



PENENTUAN JENIS KELAMIN BURUNG KENARI (*Serinus canaria*) BERDASARKAN GEN *Chromodomain Helicase DNA-Binding 1 (CHD1)*

Genotypic Sexing in Canary (*Serinus canaria*) Bird based on *Chromodomain Helicase DNA-Binding 1 (CHD1)* Gene

Afif Muhammad Akrom¹, Indarjulianto Soedarmanto^{2*}, Yanuartono², Trini Susmiati³, Alfari Nururrozi², Slamet Raharjo²

¹Program Studi Sain Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,

²Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,

³Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jl. Fauna No 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281, Indonesia

*Email: indarjulianto@ugm.ac.id

ABSTRACT

Phenotype determination of sex in young canaries is very low in accuracy. This study aimed to develop a genotypic sexing method in canaries. This study used 12 canaries consisting of 3 mature males, 3 mature females and 6 one-month-old canaries. Phenotypic sexing by cloacal observation was done on all birds, continued by genotypic sexing to identification CHD1 gene using polymerase chain reaction (PCR). The PCR used blood samples for mature canaries, and feather for mature and one-month-old canaries. The results of phenotypic observations showed that all mature male canaries had prominent and pointed cloaca forms, all mature females had flat and wide, whereas all one-month-old birds had a flat cloaca. The result of PCR showed a single band (500 bp) for mature male and double bands (500 bp and 300 bp) for mature female canaries. The PCR results of one-month-old canaries showed that there were one male and five females. Based on this study, it was concluded that genotypic sexing using the PCR method is effective in the sex determination of canaries.

Keywords: canary, CHD1, genotype, PCR, sexing

ABSTRAK

Penentuan jenis kelamin burung kenari muda secara fenotip akurasinya sangat rendah. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jenis kelamin burung kenari secara genotip. Penelitian ini menggunakan 12 ekor burung kenari, terdiri dari 6 ekor dewasa (3 jantan, 3 betina) serta 6 ekor umur 1 bulan. Semua burung ditentukan jenis kelaminnya dengan mengamati kloaka dan identifikasi gen *CHD1* menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Sampel DNA berasal dari darah dan bulu untuk burung dewasa serta bulu untuk burung umur 1 bulan. Pengamatan fenotip menunjukkan bahwa burung kenari dewasa jantan mempunyai bentuk kloaka menonjol dan runcing, dewasa betina berbentuk datar dan lebar, sedangkan semua burung umur 1 bulan mempunyai bentuk kloaka datar. Hasil identifikasi gen *CHD1* diperoleh adanya 1 pita gen sekitar 500 bp dari sampel darah dan bulu semua burung kenari dewasa jantan, dan 2 pita gen sekitar 500 bp dan 300 bp dari sampel semua burung kenari betina dewasa. Hasil PCR pada sampel burung umur 1 bulan menunjukkan bahwa 1 ekor jantan dan 5 ekor betina. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penentuan jenis kelamin secara genotip menggunakan gen *CHD1* dapat dilakukan pada burung kenari.

Kata Kunci: *CHD1*, genotip, kenari, PCR, penentuan jenis kelamin

PENDAHULUAN

Masyarakat Indonesia sejak lama gemar memelihara burung kenari (*Serinus canaria*) karena kicauan, variasi dan kombinasi warnanya yang beragam (Jepson 2010, Julita et al. 2015). Kicauan burung kenari jantan sangat bervariasi, memiliki irama lagu yang baik, dan berdurasi panjang. Menurut Amy et al. (2018) vokalisasi burung dibagi menjadi dua tipe yaitu nyanyian (*songs*) dan panggilan (*calls*). Nyanyian burung kenari jantan lebih panjang dan merupakan vokalisasi kompleks, sedangkan burung betina hanya menghasilkan suara yang cenderung lebih pendek dan sederhana (Catchpole dan Slater 2008). Perbedaan suara tersebut menyebabkan pecinta burung hanya melombakan burung kenari jantan saja, sehingga meningkatkan harga kenari jantan.

Pemeliharaan dan pelatihan kenari akan dilakukan pada usia muda mungkin oleh penggemar burung dengan cara khusus, agar nyanyian kenari jantan sesuai yang diinginkan. Kendala yang dihadapi adalah sulitnya menentukan jenis kelamin burung kenari sedini mungkin. Biasanya burung kenari baru dapat dibedakan jenis kelaminnya pada usia diatas empat bulan, tetapi pada usia tersebut burung sudah sulit untuk dibentuk suara kicauannya. Para penggemar burung kenari selama ini melakukan penentuan jenis kelamin hanya berdasarkan prediksi saja, sehingga mereka sering salah memilih jenis kelamin. Salah satu metode yang sering digunakan adalah dengan melihat bentuk kloaka, dimana pada kloaka burung jantan lebih menonjol dan runcing sedangkan kloaka burung betina cenderung lebih datar/rata (O'Dwyer et al. 2006).

Teknik penentuan jenis kelamin pada burung secara molekuler mulai banyak dikembangkan khususnya menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Metode tersebut dikembangkan berdasarkan penanda kromosom spesifik. Burung betina memiliki kromosom Z dan W, sedangkan burung jantan memiliki dua kromosom Z (Fridolfsson dan Ellegren 1999). Salah satu gen yang digunakan dalam penentuan jenis kelamin menggunakan metode PCR adalah *chromodomain helicase DNA-binding 1* (*CHD1*). Adanya perbedaan *amplicon* antara

CHD1Z dan *CHD1W* digunakan untuk identifikasi jenis kelamin pada burung (Chen et al. 2012, Morinha et al. 2012). Penggunaan pasangan primer *CHD1F/CHD1R* untuk penentuan jenis kelamin dari 77 spesies burung yang terdiri dari 230 individu menunjukkan akurasi yang lebih tinggi, yaitu sebanyak 91,2% dibanding dengan pasangan primer 2550R/2718F, 56,2% dan pasangan primer P2/P sebanyak 50,9% (Çakmak et al. 2017).

Penggunaan metode PCR dalam penentuan jenis kelamin telah lazim digunakan pada berbagai jenis burung (Morinha et al. 2011a, Morinha et al. 2011b, Vali and Doosti 2011, Khaerunnisa et al. 2013, Çakmak et al. 2017, Nugraheni et al. 2019, Purwaningrum et al. 2019), tetapi belum banyak dilakukan pada burung berkicau khususnya pada burung kenari. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan penentuan jenis kelamin burung kenari secara genotip berdasarkan gen *CHD1*, yang dibandingkan dengan gambaran kloaka secara fenotip.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus–Oktober 2018 di Laboratorium Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, nomor: 0012/EC-FKH/Int/2018.

Bahan

Penelitian ini menggunakan 12 ekor burung kenari yang terdiri dari enam ekor kenari dewasa umur enam bulan yang sudah diketahui jenis kelaminnya, tiga jantan (J1, J2 dan J3) dan tiga betina (B1, B2, dan B3), serta enam ekor burung kenari muda berumur satu bulan (A1, A2, A3, A4, A5, A6) yang belum diketahui jenis kelaminnya (Gambar 1). Burung didapatkan dari peternakan kenari di wilayah Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta.

Sampel yang digunakan untuk penentuan jenis kelamin secara genotip adalah darah untuk burung dewasa dan bulu ekor/sayap untuk semua burung. Bahan lain

yang dipakai adalah *phosphate buffer saline* (PBS), DNA gSYNC™ DNA Extraction Kit, Cat. No. GB100 (Geneaid, Taiwan), PCR-Mix (Geneaid, Taiwan), agarose (1st Base, Singapura), DNA *loading dye*, 0,5 tris borate-EDTA buffer (TBE), marka standar DNA dan pasangan primer *CHD1F* (5′- TAT CGT CAG TTT CCT TTT CAG GT-3′) dan *CHD1R* (5′-CCT TTT ATT GAT CCA TCA AGC CT-3′) (Lee et al. 2010).

Pengamatan fenotip

Sebanyak 12 ekor burung kenari diamati ciri fisik atau penanda fenotipnya untuk menentukan jenis kelaminnya. Parameter yang diamati dalam pengamatan fenotip adalah bentuk kloaka. Pengamatan bentuk kloaka dilakukan dengan melihat bentuk kloaka. Apabila kloaka lebih menonjol dan runcing, maka dimasukkan sebagai burung jantan, sedangkan kloaka lebih datar/rata dan lebar dimasukkan sebagai burung betina.

Uji genotip

Penentuan jenis kelamin secara genotip pada burung kenari dewasa dilakukan dengan mengisolasi DNA dari darah dan bulunya. Sampel darah dikoleksi menggunakan tabung mikrohematokrit dari kapiler ujung jari kaki, kemudian dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang berisi 200 µL PBS. Isolasi DNA dari sampel darah selanjutnya dilakukan dengan mengikuti protokol dari pabrik gSYNC™ DNA Extraction Kit, Cat. No. GB100 (Geneaid, Taiwan). Sampel bulu diambil dari sayap dan/atau ekor

sebanyak tiga helai, bagian *calamus*-nya dipotong-potong menjadi 0,5–1 cm, kemudian dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf. Isolasi DNA selanjutnya dilakukan dengan mengikuti protokol dari gSYNC™ DNA Extraction Kit, Cat. No. GB100 (Geneaid, Taiwan). Sebanyak 200 µL buffer GST dan 20 µL proteinase K dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang berisi sampel darah/bulu, di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu 60°C selama satu malam. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit, supernatan dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf yang baru dan ditambahkan 200 µL buffer GSB. Selanjutnya sebanyak 200 µL etanol absolut ditambahkan, dikocok selama 10 detik, larutan dipindahkan ke dalam GS *column*, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. GS *column* diletakkan ke dalam tabung koleksi dan ditambahkan 400 µL W1 buffer ke dalam GS *column*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. GS *column* selanjutnya diletakkan ke dalam tabung koleksi yang baru, kemudian disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. GS *column* dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf dan ditambahkan 100 µL buffer elusi, didiamkan selama 3 menit, kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 14.000 rpm. Hasil elusi yang berisi DNA selanjutnya dapat langsung dilakukan amplifikasi DNA atau disimpan pada suhu -20°C.

Sampel DNA yang didapatkan diamplifikasi menggunakan teknik PCR



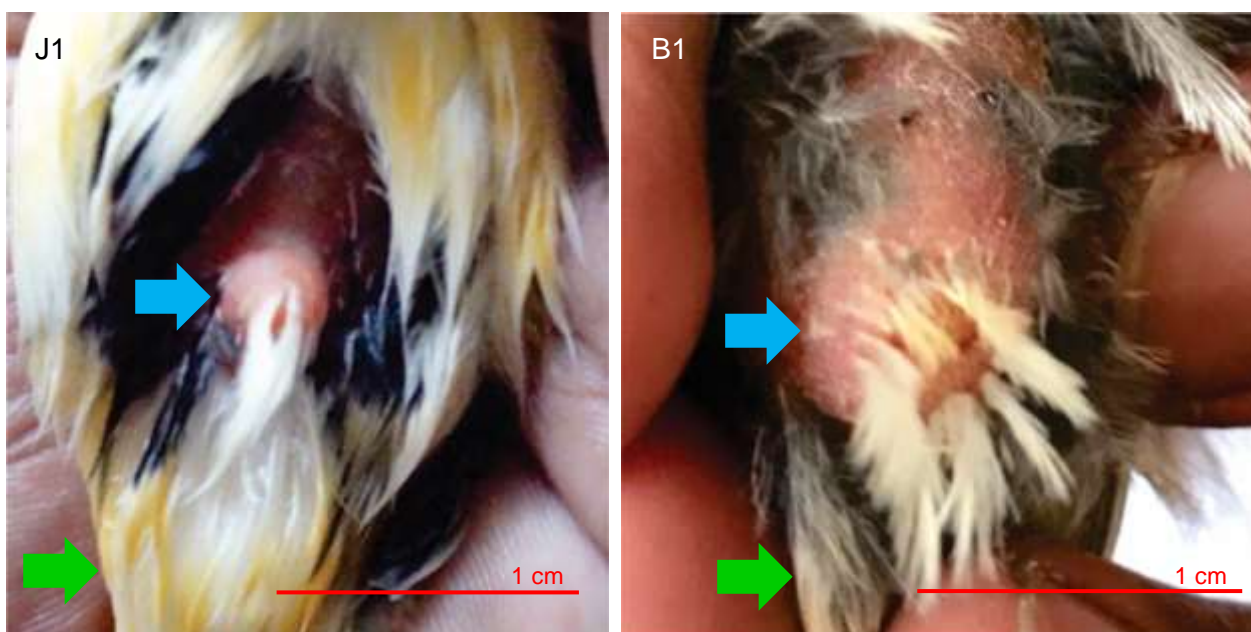
Gambar 1. Burung kenari. (J2) Burung kenari dewasa. (A1) Burung kenari umur 1 bulan

sesuai dengan metode Lee et al. (2010) menggunakan mesin *thermocycler* PCR Primus 25 Advanced® (Peqlab, Jerman). Amplifikasi dilakukan dengan komposisi total sebanyak 25 µL yang terdiri dari 12,5 µL 2× MyTaq HS Red Mix, 1 µL primer *CHD1F*, 1 µL primer *CHD1R*, 5 µL DNA *template*, dan 5,5 µL ddH₂O. Program PCR adalah 1 siklus pre-denaturasi pada suhu 94°C selama lima menit, diikuti 32 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 48,3°C selama satu menit, *elongasi* pada suhu 72°C selama satu menit, dan diakhiri post-*elongasi* selama lima menit (Lee et al. 2010). Produk PCR dielektroforesis pada gel agarose 1,5% (1st Base, Singapura) dalam larutan 0,5 TBE dengan tegangan 70 V selama 35 menit. Pita DNA hasil elektroforesis divisualisasi dengan *ultra violet* (UV) transiluminator dan didokumentasi. Metode tersebut selanjutnya dipakai untuk penentuan jenis kelamin burung yang berumur satu bulan, tetapi sampel yang diambil hanya bulu saja karena menghindari stres akibat pengambilan darah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

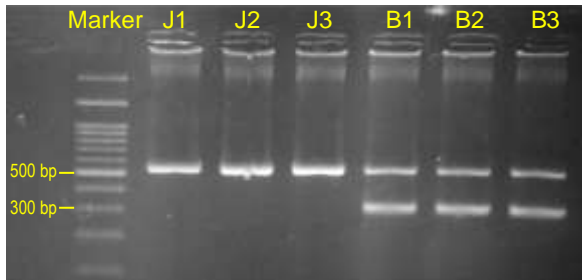
Penentuan jenis kelamin pada burung, yaitu penentuan jantan atau betina sangat penting dilakukan sedini mungkin untuk kepentingan *breeding* maupun pembentukan

karakter suara. Metode penentuan jenis kelamin yang banyak dipakai oleh masyarakat Indonesia adalah secara fenotip dengan mengamati bentuk kloaka. Hasil pengamatan bentuk kloaka burung kenari pada penelitian ini adalah tiga ekor kenari dewasa jantan (J1, J2 dan J3) memiliki bentuk kloaka yang menonjol, dan meruncing. Semua (3 ekor) kenari dewasa betina (B1, B2, dan B3) memiliki bentuk kloaka yang datar dan lebih lebar. Hal tersebut menunjukkan bahwa tiga ekor kenari betina dewasa mempunyai kloaka yang lebih datar dan lebar dibanding burung jantan dewasa. Perbedaan bentuk kloaka dapat dilihat pada Gambar 2. Namun demikian, perbedaan bentuk kloaka ini tidak dapat diamati pada sampel burung kenari yang masih berumur 1 bulan. Hal ini kemungkinan dapat ditemukan pada burung dewasa yang sudah pernah bertelur, sedangkan burung kenari betina umur 1 bulan belum dewasa kelamin dan belum bertelur, sehingga kloaka belum mengalami perubahan bentuk dari datar menjadi lebih lebar atau menonjol. Menurut Sandmeier et al. (2005) burung kenari mencapai kematangan seksual terbaik pada umur mendekati sepuluh bulan. Oleh karena itu penentuan jenis kelamin berdasarkan bentuk kloaka tidak dapat dipakai untuk semua umur.

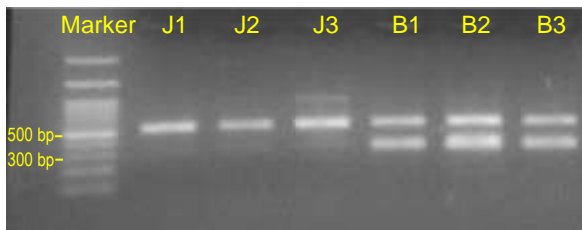


Gambar 2. Bentuk kloaka burung Kenari dewasa. Burung kenari jantan memiliki kloaka yang runcing dan menonjol (J1). Burung Kenari betina memiliki kloaka yang lebih datar dan lebar (B1). Anak panah biru: kloaka; Anak panah hijau: ekor

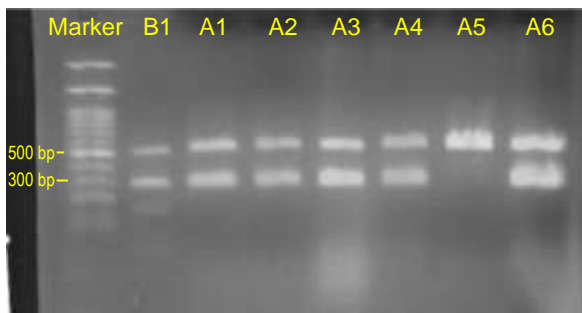
Amplifikasi gen *CHD1* dengan menggunakan sampel darah pada penelitian ini menunjukkan bahwa 3 ekor burung kenari jantan umur 6 bulan menghasilkan satu pita dengan ukuran sekitar 500 bp saat dilakukan visualisasi pada gel agarose dengan lampu UV, sedangkan 3 ekor burung kenari betina umur 6 bulan menghasilkan dua pita dengan ukuran sekitar 500 bp dan 300 bp (Gambar 2). Pita dengan besaran yang sama juga



Gambar 3. Hasil visualisasi produk PCR dengan sampel darah. Marker: marker 100 bp. Kenari jantan (J1, J2, J3) menghasilkan satu pita pada sekitar 500 bp. Kenari betina (B1, B2, B3) menghasilkan dua pita pada sekitar 500 bp dan 300 bp



Gambar 4. Hasil visualisasi produk PCR dengan sampel bulu. Marker: marker 100 bp. hasil yang didapatkan dari sampel bulu sama dengan hasil dari sampel darah yaitu burung jantan (J1, J2, J3) menghasilkan satu pita, sedangkan burung betina (B1, B2, B3) menghasilkan dua pita



Gambar 5. Hasil visualisasi produk PCR burung umur 1 bulan. Marker: marker 100 bp. B1: kontrol betina, A1, A2, A3, A4, dan A6 berjenis kelamin betina, sedangkan A5 berjenis kelamin jantan

dihasilkan ketika menggunakan *template* DNA dari sampel bulu. Burung kenari jantan menghasilkan satu pita dengan ukuran sekitar 500 bp dan burung kenari betina menghasilkan dua pita dengan ukuran sekitar 500 bp dan 300 bp (Gambar 3). Menurut Sun et al. (2017) teknik molekuler terutama yang didasarkan pada PCR merupakan teknik yang layak untuk penentuan jenis kelamin pada burung. Penggunaan teknik penentuan jenis kelamin molekuler merupakan teknik yang cepat dan non-invasif dibandingkan dengan teknik konvensional lainnya (Hsu et al. 2009, Liu et al. 2010, Chen et al. 2012).

Salah satu teknik penentuan jenis kelamin burung yang berkembang saat ini adalah identifikasi secara molekuler terhadap variasi gen *chromodomain helicase DNA-binding 1 (CHD1)* pada kromosom Z dan W. Gen *CHD1* merupakan penanda yang valid untuk membedakan jenis kelamin pada berbagai jenis burung *non-ratite* (Fridolfsson dan Ellegren 1999). Penemuan gen *CHD1 W* dan *Z* memungkinkan penerapan teknik molekuler untuk menentukan jenis kelamin burung (Faux et al. 2014). Burung betina memiliki dua kromosom yaitu kromosom Z dan W, sedangkan burung jantan memiliki dua kromosom Z (Fridolfsson dan Ellegren 1999, Brubaker et al. 2010, Chue dan Smith 2011, Sulandari dan Zein 2012, Ortega et al. 2017). Gen *CHD1* memiliki sedikit perbedaan ukuran dan urutan nukleotida antara beberapa daerah *intronik CHD1Z* dan *CHD1W* (Morinha et al. 2011b, Çakmak et al. 2017). Perbedaan *amplicon* antara *CHD1Z* dan *CHD1W* ini yang digunakan untuk identifikasi jenis kelamin pada burung (Chen et al. 2012, Morinha et al. 2012). Visualisasi hasil amplifikasi gen *CHD1* pada penelitian ini terlihat burung kenari jantan menghasilkan satu pita yang menandakan burung jantan memiliki dua kopi alel *CHD1Z*, sedangkan burung betina menghasilkan dua pita dikarenakan memiliki masing-masing satu kopi alel *CHD1Z* dan *CHD1W*.

Berdasarkan hasil PCR, sampel bulu dari burung kenari dewasa dapat digunakan sebagai sumber DNA, karena memberikan hasil yang sama dengan DNA yang berasal dari darah. Penggunaan sampel bulu untuk identifikasi kelamin pada burung kenari sangat menguntungkan karena pengambilan sampel darah pada burung kenari yang berukuran kecil sangat berisiko terhadap

Tabel 1. Hasil pengamatan kloaka burung kenari dewasa (n=6) dan umur 1 bulan (n=6) dibanding dengan hasil PCR

Umur Burung	Hasil PCR	Kloaka Runcing Menonjol (ekor)	Kloaka Datar (ekor)	Kesimpulan
6 bulan (dewasa)	1 pita	3	0	jantan
	2 pita	0	3	betina
1 bulan (muda)	1 pita	0	1	jantan
	2 pita	0	5	betina

kelangsungan hidupnya. Penggunaan bulu sebagai materi biologis dapat mempermudah pengambilan sampel dan didapatkannya kualitas dan kuantitas DNA yang baik. Secara umum sampel darah dan bulu dapat digunakan untuk mendapatkan jaringan yang mengandung DNA untuk penentuan jenis kelamin pada burung muda dan dewasa (Wellbrock et al. 2012). Pengambilan sampel darah memiliki batas maksimal yaitu 1% dari berat tubuh. Burung kenari hanya memiliki berat tubuh sekitar 20 g sehingga pengambilan darah maksimal adalah 0,2 mL. Penggunaan sampel bulu pada penelitian ini bertujuan untuk meminimalisasi stres pada burung dan juga sebagai alternatif sampel selain darah. Menurut Brown dan Brown (2009) pengambilan sampel darah mengakibatkan penurunan 21–33% rata-rata daya hidup tahunan pada cliff swallow (*Petrochelidon pyrrhonota*).

Penggunaan bulu yang baru dicabut merupakan cara yang sangat efektif untuk mendapatkan sel yang diperlukan dalam analisis DNA. Penggunaan bulu yang lepas saat *molting* (proses bergantinya bulu tua) pada burung sebagai sumber DNA memiliki kelemahan yaitu kualitas dan kuantitas DNA yang sedikit serta dapat terkontaminasi oleh inhibitor PCR (Presti et al. 2013). Jumlah bulu yang dapat digunakan dalam penentuan jenis kelamin burung adalah dua helai bulu sekunder sayap. Dengan dua helai bulu tersebut sudah mencukupi jumlah DNA untuk amplifikasi gen *CHD1*. Menurut Nugroho dan Zein (2015) di dalam bulu terdapat endapan darah dan sel hidup di dalam *calamus*. Endapan darah dan sel yang berada di dalam bulu tersebut yang digunakan sebagai sumber DNA. Isolasi DNA pada burung dapat dilakukan dengan jumlah darah yang sedikit dikarenakan burung memiliki eritrosit yang bernukleus (Nugroho and Zein 2015). Menurut Bosnjak et al. (2013) bulu merupakan sumber DNA yang andal dalam

penentuan jenis kelamin 32 spesies burung paruh bengkok.

Tabel 1 dan Gambar 5 memperlihatkan perbandingan penentuan jenis kelamin secara genotip dan fenotipe pada burung kenari umur 6 bulan dan 1 bulan. Kesesuaian hasil penentuan jenis kelamin secara fenotip dan genotip ditunjukkan pada burung umur 6 bulan, tetapi tidak pada burung yang berumur 1 bulan, Kondisi ini didukung dengan hasil penelitian O'Dwyer et al. (2006) yang melaporkan bahwa penentuan jenis kelamin berdasarkan bentuk kloaka pada burung *Pterodroma leucoptera* dewasa mempunyai akurasi yang sangat tinggi (96%). Hasil penentuan jenis kelamin secara fenotip pada burung kenari umur 1 bulan didapatkan bahwa semua sampel burung mempunyai kloaka yang datar menyerupai burung betina, tetapi hasil penentuan genotip dari jenis kelamin menunjukkan bahwa 1 ekor burung jantan dan 5 ekor burung betina. Samanya bentuk kloaka pada burung umur 1 bulan kemungkinan karena belum berkembangnya organ reproduksinya, dan untuk burung betina muda juga belum pernah bertelur. Mengacu pada beberapa referensi pada unggas dan aves antara lain burung elang Cooper (*Accipiter cooperii*), burung puyuh, ayam, maka hasil PCR pada penelitian ini yang menunjukkan 1 pita diidentifikasi sebagai burung jantan dan yang menghasilkan 2 pita diidentifikasi sebagai burung betina, walaupun pada burung umur 1 bulan mempunyai bentuk kloaka yang sama (Chen et al. 2012, Morinha et al. 2012).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, penentuan genotip dari jenis kelamin secara molekuler pada burung kenari dapat dilakukan menggunakan sampel darah atau bulu, dan menghasilkan kualitas yang sama. Penentuan jenis kelamin secara genotip pada

burung kenari dapat dilakukan mulai umur muda (satu bulan).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini sepenuhnya terselenggara atas Hibah Penelitian Kompetitif Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada tahun 2018 judul “Studi Fenotip Burung Kenari untuk Menentukan Jantan dan Betina setelah Peneguhan Secara Genotip”, sesuai surat penugasan pelaksanaan pekerjaan nomor kontrak 1584/J.01.1/22/HK4/2018 dari Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

DAFTAR PUSTAKA

- Amy M, Salvin P, Leboucher G (2018) The functions of female calls in birds. *Adv Study Behav* 50:243–271. doi: 10.1016/B978-0-12-394288-3.00005-8
- Bosnjak J, Stevanov-Pavlovic M, Vucicevic M, Stevanovic J, Simeunovic P, Resanovic R, Stanimirovic Z (2013) Feasibility of non-invasive molecular method for sexing of parrots. *Pak J Zool* 45:715–720
- Brown MB, Brown CR (2009) Blood sampling reduces annual survival in Cliff Swallows (*Petrochelidon pyrrhonota*). *The Auk* 126:853–861. doi: 10.1525/auk.2009.09048
- Brubaker JL, Karouna-Renier NK, Chen Y, Jenko K, Sprague DT, Henry PFP (2010) A noninvasive, direct real-time PCR method for sex determination in multiple avian species. *Mol Ecol Resour* 11:415–417. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02951.x
- Çakmak E, Peksen CA, Bilgin CC (2017) Comparison of three different primer sets for sexing birds. *J Vet Diagn Invest* 29:59–63. doi: 10.1177/1040638716675197
- Catchpole CK, Slater PJB (2008) *Bird song: Biological themes and variations*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge. doi: 10.1017/CBO9780511754791
- Chen CC, Liu YS, Cheng CC, Wang CL, Liao MH, Tseng CN, Chang HW (2012) High-throughput sex identification by melting curve analysis in blue-breasted quail and chicken. *Theriogenology* 77:1951–1958. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.12.004
- Chue J, Smith CA (2011) Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS J* 278:1027–1034. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08032.x
- Faux CE, McInnes JC, Jarman SN (2014) High-throughput real-time PCR and melt curve analysis for sexing Southern Ocean seabirds using fecal samples. *Theriogenology* 81:870–874. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.12.021
- Fridolfsson A, Ellegren H (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J Avian Biol* 30:116–121. doi: 10.2307/3677252
- Hsu HA, Wang PH, Chao MC, Chan FT, Wang LM, Lin PI, Chang CH, Yuan HW, Ding ST (2009) Use of random amplified polymorphic DNA to identify several novel markers for sex identification in the crested serpent eagle and crested goshawk. *Theriogenology* 72:755–764. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.05.005
- Jepson P (2010) Towards an Indonesian bird conservation ethos: Reflections from a study of birds-keeping in the cities of Java and Bali. Chapter 21. In: Tidemann SC, Gosler A (ed) *Ethno-ornithology: Birds, indigenous people, culture and society*. CRC Press, London
- Julita U, Fitri LL, Fuadah YT (2015) Kemampuan belajar bernyanyi pada burung kenari jantan muda (*Serinus canaria* Linn.) yang didedahkan secara *live-tutoring* dan *tape-tutoring*. *J ISTEK* 9:254–273
- Khaerunnisa I, Sari E, Ulfah M, Jakaria, Sumantri C (2013) Avian sex determination based on chromo helicase DNA-binding (CHD) genes using polymerase chain reaction (PCR). *Media Peternak* 36:85–90. doi: 10.5398/medpet.2013.36.2.85
- Lee JC, Tsai LC, Hwa PY, Chan CL, Huang A, Chin SC, Wang LC, Lin JT, Linacre A, Hsieh HM (2010) A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Mol Cell Probes* 24:27–31. doi: 10.1016/j.mcp.2009.08.003
- Liu WY, Zhao CJ, Li JY (2010) A non-invasive and inexpensive PCR-based procedure for rapid sex diagnosis of Chinese gamecock chicks and embryos. *J Anim Vet Adv* 9:962–970. doi: 10.3923/java.2010.962.970

- Morinha F, Magalhaes P, Ferro A, Guedes-Pinto H, Rodrigues R, Bastos E (2011a) Advances in molecular sexing of birds: a high-resolution melting-curve analysis based on *CHD1* gene applied to *Coturnix* spp. *Ann Zool Fennici* 48:371–375. doi: 10.5735/086.048.0605
- Morinha F, Carvalho M, Ferro A, Guedes-Pinto H, Rodrigues R, Bastos E (2011b) Molecular sexing and analysis of *CHD1-Z* and *CHD1-W* sequence variation in wild common quail (*Coturnix c. coturnix*) and domesticated Japanese quail (*Coturnix c. japonica*). *J Genet* 90:e39–e43. doi: 10.1007/s12041-011-0053-2
- Morinha F, Cabral JA, Bastos E (2012) Molecular sexing of birds: a comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology* 78:703–714. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.04.015
- Nugraheni P, Purwaningrum M, Widayanti R, Haryanto A (2019) Sex determination of peach-faced lovebird (*Agapornis roseicollis*) using polymerase chain reaction (PCR) techniques. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci* 355:012111. doi: 10.1088/1755-1315/355/1/012111
- Nugroho HA, Zein MSA (2015) Evaluasi metode penentuan jenis kelamin pada nuri kepala hitam (*Lorius lory*, Linnaeus 1758). *J Fauna Tropika* 24:83–93
- O'Dwyera TW, Priddel D, Carlile N, Bartle JA, Buttemer WA (2006) An evaluation of three field techniques for sexing Gould's Petrels (*Pterodroma leucoptera*) (Procellariidae). *Emu* 106:245–252. doi: 10.1071/MU05058
- Ortega MT, Foote DJ, Nees N, Erdmann JC, Bangs CD, Rosenfeld CS (2017) Karyotype analysis and sex determination in Australian Brush-turkeys (*Alectura lathamii*). *PLoS One* 12:e0185014. doi: 10.1371/journal.phone.0185014
- Presti FT, Meyer J, Antas PTZ, Guedes NMR, Miyaki CY (2013) Non-invasive genetic sampling for molecular sexing and microsatellite genotyping of hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *Genet Mol Biol* 36:129–133. doi: 10.1590/S1415-47572013005000001
- Purwaningrum M, Nugroho HA, Asvan M, Karyanti K, Alviyanto B, Kusuma R, Haryanto A (2019) Molecular techniques for sex identification of captive birds. *Vet World* 12:1506–1513. doi: 10.14202/vetworld.2019.1506-1513
- Sandmeier P, Coutteel P (2005) Management of canaries, finches, and mynahs. In: Harrison GJ, Lightfoot TL (ed) *Clinical Avian Medicine Vol 2*. Spix Publishing, Palm Beach, pp 879–911
- Sulandari S, Zein MSA (2012) Application of two molecular sexing methods for Indonesian bird species: Implication for captive breeding programs in Indonesia. *HAYATI J Biosci* 19:183–190. doi: 10.4308/hjb.19.4.183
- Sun F, Huang X, Yang S (2017) Sex identification and the sex-related gene of *Nipponia Nippon*. *Am J Biochem Biotechnol* 13:81–84. doi: 10.3844/ajbbbsp.2017.81.84
- Vali N, Doosti A (2011) Molecular study for the sex identification in Japanese quails (*Coturnix japonica*). *Afr J Biotechnol* 10:18593–18596. doi: 10.5897/AJB11.1280
- Wellbrock AH, Bauch C, Rozman J, Witte K (2012) Buccal swabs as a reliable source of DNA for sexing young and adult Common Swift (*Apus apus*). *J Ornithol* 153:991–994. doi: 10.1007/s10336-012-0843-1