

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Ayam Kampung merupakan salah satu jenis ternak unggas yang paling banyak menyebar di Indonesia dan didefinisikan sebagai ayam yang tidak mempunyai ciri spesifik yang khas, dengan kata lain memiliki genotipe dan fenotipe yang masih beragam. Di Indonesia, khususnya Sulawesi Selatan terdapat komoditi yang mampu menunjang protein hewani lokal yaitu ayam kampung. Populasi ternak ayam kampung dari tahun 2021 - 2022 mengalami peningkatan populasi dari 306.391,6 ekor menjadi 308.601,7 ekor atau dengan kenaikan sekitar 0,72% (Yuliati dkk., 2019).

Kenaikan persentase populasi ternak ayam Kampung masih terbilang rendah mengingat potensi dan kebutuhan yang masih tinggi. Ayam Kampung berpotensi tinggi untuk pengembangan peternakan dengan cara pemeliharaan yang sederhana dan modal yang sangat rendah sehingga peternak dapat mengembangkan ayam kampung secara tradisional dan turun temurun. Sifat kuantitatif merupakan sifat yang dapat diukur dengan alat ukur dan sifat ini dipengaruhi oleh banyak pasangan gen dan juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Milas dkk., 2020).

Salah satu komoditi yang digunakan pada penelitian ini adalah ayam yang berasal dari turunan ayam Kampung Alope dengan perlakuan *in ovo feeding*. Ayam Kampung Alope merupakan jenis ayam yang pemeliharaannya dilakukan dengan sistem *in ovo feeding* dengan memberikan asam amino *L-arginine*. Pemberian *L-Arginine* dapat meningkatkan perkembangan embrio ayam Kampung. Injeksi konsentrasi 1,0% *L-Arginine* pada *in ovo* meningkatkan kinerja pasca menetas dan tingkat pertumbuhan (Azhar dkk., 2019).

Peningkatan performa dan kualitas daging dapat dilakukan melalui pemuliaan dan seleksi pada tingkat DNA (Saifullah, 2021). Teknologi seleksi pada tingkat DNA disebut *Marker Assisted Selection* (MAS). MAS bergantung pada identifikasi hubungan antara penanda genetik dan lokus sifat kuantitatif terkait (QTL) (Wakchaure dkk., 2015). Salah satu marker gen yang bisa digunakan adalah gen *Calpain*. Gen *Calpain* (CAPN1) merupakan gen yang berhubungan dengan sifat kualitas daging yang berperan dalam tenderisasi daging (Yuliati dkk., 2019). Dalam proses peningkatan populasi ayam Kampung tentunya perlu melihat beberapa faktor dan salah satunya adalah sifat kualitas daging. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi hubungan keragaman gen *Calpain* pada populasi ayam Alope G5 hasil seleksi.

1.2 Landasan teori

1.2.1 Ayam Kampung Alope (Ayam Lokal Pedaging)

Ayam Kampung merupakan keturunan dari ayam hutan merah (*Gallus gallus*), ayam hutan hijau (*Gallus Varius*) dan ayam hutan kelabu (*Gallus sonneratii*). Nenek moyang diduga berasal dari India Selatan dan Tengah, dataran rendah Himalaya, Assam, Myanmar, Sri Lanka dan daerah selatan seperti Sumatera, Jawa dan pulau-pulau kecil di wilayah Indonesia Timur (Yaman, 2013). Ayam Kampung Indonesia berasal dari subspecies (*Gallus gallus bankiva*) yang berasal dari Lampung, Jawa, dan Bali. Ayam Kampung memiliki jarak genetik yang paling dekat dengan ayam hutan merah, yaitu ayam hutan merah Sumatra (*Gallus gallus gallus*) dan ayam hutan merah Jawa (*Gallus gallus javanicus*) (Edowai dkk., 2019).

Ayam Alope (ayam lokal pedaging) merupakan jenis ayam yang dikembangkan di Sulawesi Selatan lebih tepatnya di Laboratorium Produksi Ternak Unggas, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, yang saat ini telah memasuki generasi ke 5. Ayam Alope merupakan ayam yang pemeliharaannya dilakukan dengan sistem *in ovo feeding* dengan memberikan asam amino *L-Arginine*. Pemberian *L-Arginine* meningkatkan perkembangan embrio ayam kampung. Suntikan konsentrasi 1,0% *L-Arginine* pada *in ovo* dapat meningkatkan performa ayam setelah menetas dan tingkat pertumbuhan (Nursalam, 2023).

Ayam Kampung Alope merupakan salah satu populasi ayam Kampung yang telah mengalami seleksi. Ayam ini dikenal memiliki adaptasi yang baik terhadap lingkungan lokal. Gen CAPN1 berkaitan erat dengan kelembutan daging pascamortem. Hasilnya menunjukkan adanya variasi genetik yang signifikan dalam populasi ayam Kampung, yang mengindikasikan potensi besar untuk peningkatan kualitas daging melalui program seleksi genetik yang tepat (Lian dkk., 2013).

1.2.2 Keragaman Genetik Ayam Kampung di Indonesia

Ayam lokal Indonesia atau yang biasanya dikenal dengan ayam Kampung merupakan salah satu kekayaan alam dan kekayaan negara. Ayam lokal merupakan hasil domestikasi penduduk lokal terhadap unggas liar merah (*Gallus gallus*) yang memiliki keunikan dibandingkan dengan ayam di negara lain. Ayam lokal banyak dikembangkan di masyarakat yang memiliki keunggulan keragaman fenotipe dan genotipe, daya adaptasi, toleransi panas dan tahan penyakit. Secara tradisional, ayam lokal biasanya dipelihara untuk kebutuhan pangan hewani keluarga (Irwanto dkk., 2023).

Indonesia kaya akan sumberdaya genetik termasuk berbagai rumpun ayam lokal yang tersebar diseluruh kepulauan di Indonesia. Ayam lokal tersebut ada yang mempunyai penampilan spesifik seperti ayam Kedu, Sentul, Pelung, Gaok, Nunukan, dan Merawang, tetapi ada juga yang tidak spesifik dan sangat beragam penampilannya yaitu ayam Kampung. Upaya identifikasi dan karakterisasi ayam

lokal telah banyak dilakukan baik oleh Perguruan Tinggi, LIPI maupun Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Upaya ini dianggap penting karena informasi yang diperoleh, disamping berguna untuk keperluan pengelolaan plasma nutfah Indonesia, juga berguna dalam membantu program pemuliaan. Identifikasi dapat dilakukan terutama pada ciri ciri fenotip baik secara kualitatif (warna bulu, kulit, shank, bentuk jengger) maupun secara kuantitatif seperti ukuran-ukuran tubuh (morfometrik), produktivitas, reproduktivitas dan ketahanan terhadap penyakit Sartika, 2012).

Pentingnya mendukung keragaman genetik dalam populasi ayam Kampung di Indonesia untuk mengidentifikasi gen CAPN1, yang berperan penting dalam kualitas daging ayam, dan menemukan adanya variasi alel yang signifikan di antara berbagai populasi ayam. Analisis menggunakan metode PCR dan DNA Sequencing mengungkapkan bahwa genotipe-genotipe berbeda dari gen CAPN1 memberikan kontribusi yang bervariasi terhadap sifat daging, termasuk kelembutannya. Keberagaman genetik ini menunjukkan bahwa dengan strategi seleksi yang tepat, kualitas daging ayam kampung dapat ditingkatkan secara signifikan (Setioko dkk., 2019).

1.2.3 Gen *Calpain* (CAPN1)

Gen *Calpain* (CAPN1) adalah gen yang mengkodekan enzim *Calpain*, yang termasuk dalam keluarga protease kalsium-zink. Enzim *Calpain* memiliki peran penting dalam regulasi berbagai proses fisiologis, seperti proteolisis, proliferasi sel, migrasi sel, dan kematian sel. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa mutasi pada gen CAPN1 dapat berpengaruh signifikan terhadap sifat-sifat kualitatif daging pada hewan ternak, terutama dalam hal tekstur, ketahanan, dan karakteristik sensorik. Studi genom asosiasi menunjukkan bahwa variasi genetik pada CAPN1 dapat mempengaruhi kecepatan proteolisis daging, yang berdampak langsung pada kekerasan dan kualitas daging (Castro dkk., 2016).

Pada hewan ternak, penelitian juga menyoroti bahwa polimorfisme pada gen CAPN1 dapat berperan dalam menentukan potensi kerentanan terhadap penyakit otot dan gangguan metabolik lainnya. Variasi genetik pada CAPN1 dapat berhubungan dengan kejadian dan tingkat keparahan distrofi otot. Hal ini menunjukkan potensi aplikasi gen CAPN1 dalam seleksi genetik untuk meningkatkan kesehatan dan kualitas ternak, serta mengurangi risiko penyakit otot yang merugikan. Demikian pula, gen *Calpain* muncul sebagai aktor penting dalam kelembutan daging postmortem dan regulasi pertumbuhan otot pada ayam (Aboelhassan dkk., 2024).

1.2.4 Sistem *Calpain-Calpastatin*

Sistem *Calpain-Calpastatin* merupakan komponen kunci dalam pengaturan proteolisis intraseluler yang bergantung pada kalsium. Dalam konteks penelitian

mengenai identifikasi keragaman gen CAPN1 pada populasi ayam Alope generasi ke-5, peran sistem ini sangat penting untuk memahami proses degradasi protein yang mempengaruhi berbagai sifat fenotipik, termasuk kelembutan daging. *Calpain* adalah protease sistin yang diaktifkan oleh ion kalsium, sementara calpastatin berfungsi sebagai penghambat endogen yang spesifik terhadap *Calpain* (Li dkk., 2019). Dalam ayam, aktivitas proteolitik dari *Calpain*, terutama CAPN1, memainkan peran penting dalam proses pematangan dan kualitas daging pasca pemotongan (Raimbourg dkk., 2013).

Variasi genetik dalam sistem *Calpain-Calpastatin* dapat mempengaruhi berbagai aspek fisiologis dan kualitas daging. Polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) dalam gen CAPN1 dapat menyebabkan variasi dalam aktivitas enzimatik, yang pada gilirannya mempengaruhi tingkat degradasi protein otot selama pematangan. Pengendalian aktivitas calpain oleh *Calpastatin* sangat penting untuk memastikan keseimbangan yang tepat antara degradasi dan proteksi protein, yang berdampak pada tekstur dan kelembutan daging ayam. Penelitian terbaru menekankan bahwa variasi genetik ini dapat digunakan sebagai marker dalam program pemuliaan untuk meningkatkan kualitas daging ayam (Bosson dkk., 2022).

Pertumbuhan otot usia muda pada ayam juga dapat dikontrol sebagian oleh regulasi sistem *Calpain-Calpastatin*. Ayam yang tumbuh lambat memiliki aktivitas sistem yang unik dibandingkan dengan ayam yang tumbuh cepat pada usia muda, yang menyebabkan berat otot lebih rendah. Hubungan signifikan antara genotip dan berat badan pada usia muda terdeteksi untuk *Calpain*. Selain itu, polimorfisme CAPN1 dikaitkan dengan diameter serat otot dada pada berat pasar. Korelasi positif signifikan antara mRNA CAPN1 dan kandungan adenin atau guanin diseluruh perkembangan terdeteksi. Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa CAPN1 dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk kinerja pertumbuhan yang dapat membantu program pembiakan ayam yang tumbuh lambat (Kubota dkk., 2019).

1.2.5 Pengaruh Gen *Calpain* (CAPN1)

Gen *Calpain*, terutama *Calpain 1* dan *Calpain 2*, memiliki pengaruh signifikan pada pertumbuhan, kualitas daging, dan karkas ayam. *Calpain* adalah enzim protease yang berperan dalam proses pemecahan protein, terutama protein otot, yang mempengaruhi perkembangan massa otot dan efisiensi pertumbuhan ayam. Variasi genetik pada *Calpain* dapat memengaruhi kecepatan pertumbuhan ayam dengan cara meningkatkan laju sintesis dan pemecahan protein otot, yang menghasilkan pertumbuhan yang lebih cepat dan efisien dalam konversi pakan (Li dkk., 2019).

Kualitas daging juga dipengaruhi oleh aktivitas gen *Calpain*. Enzim *Calpain* berperan dalam proses pematangan daging, di mana dapat menguraikan proteinprotein yang menyebabkan kekerasan pada daging, menjadikannya lebih

lembut. Variasi genetik pada *Calpain* dapat mempengaruhi tingkat aktivitas enzim ini, sehingga menghasilkan daging dengan tekstur yang lebih lembut dan kualitas yang lebih baik (Zhang dkk., 2021). Selain itu, gen *Calpain* mempengaruhi komposisi karkas ayam dengan mengatur proporsi antara massa otot, lemak, dan tulang. Ayam dengan variasi genetik tertentu pada *Calpain* dapat menunjukkan peningkatan proporsi otot dan penurunan lemak, menghasilkan karkas yang lebih efisien dan bernilai tinggi (Baurhoo dkk., 2020).

Variasi alel pada gen *Calpain* (CAPN1) pada ayam mencakup beberapa polimorfisme penting yang mempengaruhi karakteristik daging dan pertumbuhan. *Polimorfisme Single Nucleotide* (SNPs) seperti G/C atau T/A dalam eksor dan intron CAPN1 telah diidentifikasi dan dikaitkan dengan perbedaan dalam kelembutan daging dan efisiensi konversi pakan (Wang dkk., 2017). Selain itu, variasi mikrosatelit pada CAPN1 berkontribusi pada variasi fenotipik di antara individu ayam dengan mempengaruhi stabilitas ekspresi gen (Khatib dkk., 2014). Delesi atau penghapusan bagian dari gen CAPN1 juga dapat mengurangi aktivitas enzim *Calpain*, yang berdampak pada kualitas daging dan pertumbuhan (Kim dkk., 2016). Temuan ini menunjukkan bahwa variasi alel dalam CAPN1 memiliki dampak signifikan terhadap sifat-sifat daging dan performa pertumbuhan ayam, yang dapat digunakan dalam program pemuliaan untuk meningkatkan hasil produksi (Li dkk., 2020).

1.2.6 Marker Assisted Selection (MAS)

Saat ini, informasi marka telah tersedia yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan karakter penting dalam plasma nutfah, seperti karakter penting dari materi genetik eksotis yang memungkinkan untuk diintrogresi secara cepat melalui MAS (*Marker Assisted Selection*). Teknologi MAS adalah teknologi yang mengidentifikasi gen-gen kandidat yang berpotensi digunakan sebagai penciri molekuler untuk keperluan seleksi. MAS adalah salah satu strategi kandidat gen yang memanfaatkan satu atau beberapa gen yang berpotensi dalam memaksimalkan berbagai macam sifat yang diinginkan dalam suatu populasi *breeding* (Pabendon dkk., 2016). Teknik MAS memiliki kelebihan, antara lain sifatnya yang stabil dan tidak terpengaruh lingkungan (Manalu dkk., 2023).

Melalui teknik MAS dapat diketahui lebih awal peluang dan potensi suatu hewan atau ternak secara lebih awal dan lebih akurat sehingga seleksi yang kita lakukan dapat lebih efektif dan efisien dalam menghasilkan ternak yang unggul serta menghemat waktu dan tenaga serta biaya yang timbul dalam suatu program seleksi. Target yang diharapkan adalah gen yang dianalisis bersifat polimorfik sehingga dapat memberikan sejumlah varian atau *genotype* gen tersebut. Setiap *genotype* akan memberikan ekspresi gen yang berbeda-beda. Selanjutnya *fenotyping* dilakukan pada setiap sampel yang ada dalam suatu populasi. *Fenotyping* dibutuhkan untuk merekam semua data sifat kuantitatif dan kualitatif yang ditampilkan pada semua individu (Pagala dan Nafiu, 2020).

MAS merupakan teknologi dalam pemanfaatan dalam proses seleksi yang efektif dalam membentuk populasi dasar pada hewan ternak. Teknologi MAS mendasarkan seleksi tingkat DNA (*genotype*) melalui marka atau penanda molekuler, bukan pada tingkat penampilan (*fenotype*). Hal ini disebabkan sekuens DNA berupa gen menyandingkan sifat tertentu yang dapat diekspresikan menjadi suatu fenotipe individu pada tahap selanjutnya. Marka molekuler yang digunakan dalam MAS bisa saja berupa marka mikrosatelit atau minsatelit (non- gen). Selain itu, dapat berupa gen langsung yang telah diketahui berdasarkan informasi hasil riset sebelumnya (Pagala dan Nafiu, 2020).

1.2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Teknologi di bidang genetika molekuler membuka peluang untuk meningkatkan secara genetik, mengelola, dan melestarikan ternak lokal dan membangun suatu sistem produksi ternak berkelanjutan. Teknologi molekuler bisa digunakan antara lain untuk mengeksplorasi keragaman genetik pada tingkat DNA, pemetaan gen, seleksi dengan bantuan penanda (*Marker Assisted Selection*), seleksi dengan bantuan gen, dan pelestarian berbasis molekuler. Jika diterapkan dengan tepat, teknologi ini dapat menjadi cara yang efektif untuk pengelolaan, perbaikan genetik, dan pelestarian ternak (Sumantri dkk., 2020). Kemajuan dalam bioteknologi molekuler relatif lebih cepat dan metode yang andal untuk diagnosis mutasi gen yang akurat (Tanjung dkk., 2019).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik amplifikasi DNA dengan target gen tertentu. PCR menggunakan suhu yang bertingkat dengan bantuan *Enzim Taq Polymerase* untuk mengamplifikasi DNA. Proses PCR menggunakan 1 pasang primer untuk amplifikasi DNA target (Alydrus dkk., 2023). Hasil PCR yang baik dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemurnian DNA hasil ekstraksi, ketepatan pemilihan primer yang digunakan, serta ketepatan kondisi PCR. Kondisi ini menunjukkan bahwa kondisi reaksi PCR serta primer yang digunakan melalui desain dengan program primer sudah cukup baik karena memberikan produk PCR yang sangat spesifik sesuai yang diharapkan (Depison dkk., 2017).

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman genetik pada gen *Calpain* (CAPN1) dalam populasi ayam Alope generasi ke-5 hasil seleksi dengan menggunakan metode PCR dan *DNA sequencing*. Analisis sekuens DNA dilakukan untuk mendeteksi adanya polimorfisme nukleotida tunggal (*Single Nucleotide Polymorphisms/SNP*), mengidentifikasi variasi alel dan genotipe yang terbentuk, serta mengevaluasi parameter keragaman genetik seperti frekuensi alel, frekuensi genotipe, dan nilai heterozigositas.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Oktober 2024 sampai April 2025, bertempat di Laboratorium Produksi Ternak Unggas dan Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar. Kemudian disekuensing di Laboratorium *Research and Development Centre* PT. Genetika Science, Banten.

2.2 Materi Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikrotube, mikropipet, pipet tips, centrifuge, termal Siklus (PCR machine), Elektroforesis gel unit, UV Transilluminator (gel documentapion), Vortex mixer, Spatula dan gel casting tray, Parafilm, Lab coat dan sarung tangan, Water bath atau dry bath incubator (untuk inkubasi reaksi), Freezer (-20°C untuk penyimpanan DNA dan reagen), Hot plate stirrer (untuk melarutkan agarosa), Komputer dengan perangkat lunak analisis sekuen (seperti BioEdit, Chromas, atau software sekuensing lainnya), DNA sequencer.

Bahan yang di gunakan dalam penelitian ini yaitu sampel DNA ayam, Kit ekstraksi DNA, Primer spesifik gen CAPN1 (primer forward dan reverse), Master mix PCR, Agarosa (untuk pembuatan gel elektroforesis), Buffer TBE (untuk elektroforesis gel agarosa), Gel red (untuk pewarnaan DNA pada gel), Loading dye (untuk memuat sampel ke dalam gel), DNA ladder (penanda berat molekul untuk elektroforesis), *Nuclease-free water*/DH2O (air bebas nuklease untuk reaksi PCR), Reagen purifikasi PCR (kit untuk memurnikan produk PCR), Reagen sekuensing, Buffer TE (Tris-EDTA untuk penyimpanan DNA), Etanol dan isopropanol (untuk presipitasi DNA).

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian analisis deskriptif, yaitu pendekatan yang digunakan untuk menggambarkan, menjelaskan, dan menganalisis karakteristik atau fenomena tertentu berdasarkan data yang ada.

2.3.1 Koleksi Sampel

Sampel darah dikoleksi dari 59 ekor ayam jenis kelamin campuran disetiap ayam kampung jenis Alope generasi ke-5. Pengambilan darah dilakukan melalui pembuluh darah bagian sayap (*Vena Brachialis*) pada tiap ekor ayam Alope yang ditampung pada mikrotube yang telah berisi bubuk antikoagulan EDTA untuk mencegah penggumpalan darah. Setelah itu, sampel kemudian dibawa ke laboratoruim untuk di analisis lebih lanjut dan apabila analisis sampel tidak dapat

di selesaikan dalam sehari maka dapat di simpan dalam *freezer* untuk mempertahankan kondisi sampel agar tidak rusak hingga saatnya dianalisis.

Tabel 1. Sampel DNA Ayam Alope Generasi ke-5

Umur	Jantan (Ekor)	Betina (Ekor)
10 Minggu	15	14
13 Minggu	5	10
21 Minggu	5	10
Jumlah	25	34

Sumber: Data Sekunder, 2024.

2.3.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan rangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Terpadu Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. DNA diisolasi dan dimurnikan menggunakan kit ekstraksi dengan mengikuti protokol ekstraksi yang terbagi atas beberapa tahap. Langkah awal yaitu menyiapkan tabung mikrotube 1,5 ml dan diberi label sesuai dengan kode sampel. Sampel sebanyak 10 μ l dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikrotube. Kemudian dilisiskan dengan menambahkan 30 μ l RBC buffer, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya tabung disentrifugasi dengan kecepatan 3000 g selama 5 menit, lalu supernatan dibuang. Langkah berikutnya, ditambahkan 90 μ l PBS dan 100 μ l RBC *buffer* ke dalam tabung, kemudian dicampur menggunakan shaker atau *vortex*. Setelah itu, ditambahkan 200 μ l GB *buffer* lalu dicampur kembali dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 1 jam bersamaan dengan penambahan *elution buffer*.

Selanjutnya, yaitu tahap pencucian, sampel yang telah dilisiskan ditambah 200 μ l etanol (ETOH) 96%, kemudian dicampur dengan shaker atau *vortex*. GS Columns dan tabung mikrotube baru disiapkan, lalu diberi label sesuai dengan kode sampel. Sampel kemudian dipindahkan ke dalam GS Columns dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 x g lalu supernatan dibuang. Proses dilanjutkan dengan menambahkan 400 μ l W1 *buffer*, disentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 14.000 x g, lalu supernatan dibuang. Setelah itu, ditambahkan 600 μ l *wash buffer*, disentrifugasi kembali selama 30 detik dengan kecepatan 14.000 x g, dan supernatan dibuang. Tabung kemudian disentrifugasi kering selama 3 menit pada kecepatan yang sama. GS Columns kemudian dipindahkan ke tabung mikrotube baru yang telah diberi label. Ditambahkan 200 μ l *elution buffer* yang telah dipanaskan, kemudian didiamkan selama 3 menit. Setelah itu, tabung disentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 14.000 x g untuk memperoleh hasil ekstraksi DNA.

2.3.3 Amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplifikasi hasil ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer forward dan reserve. Komposisi reaksi PCR diatur pada volume reaksi 25 µl yang terdiri atas DNA, master mix, primer forward, primer reverse, dan PCR DH2O. Penentuan volume masing-masing bahan ditentukan berdasarkan proses optimasi, adapun komposisi reaksi PCR dari setiap sampel ayam Alope.

Tabel 2. Primer skrining pada gen CAPN1

Forward primer:	5'-TCA CCT CAC GTG CCT CTC TCA-3'
Reserve primer:	5'-CGG AAC ACT TAC GTC GAT-3'
Sumber: Zhou dkk., (2017).	

Tabel 3. Komposisi PCR Sampel Ayam Alope

Sampel	DNA	Master Mix	Primer Forward	Primer Reverse	PCR DH2O
Ayam Alope	2µl	12,5 µl	1µl	1µl	8,5µl

Sampel kemudian disentrifugasi pada 10.000 RPM selama 1 menit. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam mesin PCR selama kurang lebih 2 jam. Kondisi PCR dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 95°C × 4 menit, dimana masing-masing denaturasi 95°C × 45 detik, dengan suhu annealing yaitu 58°C × 1 menit, dilanjutkan dengan ekstensi 72°C × 1 menit sebanyak dua kali, yang kemudian diakhiri dengan satu siklus ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit menggunakan mesin PCR. Produk PCR kemudian dilanjutkan ke tahapan elektroforesis dengan tahapan yang pertama yaitu membuat media agar dengan menggunakan gel agarose 2% sebanyak 1 g dan TBE 1x sebanyak 50 ml. Setelah itu gel diaduk dan dimasukkan ke dalam *microwave* selama 5 menit lalu dihomogenkan menggunakan *stirrer*. Kemudian gel tersebut dituang ke dalam *gel tray* yang telah dipasang *casting dams*, lalu *comb* dipasang untuk membuat sumur dan tunggu hingga mengeras. Setelah gel mengeras, *gel tray* kemudian dipindahkan ke alat elektroforesis lalu menambahkan TBE 1x hingga media agar terendam. Campurkan 2 µl sampel DNA dengan pewarna (*loading dye*) dan *runsafe stain* secukupnya kemudian dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam lubang sumur media agar, terakhir masukkan marker DNA yang telah dicampur dengan *loading dye marker* di salah satu lubang. Selanjutnya dilakukan proses elektroforesis selama 47 menit. Setelah selesai, sampel kemudian dipindahkan ke dalam UV *transilluminator* (*gel documentation system*) untuk divisualisasi,

keberhasilan hasil PCR dilihat dengan terbentuknya pita tunggal jelas, tegas, dan tanpa pengotor (*smear*).

Sekuensing

Hasil dari amplifikasi DNA dengan metode PCR hanya memberikan informasi mengenai ukuran DNA sampel, akan tetapi hasil tersebut belum dapat memberikan informasi mengenai perbedaan dan persamaan pada tingkat nukleotida sehingga perlu dilakukan sekuensing atau peruntutan DNA. Hasil terbaik dari ekstraksi DNA dipilih untuk dilakukan proses sekuensing DNA menggunakan mesin *sequencer ABI-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* di *Laboratorium Research and Development Centre* PT. Genetika Science, Banten.

Analisis Sekuen

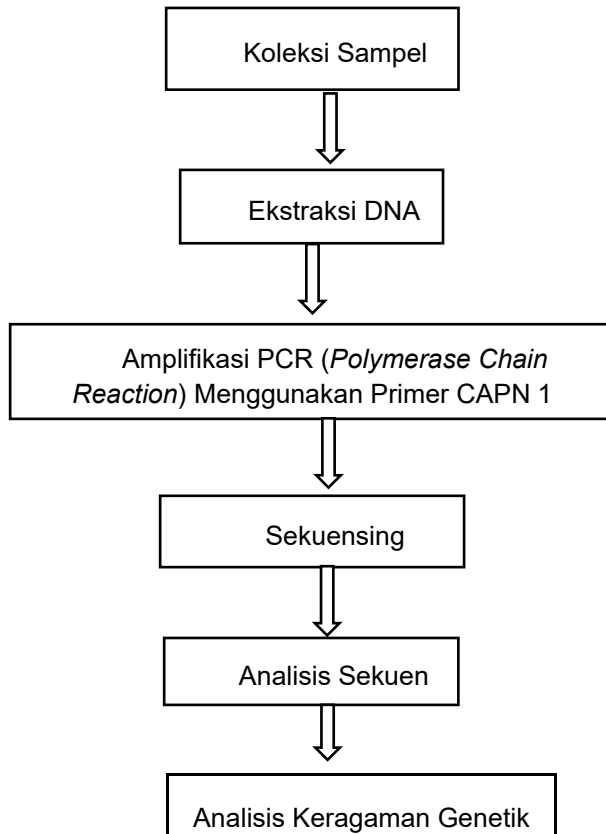
Analisis data sekuen yang diperoleh menggunakan perangkat lunak bioinformatika untuk memastikan bahwa sekuen tersebut benar-benar merupakan bagian dari gen CAPN1. Perangkat lunak yang di gunakan yaitu MEGA untuk melakukan alignmen sekuen dan mengidentifikasi variasi genetik (polimorfisme) dalam gen CAPN1.

Analisis Keragaman Genetik

menghitung parameter keragaman genetik seperti heterozigositas, frekuensi alel, dan ferekuensi genotipe serta haplotype dan frekuensinya menggunakan perangkat lunak statistik genetik DNAsp dan *Software Gene Pop 32*. Identifikasi *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) dalam populasi.

Diagram Alir

Prosedur penelitian disajikan pada diagram alir sebagai berikut:



Gambar 1. Diagram Alir