

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Ayam Alope merupakan ayam yang berasal dari ayam buras yang pada generasi pertama ayam Alope dikembangkan menggunakan teknik *in ovo feeding* atau pemberian nutrisi melalui teknik injeksi pada telur untuk meningkatkan pertumbuhan embrio dan berat tetas serta perkembangan jaringan usus halus ayam buras setelah penetasan. Injeksi nutrisi ke dalam telur pada periode inkubasi dapat menggunakan asam amino, seperti L-Arginin. L-Arginin merupakan asam amino semi esensial yang berperan untuk mensekresikan nutrisi dalam tubuh Fanik *et al.* (2021). Ayam Alope pada generasi pertama hingga saat ini, pada proses pengembangannya melalui tahap penyeleksian dimana penyeleksian ini dapat memengaruhi keragaman genetik dan mengubah frekuensi gen dalam suatu populasi ternak. Dengan demikian, sifat-sifat yang diinginkan seperti ketahanan ternak terhadap berbagai penyakit, dapat ditingkatkan. Gen yang berperan dalam sistem ketahanan penyakit diantaranya adalah gen NRAMP-1.

Gen NRAMP-1 bekerja di dalam sel darah putih yang disebut makrofag. Makrofag merupakan sel pada jaringan yang berasal dari sel darah putih atau monosit Ardiyana *et al.* (2018). Gen NRAMP-1 sebagai komponen penting dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri, termasuk *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, dan berbagai patogen intracelluler lainnya. Beberapa ayam memiliki versi gen NRAMP-1 yang lebih kuat, sehingga mereka lebih tahan terhadap penyakit. Sementara itu, ayam yang gen NRAMP-1-nya lemah bisa lebih mudah sakit karena pertahanannya kurang kuat.

Gen NRAMP-1 diketahui memiliki peran penting dalam meningkatkan sistem pertahanan tubuh ayam terhadap penyakit Hu *et al.* (2015). Namun hingga saat ini, informasi mengenai keragaman genetik ayam Alope pada gen NRAMP-1 belum diketahui. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai identifikasi keragaman gen NRAMP-1 pada populasi ayam Alope generasi Kelima (G5) agar mendukung program seleksi dan pengembangan ayam Alope yang lebih tahan terhadap penyakit.

1.2. Landasan Teori

1.2.1. Ayam Alope

Ayam Alope merupakan salah satu jenis ayam buras yang saat ini sedang dikembangkan oleh Fakultas peternakan, Universitas Hasanuddin. Pada generasi pertama hingga generasi kedua, ayam Alope dikembangkan dengan metode *in ovo feeding* yang diberikan asam amino L-Arginine atau pemberian nutrisi melalui teknik injeksi. Pemberian L-Arginine meningkatkan kinerja pasca menetas dan tingkat

pertumbuhan Azhar *et al.* (2019). Memasuki generasi ketiga hingga sekarang, proses pengembangan ayam Alope difokuskan pada tahap pemurnian genetik melalui sistem perkawinan terarah. Pada tahap ini, dilakukan seleksi terhadap calon induk jantan dan betina berdasarkan performa terbaik. Melalui tahap ini, ayam Alope diharapkan memiliki kualitas genetik yang lebih baik dan konsisten antar generasi.

Pada saat ini, pengembangan ayam Alope lebih diutamakan dalam peningkatan performa pertumbuhan dan produktivitas, sehingga daya tahan terhadap penyakit belum banyak diteliti. Ketahanan terhadap penyakit merupakan salah satu indikator penting dalam menentukan kualitas dan keberlanjutan penseleksian Saili *et al.* (2025). Oleh karena itu, mengetahui dasar genetik yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh ayam Alope sangat diperlukan untuk mendukung agar ayam Alope tahan terhadap penyakit. Salah satu langkah awal yang dapat dilakukan untuk mengetahui ketahanan penyakit pada ayam Alope adalah dengan mengetahui variasi gen yang berperan dalam sistem ketahanan penyakit salah satunya dengan menganalisis variasi gen NRAMP-1.

1.2.2. Keragaman Genetik

Keragaman genetik adalah variasi karakteristik yang diwariskan pada populasi yang sama. Keragaman genetik terdapat lebih dari satu bentuk atau macam genotip di dalam populasi. Keragaman genetik tidak hanya terjadi antara bangsa tetapi juga di dalam satu bangsa yang sama maupun antar individu di dalam populasi. Keragaman genetik dapat dilihat dari perbedaan alel pada lokus tertentu yang merupakan ekspresi gen tertentu Hadrawi (2018).

Keragaman genetik dalam sebuah populasi organisme terutama dihasilkan oleh empat mekanisme: mutasi, seleksi, migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain dan penghanyutan genetik Pratiwi (2017). Keragaman genetik penting bagi kemampuan spesies dan populasi beradaptasi terhadap perubahan kondisi lingkungan dan karena itu merupakan persyaratan bagi kelangsungan hidupnya. Keragaman yang bersifat genetik juga dapat bermanfaat dalam usaha memperbaiki suatu spesies yang dibudidayakan melalui kegiatan seleksi.

Ukuran tinggi rendahnya keragaman genetik dalam suatu kelompok atau populasi dapat dilihat berdasarkan nilai heterozigositas. Semakin tinggi derajat heterozigositas pada suatu genetik maka daya tahan hidup genetik tersebut akan semakin beragam. Nilai heterozigositas merupakan rata-rata persentase lokus heterozigositas tiap individu atau rata-rata persentase individu heterozigot dalam populasi Ardiyana *et al.* (2018).

1.2.3. Gen NRAMP-1

Salah satu gen yang mengontrol ketahanan tubuh adalah Gen *Natural Resistance-Associated Protein-1* (NRAMP-1). Gen NRAMP-1 merupakan anggota dari *solute carrier family 11* yang menranskripsi protein NRAMP dan berperan penting dalam

membatasi akses mikroba atau agen infeksi lainnya untuk mendapatkan mikronutrien penting seperti Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , dan Zn^{2+} dalam proses fagosom Cellier (2017). Pada ayam, gen NRAMP-1 terletak pada kromosom 7. Gen NRAMP-1 mensintesis protein yang berfungsi sebagai lapisan penyelubung.

Gen NRAMP-1 berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh karena menghasilkan protein yang membantu kerja makrofag dalam melawan bakteri dan parasit. Gen NRAMP-1 ini bekerja dengan cara mengatur kadar logam, seperti zat besi dan mangan di dalam sel yang diperlukan dalam proses pertahanan tubuh. Dengan mengendalikan ketersediaan logam tersebut, gen NRAMP-1 dapat meningkatkan efektivitas respons imun terhadap berbagai jenis infeksi, termasuk infeksi bakteri dan parasit yang sering menyerang ayam. Gen NRAMP-1 memiliki mutasi yang dipotong menggunakan enzim *sacI* ekson 11 termasuk mutasi *synonymous* yang memiliki asosiasi terhadap sifat ketahanan tubuh Ardiyana (2019).

Proses terbentuknya gen NRAMP-1 dimulai dari tahap transkripsi DNA, informasi genetik dari DNA diubah menjadi mRNA. Proses ini dimulai dengan pengikatan faktor transkripsi ke promotor gen NRAMP-1, yang memicu pembukaan struktur kromatin dan memungkinkan RNA polimerase untuk membaca urutan DNA. Selanjutnya, RNA polimerase mensintesis mRNA berdasarkan urutan DNA gen NRAMP-1. Setelah transkripsi selesai, mRNA mengalami pemrosesan lebih lanjut, seperti pemotongan intron dan penyambungan ekson, sebelum meninggalkan nukleus untuk diterjemahkan menjadi protein NRAMP-1 di ribosom. Ekspresi gen NRAMP-1 dan iNOS ditemukan tinggi pada jaringan hati dan usus Muhsinin (2018).

1.2.4. Penanda DNA (*Marker Assisted Selection*)

Salah satu tahapan penting dalam pemuliaan ternak adalah seleksi terhadap tetua yang membawa sifat-sifat tertentu yang diinginkan. Penggunaan teknologi genetika molekuler saat ini menjadi bagian penting dalam program peningkatan mutu genetika ternak. *Marker Assisted Selection* (MAS) merupakan salah satu pendekatan berbasis molekuler untuk menghasilkan ternak-ternak yang unggul secara genetika melalui pemanfaatan marka DNA yang berkaitan dengan lokus target sebagai alat untuk memantau seleksi fenotipik sifat yang diinginkan. Program seleksi *Marker Assisted Selection* (MAS) dapat dipacu dengan melakukan teknik molekuler yang menggunakan material DNA Sartika *et al.* (2014).

Gen penanda digunakan untuk menunjukkan keberadaan gen yang diinginkan disebut seleksi bantuan penanda. *Marker Assisted Selection* (MAS) adalah proses seleksi tidak langsung dimana suatu sifat yang diinginkan dipilih bukan berdasarkan sifat itu sendiri tetapi berdasarkan penanda yang terkait dengannya. Tujuannya adalah untuk menggabungkan semua informasi genetika pada penanda dan *quantitative trait loci* (QTL) dengan informasi fenotipik untuk meningkatkan evaluasi dan seleksi genetika Wakchaure *et al.* (2015).

Keuntungan menggunakan MAS adalah pengaruh gen terhadap produksi diukur secara langsung berdasarkan susunan genetika hewan dan tidak diperkirakan

berdasarkan fenotipe. Dari segi pengaruh ekonomi dan waktu, seleksi terhadap ternak yang memiliki keunggulan genetik berdasarkan sifat fisik yang dapat diamati secara langsung adalah sangat tidak efektif dan efisien. Keberhasilan penggunaan suatu penanda untuk seleksi dalam kegiatan pemuliaan bergantung pada beberapa syarat utama yang harus dipenuhi, yaitu peta genetik dengan jumlah lokus polimorfik yang memadai sehingga dapat mengidentifikasi *quantitative trait loci* (QTL) atau gen-gen mayor dengan akurat, dan penanda yang terkait erat dengan *quantitative trait loci* (QTL) atau gen mayor target pada peta genetik yang sudah dibuat Supriyanta (2021).

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui variasi gen NRAMP-1 pada ayam Alope generasi kelima, sehingga hasil yang diperoleh dapat digunakan sebagai dasar dalam upaya pengembangan ayam Alope yang memiliki ketahanan penyakit yang lebih baik.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2024 - Maret 2025, di Laboratorium Produksi Ternak Unggas, Laboratorium Pemuliaan dan Genetik ternak serta Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar.

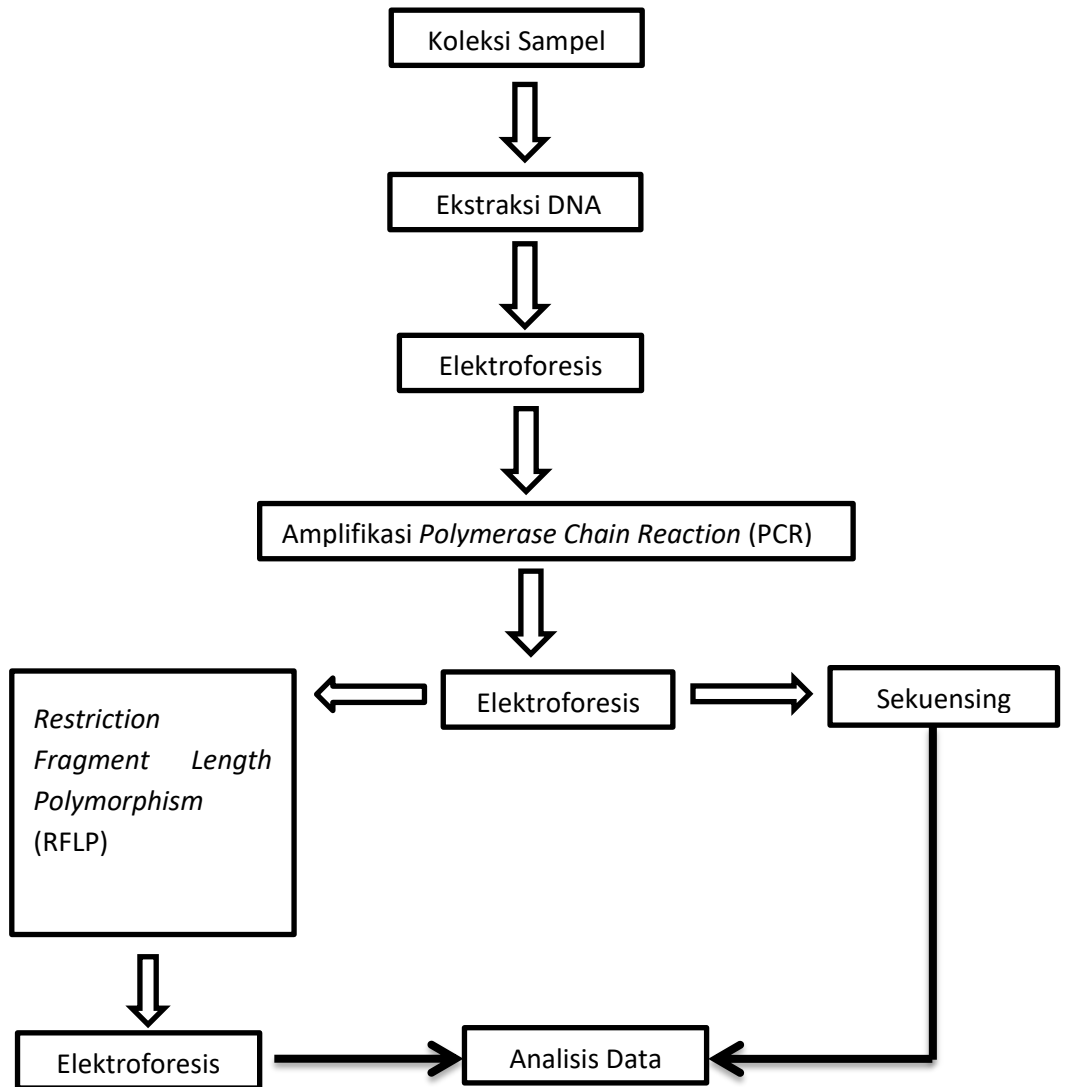
2.2. Materi Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *mikrotube*, spoit 3 ml, *mikropipet*, *centrifuge*, *vortex mixer*, spatula, timbangan, *lab coat*, *hot plate stirrer* (untuk melarutkan agarosa), gel casting tray (mencetak gel agarosa), *water bath* atau dry bath incubator (untuk inkubasi reaksi), *PCR machine* (Termal siklus), unit elektroforesis gel, UV transilluminator (Gel documentation), freezer (-20°C untuk penyimpanan DNA dan reagen), komputer dengan perangkat lunak analisis sekuen (MEGA 12, PopGene 1.32, dan bioedit), serta alat tulis dan kertas.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini darah ayam Alope sebanyak 59 ekor, serbuk *Ethylenediaminetetraacetic* (EDTA), masker, *handscoon*, tip (ukuran 10, 100, dan 1000 µL), primer spesifik gen *Natural Resistance-Associated Protein-1* (NRAMP-1) (*Forward* dan *reverse*), kit ekstraksi DNA, GS kolom, *master mix PCR*, buffer TBE (untuk elektroforesis gel agarosa), agarosa (untuk pembuatan gel elektroforesis), *flourosen* (untuk pewarnaan DNA pada gel), loading dye (untuk memuat sampel ke dalam gel), *DNA ladder* (sebagai penanda berat molekul), *Nuclease-free water/DH2O* (air bebas nuklease untuk reaksi PCR), *reagen sekuensing*, *buffer TE* (Tris-EDTA) untuk penyimpanan DNA), etanol (untuk presipitasi DNA) dan enzim restriksik *SacI*.

2.3. Metode Penelitian

Prosedur penelitian disajikan pada diagram alir prosedur penelitian yang ada pada gambar 1.



Gambar 1 Diagram Alir Prosedur Penelitian

2.3.1. Koleksi Sampel Darah

Sampel darah ayam Alope generasi kelima (G5) sebanyak 59 ekor dengan jenis kelamin campuran diperoleh dari Laboratorium Produksi Ternak Unggas. Pengambilan darah dilakukan melalui *vena branchialis* pada bagian sayap masing-masing individu menggunakan jarum venoject sebanyak 1,5 ml, kemudian ditampung ke dalam mikrotube yang telah berisi serbuk *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) sebagai antikoagulan untuk mencegah terjadinya pembekuan darah. Selanjutnya, sampel darah dibawa ke Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar, untuk dianalisis lebih lanjut. Sampel yang telah dikoleksi disimpan terlebih dahulu di dalam *freezer* bersuhu -20°C karena proses ekstraksi DNA belum dapat segera dilakukan akibat keterbatasan ketersediaan reagen. Penyimpanan pada suhu rendah ini bertujuan untuk menjaga stabilitas dan integritas DNA agar tidak mengalami degradasi sebelum dilakukan proses ekstraksi dan analisis genetik.

Tabel 1. Sampel Penelitian

Batch	Jantan	Betina
10 Minggu	15	14
13 Minggu	5	10
21 Minggu	5	10
Jumlah	25	34

Sumber: Data Peneliti, 2024

2.3.2. Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin. Sebelum ekstraksi, sampel darah beku dicairkan terlebih dahulu pada suhu ruang hingga homogen. DNA kemudian diisolasi dan dimurnikan menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Geneaid), dengan mengikuti protokol ekstraksi yang terdiri atas beberapa tahapan. Tahap awal ekstraksi dimulai dengan persiapan sampel. Tabung mikrotube berkapasitas 1,5 ml disiapkan dan diberi kode sesuai dengan identitas masing-masing sampel. Sebanyak 10 µL darah dimasukkan ke dalam tabung, kemudian ditambahkan 30 µL larutan RBC (Red Blood Cell lysis buffer) dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah proses inkubasi, sampel disentrifugasi dengan kecepatan $3.000 \times g$ selama 5 menit, dan supernatan yang terbentuk dibuang. Selanjutnya, ditambahkan 90 µL larutan PBS (Phosphate Buffered Saline) ke dalam tabung untuk melanjutkan tahap isolasi DNA.

Proses ekstraksi dilanjutkan dengan penambahan 100 μL RBC buffer dan pencampuran menggunakan shaker atau vortex, diikuti dengan 200 μL GB buffer yang juga dicampur hingga homogen. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 1 jam dengan penambahan elution buffer. Setelah inkubasi, ditambahkan 200 μL etanol 96% dan kembali dicampur secara merata. Campuran selanjutnya dipindahkan ke kolom GS yang telah ditempatkan dalam tabung baru dan diberi kode. Sentrifugasi dilakukan selama 5 menit pada kecepatan $14.000 \times g$, kemudian supernatan dibuang. Tahapan pencucian dilakukan dengan menambahkan 400 μL W1 buffer, disentrifugasi selama 30 detik, lalu dibuang supernatannya. Proses ini diulang dengan menambahkan 600 μL wash buffer dan disentrifugasi kembali. Untuk mengeringkan kolom, dilakukan sentrifugasi kering selama 3 menit. Setelah itu, kolom dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 200 μL elution buffer yang telah dipanaskan, didiamkan selama 3 menit, lalu disentrifugasi selama 30 detik pada $14.000 \times g$. Hasil ekstraksi berupa larutan bening yang menandakan DNA telah berhasil diperoleh dalam bentuk murni. Keberhasilan ekstraksi dikonfirmasi melalui elektroforesis gel agarosa, yang menunjukkan pita DNA yang jelas dan tajam, menandakan kualitas DNA baik dan siap digunakan untuk analisis lebih lanjut.

2.3.3. Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Amplifikasi DNA hasil ekstraksi dilakukan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer spesifik untuk gen NRAMP-1 (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1*). Reaksi PCR disusun dalam volume total 25 μL , yang terdiri atas 2 μL DNA template, 11,5 μL master mix, 1 μL primer *forward* dan *reverse* (seperti tercantum pada Tabel 2), serta 9,5 μL distilled water (DH_2O). Campuran reaksi kemudian dihomogenkan menggunakan vortex dan spindown. Selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam mesin PCR dan dijalankan selama 3 jam 15 menit sesuai dengan kondisi siklus termal yang telah ditentukan.

Reaksi PCR diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 95°C selama 12 menit untuk memisahkan untai ganda DNA menjadi untai tunggal. Selanjutnya, reaksi dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas tiga tahap utama, yaitu: denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit untuk menjaga DNA dalam bentuk untai tunggal; tahap annealing pada suhu 62°C selama 1 menit untuk memungkinkan primer menempel pada urutan target DNA; dan tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 2 menit, di mana enzim *Taq polymerase* mensintesis untai DNA baru. Setelah siklus utama selesai, dilakukan tahap ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 12 menit untuk memastikan seluruh fragmen DNA tersintesis secara lengkap. Hasil dari reaksi PCR kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa, yang menunjukkan pita DNA target berukuran 421 bp. Kemunculan pita tersebut mengindikasikan bahwa proses amplifikasi berhasil, dan produk PCR siap untuk dianalisis lebih lanjut melalui metode RFLP dan sekuensing.

Tabel 2. Sequen primer Gen NRAMP-1 (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1*)

Nama Primer	Primer <i>NRAMP-1 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1)</i>
Primer <i>Forward</i>	CAA TGA GAC GGTGTC TGT GG
Primer <i>Reverse</i>	CCC AGA AGA AAT CTC CCT GC

Keterangan: Muhsinin *et al.* (2016)

2.3.4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Metode Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) digunakan untuk menentukan genotipe ayam berdasarkan pola fragmen DNA yang terbentuk akibat pemotongan oleh enzim restriksi. Dalam penelitian ini, produk amplifikasi gen *NRAMP-1* dianalisis menggunakan enzim restriksi *SacI* untuk mengidentifikasi variasi alel pada ekson 11. Enzim *SacI* mengenali dan memotong pada urutan spesifik GAGCT↓C.

Reaksi RFLP dilakukan dalam total volume 7 µL, yang terdiri atas 5 µL produk PCR, 0,3 µL enzim *SacI*, 0,7 µL buffer reaksi, dan 1 µL air bebas nuklease (DH₂O). Campuran reaksi dimasukkan ke dalam tabung mikro 0,5 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam untuk memastikan pemotongan DNA berlangsung secara optimal. Hasil pemotongan DNA tersebut dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa guna mengamati pola pita DNA. Pola pita yang dihasilkan menjadi dasar dalam penentuan genotipe individu berdasarkan keberadaan atau ketidakhadiran situs potong spesifik.

2.3.5. Elektroforesis produk Ekstraksi-PCR-RFLP

Tahap elektroforesis dilakukan untuk mengevaluasi keberhasilan proses ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, serta analisis RFLP. Elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5% yang disiapkan dengan cara melarutkan 0,75 gram agarosa dalam 50 mL larutan TBE. Larutan tersebut kemudian dipanaskan dalam microwave selama ±3 menit hingga agarosa larut sempurna. Setelah sedikit mendingin, ditambahkan pewarna fluoresen sebanyak 2,1 µL, kemudian larutan dihomogenkan dan dituangkan ke dalam cetakan gel elektroforesis. Comb dipasang untuk membentuk sumur, dan setelah gel mengeras, larutan TBE sebanyak 40–50 mL dituang hingga seluruh permukaan gel terendam.

Sampel DNA sebanyak 2 µL dicampur dengan loading dye secukupnya, dihomogenkan, lalu dimasukkan ke dalam sumur gel. Sebagai pembanding, marker (penanda ukuran fragmen DNA) ditambahkan ke salah satu sumur. Elektroforesis dijalankan selama 47 menit hingga pemisahan fragmen berlangsung optimal. Setelah proses selesai, gel dipindahkan ke alat dokumentasi gel (UV

transilluminator) untuk visualisasi. Keberhasilan amplifikasi PCR ditunjukkan dengan munculnya pita DNA tunggal yang jelas dan tebal, mengindikasikan bahwa DNA target berhasil diamplifikasi dengan baik.

2.3.6. Analisis sekuensing (Genotiping)

Tahap sekuensing dilakukan untuk mengetahui urutan basa nukleotida secara lengkap pada gen NRAMP-1 hasil amplifikasi PCR. Sekuensing juga digunakan untuk membandingkan posisi pemotongan enzim restriksi yang teridentifikasi melalui metode RFLP. Dengan diketahuinya urutan basa nukleotida secara lengkap melalui analisis sekuensing, keberadaan situs pengenalan enzim restriksi *SacI* (GAGCT↓C) pada sampel dapat dipastikan secara akurat serta untuk memvalidasi pola pemotongan DNA yang diamati pada hasil elektroforesis RFLP.

Produk PCR yang digunakan untuk sekuensing merupakan sampel yang menunjukkan pita tunggal, jelas, dan tajam pada elektroforesis gel agarosa, karena menunjukkan keberhasilan amplifikasi yang baik. Proses sekuensing dilakukan di Laboratorium Research and Development Centre, PT Genetika Science, Banten, menggunakan mesin DNA sequencer.

2.4. Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara deskriptif untuk menggambarkan keragaman genetik pada populasi ayam Alope. Analisis mencakup perhitungan frekuensi alel, keseimbangan Hardy-Weinberg, heterozigositas pengamatan (H_o), dan heterozigositas harapan (H_e), yang dihitung menggunakan perangkat lunak PopGene versi 1.32. Hasil urutan DNA yang diperoleh dari proses sekuensing diselaraskan (alignment) menggunakan perangkat lunak MEGA versi 12.0 dengan metode *ClustalW* untuk menilai kesesuaian antar sekuens. Selanjutnya, identifikasi genotipe gen NRAMP-1 dari hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan basis data NCBI dan aplikasi *WebCutter* untuk mendeteksi keberadaan situs potong enzim restriksi.