dengan menggunakan spuit 1 ml yang telah dibasahi heparin. Sampel darah dimasukkan dalam tabung ependorf yang diberi alkohol 96% (PA) disimpan dalam lemari pendingin suhu $\pm 16^{\circ}$ C. Selanjutnya dilakukan isolasi dan ekstraksi DNA, teknik PCR-dengan kondisi PCR optimal adalah predenaturasi dengan suhu 94° C selama 1,5 menit; annealing suhu 48° C selama 1 me-nit; ekstensi awal suhu 72° C selama 45 detik; ekstensi akhir suhu 72° C selama 5 me-nit dan post denaturasi suhu 4° C selama 1 detik, siklus amplifikasi yang digunakan adalah 30 siklus. Primer yang digunakan ini adalah primer *sexing* P2 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') dan P8 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'). Terakhir dilakukan elektroforesis DNA produk teknik PCR.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

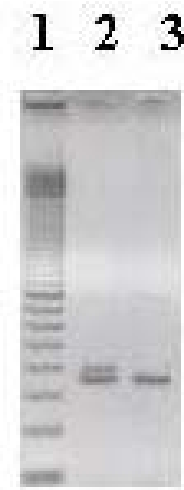
Hasil penelitian menunjukkan dari empat sampel DNA *sexing* burung kepodang didapatkan tiga sampel yang teramplifikasi dan 1 sampel tidak teramplifikasi (tabel 1)

Tabel 1. Hasil analisis DNA sexing menggunakan penanda P2 dan P8

No	Sampel DNA	Teramplifikasi	Ket. Pita DNA	Jenis kelamin
1	Kepodang 1	+	Satu pita	Jantan
2	Kepodang 2	+	Dua pita	betina
3	Kepodang 3	-	-	-
4	Kepodang 4	+	Satu pita	Jantan

Dari tiga sampel yang teramplifikasi diketahui bahwa burung kepodang nomor satu, dan empat hanya memiliki satu pita DNA, sedangkan burung kepodang nomor dua memiliki dua pita DNA (tabel 1 dan gambar 1). Jenis kelamin burung kepodang diindikasikan dari munculnya satu atau dua pita DNA sehingga dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa burung kepodang yang memiliki satu pita berjenis kelamin jantan dan yang memiliki dua pita adalah berjenis kelamin betina.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa dari empat sampel DNA burung kepodang hanya tiga sampel yang teramplifikasi. Satu sampel yang tidak teramplifikasi secara pasti tidak diketahui penyebabnya, tetapi ada beberapa kemungkinan, antara lain : DNA hasil isolasi masih kotor yang mungkin diakibatkan kesalahan teknis pada waktu memisahkan supernatan DNA dari larutan fenol dengan mikropipet ,ternyata fenol ikut terambil sehingga mengakibatkan pecahnya molekul DNA, atau DNA kotor oleh RNA maupun protein, rusaknya DNA karena sampel lisis akibat penyimpanan dalam alcohol 96% rerlalu lama yang mengakibatkan DNA terkontaminasi oleh faktor luar. Dalam proses PCR kesalahan yang terjadi kemungkinan pada waktu pembuatan larutan cocktail tidak tercampur rata.



Ket : 1. Marker 100 bp
2. kepodang 2 : jenis kelamin betina
3. kepodang 1 : jenis kelamin jantan

Gambar 1. Hasil elektroforesis gel agarose 2% DNA sexing burung kepodang dengan menggunakan penanda P2 dan P8.

Tiga sampel yang teramplifikasi menunjukkan bahwa burung kepodang berjenis kelamin jantan memiliki satu pita, sedangkan burung kepodang betina memiliki dua pita (tabel 1 dan gambar 1). Griffiths *et al* (1998) menjelaskan bahwa selama proses PCR akan diproduksi baik pita CHD (*Chromobox-helicase-DNA binding gene*) W dan CHD-Z dan kedua primer (P2 dan P8) secara simultan mengamplifikasi secara homolog bagian dari CHD-W dan CHD-Z. Dua gen CHD memiliki intron yang dipasangkan dengan primer P2 dan P8. Sekuens primer P2 telah diposisikan 132 bp kearah muara intron. P2 melekat pada ekson gen CHD1 dan mengamplifikasi ekson beserta intron. Sekuens gen CHD-W dan en CHD-Z menggunakan primer P8 sebagai *primer forward* dan bersama primer P2 mengamplifikasi ekson dan intron dalam gen CHD tersebut. P8 juga mengamplifikasi ekson gen CHD1 tetapi dengan arah yang berlawanan dengan P2 (*reverse-forward amplification*). Dari hasil visualisasi agarose di bawah UV, ketika primer sesuai dengan intron gen DNA *sex specific* maka akan menghasilkan satu pita yang membagi antara jantan atau betina spesifik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penentuan jenis kelamin burung kepodang dapat menggunakan analisis DNA – teknik PCR dengan *primer sexing* P2 dan P8. Burung kepodang berjenis kelamin jantan memiliki satu pita DNA, sedangkan burung kepodang berjenis kelamin betina memiliki dua pita DNA.

DAFTAR PUSTAKA

- Colbert, E.H. 1980. *Evolution of the vertebrates*. 3th ed. Willey & Sons.Inc. New York.p.459.
- Griffiths, R., Double.M.C, Orr, T.K. dan Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Short communication*. Molecular Laboratory, DEEB. Australian national University.
- Higdon, P.L. 1986. *Sexing birds without surgery* : These is new safe accurate alternative to surgical sexing. Bird talk. PO.Box 6050 Mission Viejo.

- King, B.F., Martin, W. and Dickson, F.C. 1975. *A field guide to the birds of South East Asia*. Collins-Crafton Street, London.
- Mackinnon. J. 1990. *Field guide to the birds of Java and Bali*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. pp. 278 -280.
- Muladno. 2002. *Seputar teknologi rekayasa genetika*. Pustaka Wira Usaha Muda. Bogor.
- Rahayuningsih, M. 2001. Penentuan jenis kelamin burung kepodang (*Oriolus chinensis maculatus* L.) berdasarkan karakter morfologi. Tesis. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Rahayuningsih, M. 2002. Kajian kadar hormon testosteron untuk menentukan jenis kelamin burung kepodang (*Oriolus chinensis maculatus* L.). Laporan penelitian dosen muda. Universitas Negeri Semarang. Semarang.
- Sulandari, S. (1999). Sexing birds using DNA analysis for ex-situ conservation program. Cibinong: Laboratory of Genetic, Divison of zoology,PC for Biology.LIPI.
- Sulandari S, Zein, MSA, dan Muladno. 2003 *Panduan praktis laboratorium DNA*. Cibinong: Bidang zoology Pusat Penelitian Biologi LIPI.
- Van Balen dan Ismu. 1993. Burung Kepodang sebagai identitas daerah Jawa Tengah dan pengembangannya dari aspek sosial dan ekonomi. *Sarasehan Flora dan Fauna Identitas Jawa Tengah*. Semarang, 28 Agustus 1993.