

Aplikasi Kajian DNA Molekuler dan Fenotipik Pada Program Pelepasliaran Burung Kakatua
(Application of Molecular DNA and Phenotypic Study for Reintroduction Programme of Cockatoos)

Moch Syamsul Arifin Zein, Tri Haryoko, Yuli Sulistya Fitriana, Eko Sulistyadi, & Dewi Malia Prawiradilaga

Bidang Zoologi, Puslit Biologi-LIPI
Gedung Widiasatwaloka, Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46 Cibinong 16911
Email: zein_genetic@yahoo.com

Memasukkan: September 2016, **Diterima:** Januari 2017.

ABSTRACT

There are six species of cockatoos in Indonesia which are well known as exotic, smart, and they can be trained in a variety of attractions. Thus, many people want to keep those birds as pets. All of pets which have been kept by community should be evaluated from various aspects before being reintroduced to their natural habitat. The examination of sex and species of illegal cockatoos play as a key role for the reintroduction programme. The objective of this study was to evaluate the reliability and effectivity of evaluation technique of morphometric and molecular for reintroduction programme of cockatoos. We used the COI gene sequences from 68 individuals of cockatoos from pet communities in and around Jakarta and four sequences from GenBank. The phylogenetic analysis used the neighbor-joining method, in which the genetic distance matrix calculations with Kimura 2-parameter models that are implemented on a pairwise distance calculation in the MEGA program version 6:05. The result of the genetic variation of the cockatoo species which shows intraspecific divergence was *Cacatua alba* (n=4)= 0%, *C. galerita* (Australia n=9)= 0.6%, *C. galerita* (Indonesia n=53)= 0.3%, *C. goffiniana* (n=3)= 0%, *C. moluccensis* (n=7)= 0.1%, and *C. sulphurea* (n=2)= 0.3%, with a range of 0-0.6%. The results indicate that the average of intraspecific of COI in the cockatoos community was $0.25\pm 0.055\%$, and interspecific divergences ranged from 3.1 to 11.6%. The phylogenetic tree shows the monophyletic clade of cockatoo species in Indonesia. In addition, DNA barcode analysis and molecular sexing could correct the error and doubts the result of five individual species identification and two individual sexing identification of *C. galerita* by morphological identification. The results of morphological examination base on body weight, body length and head-bill length of *C. galerita triton* were not significantly different ($P\geq 0.5$). Finally, 19 individuals *C. galerita triton* and two individuals *P. aterrimus* were reintroduced to their natural habitat.

Keywords: cockatoo, barcodes DNA, reintroduction

ABSTRAK

Ada enam spesies burung kakatua di Indonesia yang diketahui sebagai satwa eksotis, cerdas, dan dapat dilatih untuk berbagai atraksi. Oleh sebab itu banyak komunitas pecinta burung ingin memiliki dan memeliharanya. Semua satwa yang telah dipelihara masyarakat perlu dilakukan evaluasi dari berbagai aspek sebelum dilepas kembali ke habitat alam. Identifikasi spesies dan jenis kelamin kakatua peliharaan ilegal memiliki peran kunci untuk program reintroduksi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi realibilitas dan efektivitas teknik morfometri dan molekuler untuk program reintroduksi kakatua ke habitat alam. Sebanyak 68 sekuen gen COI kakatua yang dikoleksi dari komunitas pecinta burung di sekitar Jakarta dan empat sekuen dari GenBank digunakan dalam kajian ini. Analisa filogenetik menggunakan metoda neighbor-joining, dimana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura-2 parameter diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program MEGA Versi 6.05. Hasil analisa menunjukkan variasi intraspesifik adalah *Cacatua alba* (n=4)= 0%, *C. galerita* (n=53)= 0,3%, *C. goffiniana* (n=3)= 0%, *C. moluccensis* (n=7)= 0,1%, dan *C. sulphurea* (n=2) = 0,3%, dengan kisaran antara 0-0,6%. Rata-rata divergensi intraspesifik sekuen COI adalah $0,25\pm 0,055\%$ dan interspesifik berkisar antara 3,1-11,6%. Pohon filogenetik menunjukkan *clade* monofiletik spesies kakatua di Indonesia. Selain itu, analisis *DNA barcode* dan penentuan jenis kelamin dengan teknik molekuler telah melakukan koreksi terhadap lima individu hasil identifikasi spesies dan dua individu hasil identifikasi jenis kelamin *C. galerita triton*. Hasil kajian *C. galerita triton* jantan dan betina berdasarkan berat tubuh, panjang tubuh, dan panjang kepala-paruh tidak berbeda nyata ($P\geq 0,5$). Akhirnya, sebanyak 19 ekor *C. galerita triton* dan dua ekor *P. aterrimus* telah dilepasliarkan di habitat alam.

Kata Kunci: Kakatua, DNA barcode, reintroduksi

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kaya keanekaragaman hayati, namun pengelolaan belum dilakukan secara optimal. Lebih dari 35.000 jenis hidupan liar di dunia dikategorikan sebagai jenis terancam punah (CITES 2015), diantaranya adalah beranekaragam jenis burung. Penyebab utama kepunahan adalah rusaknya habitat dan perburuan untuk perdagangan (Metz 2005). Perdagangan satwa liar menjadi ancaman serius bagi kelangsungan hidup satwa di alam, karena sekitar 95% satwa yang diperdagangkan berasal dari tangkapan alam dan sisanya hasil penangkaran (ProFauna 2009).

Burung sangat diminati masyarakat sebagai hewan peliharaan karena keindahan warna bulu dan kemerduan suara. Sebanyak 117 ekor dari berbagai spesies burung dilindungi telah diserahkan masyarakat sekitar Jakarta kepada Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan pada tahun 2015. Penyerahan burung dilakukan dengan maksud untuk dilepasliarkan kehabitat alam tempat hidupan liar itu berada. Hasil penyerahan tersebut dititipkan di lembaga konservasi, yaitu Taman Margasatwa Ragunan, Taman Safari Indonesia Cisarua, Taman Mini Indonesia Indah, Pusat Transit Satwa Tegal Alur, Pusat Transit Satwa Gadok, dan Taman Impian Jaya Ancol.

Perdagangan internasional terhadap burung liar lebih dari 2600 spesies yang didominasi oleh Ordo Passeriformes dan Psittaciformes yang disuplai dari Afrika, Asia, Oceania, dan *Neotropic* (FAO 2008). Jenis burung dari Ordo Psittaciformes di Indonesia yang banyak diperdagangkan dan dipelihara masyarakat antara lain *Cacatua galerita*, *Cacatua sulphurea*, *Cacatua alba*, *Cacatua goffiniana*, *Cacatua moluccensis*, *Cacatua sanguinea*, dan *Probosciger aterrimus*.

Kakatua kecil jambul kuning (*C. sulphurea*) CITES appendix I dengan ciri-ciri warna putih dan mempunyai jambul dan pipi berwarna kuning, ekor bawah tertutup sapuan warna kuning, panjang tubuh sekitar 330-350 mm (Coates & Bishop 1997). Burung *C. sulphurea* memiliki 6 subspecies, yaitu: 1). *C. s. sulphurea* (JF. Gmelin, 1788) dengan distribusi di pulau: Sulawesi, Muna, dan Buton. 2). *C. s. abbotti* (Oberholser, 1917) mempunyai distribusi di Kepulauan Masalembu (Jawa Timur). 3). *C. s. djampeana* (Hartert, 1897) dengan distribusi di

Pulau Tukangbesi (Wangiwangi, Tomea dan Binongko) dan Pulau Tanahjampea (Kayuadi, Tanahjampea, Kalao, Kalaotoa dan Madu). 4). *C. s. occidentalis* Hartert, 1898 dengan distribusi di pulau: Lombok, Sumbawa, Komodo, Padar, Rinca, Flores, Pantar, dan Alor. 5). *C. s. parvula* (Bonaparte, 1850) tersebar di pulau: Roti, Semau, dan Timor. 6). *C. s. citrinocristata* (Fraser, 1844) dengan distribusi di Pulau Sumba (Rowley & Sharpe. 2016).

Kakatua koki (*C. galerita*) mempunyai kemiripan dengan *C. sulphurea*, namun ukuran tubuh lebih besar dengan panjang tubuh 380-510 mm (Beehler *et al.* 2001) dan rentang sayap lebih dari 260 mm. Selain itu, *C. galerita* mempunyai lingkaran mata berwarna biru. *C. galerita* memiliki 4 subspecies, yaitu 1). *C. g. triton* Temminck, 1849 dengan sebaran di pulau Papua bagian barat, Papua Nugini dan pulau sekitarnya. 2). *C. g. eleonora* Finsch, 1863 dengan sebaran di Pulau Aru. 3). *C. g. fitzroyi* (Mathews, 1912) penyebarannya di Australia bagian utara. 4). *C. g. galerita* (Latham, 1790) dengan sebaran di Australia bagian timur dan tenggara termasuk Pulau Kangaroo dan Tasmania (Rowley & Kirwan 2016).

Kakatua putih (*C. alba*) merupakan burung endemik hutan hujan tropis dataran rendah di pulau: Halmahera, Bacan, Ternate, Tidore, Kasiruta, dan Madiola yang merupakan wilayah Maluku Utara. *C. moluccensis* adalah burung endemik hutan dataran rendah dengan ketinggian 0-1000 m di atas permukaan laut di pulau: Seram, Ambon, Haruku, dan Saparua (Maluku Selatan). Kakatua Tanimbar (*Cacatua goffiniana*) mempunyai ukuran panjang tubuh-sekitar 320 mm, bulu dan jambulnya berwarna putih, dengan bercak-bercak merah pada bulu di sekitar paruh. Burung ini endemik di pulau: Yamdena, Larat, Selaru, serta Tanimbar dan sekitarnya (Coates & Bishop 1997).

Burung kakatua rawa (*Cacatua sanguinea*) memiliki panjang tubuh sekitar 380 mm. Bulu dan jambul berwarna putih, kelopak mata agak lebar dan berwarna biru. Spesies ini memiliki 5 subspecies yaitu 1). *C.s.transfreta* Mees, 1982 dengan sebaran di bagian selatan Papua dan Papua Nugini. 2). *C.s.sanguinea* Gould, 1843 di bagian barat laut Australia. 3). *C.s.normantoni* (Mathews, 1917) di bagian barat Cape York Peninsula. 4). *C.s.westralensis* (Mathews, 1917) di bagian barat Australia. 5). *C.s.gymnopis* Sclater, 1871 di Australia bagian Tengah dan Timur (Rowley,

2016). Kakatua raja (*Probosciger aterrimus*) sangat besar berjambul hitam dengan bercak merah di pipih, paruh sangat besar, dan pada yang betina memiliki paruh lebih kecil dengan daerah sebaran di Papua (Beehler *et al.* 2001).

Burung kakatua yang dipelihara masyarakat secara ilegal terus bertambah dan merupakan ancaman bagi keberlangsungan kehidupan burung tersebut di alam. Oleh karena itu Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan pada tahun 2015 melakukan program kampanye penyelamatan kakatua. Dalam program tersebut masyarakat diharapkan menyerahkan secara sukarela burung kakatua yang dipelihara kepada pemerintah untuk selanjutnya ditindaklanjuti dengan program pelepasliaran ke habitat alamnya. Proses pelepasliaran burung yang sudah hidup bersama manusia memerlukan beberapa tahapan untuk dapat hidup kembali dengan baik di alam. Tahapan pertama melakukan identifikasi setiap individu. Tahapan kedua adalah *Pre-release* (menyiapkan kondisi untuk kelayakan pelepasliaran). Tahapan ketiga adalah Pelepasliaran (*release*) di habitat dan distribusi yang tepat, dan tahap keempat adalah monitoring pasca pelepasliaran. Setiap individu dikembalikan ke wilayah distribusi habitat asal yang dapat mendukung kehidupan alamiah dari burung tersebut. Oleh sebab itu diperlukan kajian fenotipik dan DNA molekuler untuk menentukan spesies, garis keturunan, dan jenis kelamin.

Pemanfaatan teknologi molekuler merupakan bagian penting dalam proses investigasi hidupan liar yang diperdagangkan (Iyengar. 2014) dan dipelihara oleh masyarakat sebagai hewan kesayangan. Pendekatan molekuler sebagai alat standar taksonomi telah digunakan sejak 20 tahun yang lalu dan saat ini telah tersedia akses protokol lebih cepat dan besar (Borisenko *et al.* 2008). Teknik DNA molekuler ini diketahui dapat digunakan sebagai alat bantu identifikasi jenis melalui urutan sekuen DNA barcode dari gen COI (Cytochrome - C oxidase subunit-I) DNA mitokondria (Hebert *et al.* 2003). Gen COI diketahui memiliki variasi intraspesifik rendah tetapi divergensi tinggi antara taksa yang berdekatan (Ward *et al.* 2005; Hajibabaei *et al.* 2006). Teknik DNA molekuler untuk identifikasi jenis dan jenis kelamin (*sexing*) lebih akurat sehingga setiap individu dapat diketahui jenis kelaminnya

secara tepat. Oleh karena itu dalam program pelepasliaran burung kakatua hasil penyerahan masyarakat perlu dilakukan identifikasi secara morfologi dan teknik DNA molekuler untuk menentukan spesies, garis keturunan, dan jenis kelamin.

BAHAN DAN CARA KERJA

Program kampanye penyelamatan burung kakatua oleh Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan menghasilkan sebanyak 117 ekor berbagai spesies burung telah diserahkan masyarakat Jakarta dan sekitarnya. Burung dipelihara sementara di lembaga konservasi untuk pemeriksaan kesehatan dan pemulihan kondisi fisik. Lembaga konservasi yang ditunjuk adalah Taman Margasatwa Ragunan (39 ekor), Taman Safari Indonesia Cisarua (26 ekor), Taman Mini Indonesia Indah (26 ekor), Pusat Transit Satwa Tegal Alur (8 ekor), Pusat Transit Satwa Gadok (14 ekor), dan Taman Impian Jaya Ancol (4 ekor). Berdasarkan pengamatan ciri-ciri morfologi, hasil pemeriksaan kondisi kesehatan dan kelayakan maka sebanyak 68 ekor burung dipilih sebagai kandidat yang akan dilepas ke habitat alam terdiri dari kakatua koki (*Cacatua galerita*), kakatua kecil jambul kuning (*Cacatua sulphurea*), kakatua putih (*Cacatua alba*), kakatua Tanimbar (*Cacatua goffiniana*), kakatua Maluku (*Cacatua moluccensis*), dan kakatua raja (*Probosciger aterrimus*).

Deskripsi ciri-ciri khusus setiap spesies dilakukan pada populasi burung *Psittacidae* yang diserahkan masyarakat di Pusat Penangkaran *ex-situ*. Setiap individu diambil foto dari berbagai sisi sebagai bahan kajian. Selain itu dilakukan pengukuran fenotipe meliputi: berat tubuh, panjang tubuh, dan panjang kepala-paruh (*head-bill*). Data fenotipe ini, digunakan sebagai dasar penentuan spesies. Kajian ukuran tubuh antara burung jantan dan betina dilakukan analisa statistik Anova dengan SPSS 16.0.

Setiap ekor burung diambil sampel darah untuk keperluan identifikasi spesies, garis keturunan, dan jenis kelamin dengan teknik DNA. Ekstraksi dan isolasi DNA dilakukan dengan metoda fenol-kloroform (Sambrook *et al.* 1989) dan hasil ekstraksi DNA disimpan di dalam *freezer* sampai dilakukan proses PCR.

Identifikasi spesies dilakukan dengan barcode

DNA menggunakan gen COI (Cytochrome-b subunit-I) DNA mitokondria. Amplifikasi gen target dengan reaksi PCR menggunakan primer Bird F₁: 5'-TTC.TCC.AAC.CAC.AAA.GAC.ATT.GGC.A C3'' dan Bird R2: 5'-ACT.ACA.TGT.

GAG.ATG.ATT.CCG.AAT.CCA.G3'' (Hebert *et al.* 2004). Komposisi larutan PCR terdiri dari 2,5 µl (10xBufer); 0,5 µl dNTP (10mM); 0,625 µl primer F (10pmol/µl), 0,625 µl primer R (10pmol/µl), 0,125 µl Top Taq DNA Polymerase Qiagen (5unit/µl), penambahan dH₂O sampai volume 25 µl. Kondisi PCR optimal adalah *pre*-denaturasi pada 95°C selama 1 menit, (denaturasi pada 95°C selama 1 menit, *annealing* 45°C selama 1 menit 30 detik, dan elongasi pada 72°C selama 1 menit 30 detik) 5x, (denaturasi pada 95°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 1 menit 30 detik, dan elongasi pada 72°C selama 1 menit 30 detik) 35x dan final elongasi 72°C selama 5 menit. Hasil PCR dilanjutkan dengan analisa sekuensing menggunakan jasa layanan 1st BASE, Singapore.

Analisa data sekuen barcode DNA dilakukan terhadap 68 ekor burung kakatua yang terpilih pada tahap seleksi tahap pertama. Sebagai pembanding digunakan 4 (empat) sekuen barcode DNA dari *Genbank*, yaitu *C. moluccensis* (kode akses JF414239.1 dan NC020592.1); *C. sulphurea* (kode akses JF414291.1), dan *C. alba* (kode akses JF414300.1), serta Nuri bayan (*Eclactus rotatus*) sebagai *outgroup* I, dan Nuri kepala hitam (*Lorius lorry*) sebagai *outgroup* II, sehingga total sekuen yang digunakan sebanyak 74 fragmen gen COI DNA mitokondria. Analisa filogenetik menggunakan metoda *neighbor-joining*, dimana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura-2 Parameter (K2P) yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) Versi 6.05 (Tamura *et al.* 2013).

Identifikasi jenis kelamin dilakukan dengan amplifikasi menggunakan primer 2550F dan 2718R dengan target segmen gen CHD1 yang terletak pada kromosom seks. Runtutan sekuen primer 2550F adalah sebagai berikut 5'-GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA-3', sedangkan sekuen primer 2718R yaitu 5'-ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG-3' (Fridolfsson & Ellegren 1999). Amplifikasi dilakukan dengan volume total reaksi 15 µl dengan perincian komposisi

sebagai berikut 0,2 mM untuk setiap dNTP, 0,3 pmol untuk setiap primer, 2,5 Mm MgCl₂, 0,5 unit Taq DNA Polymerase dalam 1x buffer reaksi (10 mM Tris-HCl pH 8,3 dan 50 mM KCl) dan 0,3 mg/ml BSA.

Reaksi amplifikasi dijalankan pada mesin *thermocycler* Gene Amp*PCR system 9700 (Applied Biosystem, USA) pada kondisi *pre*denaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 45 detik, *annealing* 46°C selama 45 detik dan elongasi 72°C selama 90 detik sebanyak 30 siklus. Pada akhir siklus diikuti reaksi pasca-elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit (Sulandari & Zein 2012). Produk PCR yang diperoleh dielektroforesis pada gel agarose 2% yang telah di *staining* dengan *Flourosafe* dan di *running* dalam tegangan 100 volt selama 45 menit. Produk PCR dielektroforesis dengan dibandingkan DNA *marker* ukuran 100 pasang basa (Fermentas). Hasil elektroforesis divisualisasi dengan UV transiluminator. Elektroforesis produk PCR untuk jenis kelamin betina (♀) ditunjukkan dengan dua pita yakni Z yang berukuran sekitar 450 pasang basa dan W yang berukuran sekitar 650 pasang basa, sedangkan jenis kelamin jantan (♂) ditunjukkan dengan munculnya satu pita Z yang berukuran 650 pasang basa (Fridolfsson & Ellegren 1999).

HASIL

Barcode DNA pada Populasi Kakatua yang Dipelihara Masyarakat

Kajian barcode DNA dilakukan pada burung kakatua yang dipelihara oleh masyarakat sekitar Jakarta. Setelah dilakukan seleksi tahap pertama berdasarkan tampilan dan hasil pemeriksaan kesehatan, maka sebanyak 68 ekor burung kakatua dianalisa menggunakan sekuen gen COI DNA mitokondria dan empat sekuen gen COI kakatua diambil dari *GenBank*. Hasil identifikasi spesies dengan barcode DNA terdapat lima spesies kakatua, yaitu *C. galerita*, *C. sulphurea*, *C. alba*, *C. goffiniana*, *C. moluccensis*, dan *Probosciger aterrimus*. Divergensi sekuen intraspesifik DNA barcode adalah *C. galerita* (n=53)= 0,3±0,001%, *C. sulphurea* (n=2)= 0,3±0,002%, *C. alba* (n=4)= 0, *C. moluccensis* (n=7)= 0,1±0,001%, *C. goffiniana* (n=3)= 0%, dan *P. aterrimus* (n=2)=0%. Rata-rata jarak genetik intraspesifik 0,11±0,08%. Jumlah spesies kakatua

terbanyak yang dianalisa adalah *C. galerita*, yaitu 53 individu dan memiliki 10 garis keturunan dengan nilai *bootstrap* antar garis keturunan adalah 95/55/95/52/39/39/63/63/69/87%. Pada *C. sulphurea* nilai *bootstrap* antar garis keturunan adalah 99% (satu garis keturunan), *C. alba* 99% (satu garis keturunan), *C. moluccensis* 99/69/66% (tiga garis keturunan), dan *C. goffiniana* 99% (satu garis keturunan). Similaritas dari masing-masing spesies adalah *C. galerita* 99,7%, *C. sulphurea* 99,7%, *C. alba* 100%, *C. moluccensis* 99,9%, dan *C. goffiniana* 100% (Tabel 1). Jarak genetik interspesifik dari burung kakatua, yaitu *C. galerita*, *C. sulphurea*, *C. alba*, *C. moluccensis*, *C. goffiniana*, dan *P. aterrimus* (Psittacidae) berkisar 3,1-11,6% (Tabel 2).

Pohon filogeni burung kakatua (Psittacidae) berdasarkan gen COI terbentuk dua *clade monophyletic* dari lima spesies burung kakatua (*C. galerita*, *C. sulphurea*, *C. alba*, *C. moluccensis*, dan *C. goffiniana*) dengan nilai *bootstrap* 96% terhadap kakatua raja (*P. aterrimus*). Nilai *bootstrap* 99% terhadap Nuri bayan/*E. rotatus* (*outgroup* I) dan Nuri kepala hitam/*L. lory* (*outgroup* II). *Clade* I dengan nilai *bootstrap* 99% terdiri dari *subclade* I-A dan *subclade* I-B. *Subclade* I-A terdiri dari *C. galerita* dan *C. sulphurea* dengan nilai *bootstrap* 96% dan *subclade* I-B terdiri *C. alba* dan *C. moluccensis*

dengan nilai *bootstrap* 78%, sedangkan *clade* II hanya *C. goffiniana* dengan nilai *bootstrap* 99% (Gambar 1).

Kajian DNA dan Fenotipik Psittacidae yang di Lepas ke Habitat Alam

Hasil filogenetik berdasarkan DNA barcode dari gen COI DNA mitokondria dalam menentukan spesies dan garis keturunan dari individu yang dipilih pada tahap pertama, dilanjutkan pengamatan terhadap individu yang mempunyai kebugaran (*fitness*) dan kesehatan paling baik untuk hidup kembali di habitat alam. Kajian ini meliputi analisa filogeni, identifikasi jenis kelamin, dan fenotipik, serta tampilan dari masing-masing individu. Hasil evaluasi dipilih 19 individu *C. galerita* dan dua individu *P. aterrimus*.

Analisa Pohon Filogeni Individu yang Siap di Lepas ke Habitat Alam

Konstruksi pohon filogeni *C. galerita* dan *P. aterrimus* yang terpilih pada tahap akhir evaluasi dan siap dilepas ke habitat alam dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan situs polimorfik terdapat tujuh haplotipe (garis keturunan) pada *C. galerita* dan satu haplotipe pada *P. aterrimus*. Analisa filogenetik ini dilakukan dengan membandingkan sekuen barcode *C. galerita* pada

Tabel 1. Garis keturunan burung kakatua dengan K2P pada gen COI mitokondria DNA

No	Nama Spesies	Jarak Genetik Intraspesifik %	Nilai Bootstrap antar garis keturunan %	Similaritas %
1	<i>C. galerita</i>	0,3±0,1	95//55/95/52/39/39/63/63/69/87	99,7
2	<i>C. sulphurea</i>	0,3±0,2	99/	99,7
3	<i>C. alba</i>	0	99/	100
4	<i>C. moluccensis</i>	0,1±0,001	99/69/66/	99,9
5	<i>C. goffiniana</i>	0	99/	100
6	<i>P. aterrimus</i>	0	99/	100

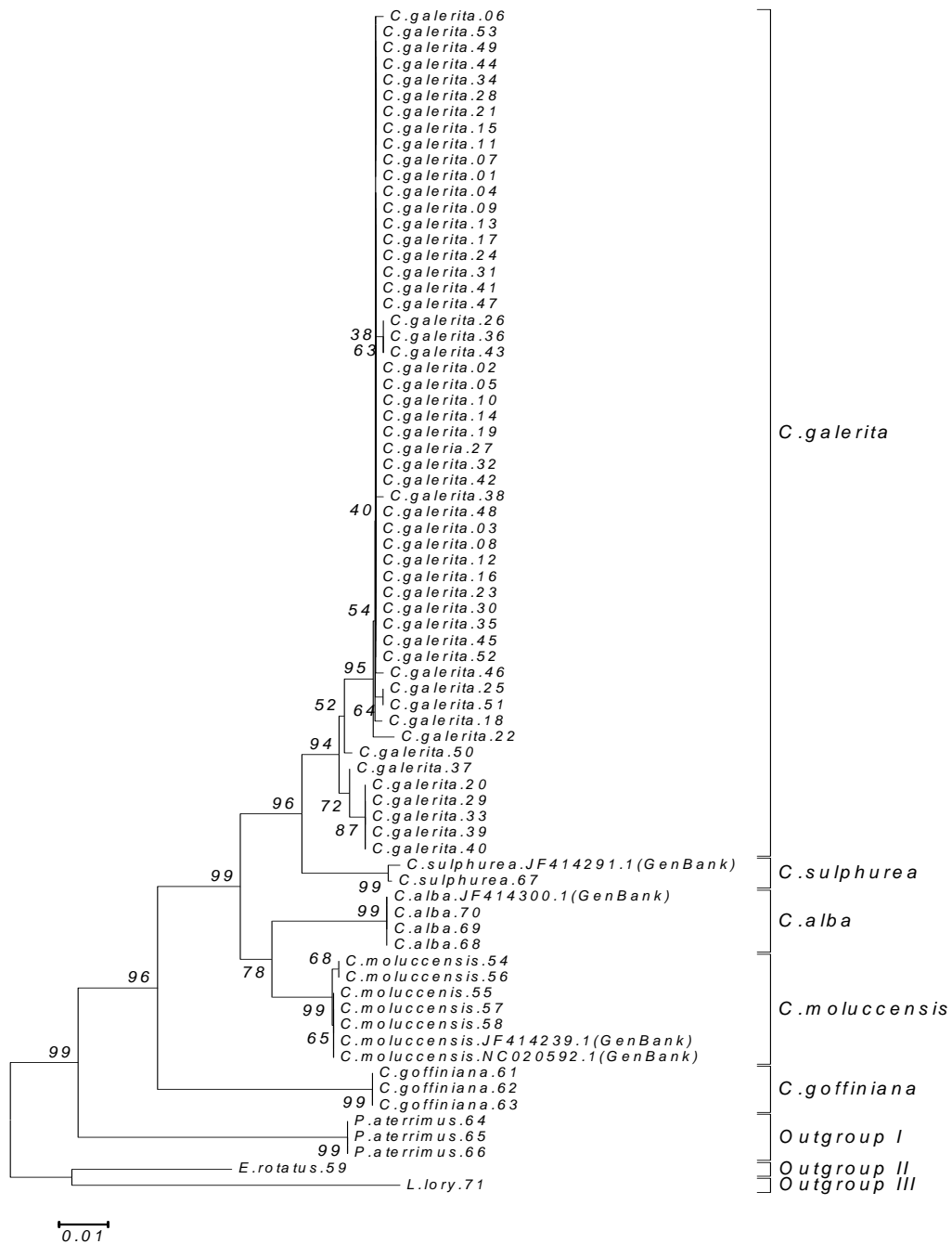
Tabel 2. Jarak genetik interspesifik burung kakatua (Psittacidae)

No	Nama Spesies	<i>C. galerita</i>	<i>C. moluccensis</i>	<i>C. goffiniana</i>	<i>P. aterrimus</i>	<i>C. sulphurea</i>	<i>C. alba</i>
1	<i>C. galerita</i>	0,000	0,008	0,012	0,014	0,007	0,009
2	<i>C. moluccensis</i>	0,044	0,000	0,012	0,014	0,010	0,007
3	<i>C. goffiniana</i>	0,086	0,086	0,000	0,014	0,012	0,012
4	<i>P. aterrimus</i>	0,114	0,108	0,116	0,000	0,014	0,014
5	<i>C. sulphurea</i>	0,031	0,058	0,087	0,113	0,000	0,010
6	<i>C. alba</i>	0,056	0,036	0,086	0,110	0,059	0,000

Keterangan: Di atas diagonal standard deviasi

kajian ini dengan *C. galerita* dari Australia dimana sekuen gen COI diambil dari *GenBank*. Hasil analisa menunjukkan bahwa *C. galerita* yang dianalisa merupakan subspecies *C. galerita triton* yang berasal dari Papua. Hasil filogeni menunjukkan garis keturunan yang berbeda dengan *C. galerita* yang berasal dari Australia (Gambar 3.) dengan jarak genetik 3,7%. Lebih lanjut hasil analisa menunjukkan jarak genetik

dalam populasi subspecies *C. galerita triton* (0,6%), *C. galerita* dari Australia (0,06%), dan *P. aterrimus* (0). Di Australia terdapat dua subspecies *C. galerita*, yaitu *C. g. fitzroyi* (Mathews, 1912) dengan penyebaran di Australia bagian utara dan *C. g. galerita* (Latham, 1790) dengan sebaran di Australia bagian timur dan tenggara termasuk pulau Kangaroo dan Tasmania (Rowley & Kirwan 2016).



Gambar 1. Pohon filogeni berdasarkan gen COI DNA mitokondria pada burung kakatua (Psittacidae) pada seleksi tahap I.

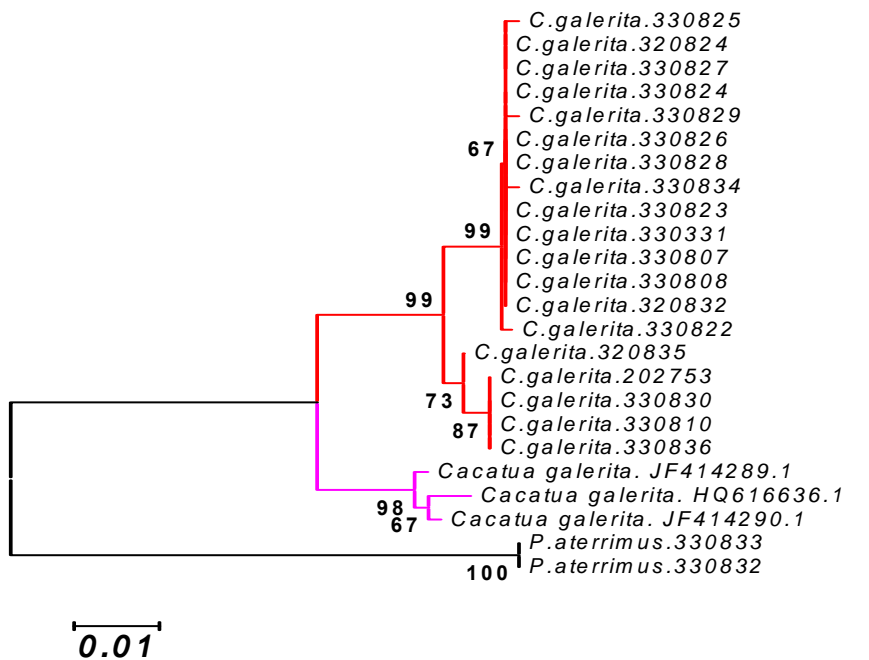
Jenis Kelamin

Selain dilakukan identifikasi jenis kelamin berdasarkan morfologi, dilakukan juga identifikasi jenis kelamin berdasar teknik DNA untuk melakukan koreksi kemungkinan terjadi kesalahan. Hasil identifikasi jenis kelamin dengan teknik DNA secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 4.

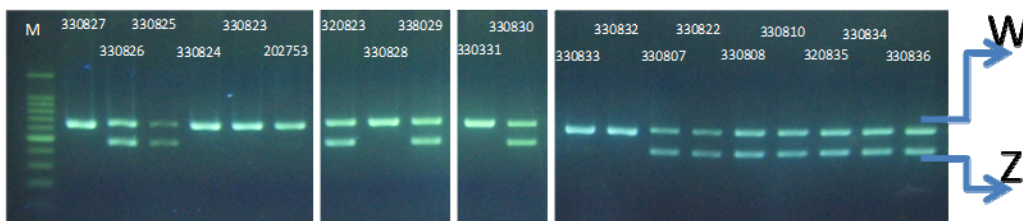
Karakteristik Fenotipik

Hasil kajian karakteristik fenotipik dibandingkan dengan hasil kajian DNA terdapat kesamaan dan perbedaan. Hasil yang sama dalam menentukan spesies dan jenis kelamin dapat dilihat pada Tabel 3, sedangkan kajian fenotipik yang berhasil dikoreksi dengan hasil kajian DNA untuk menentukan spesies dan jenis kelamin dapat dilihat pada Tabel 4.

Karakter morfologi yang diukur pada *C. galerita triton*, yaitu meliputi berat tubuh, panjang tubuh, dan panjang kepala-paruh (*headbill*) dapat dilihat pada Tabel 5, sedangkan hasil statistik Anova dengan SPSS 16.0 terhadap jenis kelamin *C. galerita triton* (Tabel 6). Berdasarkan hasil statistik menunjukkan antara *C. galerita triton* jantan dan betina menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($F_{hitung} < F_{Tabel}$) pada tingkat kepercayaan 95 % dengan parameter yaitu berat badan ($F_{Hitung} 1,721$); panjang total ($F_{Hitung} 3,844$) dan panjang kepala-paruh ($F_{Hitung} 3,837$). Namun demikian berdasarkan rata-ran ketiga parameter tersebut menunjukkan pola bahwa *C. galerita triton* jantan lebih besar daripada betina seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 3. Pohon filogeni *C. galerita triton*, *C. galerita* (Australia), dan *P. aterrimus* yang dilepas ke habitat alam di Kawasan Cagar Alam Cyclops, Jayapura, Papua pada tanggal 17 Desember 2015. Konstruksi pohon filogeni menggunakan jarak genetik K2P dengan metoda *Neighbour Joining*.



Gambar 4. Elektroforesis produk PCR. M: Marker DNA (100 pasang basa); betina (♀) ditunjukkan dengan dua pita yakni Z yang berukuran sekitar 450 pasang basa dan W yang berukuran sekitar 650 pasang basa, sedangkan sampel 3 jenis kelamin jantan (♂) ditunjukkan dengan munculnya satu pita Z yang berukuran 650 pasang basa.

PEMBAHASAN

Barcode DNA pada populasi kakatua di masyarakat

Hasil kajian barcode DNA pada burung kakatua yang dipelihara masyarakat sekitar Jakarta menunjukkan divergensi sekuen intraspesifik dari fragmen gen COI DNA mitokondria berkisar 0,0-0,6% dengan rata-rata $0,25 \pm 0,055\%$ dan interspesifik berkisar 3,1-11,6%, sedangkan hasil kajian lain terhadap burung kakatua putih menunjukkan performan yang tidak jauh berbeda, yaitu divergensi intraspesifik dan interspesifik berkisar antara 0,0-0,26% dan 2,99-10,2% (Astuti & Sulandari 2010). Hasil divergensi

interspesifik lebih besar dari 3% menunjukkan setiap spesies mempunyai sekuen *barcode* unik, sehingga *clade* dan *subclade* antar taksa terlihat jelas dengan resolusi tinggi.

Jika hal ini di dibandingkan dengan divergensi intraspesifik dan interspesifik hasil penelitian sekuen gen COI DNA mitokondria burung di Korea, diketahui rata-rata 0,3% dan 7,9% (Yoo *et al.* 2006), sedangkan burung di Jepang jarak genetik interspesifik berkisar antara 2-2,5%, namun diketahui ada kelompok burung yang mempunyai jarak genetik interspesifik dengan perbedaan lebih dari 2% dan ada kelompok burung yang mempunyai divergensi sekuen interspesifik lebih kecil dari 2% (Nishiumi

Tabel 3. Hasil identifikasi subspecies dan jenis kelamin berdasarkan karakteristik fenotipik dan DNA molekuler

No	Kode	Identifikasi Morfologi		Identifikasi Molekuler	
		Subspecies	Sex	Subspecies	Sex
1	330827	<i>Cacatua galerita triton</i>	M	<i>Cacatua galerita triton</i>	M
2	330825	<i>Cacatua galerita triton</i>	F	<i>Cacatua galerita triton</i>	F
3	330824	<i>Cacatua galerita triton</i>	M	<i>Cacatua galerita triton</i>	M
4	330823	<i>Cacatua galerita triton</i>	M	<i>Cacatua galerita triton</i>	M
5	330822	<i>Cacatua galerita triton</i>	M	<i>Cacatua galerita triton</i>	M
6	330828	<i>Cacatua galerita triton</i>	M	<i>Cacatua galerita triton</i>	M
7	330829	<i>Cacatua galerita triton</i>	F	<i>Cacatua galerita triton</i>	F
8	330331	<i>Cacatua galerita triton</i>	M	<i>Cacatua galerita triton</i>	M
9	330830	<i>Cacatua galerita triton</i>	F	<i>Cacatua galerita triton</i>	F
10	330833	<i>Probosciger aterrimus</i>	M	<i>Probosciger aterrimus</i>	M
11	330832	<i>Probosciger aterrimus</i>	M	<i>Probosciger aterrimus</i>	M
12	330808	<i>Cacatua galerita triton</i>	F	<i>Cacatua galerita triton</i>	F
13	330810	<i>Cacatua galerita triton</i>	F	<i>Cacatua galerita triton</i>	F
14	330834	<i>Cacatua galerita triton</i>	F	<i>Cacatua galerita triton</i>	F
15	330836	<i>Cacatua galerita triton</i>	F	<i>Cacatua galerita triton</i>	F
16	320832	<i>Cacatua galerita triton</i>	M	<i>Cacatua galerita triton</i>	M

Tabel 4. Hasil identifikasi subspecies dan jenis kelamin dan DNA berdasarkan karakteristik fenotipik dan DNA molekuler

Kode	Identifikasi Morfologi		Identifikasi Molekuler		Karakter Morfologi		
	Subspecies	Sex	Subspecies	Sex	Bobot	Panjang	Panjang Kepala Paruh
330826	<i>C. sulphurea parvula</i>	F	<i>C. galerita triton</i>	F	578	460	68.9
320824	<i>C. galerita eleonora</i>	M	<i>C. galerita triton</i>	F	490	470	74.4
330807	<i>C. sulphurea parvula</i>	F	<i>C. galerita triton</i>	F	420	390	70.1
330823	<i>C. sulphurea parvula</i>	M	<i>C. galerita triton</i>	F	470	390	67.7
320835	<i>C. galerita eleonora</i>	F	<i>C. galerita triton</i>	F	420	383	69.9

Tabel 5. Karakter morfologi jenis *C. galerita triton* yang dilepasliarkan setelah identifikasi secara molekuler

No Tag	Jenis	Sex	Bobot Tubuh (gram)	Panjang Tubuh (mm)	Panjang Kepala-Paruh (mm)
330826	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	578	460	68.9
330825	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	926	510	94.4
320824	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	490	470	74.4
330829	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	600	455	65.0
330830	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	610	450	72.2
330807	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	420	390	70.1
330822	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	470	390	67.7
330808	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	850	470	80.8
330810	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	590	430	79.0
320835	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	420	383	69.9
330834	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	690	470	74.6
330836	<i>Cacatua galerita triton</i>	Betina	800	480	82.4
			620.33±166,89	446.50± 40,18	74.95±8.14
330827	<i>Cacatua galerita triton</i>	Jantan	779	480	82.2
330824	<i>Cacatua galerita triton</i>	Jantan	808	600	98.6
330823	<i>Cacatua galerita triton</i>	Jantan	704	520	80.2
330822	<i>Cacatua galerita triton</i>	Jantan	605	470	87.8
330828	<i>Cacatua galerita triton</i>	Jantan	770	445	77.8
330331	<i>Cacatua galerita triton</i>	Jantan	780	460	76.4
320832	<i>Cacatua galerita triton</i>	Jantan	540	450	75.0
<i>Rata-rata</i>			712.29±102,29	489.29±4.80	82.57±8.24

Tabel 6. Hasil statistik Anova dengan SPSS 16.0 terhadap *Cacatua galerita triton*

Parameter	Sex	Jumlah	Rataan	Std. Dev	Minimum	Maksimum	df	F
Bobot Badan	Jantan	7	712,29	102,3	540	808	1	1.721
	Betina	12	620,33	166,9	420	926	17	
	Total	19	654,21	150,29	420	926	18	
Panjang Total	Jantan	7	489,29	54,8	445	600	1	3.844
	Betina	12	446,5	40,19	383	510	17	
	Total	19	462,26	49,37	383	600	18	
Panjang Kepala-Paruh	Jantan	7	82,57	8,25	75	98,6	1	3.837
	Betina	12	74,95	8,14	65	94,4	17	
	Total	19	77,76	8,8	65	98,6	18	

2012). Burung di Belanda intraspesifik rata-rata 0,29% dan interspesifik rata-rata 9,54%, selain itu 95% jenis yang dianalisa mempunyai sekuen DNA barcode unik, sedangkan sisanya dijelaskan adanya proses hibridisasi sehingga terdapat anak jenis (Aliabadian *et al.* 2013). Hasil kajian pada burung di Skandinavia juga dilaporkan sangat efektif menggunakan sekuen gen COI DNA mitokondria (Jonhson *et al.* 2009).

Gen COI juga telah dibuktikan memiliki resolusi dan tampilan tinggi pada pengujian terhadap burung di wilayah Amerika Utara (Hebert *et al.* 2004). Hal ini juga dilaporkan Kevin *et al.* (2007). Oleh karena itu jarak genetik intraspesifik dan interspesifik pada burung kakatua di Indonesia berada pada kisaran hasil penelitian di negara lain dengan menggunakan gen COI DNA mitokondria. Penggunaan gen COI DNA mitokondria

sebagai gen *barcode* pada burung kakatua di Indonesia memiliki kinerja dan resolusi tinggi memisahkan antar jenis burung kakatua secara jelas.

Jarak genetik interspesifik yang tinggi (3,1-11,6%) dapat membentuk pohon filogenetik yang menunjukkan hubungan garis keturunan dari masing-masing spesies burung kakatua. Hal ini memberi gambaran kecepatan dan pola-pola perubahan yang terjadi pada DNA dimana tiap kelompok (*branch*) mewakili *clade* atau kelompok *monophyletic*, sebuah kelompok keturunan dari satu garis nenek moyang. Hasil rekonstruksi pohon filogeni dari lima spesies burung kakatua (Psittacidae) menggunakan sekuen gen COI terdapat dua *clade monophyletic* dengan nilai *bootstrap* 96% terhadap kakatua raja (*P. aterrimus*). *Clade I* terdiri dari *subclade I-A* yang terdiri dari *C. galerita* dan *C. sulphurea* merupakan *sister species* dengan nilai *bootstrap* 96%, sedangkan *subclade I-B* merupakan *sister species* antara *C. alba* dan *C. moluccensis* dengan nilai *bootstrap* 78%. Pada *clade II* hanya terdapat satu spesies, yaitu *C. goffiniana*. Hasil kajian lain *C. goffiniana* merupakan *sister species* dengan *C. sanguinea* (Astuti & Sulandari 2010). Hal ini dapat dikatakan bahwa *C. galerita* dan *C. sulphurea* serta *C. alba* dan *C. moluccensis* masing-masing memiliki garis keturunan dekat. Menurut Podani (2010) *sister-group* diartikan sebagai istilah relatif dengan penekanan hanya pada kerabat terdekat yang dimasukkan dalam analisa diantara kelompok, jenis atau spesimen.

Hasil Koreksi Analisa DNA dan Fenotipik

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik pada burung kakatua di Indonesia menunjukkan jenis *C. galerita* memiliki situs polimorfik tinggi, yaitu terdapat 11 haplotipe dan 10 garis keturunan berdasarkan sekuen gen COI DNA mitokondria dan terdapat tujuh haplotipe dan enam garis keturunan pada *C. galerita* yang terpilih untuk dilepas di habitat asli. Keragaman haplotipe ini sebagai indikator bahwa burung kakatua dari jenis *C. galerita* yang dipelihara masyarakat berasal dari berbagai lokasi yang mempunyai sebaran luas. Seperti diketahui distribusi *C. galerita* di Indonesia meliputi wilayah Papua dan pulau-pulau kecil di sekitarnya. Di

Australia, distribusi *C. galerita* meliputi Australia Barat, Australia Timur (Queensland), Australia Selatan (Victoria dan Tasmania). Introduksi *C. galerita* pernah dilakukan di pulau Seram (Indonesia) dan New Zealand (Sibley & Monroe 1990). Berdasarkan anak jenis, distribusi *C. galerita* meliputi *C. g. eleonora* di pulau Aru, *C. g. triton* di Papua, *C. g. fitzroyi* di Australia Utara, dan *C. g. galerita* di Australia Timur.

Berdasarkan variasi genetik yang tinggi dari sekuen gen COI *C. galerita*, maka analisa ini telah berhasil melakukan koreksi terhadap kesalahan identifikasi secara morfologi (Tabel 4). Pada awal identifikasi spesies secara morfologi di lapangan terhadap lima individu diketahui sebagai *C. sulphurea parvula* dan *C. galerita eleonora*. Hasil pengukuran panjang tubuh, terhadap 3 ekor (Kode 330826, 330807, dan 330823) yang terkoreksi mempunyai panjang tubuh 460 mm, 390 mm dan 390 mm, sehingga hasil analisis genetik terhadap ketiga ekor burung tersebut sudah sesuai dengan parameter ukuran tubuh *C. galerita* yang berkisar 380-510 mm, sedangkan untuk dua ekor (Kode 320824 dan 320835) memiliki panjang tubuh 470 mm dan 383 mm teridentifikasi sebagai *C. galerita eleonora* termasuk dalam kisaran *C. galerita* (380-510 mm) dan hasil analisis molekuler menunjukkan bahwa kedua ekor burung tersebut adalah *C. galerita triton*. Hal ini sesuai dengan Beehler *et al.* (2001) bahwa kisaran panjang tubuh *C. galerita* antara 380-510 mm dan panjang tubuh *C. sulphurea* berkisar 330-350 mm (Bishop & Coates 1997). Adanya perbedaan hasil identifikasi secara morfologi disebabkan oleh parameter berat badan yang berkisar 420-578 gram yang lebih kecil dibandingkan rata-rata berat badan *C. galerita triton* betina $620,33 \pm 166,89$ gram dan *C. galerita triton* jantan $712,29 \pm 102,29$ gram (Tabel 5).

Hasil pengamatan bertahap yang dilakukan meliputi kebugaran individu, karakter fenotipik, barcode DNA, identifikasi jenis, kesehatan, dan pertimbangan berbagai segi maka 19 ekor *C. g. triton* tersebut telah dilepasliarkan oleh Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan di Kawasan Cagar Alam Cyclops, Jayapura, Papua pada tanggal 17 Desember 2015. Sisa yang tidak memenuhi syarat pelepasliaran ke habitat alam dipelihara di institusi konservasi untuk kepentingan

konservasi *ex-situ*, penelitian, pendidikan, dan pariwisata.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilakukan dengan biaya dari DIPA tahun anggaran 2015, Pusat Penelitian Biologi-LIPI atas permintaan Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan untuk keperluan program reintroduksi burung Kakatua ke habitat alam. Terima kasih pada Kepala Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi yang memberi dukungan pada kegiatan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aliabadian, M., KK. Beentjes, CSK. Roselaar, HV. Brandwijk, V. Nijman & R.Vong. 2013. DNA barcoding Birds of Dutch. *Zoo Keys* 365:25-48.
- Astuti, D. & S. Sulandari. 2010. The DNA sequence performance of COI gene in white cockatoos (*Cacatua*, Psittaciformes). *Treubia*.37:1-14.
- Beehler, BM., TK. Pratt & DA. Zimmerman. 2001. *Burung burung di kawasan Papua*. Puslitbang Biologi-LIPI. Edisi Bahasa Indonesia. 498 hal.
- Borisenko, AV., BK. Lim, NV. Ivanova, RH. Hanner & PDN. Hebert. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: afield study in Suriname. *Molecular Ecology Resources*. 8:471-479.
- CITES. 2015. Accessed 6 April 2016 (<http://www.cites.org>).
- Coates, BJ. & KD. Bishop. 1997. *A Guide to the birds of Wallacea : Sulawesi, The Moluccas and Lesser Sunda Islands, Indonesia*. Dove Publications Pty.Ltd, Australia. p.523.
- Food and Agriculture Organization [FAO]. 2008. *International Trade in Wild Birds (And Other Releant Movements) in Latin America and The Caribbean*. Electronic Publishing Policy and Support Branch, Information Division, FAO, Rome, Italy
- Hebert, PDN., A. Cywinska, SL. Ball & JR. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270: 313–322.
- Hebert, PDN., MY. Stoeckl, TS. Zemplak & CM. Francis. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biology* 2: e312
- Hajibabaei, M., DH. Janzen, JM. Burns, W. Hallwachs & PDN. Hebert. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings. Natals. Academic Science*. USA 103: 968-971.
- Iyengar, A. 2014. Forensic DNA, analysis for animal protection and biodiversity conservation: a review. *Journal of Nature Conservation*. 22(3):195-205.
- Kevin C., R. Kerr, MY. Stoeckle, CJ. Dove, LA. Weigh, CM. Francis & PDN. Hebert. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of Nort American birds. *Molecular Ecology*. Note:7: 535-543
- Kilpatrick, CW. 2002. Noncryogenic preservation of mammalian tissue for DNA extraction: an assessment of storage methods. *Bioche. Gen*. 40:53-62.
- Metz, S. 2005. The Current Status of Indonesian Cockatoos in the Wild: Returning Smuggled Parrots to their Forest Homes. *Parrot Society of Australia* 15: 34-37.
- Nishiumi, I. 2012. DNA barcoding and species classification of Japanese birds. *Japan Journal of Ornithology* 61:223-237.
- Podani, J. 2010. Taxonomy in Evolutionary Perspective-An essay on the relationships between taxonomy and evolutionary theory. *Synbiologia Hungarica* 5:1-4.
- ProFauna. 2009. *ProFauna's Report: Wildlife Trade Survey on the Bird Market in Java*. ProFauna Indonesia (<http://www.profauna.org>).
- Rowley, I. & CJ. Sharpe. 2016. Yellow-crested Cockatoo (*Cacatua sulphurea*). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. <http://www.hbw.com/node/54422> on 16 May 2016).
- Rowley, I. & GM. Kirwan. 2016. Sulphur-crested Cockatoo (*Cacatua galerita*). In: del Hoyo, J., A. Elliott, J. Sargatal, DA. Christie & E. de Juana. (eds.). *Handbook of the Birds of the*

- World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. <http://www.hbw.com/node/54423> on 16 May 2016).
- Rowley, I. 2016. Little Corella (*Cacatua sanguinea*). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. (retrieved from <http://www.hbw.com/node/54417> on 16 May 2016).
- Sambrook, J., EF. Frisch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbour Lab. Press. New York.
- Sibley, CG. & BL. Monroe Jr. 1990. *Distribution and Taxonomy of Birds of the world*. Yale University Press. New Haven and London.
- Sulandari, S. & MSA. Zein. 2012. Application of two molecular sexing methods for Indonesian bird species: implication for captive breeding programs in Indo-nesia. *Hayati Jurnal Bioscience*. 19(4):183-190
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipiski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Yoo, HS., JY. Eah, JS. Kim, YJ. Kim, MS. Min, WK. Paek, H. Lee & CB. Kim. 2006. DNA barcoding Korean birds. *Molecules and Cell*. 22(3):323-327.

