

Komparasi Lima Jenis Primer *Polymerase Chain Reaction* untuk Mengidentifikasi Kelamin Burung Famili Columbidae yang Akurat

Comparison of Five Types of Polymerase Chain Reaction Primers for Sex Identification in Columbidae Family Birds

Fauziah Fitriana¹, Riza Resita¹, Yuda Disastra¹, Gioknio Happy Alfatik¹, Clara Ajeng Artdita¹, Aris Haryanto², Fatkhanuddin Aziz^{1*}

¹Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Veteriner, Departemen Teknologi Hayati dan Veteriner, Sekolah Vokasi, UGM

²Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM

*Corresponding author, Email: fatkhanuddin.aziz@mail.ugm.ac.id

Naskah diterima: 31 Agustus 2021, direvisi: 21 April 2022, disetujui: 14 Juni 2022

Abstract

Sex determination in some bird species are quite difficult to determined because it's same morphological characteristics (monomorphic) among males and females, an example is the Columbidae family. A popular molecular sex determination technique for birds is the Polymerase Chain Reaction (PCR) method with the Chromo Helicase DNA-binding (CHD) target gene. In the other hand, the success of PCR amplification of the target gene is influenced by the specificity of the DNA template with the oligo primer used. This study aimed to evaluate 5 types of PCR primers P2/P8, 2550F/2718R, CHD1F/CHD1R, 1237L/1272H and CHD1LF/CHD1LR to determine the sex of the Columbidae family. This research was conducted by tested the 5 types of primers mentioned above on DNA samples of each pair of males and females from pigeons, balam jambi, punai, derkuku, and perkutut birds respectively. The results showed that CHD1LF/CHD1LR PCR primer showed the best results and was recommended to determine the sex of the Columbidae family.

Keywords: Columbidae; sex determination; PCR; primer

Abstrak

Penentuan jenis kelamin pada beberapa spesies burung cukup sulit dilakukan dikarenakan jantan dan betina memiliki ciri morfologi yang sama (monomorfik), salah satunya famili Columbidae. Teknik penentuan jenis kelamin burung secara molekuler yang populer adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan gen target *Chromo Helicase DNA-binding* (CHD), namun keberhasilan amplifikasi gen target pada PCR tersebut dipengaruhi salah satunya kesesuaian DNA *template* dengan primer yang digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi 5 jenis primer PCR P2/P8, 2550F/2718R, CHD1F/CHD1R, 1237L/1272H dan CHD1LF/CHD1LR untuk menentukan jenis kelamin famili Columbidae. Penelitian ini dilakukan dengan menguji 5 jenis primer tersebut di atas pada sampel DNA tiap pasang jantan dan betina dari burung merpati, balam jambi, punai, derkuku, dan perkutut. Hasil penelitian diketahui primer CHD1LF/CHD1LR menunjukkan hasil terbaik dan direkomendasikan untuk menentukan jenis kelamin famili Columbidae.

Kata kunci: Columbidae; jenis kelamin; PCR; primer

Pendahuluan

Keanekaragaman burung di Indonesia memiliki angka yang tinggi. Jumlah burung pada tahun 2018 berjumlah 1,771 spesies dan pada tahun 2019 naik menjadi 1,777 spesies (Latumahina *et al.*, 2020). Beberapa spesies burung ini tersebar di seluruh Indonesia mulai dari Sulawesi, Maluku, Nusa Tenggara Timur, Jawa dan daerah lainnya. Beberapa spesies burung ini salah satunya dari famili Columbidae yang dapat dijumpai di Indonesia antara lain *Columba livia* (Merpati), *Streptopelia chinensis* (Tekukur), *Geopelia striata* (Perkutut Jawa), *Treron griseicauda* (Punai pengantin), *Treron vernans* (Punai Gading), dan *Streptopelia bitorquata* (Dederuk Jawa) (Eprilurahman *et al.*, 2018). Burung famili Columbidae tersebut telah banyak dibudidayakan akhir-akhir ini karena bernilai ekonomis tinggi, khususnya jenis kelamin jantan.

Penentuan jenis kelamin spesies burung memang menjadi masalah utama bagi para *breeder* burung sendiri, pencinta burung pemula atau masyarakat awam. Menurut Griffiths *et al.* (1998), spesies burung di dunia lebih dari 50% karakter morfologi eksternalnya bersifat identik yang menjadikan burung sulit diamati atau bahkan tidak dapat dibedakan jenis kelaminnya pada anakan burung. Penelitian yang dilakukan Disastra (2021) memperlihatkan adanya kesalahan penjual burung dalam menentukan jenis kelamin famili Columbidae, sedangkan penentuan jenis kelamin merupakan hal yang penting. Tujuan dari penentuan jenis kelamin adalah sebagai upaya peningkatan manajemen pemeliharaan, pengembangan populasi, penekanan biaya *breeding*, hingga peningkatan upaya konservasi (Morinha *et al.*, 2012; Maciej *et al.*, 2017). Penentuan jenis kelamin pada burung famili Columbidae ini cukup sulit dilakukan dikarenakan jantan dan betina memiliki ciri morfologi yang sama (monomorfik). Metode penentuan jenis kelamin (*sexing*) pada burung monomorfik dapat dilakukan dengan berbagai cara misalnya *laparoscopy*, *vent sexing*, *sexing steroid* dan *karyotyping* (Purwaningrum *et al.*, 2016). Metode tersebut memiliki kelemahan, seperti membutuhkan waktu yang lama, akurasi rendah, mahal, dan beberapa metode tersebut dapat menyebabkan rasa sakit dan kematian pada burung (Nugroho dan Zein, 2015).

Teknik penentuan jenis kelamin burung secara molekuler yang banyak dikembangkan adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR diketahui dapat mengidentifikasi jenis kelamin burung secara tepat dan memiliki sensitifitas tinggi (Kulibaba dan Liashenko, 2021). Pengembangan metode tersebut didasari oleh perbedaan kromosom kelamin pada burung. Burung jantan memiliki dua kromosom Z (homogamet ZZ), sedangkan burung betina memiliki satu kromosom Z dan satu kromosom W (heterogamet ZW) (Vucicevic *et al.*, 2013; Akrom *et al.*, 2020). Gen target yang umum digunakan dalam penentuan jenis kelamin adalah gen *Chromo Helicase DNA-binding* (CHD) (Kulibaba dan Liashenko, 2021). Amplifikasi segmen gen CHD pada burung jantan hanya menghasilkan satu fragmen ampikon dari kromosom Z, sedangkan pada burung betina akan menghasilkan satu fragmen W atau dua fragmen dari kromosom Z dan W yang memiliki perbedaan panjang intron yang teramplifikasi (Wulansari *et al.*, 2013; Pamulang dan Haryanto, 2021).

Empat jenis primer PCR P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998), 2550F/2718R (Fridolfsson dan Ellegren, 1999), CHD1F/CHD1R (Lee *et al.*, 2010), dan 1237L/1272H (Kahn *et al.*, 1998) sangat umum digunakan pada *molecular sexing*, namun demikian spesifisitas primer tersebut pada famili Columbidae perlu dikaji lebih dalam. Berbeda dengan 4 primer tersebut, primer CHD1LF/CHD1LR (Liang *et al.*, 2019) menunjukkan potensi yang baik, namun terbatas baru dicoba pada burung merpati saja. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi 5 jenis primer PCR P2/P8, 2550F/2718R, CHD1F/CHD1R, 1237L/1272H, dan CHD1LF/CHD1LR untuk menentukan jenis kelamin famili Columbidae yaitu burung merpati (*Columba livia*), balam jambi (*Streptopelia chinensis*), punai pengantin (*Treron griseicauda*), derkuku (*Spilopelia chinensis*), dan perkutut (*Geopelia striata*).

Materi dan Metode

Sampel DNA

Penelitian ini menggunakan DNA yang sebelumnya diekstraksi dari sampel darah tiap pasang jantan dan betina dari burung merpati,

Tabel 1. Sekuen primer yang digunakan untuk amplifikasi gen target CHD.

Nama Primer	Kode dan Sekuen Primer	Ukuran Target	Referensi
*CHD1LF/CHD1LR	CHD1LF (5'-TTCTGAGGATGGAAATGAGT-3') CHD1LR (5'-AGCAATGGTTACAACACTTC-3')	♂: 474 bp, ♀: 474 & 319 bp	(Liang <i>et al.</i> , 2019)
P2/P8	P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3')	♂: 366 bp, ♀: 348 & 366 bp	(Griffiths <i>et al.</i> , 1998)
2550F/2718R	2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3')	♂: 600-650 bp, ♀: 400-450 bp	(Fridolfsson and Ellegren, 1999)
CHD1F/ CHD1R	CHD1F (5'-TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT-3') CHD1R (5'-CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT-3')	♂: 524 bp, ♀: 328 & 524 bp	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
1237L/ 1272H	1237L (5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3') 1272H (5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3')	♂: 242 bp, ♀: 215 bp	(Kahn <i>et al.</i> , 1998)

*Penamaan primer Liang *et al.* (2019) disesuaikan, untuk membedakan dengan Lee *et al.* (2010) yang lebih dahulu dipublikasi.

Tabel 2. Program PCR 5 jenis primer untuk amplifikasi gen target CHD.

Program	CHD1LF/CHD1LR		P2/P8		2550F/2718R		CHD1F/CHD1R		1237L/1272H	
	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Suhu (°C)	Waktu (detik)
Pre-denaturasi	94	300	94	90	94	120	95	300	94	120
Denaturasi	94	30	94	30	94	30	94	30	94	30
Annealing	53.5	30	48	45	50	30	48	30	56	60
Ekstensi	72	30	72	45	72	30-40	72	60	72	120
Siklus	38 siklus		30 siklus		25-35 siklus		28 siklus		30 siklus	
Post-ekstensi	72	300	72	300	72	300	72	300	72	600

balam jambi, punai, derkuku, dan perkutut oleh Disastra (2021).

Amplifikasi DNA

Campuran PCR sebanyak 25 µl yang terdiri dari 5 µl mastermix (5X PCR Master Dye Mix, ExcelTaq, SMOBIO, Taiwan), 1 µl primer *forward* (10 pmol/µl), 1 µl primer *reverse* (10 pmol/µl), 16 µl DDH₂O, dan 2 µl DNA *template*. Urutan 5 pasang basa primer yang digunakan tertera pada Tabel 1, dan semuanya didapat dari IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Singapura).

Campuran PCR kemudian dihomogenkan dan disentrifus beberapa detik lalu PCR *tube* dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* (SelectCycler II Thermal Cycler, Select BioProducts, USA) dengan program PCR seperti pada Tabel 2. Produk PCR kemudian dielektroforesis atau disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -20°C sampai digunakan.

Elektroforesis dan Visualisasi Produk PCR

Produk PCR dielektroforesis menggunakan 1,5% gel *agarose* (Bioron, Jerman) dalam *Tris-borate-EDTA* (TBE) *buffer* (Omnipure, Merck, USA), dan DNA *staining* (FloroSafe, First BASE, Taiwan). Produk PCR dan 100 bp DNA *ladder* (Geneaid, Taiwan) dimasukkan ke dalam tiap sumuran berbeda. Gel dielektroforesis menggunakan *submarine electrophoresis system* (Mupid-exU, Jepang) dengan voltase 135 volt selama 20 menit. Selanjutnya gel divisualisasi pada *Dual LED Blue Transilluminator* (BIO-HELIX, Taiwan). Band produk PCR yang muncul kemudian dibandingkan dengan DNA *ladder*, dan didokumentasikan dengan kamera.

Hasil dan Pembahasan

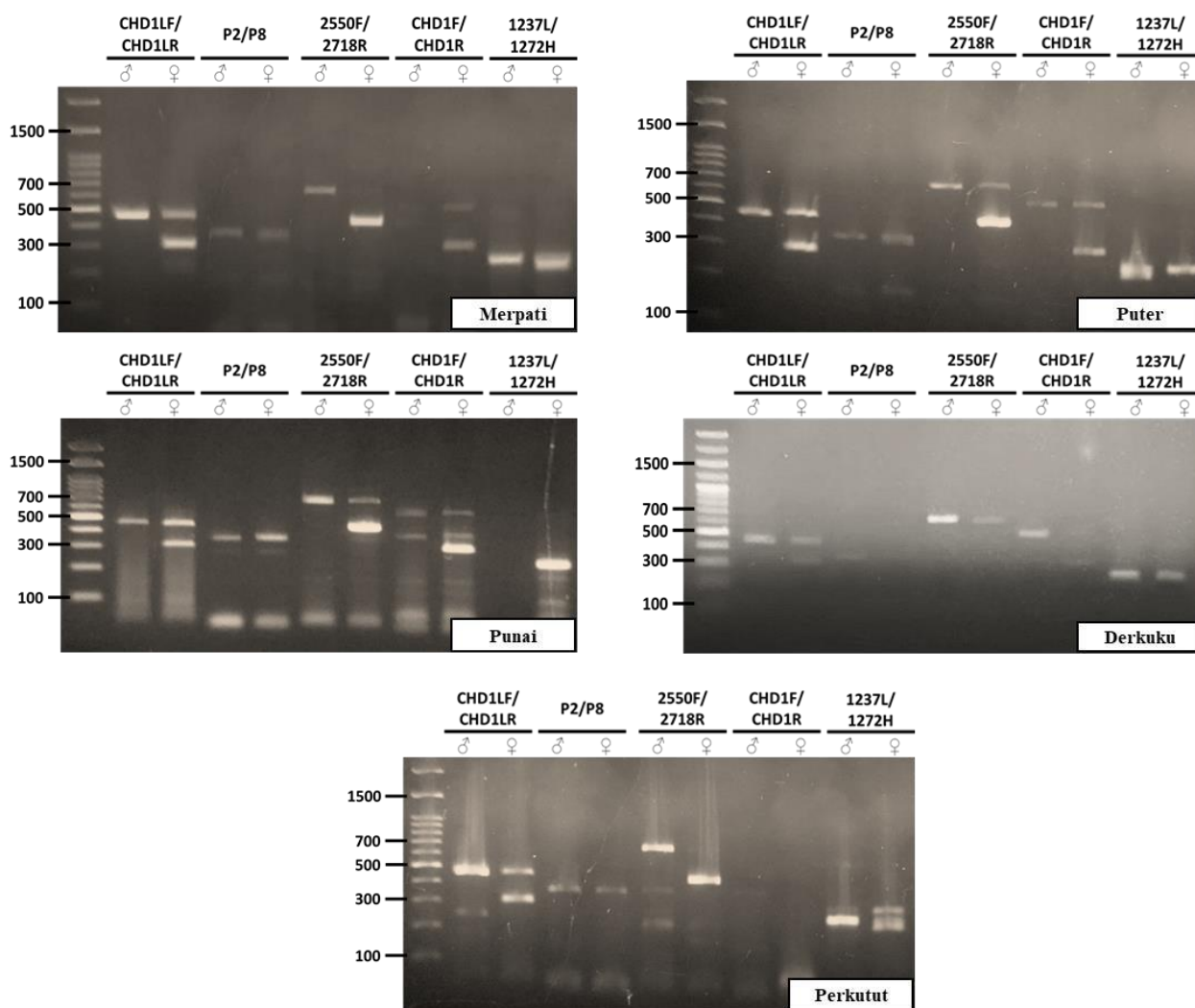
Hasil elektroforesis menunjukkan semua primer yang diuji mayoritas menghasilkan produk PCR (Gambar 1). Namun, primer CHD1LF/CHD1LR memperlihatkan pita *band* yang paling jelas, mudah dianalisis dan konsisten di semua spesies maupun jenis kelamin. Diketahui

pada jenis kelamin jantan dari burung merpati, balam jambi, punai, derkuku, dan perkutut menunjukkan pita berukuran 474 bp, sedangkan pada betina terlihat 2 pita berukuran 474 dan 319 bp.

Variasi produk PCR pada sampel yang menggunakan primer P2/P8, 2550F/2718R, CHD1F/CHD1R, dan 1237L/1272H terlihat pada visualisasi gel agarose. Diketahui produk PCR yang muncul pada 4 primer tersebut tidak konsisten pada seluruh sampel yang diuji. Beberapa primer menunjukkan produk PCR yang tidak sesuai referensi sebelumnya. Ekstra *band* PCR terlihat pada primer 2550F/2718R khususnya pada spesies puter dan punai. Hal tersebut tidak sesuai dengan referensi sebelumnya yang harusnya hanya terdapat satu pita di setiap kelamin dengan ukuran 600-650 bp pada jantan dan 400-450 bp pada betina. Dilain hal, produk PCR primer CHD1F/CHD1R pada spesies punai juga memperlihatkan ekstra *band*.

Kontras dengan P2/P8, 2550F/2718R, CHD1F/CHD1R, dan 1237L/1272H, ukuran pita yang ditampilkan primer CHD1LF/CHD1LR pada semua sampel yang diuji diketahui telah sesuai dengan referensi dan mudah dianalisis karena perbedaan ukuran produk PCR yang mencolok antara jantan dan betina.

Keberhasilan amplifikasi gen target pada PCR dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya kesesuaian DNA *template* dengan primer yang digunakan. Urutan basa nukleotida pada primer yang tidak sesuai dengan DNA *template* biasanya tidak akan menghasilkan produk PCR dengan ukuran target sebenarnya atau bahkan tidak ada amplifikasi sama sekali (Green dan Sambrook, 2019). Primer P2/P8, 2550F/2718R, CHD1F/CHD1R, dan 1237L/1272H dalam penelitian ini tidak memberikan hasil yang memuaskan dan konsisten seperti CHD1LF/CHD1LR. Hasil bias pada penentuan jenis kelamin dengan PCR telah dilaporkan sebe-



Gambar 1. Hasil PCR 5 jenis primer pada 5 spesies famili Columbidae.

lumnya. Penelitian Griffiths *et al.* (1998) memperlihatkan primer P2/P8 menghasilkan produk PCR yang samar pada sampel *rock pigeon* (*Columba livia*) bila dibandingkan sampel dari spesies lain. Selain itu, penggunaan primer P2/P8 juga direkomendasikan untuk menurunkan suhu *annealing* pada program PCR serta penggunaan gel *acrylamide* pada visualisasi produk PCR yang sebenarnya kurang populer saat ini dibandingkan gel agarose dalam visualisasi produk PCR. Gen CHD-W dan CHD-Z antar spesies unggas diketahui mempunyai keragaman yang luas (Ciorpac *et al.*, 2016; Krocak *et al.*, 2021; Kulibaba dan Liashenko, 2021). Penelitian Huang *et al.* (2011) melaporkan adanya perbedaan urutan basa nukleotida gen CHD-W dan CHD-Z pada 3 spesies Columbidae (*C. livia*, *C. pulchricollis*, dan *S. tranquebarica*). Hal tersebut mengindikasikan keragaman genetik dalam satu famili, sehingga diperlukan penggunaan primer yang sesuai dengan spesies yang akan diuji.

Kesimpulan

Primer CHD1LF/CHD1LR memperlihatkan hasil yang akurat untuk famili *Columbidae* (burung merpati, balam jambi, punai, derkuku, dan perkutut) dibanding primer dari referensi lain yang diuji pada penelitian ini. Potensi penggunaan primer CHD1LF/CHD1LR perlu dilakukan untuk mengetahui spesifisitasnya pada burung lain di luar famili *Columbidae* yang tidak dapat diidentifikasi sebelumnya menggunakan P2/P8, 2550F/2718R, CHD1F/CHD1R, dan 1237L/1272H.

Daftar Pustaka

- Akrom, A. M., Indarjulianto, S., Susmiati, T., Raharjo, S., Permana., R. G. S. dan Sitompul, Y. Y. (2020). Swab Bukal Sebagai Bahan Sexing Piyikan Burung Kenari (*Serinus canaria*) dan Burung Merpati (*Columba livia*). Jurnal Sain Veteriner. 38 (1): 31-36.
- Ciorpac, M., Druica, R. C., Ghiorghita, G., Cojocar, D. and GORGAN, D. L. (2016). CHD genes: a reliable marker for bird populations and phylogenetic analysis? Case study of the superfamily Sylvioidea (Aves: *Passeriformes*). Turkish Journal of Zoology. 40 (5): 749-757.
- Disastra, Y. (2021). Validasi Jenis Kelamin Burung Famili *Columbidae* dari Informasi Penjual Dibandingkan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan Nekropsi. Proyek Akhir. Program Studi Teknologi Veteriner. Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Eprilurahman, R., Asti, H. A., Hadisusanto, S., Yudha, D. S., Trijoko., Ramadani, R. S., Pranoto, F. S. dan Muhtianda, I. A. (2018). Kekayaan Fauna Gianyar, Bali: Udang, Ikan, Amfibi, Reptil, Burung dan Mamalia. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Fridolfsson, A. K. and Ellegren, H. (1999). A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. Journal of Avian Biology. 30 (1): 116-121.
- Green, M. R. and Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Protocols, 2019 (6).
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K. and Dawson, R. J. G. (1998). A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology. 7 (8): 1071-1075.
- Huang, H. W., Su, Y. F., Yao, C. T., Hung, Y. C., Chen, C. C., Cheng, C. C., Lung, S. L. and Chang, H. W. (2011). High-throughput gender *Columbidae* identification of three species using melting curve analysis. Theriogenology. 75 (1): 73-79.
- Kahn, N. W., John, J. S. and Quinn, T. W. (1998). Chromosome-specific Intron Size Differences in the Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds. The Auk. 115 (4): 1074-1078.
- Krocak, A., Wołoszyńska, M., Wierzbicki, H., Kurkowski, M., Grabowski, K. A., Piasecki, T., Piasecki, T., Galosi, L. and Urantówka, A. D. (2021). New Bird Sexing Strategy Developed in the Order *Psittaciformes* Involves Multiple Markers to Avoid Sex Misidentification: Debunked Myth of the Universal DNA Marker. Genes. 12 (6): 878.

- Kulibaba, R. O. and Liashenko, Y. V. (2021). Analysis of CHD Gene Polymorphism as a Model Object for Molecular Sexing of Eurasian Eagle-Owl (*Bubo bubo*). *Cytology and Genetics*. 55 (4): 324-330.
- Latumahina, F. S., Sahusilawane, J. F. dan Mardiatmoko, G. (2020). *Penyebaran Burung Pada Pulau-Pulau Kecil di Maluku*. Deepublish. Yogyakarta.
- Lee, J. C. I., Tsai, L. C., Hwa, P. Y., Chan, C. L., Huang, A., Chin, S. C., Wang, L. C., Lin, J. T., Linacre, A. and Hsieh, H. M. (2010). A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Molecular and Cellular Probes*. 24 (1): 27-31.
- Liang, S., Chen, M., Gao, C., Yan, H., Zhang, G. and Wang, X. (2019). Sex identification of pigeons using polymerase chain reaction analysis with simple DNA extraction. *Avian Biology Research*. 12 (2): 45-48.
- Maciej, M., Joanna, G., Patrycja, F. and Arkadiusz, M. (2017). Determining sex in pigeons (*Columba livia*). *World Scientific News*. 73 (2): 109-114.
- Morinha, F., Cabral, J. A. and Bastos, E. (2012). Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*. 78 (4): 703-714.
- Nugroho, H. A. dan Zein, M. S. A. 2015. Evaluasi Metode Penentuan Jenis Kelamin pada Nuri Kepala Hitam. *Zoo Indonesia*. 24 (2): 83-93.
- Pamulang, Y. V. and Haryanto, A. (2021). Molecular bird sexing on kutilang (*Pycnonotus* sp.) based on amplification of CHD-Z and CHD-W genes by using polymerase chain reaction method. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 22 (1): 449-452.
- Purwaningrum, M., Nugroho, H. A., Asvan, M., Karyanti, K., Alviyanto, B., Kusuma, R. and Haryanto, A. (2019). Molecular techniques for sex identification of captive birds. *Veterinary World*. 12 (9): 1506-1513.
- Wulansari, W., Yuda, P. dan Zahida, F. (2013). Uji Efektifitas Gen CHD Sebagai Penanda Molekuler untuk Identifikasi Jenis Kelamin pada Burung Air. *Jurnal Biologi*. pp. 1-8.
- Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Jasna, B., Gajic, B., Aleksic, N. and Stanimirovic, Z. (2013). Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biology*. 32 (3): 269-276.