

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Peranan ayam kampung sebagai penyedia daging dan telur untuk memenuhi konsumsi protein hewani sangat berarti terutama bagi masyarakat pedesaan. Kontribusi ayam kampung terhadap produksi daging unggas cukup tinggi. Pada tahun 2020 sampai 2021 terjadi peningkatan dari 16,24 juta ton menjadi 16,49 juta ton dan pada tahun 2021 sampai 2022 konsumsi ayam kampung dari 16,49 juta ton meningkat menjadi 16,95 juta ton. Selera konsumen terhadap ayam kampung yang dari tahun ke tahun semakin meningkat. Besarnya permintaan akan produk ayam kampung belum mampu dipenuhi oleh peternak ayam kampung terutama bila permintaan dalam jumlah besar dan kontinu. Untuk mengatasi masalah ini perlu dicari berbagai alternative untuk meningkatkan produktivitas ayam kampung (BPS, 2023).

Ayam Mirah adalah ayam lokal yang berasal dari daerah Kabupaten Simalungun. Ayam Mirah mirip dengan ayam hutan merah Sumatera atau *Gallus-gallus*. Syarat utama dalam kegiatan adat etnis daerah Simalungun adalah menggunakan ayam Mirah, maka saat ini ayam Mirah memiliki ekonomis yang sangat tinggi. Bagi masyarakat Simalungun, ayam Mirah merupakan symbol wibawa, kekuatan, dan kekuasaan. Permintaan konsumen akan ayam Mirah sangat tinggi sehingga harga jualnya sangat tinggi. Ayam mirah memiliki warna bulu yang indah, serta lebih tahan terhadap serangan penyakit daripada jenis ayam lainnya karena itu masyarakat sangat suka memeliharanya (Siagian *et al.*, 2013).

Ayam Mirah dalam tradisi Simalungun bagian dari adat istiadat, baik kepada leluhur, maupun ke peralihan kehidupan lainnya. Ayam Mirah juga disajikan untuk memberikan kehormatan kepada pengawal raja dan pelindung masyarakat sehingga diberi kemampuan perang yang kuat, selain itu ayam mirah di sajikan untuk kesucian yang dimana membela yang mana pun, kecuali hanya kebenaran. Sehingga untuk memperebut dan mempertahankan kekuasaan, Raja Namartuah dengan gelar Partiga-tiga Sipunjung melakukannya dinasti kerajaan

Nagur adalah Raja pertama di Pematang Siantar. Tugu ayam Mirah belum tepat disebutkan sebagai icon kota, mengingat ayam Mirah adalah kuliner khas etnis Simalungun dalam prosesi budaya dan adat istiadat. Ayam Mirah inilah yang juga memiliki peran penting di kerajaan Siantar dahulunya (Anonymous, 2023).

Gen adalah materi genetik yang terdiri atas sepenggal DNA yang menentukan sifat individu melalui pembentukan polipeptida. Unit terkecil materi genetik ini terdapat dalam setiap lokus yang khas pada kromosom. Gen juga berperan sebagai pengendali sifat pada organisme, dalam hal ini gen memegang peranan penting dalam proses pewarisan sifat. Gen memiliki sifat-sifat sebagai berikut :1. Mengandung informasi genetik, 2. Masing-masing gen mempunyai tugas dan fungsi berbeda, 3. Pada waktu pembelahan mitosis dan meiosis dapat mengadakan duplikasi, 4. Ditentukan oleh susunan kombinasi basa nitrogen, 5. Sebagai zarah yang terdapat dalam kromosom. Fungsi gen sebagai berikut : 1. Gen berfungsi sebagai zarah tersendiri yang terdapat dalam kromosom, 2. Menyampaikan informasi genetic dari induk kepada keturunannya, 3. Mengatur proses metabolisme dan perkembangan (Anonymous, 2022).

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa sindrom *RIN2* pada manusia juga disebut sindrom MACS (macrocephaly, alopecia, cutis laxa, dan scoliosis), penyakit kulit herediter langka yang disebabkan oleh hilangnya homozigot 1-pb *RIN2* (Syx *et al.*, 2010; Kameli *et al.*, 2020). Pemindaian selektif genom kuda ras menunjukkan *RIN2* memainkan peran serupa dalam transmisi sinyal, menunjukkan bahwa *RIN2* berada di bawah seleksi buatan yang kuat pada kuda balap (Moon *et al.*, 2015). Analisis komparatif metilasi genom dan transcriptome otot terpanjang pada domba menunjukkan bahwa *RIN2* mungkin merupakan gen fungsional yang mempengaruhi sifat kualitas daging (Cao *et al.*, 2017).

Gen *RIN2* yaitu yang mengkode RAS dan Rab berinteraksi protein 2, dapat berinteraksi dengan Rab5 yang terikat GTP dan berpartisipasi dalam endositosis dini. Penelitian ini menemukan penyisipan/penghapusan 61-bp (indel) di bagian intron 6 gen *RIN2* yang berpengaruh terhadap sifat ekonomi pada ayam (Lin *et al.*, 2021). Penelitian tentang gen *RIN2* pada ayam Mirah saat ini belum

dilakukan. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui adanya mutasi indel 61 bp pada ayam Mirah serta pengaruhnya terhadap ukuran tubuh ayam Mirah.

1.2 Identifikasi Masalah

1. Apakah terdapat mutasi indel 61 bp pada gen *RIN2* ayam Mirah ?
2. Apakah mutasi indel 61 bp pada gen *RIN2* berasosiasi terhadap ukuran tubuh ayam Mirah ?

1.3 Tujuan Penelitian

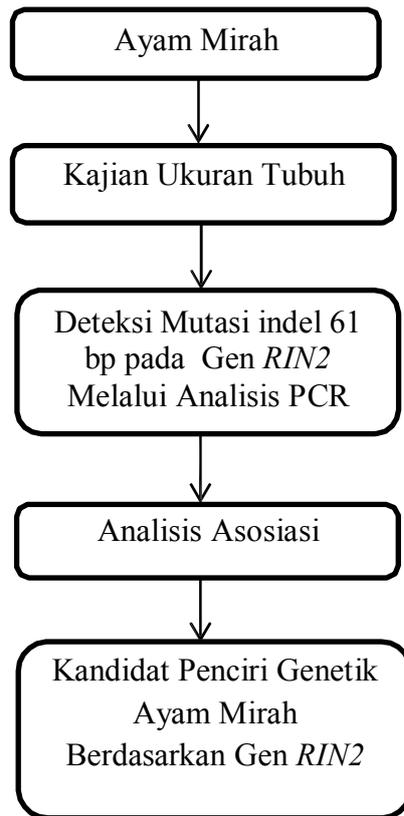
1. Untuk mendeteksi adanya mutasi indel 61 bp pada gen *RIN2* ayam Mirah.
2. Untuk mengetahui mutasi indel 61 bp pada gen *RIN2* berasosiasi terhadap ukuran tubuh ayam Mirah.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memperoleh marka genetik untuk melakukan seleksi molekuler terhadap ukuran tubuh ayam Mirah.

1.5 Kerangka Pemikiran

Ayam Mirah adalah ayam lokal yang berasal dari daerah Kabupaten Simalungun. Ayam Mirah mirip dengan ayam hutan Sumatera atau *Gallus gallus*. Akan tetapi, kajian genetik pada ayam ini belum pernah dilakukan. Ayam Mirah dapat ditingkatkan nilai ekonominya melalui seleksi molekuler. Salah satu kandidat gen yang dapat digunakan untuk seleksi molekuler adalah gen *RIN2*. Penelitian terdahulu menjelaskan bahwa terdapat mutasi indel 61 bp pada gen *RIN2* yang dapat berpengaruh terhadap lemak perut pada ayam. Mutasi tersebut dapat dideteksi menggunakan analisis PCR. Secara ringkas, kerangka pemikiran pada penelitian ini tersaji pada Gambar 1 sebagai berikut:



Gambar 1. Diagram Alir

1.6 Hipotesis

1. Terdapat mutasi indel 61 bp pada gen *RIN2* pada ayam Mirah.
2. Terdapat keragaman genetik gen *RIN2* pada ayam Mirah yang berasosiasi terhadap ukuran tubuh ayam Mirah.

1.7 Defenisi Operasional

1. Ayam Mirah adalah ayam asli dari daerah Simalungun yang dikembangkan di Kecamatan Tigapanah.
2. Gen *RIN2* adalah gen yang berada di kromosom 3 pada kromosom tubuh yang terletak pada intron 6 dengan panjang 61 bp. Fungsinya sebagai faktor pertukaran nukleotida guanin.
3. Mutasi adalah perubahan yang terjadi pada urutan nukleotida. Mutasi merupakan perubahan materi genetik suatu sel yang diwariskan kepada keturunannya.

4. Indel adalah istilah dari insersi (penyisipan) atau delesi (penghapusan) basa dalam genom suatu organisme. Indel merupakan mutasi gen yang disebabkan karena adanya perubahan jumlah basa nitrogen.
5. Mutasi indel adalah perubahan yang terjadi pada jumlah basa nitrogen.
6. 61 bp adalah ukuran mutasi indel di 61 bp.
7. Promotor region gen adalah wilayah DNA yang mengarah ke inisiasi transkripsi dari gen tertentu. Promotor terletak di dekat lokasi awal transkripsi gen, bagian hulu dari DNA.
8. Intron adalah urutan non-coding dalam gen yang dihilangkan selama penyambungan RNA. Ekson adalah urutan pengkodean yang berisi informasi yang diperlukan untuk sintesis protein.
9. Ukuran Tubuh adalah besar kecilnya bentuk tubuh pada ayam, cara pengukurannya adalah:
 - a. Panjang paha atas diukur berdasarkan tulang femur (cm) diukur pada sepanjang tulang paha pada bagian ujung distal yang berartikulasi dengan tibia, fibula, dan patella dengan menggunakan jangka sorong (Sartika, 2013 ; Suhardi, 2012).
 - b. Panjang paha bawah diukur berdasarkan tulang tibia (cm) diukur dari patella sampai ujung tibia dengan menggunakan jangka sorong (Sartika, 2013 ; Suhardi, 2012).
 - c. Panjang kaki diukur berdasarkan tulang tarsometatarsus atau shank (cm) diukur sepanjang tulang tarsometatarsus dengan menggunakan jangka sorong
 - d. Lingkar kaki diukur berdasarkan tulang tarsometatarsus (cm) diukur dengan melingkari tulang tarsometatarsus (shank) pada bagian tengah dengan menggunakan pita ukur yang kemudian dikonversi ke jangka sorong (Sartika, 2013 ; Suhardi, 2012).
 - e. Panjang jari ketiga (cm) diukur dari pangkal jari ketiga sampai ujung jari dengan menggunakan jangka sorong.
 - f. Panjang sayap (cm) diukur dengan merentangkan bagian sayap terlebih dahulu dan dimulai dari pangkal humerus sampai ujung phalanges

dengan menggunakan pita ukur dan kemudian dikonversi ke jangka sorong.

- g. Panjang maxilla (cm) diukur dari pangkal sampai ujung paruh bagian atas dengan menggunakan jangka sorong (Sartika, 2013 ; Suhardi, 2012).
- h. Tinggi jengger (cm) diukur dari pangkal jengger di atas kepala sampai ujung jengger yang paling tinggi dengan menggunakan jangka sorong (Sartika, 2013 ; Suhardi, 2012).
- i. Panjang dada diukur berdasarkan tulang sternum (cm) diukur sepanjang tulang dada bagian depan mulai dari pangkal atas hingga ujung dada dengan menggunakan pita ukur kemudian dikonversi ke jangka sorong.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ayam Mirah

Bagi masyarakat Simalungan, Dayok Mirah merupakan simbol wibawa, kekuatan, dan kekuasaan. Adapun manfaat dari ayam Mirah ialah sebagai kuliner khas daerah Simalungun. Yang dahulunya merupakan makanan bangsawan yakni dayok nabinatur. Tidak hanya enak dan unik, dayok nabinatur juga kaya akan sejarahnya. Sebenarnya dayok nabinatur bisa dibuat menggunakan ayam jenis apapun. Akan tetapi, ayam kampung jantan paling sering dipilih. Alasannya cukup menarik untuk dijadikan pertimbangan (Siagian *et al.*, 2013).

Seiring berjalannya waktu, perkawinan ayam Mirah dengan jenis ayam lain ternyata telah memberi efek negatif, yaitu sulit menemukan ayam Mirah murni. Saat ini ayam Mirah hanya dijumpai pada beberapa wilayah tertentu di Kabupaten Simalungun dengan populasi terbatas (Siagian *et al.*, 2013). Secara umum klasifikasi ayam menurut Suprijatna (2005) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Aves
Subkelas	: Neornithes
Superordo	: Neognathae
Ordo	: Galliformes
Famili	: Phasianidae
Genus	: Gallus
Spesies	: <i>Gallus gallus</i>

Perawakan ayam kampung jantan yang gagah membuatnya menjadi simbol kekuatan, kerja keras, semangat, pantang menyerah, dan tahan banting. Karena alasan itulah ayam kampung jantan paling sering dipilih oleh masyarakat Simalungun ketika membuat dayok nabinatur. Adapun ciri penotip ayam Mirah yaitu: untuk ayam jantan, pola bentuk ekor adalah kemudi terangkai panjang dan buku ekor yang paling panjang menekuk kebawah, warna bulu diselimuti warna

merah keemasan. Jengger tunggal dan besar, bergerigi berwarna merah. Ada bintik putih pada muka untuk sekelompok jantan, sementara sekelompok lain tidak memiliki bintik putih, untuk ayam betina memiliki bulu coklat keputihan dengan totol coklat yang lebih gelap, pola bentuk ekornya kemudi mahkota, yang ujungnya berwarna hitam. Ayam tersebut diyakini belum bercampur dengan ayam jenis lain, sehingga memudahkan untuk memperoleh ayam sampel yang lebih murni secara genetic (Siagian *et al.*, 2013).



Gambar 2. Ayam Mirah

2.2 Organel Sel Ayam

Dalam tubuh hewan terdapat sel-sel yang membentuk jaringan hewan tersebut. Struktur sel hewan berbeda dari sel eukariotik lainnya, seperti sel tumbuhan, karena tidak memiliki dinding sel dan kloroplas, dan umumnya memiliki vakuola yang lebih kecil atau bahkan tidak ada. Sel manusia merupakan salah satu jenis sel hewan. Sel hewan merupakan organel terkecil dalam tubuh dengan membran tipis di sekitarnya dan berisi larutan koloid yang mengandung senyawa kimia. Salah satu keunggulannya adalah kemampuannya untuk melakukan duplikasi diri melalui proses pembelahan. Di dalam sel hewan terdapat senyawa penting seperti karbohidrat dan lipid yang berperan dalam proses pembelahan dan fotosintesis. Karbohidrat sangat penting dalam fotosintesis, sedangkan lipid berfungsi sebagai cadangan makanan seperti lemak dan minyak. Selain itu, terdapat juga protein yang berperan dalam metabolisme tubuh

hewan dan tumbuhan, serta asam nukleat yang penting dalam sintesis protein (Anonymous, 2023). Berikut adalah beberapa fungsi dan struktur sel hewan yang perlu diketahui:

1. Membran Sel

Membran sel merupakan lapisan tipis yang mengelilingi dan melindungi sitoplasma dan nukleoplasma sel. Membran ini berfungsi sebagai batas antara sel dengan cairan di sekitarnya.

2. Sitoplasma

Sitoplasma adalah kompartemen sel yang terletak di antara membran plasma dan inti sel. Mengandung berbagai zat seperti air, protein, karbohidrat, lemak, mineral, dan vitamin, sitoplasma berperan penting dalam menyimpan dan menghasilkan bahan kimia yang dibutuhkan oleh sel.

3. Retikulum Endoplasma

Retikulum endoplasma adalah jaringan membran yang meliputi seluruh sel dan berhubungan dengan inti sel. Terdiri dari jaringan tabung dan kantong membran yang disebut cisternae, retikulum endoplasma berfungsi dalam sintesis protein, modifikasi protein, serta transportasi bahan di dalam sel.

4. Mitokondria

Mitokondria adalah organel yang berperan penting dalam produksi energi sel melalui respirasi seluler. Memiliki struktur berlapis dengan lipatan-lipatan membran yang disebut kroma, mitokondria menghasilkan adenosin trifosfat (ATP) sebagai sumber energi utama sel.

5. Mikrofilamen

Mikrofilamen adalah komponen sitoskeleton yang terdiri dari protein aktin. Berbentuk batang padat dengan diameter sekitar 7 nm, mikrofilamen berperan dalam memberikan dukungan struktural pada sel dan mempertahankan bentuknya.

6. Lisosom

Lisosom adalah vesikel yang terikat pada membran dan berisi enzim hidrolitik. Terdapat pada sel eukariotik, lisosom berfungsi untuk mengontrol pencernaan intraseluler, melakukan fagositosis untuk mencerna materi, menghancurkan organel sel yang rusak, dan memasukkan makromolekul dari luar sel melalui endositas.

7. Peroxisom

Peroxisom, juga dikenal sebagai badan mikro, adalah organel berukuran kecil yang berisi enzim katalase. Fungsinya adalah untuk menguraikan peroksida (H_2O_2) atau zat-zat metabolik yang beracun, serta mengubah lemak menjadi karbohidrat. Peroxisom terdapat di sel hati dan ginjal.

8. Ribosom

Ribosom pada sel hewan berperan dalam translasi RNA menjadi rantai polipeptida atau protein dengan menggunakan asam amino. Ribosom terikat pada retikulum endoplasma kasar atau membran inti sel, tempat terjadinya sintesis protein.

9. Sentriol

Sentriol adalah struktur berbentuk tabung yang terdapat pada sel eukariotik. Berperan penting dalam pembelahan sel, sentriol membentuk benang spindel, silia, dan flagela. Dalam bentuk gabungan, sepasang sentriol membentuk sentrosom.

10. Mikrotubulus

Mikrotubulus adalah organel dalam sitoplasma yang berbentuk silinder panjang berongga. Terdiri dari protein globular bulat yang disebut tubulin, dengan diameter sekitar 12 nm dan diameter luar sekitar 25 nm.

11. Badan Golgi

Badan Golgi atau aparatus Golgi merupakan organel yang terlibat dalam proses ekskresi sel hewan. Organel ini terletak di dalam sel eukariotik, seperti ginjal, dan memiliki struktur berupa kantong pipih yang berukuran bervariasi dan terikat oleh membran.

12. Nukleus

Nukleus adalah organel yang mengatur dan mengendalikan aktivitas sel hewan. Mulai dari metabolisme hingga pembelahan sel, nukleus memiliki peran penting dalam sel.

13. Nukleolus

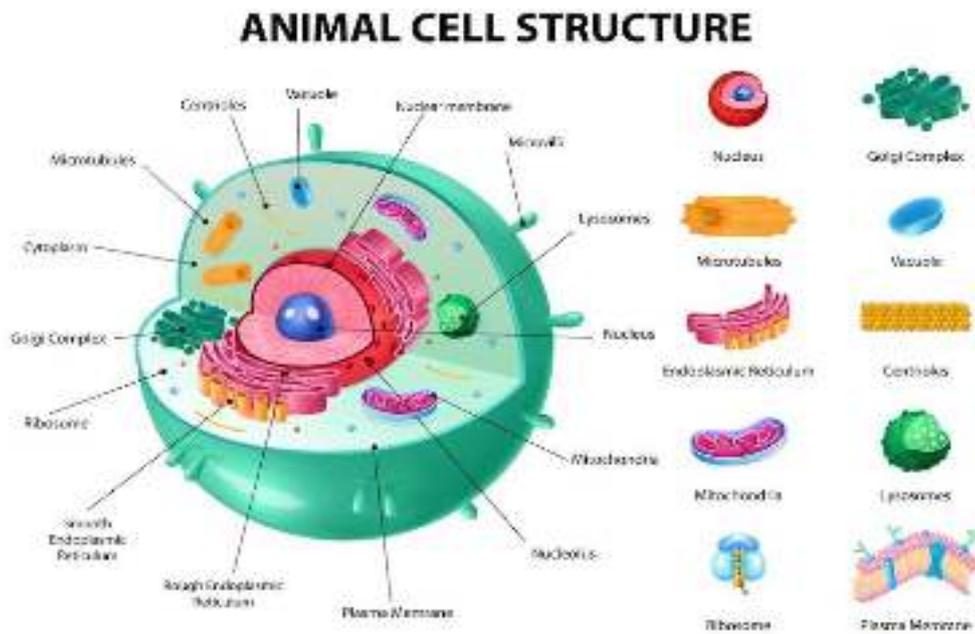
Nukleolus adalah struktur tanpa membran yang terdapat di dalam nukleus. Nukleolus terdiri dari protein dan asam nukleat, khususnya RNA ribosom. Fungsi utama nukleolus adalah sintesis dan perakitan komponen ribosom.

14. Nukleoplasma

Nukleoplasma adalah bagian padat dalam nukleus sel atau inti sel. Di dalam nukleoplasma terdapat serat kromatin padat yang membentuk kromosom.

15. Membran Inti

Membran inti merupakan komponen struktural utama nukleus yang melapisi seluruh organel tersebut. Selain itu, membran inti juga berfungsi sebagai penghalang antara sitoplasma dan inti sel.



Gambar 3. Sel Pada Ayam

(Sumber : Anonymous, 2023)

2.3 Mutasi Gen

Mutasi berasal dari kata *Mutatus* (bahasa latin) yang artinya adalah perubahan. Mutasi didefinisikan sebagai perubahan materi genetik (DNA) yang dapat diwariskan secara genetik keketurunannya. Istilah mutasi pertama kali digunakan oleh Hugo de Vries, untuk mengemukakan adanya perubahan fenotipe yang mendadak pada bunga *Oenothera lamarckiana* dan bersifat menurun. Ternyata perubahan tersebut terjadi karena adanya penyimpangan dari kromosomnya. Seth wright juga melaporkan peristiwa mutasi pada domba jenis Ancon yang berkaki pendek dan bersifat menurun. Penelitian ilmiah tentang mutasi dilakukan pula oleh Morgan. (1910) dengan menggunakan *Drosophila melanogaster* (lalat buah). Akhirnya murid Morgan yang bernama Herman Yoseph Muller berhasil dalam percobaannya terhadap lalat buah, yaitu menemukan mutasi buatan dengan menggunakan sinar X. Mutasi indel adalah perubahan yang terjadi pada jumlah basa nitrogen. Mutasi transisi yaitu suatu pergantian basa purin dengan basa purin lain atau pergantian basa pirimidin

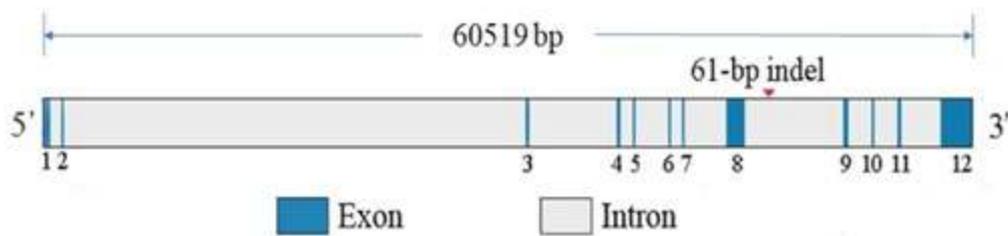
dengan basa pirimidin lain. Mutasi transversi merupakan salah satu mutasi yang mengakibatkan pergantian basa nitrogen yang tidak sejenis.

Peristiwa terjadinya mutasi disebut mutagenesis. Makhluk hidup yang mengalami mutasi disebut mutagen. Mutasi bersifat acak, 90% sesungguhnya bersifat merugikan bagi individu atau populasi suatu spesies. Dikatakan bersifat merugikan karena mutasi 10 menimbulkan perubahan suatu karakter dari keadaan yang biasanya padahal karakter itu sudah beradaptasi selama jutaan tahun terhadap lingkungan. Dengan adanya perubahan, maka makhluk itu harus beradaptasi lagi.

2.4 Gen *RIN2* (RAS and Rab Interactor 2)

Gen *RIN2* merupakan protein yang dihasilkan sitoplasma yang mengkode protein interaksi RAS dan Rab 2, berfungsi sebagai faktor pertukaran nukleotida guanin. *RIN2* telah terbukti berinteraksi dengan Rab5, GTPase kecil yang berpartisipasi dalam endositosis awal (Saito *et al.*, 2002; Grosshans *et al.*, 2006). Rab5 diperlukan untuk pengangkutan vesikel endositik ke endosom awal (Saito *et al.*, 2002). Penghapusan *RIN2* dapat mengganggu pensinyalan endosome terkait Rab5 dan juga dapat merusak sekresi protein dari retikulum endoplasma ke aparatus Golgi atau dari Aparatus golgi ke membrane plasma, yang mengarah ke struktur serat kolagen, dan kelainan fenotipik (Syx *et al.*, 2010).

Saat ini telah diketahui bahwa mutasi indel (insersi/delesi) pada gen *RIN2* sepanjang 61 bp berhubungan dengan sifat-sifat ekonomi pada ayam (Lin *et al.*, 2021). Menurut database GenBank: NC_052534.1, mutasi indel 61 bp pada gen *RIN2* ayam terletak di intron 8. Menurut database GenBank tersebut, gen *RIN2* pada ayam memiliki panjang 60.591 bp dengan 12 ekson. Struktur gen *RIN2* pada ayam dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur dan mutasi indel 61 bp pada Gen RIN2 pada ayam

(Sumber : Lin *et al.*, 2021)

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR merupakan suatu metode *in vitro* dalam sintesis DNA. Prinsip dasar metode ini adalah perbanyakkan fragmen DNA menggunakan enzim polymerase pada temperatur yang tinggi yang dilakukan secara berulang. Pada proses PCR dibutuhkan oligo nukleotida pendek (primer DNA) yang berperan dalam mengawali proses ini. Primer akan menempel atau hybrid pada untai tunggal DNA saat temperatur diturunkan setelah terjadi pemisahan untai ganda DNA. Produk hasil PCR dapat diamati menggunakan teknik elektroforesis agarose (Puspitaningrum, 2018). Terdapat tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30 – 40 siklus dan berlangsung dengan cepat, yaitu:

2.5.1 Denaturasi

Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5°C; 95°C dan 97,5°C (Yusuf, 2010).

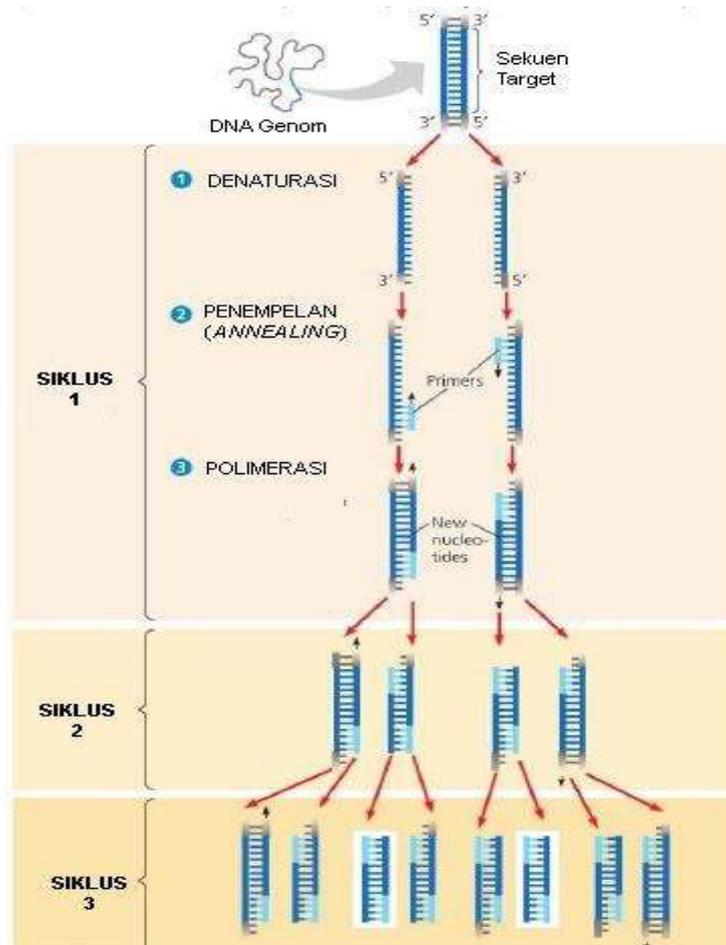
2.5.2 Annealing

Annealing merupakan tahap penempelan primer pada untai tunggal. Annealing primer akan mengalami hibridasi primer PCR pada sekuen target. Proses ini ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template (Norhayati *et al.*, 2011). Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR (Yusuf, 2010).

Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperature penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C (Yusuf., 2010).

2.5.3 Pemanjang Primer (Extention)

Pemanjangan primer merupakan proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Produk *PCR* dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarose. Metode ini terdiri atas menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif (Yusuf, 2010). Proses skema *PCR* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Proses Skema PCR

(Sumber: Anonymous, 2010)

2.6 Morfometrik

Ayam Kampung adalah ayam lokal yang tidak memiliki karakteristik khusus. Masyarakat umumnya memelihara ayam kampung untuk mendapatkan daging, telur maupun sebagai tabungan. Bila dibandingkan dengan ayam ras, produktivitas beberapa galur ayam lokal tersebut masih tergolong rendah. Salah satu usaha untuk meningkatkan produktivitas ternak adalah melalui seleksi. Namun demikian, perlu dilakukan karakterisasi sebagai dasar untuk melakukan seleksi terhadap ayam lokal. Karakterisasi merupakan langkah awal dalam pemuliaan ternak dalam rangka mengidentifikasi sifat-sifat penting yang bernilai ekonomis seperti bobot badan dan pertambahan bobot badan atau sifat-sifat penciri rumpun ternak yang bersangkutan. Karakterisasi ayam lokal dapat dilakukan dengan cara mengidentifikasi morfometrik.

Fungsi dari morfometrik digunakan untuk memprediksi bobot badan dan komposisi karkas ayam. Morfometrik merupakan indikator yang baik dan memiliki kolerasi yang cukup erat dengan parameter bobot hidup (Suparyanto, 2004). Pengukuran juga dapat menjadi indikator dalam proses seleksi ayam (Kurnianto *et al.*, 2013).

Morfometrik merupakan sifat kuantitatif yang dapat digunakan sebagai kriteria seleksi untuk meningkatkan produktivitas ayam lokal. Sifat kuantitatif ayam lokal berdasarkan morfometrik meliputi panjang badan, panjang leher, panjang sayap, lebar sayap, lingkaran dada, lebar dada, panjang kepala, lebar kepala, panjang paruh, panjang jengger, tinggi jengger, panjang tulang tibia, panjang metatarsus, lingkaran metatarsus, panjang jari terpanjang, panjang femur, panjang maxilla, panjang sternum, dan bobot badan (Ashifudin *et al.*, 2017; Hummairah *et al.*, 2016; Rangkuti *et al.*, 2016).

Variabel-variabel morfometrik tersebut dapat menjadi penciri ukuran dan bentuk tubuh ayam lokal yang berguna untuk memprediksi potensi produksi, peluang peningkatan produktivitas ternak, dan sebagai acuan standarisasi sifat-sifat ayam lokal secara lengkap seperti pada ayam kedu jengger merah dan jengger hitam generasi pertama (Ashifudin *et al.*, 2017).

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan pada Maret 2023 sampai dengan Mei 2023 pengambilan data lapangan dan sampel darah ayam Mirah dilakukan di Kabupaten Karo, Kecamatan Tigapanah, Sumatera Utara. Analisa data dilakukan di Pusat Riset Zoologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Jl. Raya Jakarta – Bogor 46, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

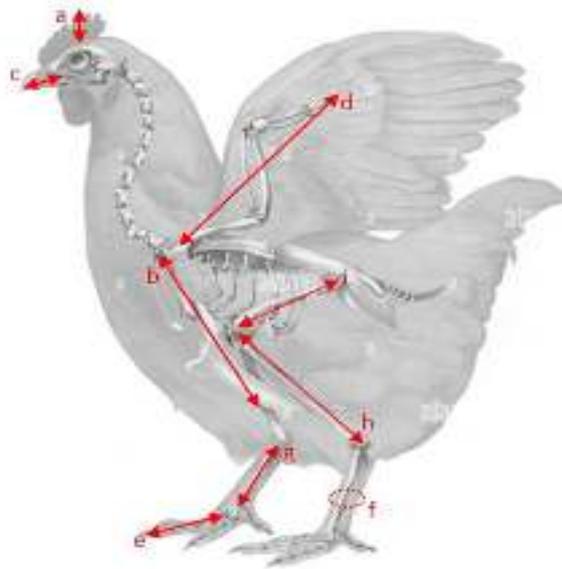
3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Sampel DNA

Penelitian ini menggunakan sampel DNA dari ayam Mirah sebanyak 51 sebagai sampel yang digunakan dari peternak yang berbeda-beda di daerah Simalungun. Dimana setiap satu ekor ayam akan di ambil darahnya minimal 1 ml sebagai sampel, disimpan di tabung EDTA warna ungu.

3.2.2 Data Berat Badan dan Morfometrik

Berat badan ayam Mirah jantan dewasa diukur menggunakan timbangan digital crane. Selanjutnya sebanyak sepuluh ekor ayam jantan diukur pada masing-masing ukuran tubuh yaitu: (a) tinggi jengger (TJ), (b) panjang dada (PD), (c) panjang maxilla (PM), (d) panjang sayap (PS), (e) panjang jari ketiga (PJK), (f) lingkaran kaki (LK), (g) panjang kaki (PK), (h) panjang paha bawah (PB) dan (i) panjang paha atas (PA) seperti pada Gambar 6 berikut:



Gambar 6. Skema Pengukuran Pada Ayam

3.2.3 Bahan dan Peralatan Penelitian

Amplifikasi DNA. Bahan yang digunakan: PCR mix (HS Taq Mix Red, PCR Biosystem, UK), Sepasang primer yaitu forward dan reverse, DDW (Destilated Water) freenucleat, DNA template Ayam Mirah dapat dilihat pada Lampiran 2 . Alat yang digunakan: mesin PCR Eppendorf (Mastercycler gradient), mesin mini sentrifuse, spin-down, micro pipet (ukuran 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L), tips (white tips 10 μ L, yellow tips 100 μ L, blue tips 1000 μ L) PCR tube 0,2 ml, rak tube, gloves, mesin visualisasi UV G Box (Syngene, UK) dapat dilihat pada Lampiran 1.

Elektroforesis. Bahan yang digunakan adalah Produk PCR, DNA Ayam Mirah 61 bp, Loading dye 6x (vivantis), larutan TBE (Tris base, boric acid and EDTA) 10x (Thermo Scientific (EU) Lithuania), agarose (Vivantis, USA). Alat yang digunakan: Mesin Elektroforesis 100 v (Mupid-ex), timbangan analitik 252g/0,1g (Libra Mas), spin-down, micro pipet (ukuran 10 μ L), Gel Tray, rak tube, magnetik steerer, botol kaca 500 ml, gelas ukur 100 ml.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Prosedur Penelitian

3.3.1.1. Pengukuran Morfometrik Ayam

Bagian-bagian tubuh luar yang akan diukur adalah dari kepala hingga bagian tarsometatarsus hingga kaki ayam kampung. Seluruh ukuran tubuh diukur dalam satuan cm dan bagian tubuh yang diukur antara lain:

Tinggi jengger (TJ) diukur dari pangkal jengger di atas kepala hingga bagian tertinggi jengger diukur menggunakan pita ukur.

Panjang dada (PD) diukur dari kiri ke kanan bagian depan dada menggunakan pita ukur.

Panjang maxilla (PM) diukur menggunakan pita ukur.

Panjang sayap (PS) diukur mulai dari bagian atas sayap hingga bagian terbawah sayap.

Panjang jari ketiga (PJK) dari ayam menggunakan pita ukur.

Lingkar kaki (LK) diukur menggunakan pita ukur.

Panjang kaki (PK) diukur menggunakan pita ukur.

Panjang paha bawah (PB) diukur menggunakan pita ukur.

Panjang paha atas (PA) diukur dari pangkal paha bawah hingga bagian tertinggi menggunakan pita ukur.

3.3.1.2 Pengambilan Darah

Pengambilan darah (*venesection*) merupakan salah satu hal yang terpenting dari kegiatan peternakan. *Vena pectoralis* merupakan pembuluh darah yang terletak pada bagian bawah sayap unggas. *Vena pectoralis* banyak mengandung pembuluh darah dan dari luar pembuluh terlihat berwarna biru.

Prosedur pengambilan sampel darah pada unggas :

Siapkan unggas dalam posisi terbaring sambil dipegang

Praktikan menahan kepala unggas ke satu sisi dan membuka sayap

Bersihkan bagian yang akan ditusuk dengan kapas yang telah dibasahi alcohol 75%

Darah diambil dengan cara menusukkan jarum di *Vena pectoralis* yang berada di bawah sayap

Tampung darah menggunakan Tabung EDTA warna ungu

Tabung EDTA berfungsi untuk mencegah darah membeku selama persiapan penelitian

3.3.1.3 Ekstraksi DNA

Prosedur ekstraksi DNA dilakukan sesuai petunjuk genomic DNA extraction kit (Genaid) langkah ekstraksi DNA berdasarkan protokol tersebut adalah diawali dengan berikut: 300 μ L sampel darah kedalam tube (ukuran 1,5 mL) kemudian tambah 900 μ L RBC Lysis Buffer, kocok menurut angka 8 (jangan di vortex) inkubasi pada suhu ruangan 10 menit, sentrifus dengan kecepatan 4000 rpm 5 menit, buang supernatant dengan mikro pipet, tambah 100 μ L RBC Lysis Buffer, tambah 200 μ L GB Buffer kemudian di vortex, inkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit, selama inkubasi di goyang-goyang atau di bolak balik setiap 3 menit bersama dengan inkubasi tersebut lakukan juga inkubasi pada Elution Buffer untuk digunakan pada saat DNA elution, tambah etOH absolut sebanyak 200 μ L dengan segera di vortex selama 10 detik, bila masih ada presipitat/endapan hancurkan dengan cara pipetting berulang-ulang, pindahkan kedalam GD Column, senrifugasi pada 14000-16000xg selama 5 menit lalu buang supernatant, tambah W1 Buffer sebanyak 400 μ L kedalam GD Column, sentrifus 14000-16000xg selama 1 menit lalu buang supernatant, tambah Wash Buffer (yang sudah ditambah Et OH) sebanyak 600 μ L kedalam GD Column, sentrifus 14000-16000xg selama 1 menit lalu buang supernatant, sentrifus lagi 14000-16000xg selama 3 menit lalu buang supernatant, pindah GD Column ke micro tube yang berukuran 1,5 mL, tambah 100 μ L Elution Buffer (sudah di pre-heat) di tengah-tengah GD Column lalu diamkan selama 3 menit agar terserap, sentrifus 14000-16000xg selama 1 menit, sampel siap digunakan atau disimpan di freezer (-20°C).

3.3.1.4 Uji Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Uji kualitas DNA merupakan salah satu teknik dasar dalam Biologi Molekuler yang bertujuan untuk menentukan ada tidaknya kontaminasi protein dan RNA. Tes kuantitas DNA dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer.

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur konsentrasi senyawa berdasarkan kemampuannya menyerap cahaya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan perbedaan kemurnian DNA yang diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis dan Nanodrop Spektrofotometer. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif eksploratif dengan teknik sampling purposif. Jumlah sampel yang digunakan adalah 51 sampel. Hasil dari ini studi adalah bahwa ada perbedaan konsentrasi dan kemurnian DNA dari kuantitatif pengujian dengan spektrofotometer UV-Vis dan Nanodrop diperoleh berdasarkan uji statistik menggunakan Uji Ketergantungan T. Hasil dari penelitian ini adalah bahwa dalam mengukur kemurnian DNA terdapat perbedaan kemurnian DNA karena hasil Sig (2-Tailed) menggunakan 0,001 atau dibawah 0,05 (Ha adalah diterima). Dan berdasarkan uji statistik pada pengukuran konsentrasi DNA diketahui bahwa ada perbedaan dalam konsentrasi DNA.

3.3.1.5 Amplifikasi DNA

PCR pada gen *RIN2* dilakukan pada volume total 10 μ L terdiri dari; DNA 2 μ L, primer yang digunakan pada gen *RIN2* adalah primer forward dan reverse masing-masing sebanyak 0,5 μ L, PCR mix sebanyak 5 μ L dan DDW sebanyak 2 μ L. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *RIN2* menggunakan desain primer menurut Lin *et al.* (2021) yaitu RIN2-F 5'-AGT CTA GCT CTG GTC GTG TG-3' RIN2-R: 5'-CAC CGC ACC TGA TAT CCC AC-3'. Struktur gen *RIN2* ayam Mirah (ENSGAL 00010018351). Target panjang sekuen gen *RIN2* ayam (GenBank: NC_052534.1) dalam penelitian ini sebesar 585 bp (delesi) atau 646 bp (insersi) meliputi region intron 6, tanda bintang (*) menandakan lokasi indel (Gambar 7). Contoh posisi primer yang menempel di gen *RIN2*. Progam PCR yang digunakan mengikuti hasil gradient PCR yang akan dilakukan. Proses amplifikasi dijalankan dengan 35 siklus menggunakan mesin Eppendorf (Mastercycler gradient) dengan program mesin seperti Tabel 1 berikut:

Tabel 1. Program PCR Untuk Amplifikasi Gen *RIN2* Pada Ayam Mirah

Tahapan	Suhu	Waktu
Predenaturasi	95°C	5 Menit
Denaturasi	95 °C	15 Detik
Annealing	50.7 °C	15 Detik
Ekstensi	72 °C	30 Detik
Ekstensi Akhir	72 °C	3 Menit

Forward >>>

49184 agtctag ctctggctgt
49201 gtgactaaat gcaattaatg tgtaaggcag gatgctttta aacaaatgaa ctgcttttg
49261 aaacaactgc tgcctattgc tggagcctgg aagcaaccag agtgaatcag gagcatcaga
49321 tgttgctgat ctcagcagat aactatgtga cagcaagatg tagtcatccc tgtagagaac
49381 ttttaaaatg cagctctgcc tactatccag gttcttactt gactatttca gtacagaatt
49441 gtaggccttc cttgaacagt aggattccca gtggtgggat ggaattaaag gcatac *ctggg
49501 ctggacggag gagatcctgc tcaactagca ggtgtttggg aggtggtgct actggtgctg
49561 agtgagcagt caccattgtc agatgtcacc agacagggtc ccagtgcctg aacctgggcc
49621 taggccagga atggtcagct ttaaggaatt tggcaaggaa gtctttgctg attgcatata
49681 gagctgcctg gaaagaatgc tgcctgttat ctctcttctg gtttctaata cagcatggct
49741 ctttcagt gt gggatacag gtgcggtg
<<< Reverse

Gambar 7. Target Sekuen Gen *RIN2* pada ayam (*Gallus domesticus*) dan lokasi indel mutation (*) antara basa ke 49495 dan basa ke 49496

3.3.1.6 Elektroforesis

Proses elektroforesis dilakukan untuk melihat fragmen DNA hasil PCR, pada agarose gel 2% pada tegangan 100 volt selama 35 menit. Volume reaksi loading dye sebanyak 2 µL. PCR produk sebanyak 10 µL. selain itu digunakan juga staining sebanyak 3 µL, dan marker sebanyak 5 µL. pada tahap elektroforesis diperlukan agarose dengan konsentrasi 2,0 % yang dibuat dengan cara menambahkan bubuk agarose 2 gr kedalam tabung larutan 100 ml larutan TBE 100 ml. Larutan tersebut dipanaskan oleh microwave oven 2 menit. Larutan yang masih cair dituangkan ke dalam pencetak gel sebanyak 60 ml serta sisir ditempatkan di dekat tepian gel dan dibiarkan mengeras. Sisir dicabut setelah gel mengeras sehingga terbentuk sumur-sumur. Gel selanjutnya ditempatkan ke dalam gel tray elektroforesis yang sudah berisi larutan buffer TBE 100 ml. TBE 100 ml

dibuat dengan cara menambahkan sebanyak 100 ml TBE 10x dengan 900 ml DDW (*double destilated water*).

Produk PCR sebanyak 10 μ L dicampur dengan *loadingdye* sebanyak 2 μ L, dengan menggunakan mikropipet dimasukkan dalam sumur-sumur gel. Marker sebanyak 5 μ L ditaruh dalam sumur paling kiri sebagai penanda. Gel tray selanjutnya dialiri listrik 100 volt selama 30 menit, molekul DNA yang bermuatan negatif pada pH netral akan bergerak (bermigrasi) ke arah positif. Setelah elektroforesis selesai, gel agarose diambil untuk dilihat panjang pita DNA dengan menggunakan sinar ultraviolet dalam mesin Visualisasi. Pembacaan fragmen DNA dilakukan dengan menarik garis lurus antara posisi pita dari masing-masing sampel DNA dengan posisi pita DNA marker. Visualisasi dilakukan menggunakan mesin G-Box.

3.3.1.7 Sekuensing

Pada penelitian ini menggunakan 2 sampel dengan genotipe II dan DD pada volume 25 μ L melalui first base laboratory (Malaysia). Untuk memverifikasi apakah ada indel yang terjadi.

3.3.1.8 Deteksi Mutasi

Deteksi gen *RIN2* dilakukan dengan sekuensing. Sampel PCR produk sebanyak 10 μ L digunakan untuk analisis sekuensing menggunakan jasa Laboratorium 1st Base Laboratory Service, Malaysia. Deteksi mutasi dilakukan dengan mengamati pola grafik kromatogram. Grafik kromatogram yang berwarna merah menunjukkan nuklotida T biru, C hijau, A merah, G hitam.

3.4 Analisis Data

Data sekuen yang diperoleh selanjutnya dilakukan pensejajaran sekuen (*alignment*) dilakukan dengan perangkat lunak *BioEdit Sequence Alignment Editor* version 5.0.6 (Hall, 2001) dan proses pembuatan pohon fenetik ini menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 5) (Tamura *et al.*, 2011).

3.4.1 Perubahan yang Diamati

3.4.1.1 Frekuensi Genotipe (X_{ii})

Frekuensi genotipe merupakan rasio dari jumlah suatu genotipe terhadap suatu populasi dengan menghitung perbandingan antara jumlah genotipe tertentu pada setiap populasi. Rumus menghitung frekuensi genotipe menurut Nei dan Kumar. (2000) adalah sebagai berikut:

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{N}$$

Keterangan :

x_{ii} = frekuensi genotip ke ii.

n_{ii} = jumlah individu bergenotipe ii.

N = jumlah individu sampel.

3.4.1.2 Frekuensi Alel (X_i)

Frekuensi alel merupakan rasio suatu alel terhadap keseluruhan alel pada satu lokus dalam populasi. Frekuensi alel (x_i) gen *RIN2* dapat dihitung berdasarkan rumus Nei dan Kumar. (2000) seperti di bawah ini :

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2N}$$

Keterangan :

x_i = frekuensi alel ke-i.

n_{ii} = jumlah individu bergenotipe ii.

n_{ij} = jumlah individu bergenotipe ij.

N = jumlah individu sampel.

3.4.1.3 Heterozigositas (H_e)

Keragaman genetik dapat diketahui melalui estimasi frekuensi heterozigositas pengamatan yang diperoleh dari masing-masing populasi dengan menggunakan rumus Weir. (1996) sebagai berikut:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n X_i^2$$

Keterangan :

H_e = heterozigositas harapan.

X_i = frekuensi alel ke-i.

Heterozigositas Observasi (H_o) dihitung dengan menggunakan rumus Nei dan Kumar. (2000):

$$\sum -$$

Keterangan :

H_o = heterozigositas pengamatan.

n_{ij} = jumlah genotip heterozigot.

N = jumlah pengamatan (total sampel)

3.4.1.4 Alel Efektif (N_e)

Alel efektif merupakan suatu perhitungan yang digunakan untuk mengetahui jumlah alel yang umum dijumpai dalam suatu lokus pada suatu gen. Jumlah alel efektif adalah sebuah ukuran dari jumlah alel efektif yang diperoleh dari masing-masing karakter. Nilai ini adalah nilai resiprok atau nilai kebalikan dari homozigositas. Semakin tinggi nilai n_e , maka semakin banyak individu yang heterozigot. Rumus untuk menghitung nilai n_e adalah sebagai berikut (Nei dan Kumar, 2000):

$$n_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^n X_i^2}$$

Keterangan:

n_e = jumlah alel efektif.

X_i = frekuensi alel i.

3.4.1.5 Polymorphic Informatic Content (PIC)

Polymorphic Informatic Content merupakan indeks yang digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik pada suatu lokus gen. Kategori hasil

perhitungan PIC menurut Bostein *et al.* (1980) terdiri atas tiga kategori yakni: rendah ($PIC < 0,25$), moderat ($0,25 < PIC < 0,50$) dan tinggi ($PIC > 0,50$). Nilai PIC dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$PIC = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n X_i^2}{n} - \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n 2X_i X_j}{n^2}$$

$$H_e = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n 2X_i X_j}{n^2}$$

Keterangan:

PIC = polymorphis informative content.

X_i = frekuensi allel ke-i.

X_j = frekuensi allel ke-j.

H_e = heterozigositas harapan.

3.4.1.6 Nilai Chi-square (χ^2)

Nilai *Chi-square* (χ^2) berguna untuk mengukur keseimbangan Hardy-Weinberg pada suatu populasi (Falconer dan Mackay, 1996). Perhitungan nilai χ^2 adalah sebagai berikut:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Keterangan:

χ^2 = nilai *Chi square*

O = frekuensi observasi

E = frekuensi harapan (*expected*)

p = frekuensi allel A

q = frekuensi allel a

N = jumlah total individu

3.4.2 Asosiasi (Y_{ij})

Model linier diterapkan untuk menganalisis asosiasi varian gen *RIN2* dengan sifat pertumbuhan pada ayam Mirah menggunakan perangkat lunak SPSS V13.0 (SPSS Inc., USA) dengan rumus matematika menurut (Ren *et al.*, 2019) sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} : adalah sifat yang diukur pada masing-masing hewan

μ : adalah rata-rata populasi keseluruhan

G_i : adalah efek tetap terkait dengan genotip ke- i

E_{ij} : adalah kesalahan acak.