

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Ayam lokal merupakan jenis ayam bukan ras (buras) Indonesia yang telah lama dipelihara dan dikembangkan oleh masyarakat Indonesia (Junaedi dkk., 2021). Indonesia memiliki banyak rumpun unggas lokal yang berpotensi untuk dikembangkan. Keragaman ayam lokal di tiap daerah bervariasi, sehingga memungkinkan dilakukan perbaikan mutu genetik untuk menghasilkan ayam lokal yang potensial sebagai komersial, namun nyatanya masih banyak rumpun unggas lokal yang belum dikarakterisasi dan mungkin sudah ada yang hampir punah padahal belum sempat digali tentang informasi dan potensi keragaman genetiknya (Suryadi dkk., 2022).

Ayam lokal Indonesia memiliki keragaman tinggi yang tampak pada beragamnya fenotip dan informasi genotip yang berbeda-beda. Keragaman genotip pada ayam lokal terlihat pada adanya keragaman susunan nukleotidanya (Tamzil dan Indarsih, 2022). Salah satu jenis ayam kampung hasil program seleksi yaitu ayam Alope. Ayam Alope adalah jenis ayam kampung hasil seleksi yang ditingkatkan dengan sistem *In Ovo Feeding* (IOF) dengan pemberian injeksi asam amino *L-Arginine* (Azhar et al., 2016). Meskipun ayam alope menunjukkan beberapa keunggulan, seperti produktivitas yang tinggi, namun informasi mengenai kekerabatan genetiknya dengan ayam lainnya masih belum ada.

Kekerabatan genetik merujuk pada hubungan evolusi antara individu atau spesies berdasarkan kesamaan genetik. Hubungan kekerabatan antar individu dalam populasi ternak berperan penting dalam menentukan tingkat keragaman genetik yang ada. Pemahaman akan kekerabatan genetik menjadi sangat penting dalam mengidentifikasi potensi dan kontribusi genetik suatu spesies untuk mendukung program pemuliaan dan konservasi. Dengan memahami kekerabatan ini, penelitian dapat menyusun strategi pemeliharaan sumber daya genetik unggas yang lebih efektif. Khusus untuk ayam Alope, identifikasi kekerabatannya dengan jenis ayam lain akan memberikan gambaran yang jelas tentang posisi dan peran ayam Alope di antara populasi serta melengkapi data yang masih kurang terkait hubungan genetiknya (Suryani dkk., 2024).

Salah satu pendekatan untuk memahami kekerabatan genetik ayam Alope adalah dengan menggunakan marker DNA mitokondria D-Loop. DNA mitokondria D-Loop merupakan *control region*, yaitu wilayah yang tidak mengkode protein. Daerah ini dikenal sebagai bagian paling hipervariabel dalam genom mitokondria dan memiliki tingkat polimorfisme yang lebih tinggi dibandingkan dengan wilayah mtDNA lainnya. Keunikan dari D-Loop terletak pada tingginya variasi genetik, dengan tingkat evolusi yang lima kali lebih cepat daripada bagian mtDNA lainnya (Satiyarti dan Anggita, 2018). Ayam Alope sendiri merupakan hasil seleksi dari berbagai jenis ayam lokal, namun hingga kini informasi mengenai kekerabatan genetiknya dengan jenis

ayam lainnya masih belum tersedia. Oleh karena itu, penelitian dengan menggunakan marker DNA mitokondria D-Loop diperlukan untuk mengidentifikasi kekerabatan genetik antara ayam Alope dengan jenis ayam lainnya. Hal inilah yang melatarbelakangi dilakukannya penelitian mengenai Identifikasi Kekerabatan Genetik Ayam Alope dengan Ayam Lainnya Berbasis Marker DNA Mitokondria D-Loop.

1.2 Landasan Teori

1.2.1 Ayam Alope

Ayam kampung merupakan ayam asli Indonesia yang paling banyak ditemukan dan menyebar di seluruh Indonesia (Alfian dkk., 2017). Ayam kampung tersebar di Indonesia tidak memiliki spesifik tertentu karena keragaman fenotipe maupun genotipenya cukup tinggi. Ciri-ciri keragaman genetik ayam kampung adalah pada warna bulu ayam kampung yang sangat bervariasi dan bentuk tubuh. Saat ini pengembangan mutu genetik ayam kampung bisa dilakukan dengan cara melakukan program seleksi, perkawinan silang, penyesuaian manajemen, pemilihan varietas dan penerapan teknologi (Permadi dkk., 2020).

Ayam Alope merupakan ayam yang dikembangkan di Sulawesi Selatan lebih tepatnya di Laboratorium Produksi Ternak Unggas, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin (Nugraha, 2023). Ayam Alope merupakan salah satu jenis ayam yang berasal dari ayam buras yang pada generasi pertama ayam Alope dikembangkan menggunakan sistem *In Ovo Feeding* (IOF) atau pemberian injeksi asam amino *L-arginine* kedalam embrio di umur 8 hari masa inkubasi. Pemberian *L-arginine* dapat meningkatkan perkembangan embrio ayam kampung. Selanjutnya, dilakukan proses seleksi pada generasi kedua dan seterusnya, hingga menghasilkan ayam Alope generasi kelima yang memiliki performa unggul (Azhar dkk., 2019).

Pengembangan ayam Alope merupakan salah satu langkah strategis dalam meningkatkan kualitas genetik ayam kampung lokal agar mampu bersaing dengan ayam ras dalam hal produktivitas dan efisiensi pemeliharaan. Dengan adanya proses seleksi berkelanjutan hingga generasi kelima, ayam Alope diharapkan memiliki keunggulan dalam aspek pertumbuhan, daya tahan tubuh, efisiensi pakan, dan adaptasi terhadap lingkungan tropis. Teknologi *IOF* yang digunakan pada tahap awal pengembangan terbukti dapat meningkatkan viabilitas embrio serta memperbaiki performa pertumbuhan ayam pada fase awal kehidupan (Azhar dkk., 2016).

1.2.2 Keragaman Genetik Ayam Kampung di Indonesia

Ayam kampung di Indonesia memiliki keragaman genetik yang tinggi karena populasi yang tersebar luas dan berbeda di setiap wilayah (Jaya, 2021). Keanekaragaman jenis ayam lokal di Indonesia merupakan kekayaan Sumber Daya Genetik Ternak (SDGT) yang berpotensi untuk dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai sumber plasma nutfah baik untuk konservasi maupun pemanfaatan. Hal ini mempunyai arti

penting dan strategis dalam upaya mendorong ketahanan pangan dan mencegah menurunnya potensi ayam lokal. Ayam lokal dikenal sebagai ayam yang berasal dari domestikasi ayam hutan (*Gallus gallus*) dan dikelompokkan menjadi beberapa jenis, antara lain jenis pedaging, petelur, dwiguna dan jenis hias (*fancy*) (Sutopo dkk., 2024).

Ayam kampung merupakan salah satu ayam lokal Indonesia yang memiliki keanekaragaman genetik yang cukup tinggi jika dibandingkan dengan ayam komersial. Analisis genetik menggunakan metode seperti mikrosatelit, NP (*Single Nucleotide Polymorphism*), dan mtDNA (*mitochondrial DNA*) telah digunakan untuk mengidentifikasi keragaman ini. Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya aliran genetik antara populasi yang berbeda, yang menunjukkan bahwa meskipun terdapat variasi, ayam kampung tetap mempertahankan sejumlah kesamaan genetik yang mencerminkan sejarah domestikasi dan interaksi manusia (Daryono dan Perdamaian, 2019).

Upaya untuk melestarikan keragaman genetik ayam kampung sangat penting mengingat potensi mereka sebagai sumber daya genetik yang berharga. Pelestarian sumberdaya genetik unggas lokal dapat dilaksanakan apabila telah diidentifikasi karakteristiknya. Keragaman sifat fenotip dan genotip dapat dilihat dari bentuk jengger. Jengger sebagai identitas potensi produksi dan reproduksi ayam kampung. Jengger yang tumbuh dan berkembang dengan baik menunjukkan kinerja produksi dan reproduksi yang tinggi. Pemeliharaan keragaman ini dapat membantu dalam pengembangan varietas ayam kampung yang lebih unggul, baik dari segi produksi maupun ketahanan terhadap penyakit (Lestari dkk., 2020).

1.2.3 Kekerabatan Genetik Ayam Alope

Kekerabatan genetik pada ayam Alope merupakan aspek penting dalam memahami hubungan genetiknya dengan ayam lainnya. Proses domestikasi pada unggas, seperti pada hewan ternak lainnya, telah menghasilkan berbagai jenis atau subpopulasi dengan perbedaan genetik yang khas. Proses ini dipengaruhi oleh adaptasi terhadap lingkungan lokal dan kebutuhan peternak setempat. Keragaman genetik muncul baik antar populasi maupun di dalam populasi, yang terlihat dari variasi fenotip dan performa ayam (Zein dan Sulandari, 2012).

Kekerabatan genetik pada ayam tercermin dalam karakteristik morfologi dan produktivitasnya. Sama seperti pada ternak lainnya, isolasi geografis dan proses domestikasi jangka panjang telah menghasilkan perbedaan genetik yang signifikan pada populasi ayam lokal. Subpopulasi ayam lokal memiliki hubungan genetik yang kompleks, yang dapat dimanfaatkan dalam upaya pelestarian dan pengembangan bibit unggul. Pemahaman ini sangat penting, terutama dalam menghadapi tantangan perubahan iklim dan penyakit unggas yang semakin kompleks (Sartika dkk., 2004).

Secara umum, kekerabatan genetik dapat diidentifikasi melalui analisis filogeni, yang sering dilakukan dalam studi berbasis marker DNA. Penelitian genetik semacam ini memberikan pemahaman yang mendalam tentang struktur populasi serta membantu dalam upaya pelestarian sumber daya genetik unggas. Identifikasi

kekerabatan genetik juga berperan penting dalam mendukung pengembangan program pembiakan yang bertujuan untuk meningkatkan kualitas genetik ayam, termasuk ketahanannya terhadap penyakit. Melalui analisis ini, potensi genetik unggas lokal dapat lebih dioptimalkan, sehingga mendukung ketahanan pangan dan pemuliaan berkelanjutan (Pagala dan Nafiu, 2020).

1.2.4 DNA Mitokondria D-Loop

Setiap sel mengandung satu hingga ratusan DNA mitokondria. DNA mitokondria merupakan DNA utas ganda yang berbentuk sirkuler, mengandung sejumlah gen penting untuk respirasi dan pembentukan energi sel tubuh dan fungsi lainnya, sehingga relatif lebih mudah untuk mengisolasi nukleotidanya dari genom. Genom mitokondria hewan berukuran relatif kecil dan terdapat dalam jumlah banyak, maka eksplorasi rumpun dan penelaahannya lebih mudah. DNA mitokondria (mtDNA) merupakan penanda yang banyak digunakan dalam studi molekuler karena perkembangannya yang cepat, warisan matrilineal, dan struktur molekulnya yang sederhana (Makmur, 2020).

Salah satu genom dari mtDNA adalah Displacement Loop (D-Loop). Daerah D-Loop DNA mitokondria adalah control region, yaitu daerah yang tidak mengkode protein. Dinamakan D-Loop karena pada fragmen tersebut terdapat fragmen DNA dengan struktur 3-rantai (membentuk hairpin), terbentuk akibat terciptanya rantai berat (H-strand) yang menggantikan rantai induk dan membentuk struktur tripleks D-Loop (3-strand). Daerah D-Loop merupakan daerah yang paling hipervariabel, lebih polimorfik dibandingkan dengan daerah DNA mitokondria lainnya. Daerah D-Loop sering digunakan untuk analisis filogenetik baik didalam spesies maupun antar spesies (Sulandari dan Zein, 2009).

Keunikan dari D-Loop adalah mempunyai polimorfisme atau variasi genetik tertinggi pada mtDNA. Region D-Loop memiliki keragaman yang tinggi dan tingkat evolusi lima kali lebih cepat daripada region lain yang terdapat di mtDNA. Beberapa penelitian sebelumnya telah banyak menggunakan mtDNA D-Loop untuk memahami evolusi dan mengkarakterisasi garis keturunan termasuk perbedaan genetik, haplotipe, jarak genetik, dan pohon filogeni. Selain itu, D-Loop juga dapat memberikan informasi genomik untuk mempelajari tentang perbedaan dan hubungan dari suatu spesies dengan spesies lain (Satiyarti dan Anggita, 2018).

1.2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Teknik analisis PCR (*Polymerase Chain Reactin*) merupakan teknik yang paling umum digunakan di dunia. PCR merupakan suatu metode *in vitro* untuk menghasilkan sejumlah besar fragmen DNA spesifik dengan panjang dan sekuens yang telah ditentukan dari sebagian kecil template kompleks. PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplementer dengan ujung 5 dari kedua rantai sekuens target.

Oligonukleotida tersebut digunakan sebagai primer untuk memungkinkan DNA template dikopi oleh DNA *polymerase* (Salsabila dkk., 2021).

Terdapat tiga tahapan PCR yakni denaturasi, annealing, dan *extension*. Tahap pertama PCR adalah denaturasi, denaturasi merupakan pemisahan *strand* DNA dari untai ganda (*double helix*) menjadi DNA untai Tunggal (*single-stranded*) dengan menggunakan panas bersuhu lebih dari 90 °C. Tahap kedua PCR adalah *annealing*, pada tahap ini menggunakan suhu 45-65 °C sehingga terjadi penempelan primer DNA *forward* dan *reverse* sehingga berikatan pada daerah komplementer pada sekuens *single-stranded* DNA. Tahap ketiga adalah *extension*, campuran reaksi kemudian dipanaskan hingga 72 °C sehingga *Taq polymerase* melakukan pemanjangan membentuk *strand* DNA baru. Setelah melalui satu siklus, reaksi kemudian berulang dan kembali ke siklus denaturasi dan terus berulang beberapa kali untuk melipatgandakan jumlah produk DNA. Contohnya, apabila terdapat 6 siklus maka terdapat 26 salinan. Proses pengulangan ini berlangsung terus menerus dengan total 25-40 siklus PCR (Duda dkk., 2020).

Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Sebelum dilakukan PCR dengan sampel penelitian, perlu dilakukan optimasi agar didapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai sehingga mendapatkan hasil PCR yang optimal. Faktor-faktor yang menentukan keberhasilan PCR diantaranya adalah 1) konsentrasi dan kualitas DNA, 2) temperatur annealing dari kedua primer, 3) konsentrasi MgCl₂, 4) enzim polimerase, 5) konsentrasi dan kualitas primer, 6) jumlah siklus PCR, 7) deoksinukleotida triphosphate (dNTP), dan faktor lain seperti larutan *buffer* (Setyawati dan Zubaidah, 2021).

1.3 Tujuan dan Kegunaan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kekerabatan genetik ayam Alope dengan ayam lainnya berbasis marker DNA mitokondria D-Loop.

Kegunaan dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai kekerabatan genetik antara ayam Alope dengan ayam lainnya menggunakan marker DNA mitokondria D-Loop.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2024 sampai Maret 2025, bertempat di Laboratorium Produksi Ternak Unggas, Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, kemudian disekuensing di Laboratorium *Research and Development Centre* PT. Genetika Science, Banten.

2.2 Materi Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spuit 3 ml, jas lab, gloves (sarung tangan) mikrotube, mikropipet, centrifuge, Vortex mixer, *Water bath* atau *dry bath incubator* (untuk inkubasi reaksi), GS Columns, *Freezer*, termal Siklus (*PCR machine*), timbangan analitik, spatula, gelas beaker, *hot plate stirrer* (untuk melarutkan agarosa), *magnetic stirrer*, *microwave*, *gel casting tray*, casting dams, *comb* (pencetak untuk sumur), Elektroforesis gel unit, UV Transilluminator (*gel documentapion*), Komputer dengan perangkat lunak analisis sekuen (seperti *BioEdit*, *Chromas*, atau software sekuensing lainnya) dan DNA sequencer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 10 sampel darah ayam Alope, RBC, PBS (*Phosphate Buffered Saline*), RBC buffer, GB buffer, *elution buffer*, *Ethanol* (ETOH) 96%, *W1 buffer*, *wash buffer*, *primer D-Loop forward* (5'-AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC-3'), *primer D-Loop reverse* (5'-ATG TGC CTG ACC GAG GAA CCA G-3'), *Master mix* PCR, *water* (DH₂O), MgCl₂, Agarosa, Tris base, asam borat, EDTA, *Gel red* (untuk pewarnaan DNA pada gel), *Loading dye* (untuk memuat sampel ke dalam gel), *DNA ladder* (penanda berat molekul untuk elektroforesis), *Reagen* purifikasi PCR (kit untuk memurnikan produk PCR), dan *Reagen* sekuensing

1.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Koleksi sampel

Sampel darah diambil melalui sayap (vena *brachialis*) menggunakan spuit 3 ml dan ditampung pada tabung *microtube* yang telah berisi bubuk antikoagulan EDTA untuk mencegah penggumpalan darah. Setelah itu, sampel kemudian dibawa ke laboratorium dan disimpan dalam *freezer* untuk mempertahankan kondisi sampel agar tidak rusak hingga saatnya dianalisis.

1.3.2 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 disediakan dalam beberapa tahap. Pertama, menyiapkan tabung mikrotube 1,5 ml dan diberi label sesuai dengan kode sampel. Sampel sebanyak 10 µl dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikrotube. Kemudian dilisiskan dengan menambahkan 30 µl 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 µl PBS dan 100 µl RBC *buffer* ke dalam tabung, kemudian dicampur menggunakan shaker atau *vortex*. Setelah itu, ditambahkan 200 µl 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 µl 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 µl W1 *buffer*, disentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 14.000 x g, lalu supernatan dibuang. Setelah itu, ditambahkan 600 µl *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 µl *elution buffer* yang telah dipanaskan, kemudian dидiamkan selama 3 menit. Setelah itu, tabung disentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 14.000 x g untuk memperoleh hasil ekstraksi DNA.

1.3.3 Amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplifikasi DNA hasil ekstraksi dilakukan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan target wilayah D-Loop mitokondria sepanjang 600 bp. Proses amplifikasi ini menggunakan sepasang primer spesifik untuk daerah D-Loop, dengan sekuens sebagai berikut:

Tabel 1. Primer D-Loop

Forward primer:	5'-AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC-3'
Reverse primer:	5'-ATG TGC CTG ACC GAG GAA CCA G-3'

Sumber: Islam dan Nishibori, 2012

Komposisi reaksi PCR diatur pada volume reaksi 25 µl yang terdiri atas 12,5 µl master mix, 1 µl masing-masing primer forward dan reverse, 8,9 µl DH₂O, 0,1 µl MgCl₂ dan 2 µl DNA. kemudian disentrifugasi pada 10.000 RPM selama 1 menit. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam mesin PCR selama kurang lebih 3 jam 10 menit. Kondisi PCR mulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C × 4 menit, diikuti dengan 35 siklus berikutnya masing-masing denaturasi 94°C × 45 detik, dengan suhu annealing yaitu 65°C × 1 menit, yang 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 dengan menggunakan mesin PCR. Produk PCR kemudian dilanjutkan ke tahapan elektroforesis dengan tahapan yang pertama yaitu

membuat gel dengan menggunakan agarose 1,5 % sebanyak 0,75 g dan TBE sebanyak 50 ml. Setelah itu dimasukkan ke dalam microwave selama 5 menit, lalu menambahkan *gel red* lalu dihomogenkan. 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 40 menit. Setelah selesai sampel kemudian dipindahkan ke dalam UV transiluminator (*gel documentation system*) untuk divisualisasi, keberhasilan hasil PCR dilihat dengan terbentuknya pita tunggal jelas, tegas, dan tanpa pengotor (*smear*).

1.3.4 Sekuensing

Hasil amplifikasi DNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) hanya memberikan informasi terkait ukuran fragmen DNA yang diperoleh, namun belum mampu mengungkap perbedaan maupun persamaan pada tingkat nukleotida. Oleh karena itu, diperlukan tahap lanjutan berupa proses sekuensing (peruntutan DNA) untuk memperoleh data sekuens nukleotida secara detail. Sampel dengan kualitas hasil ekstraksi DNA terbaik dipilih untuk proses sekuensing yang dilakukan di Laboratorium *Research and Development Centre* PT. Genetika Science, Banten. Proses sekuensing dilakukan menggunakan metode Sanger, yaitu metode klasik peruntutan DNA yang berbasis pada prinsip penghentian sintesis rantai DNA secara selektif menggunakan nukleotida berlabel (dideoksinukleotida atau ddNTP). Metode ini memungkinkan pembacaan urutan basa DNA secara akurat dan efisien pada fragmen DNA berukuran pendek hingga menengah. Pada tahap sekuensing ini digunakan primer spesifik, yaitu CR-For 5'-TCTATATTCCACATT-3' dengan target wilayah D-Loop mitokondria sepanjang 350 bp.

1.3.5 Analisis Bioinformatik (MEGA 11.0 dan DnaSp)

Runutan nukleotida yang telah diedit kemudian disejajarkan (*alignment*) dengan menggunakan fitur Clustal W yang tersedia pada software *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA 11.0). Analisis bioinformatik yang dilakukan yaitu komposisi nukleotida, *haplotype*, jarak genetik dan pohon filogeni.

Komposisi nukleotida merupakan salah satu bentuk karakterisasi gen atau keunikan suatu gen dimana basa nukleotida merupakan bagian dari DNA yang dapat terlibat dalam pemasangan basa, utamanya adalah sitosin (C), guanin (G), adenin (A), dan timin (T) secara berurutan yang dalam genetika basa nukleotida tersebut biasanya hanya disebut sebagai basa N yang komposisinya sesuai dengan hasil sekuensing yang dilakukan (Hamida dan Taher, 2019).

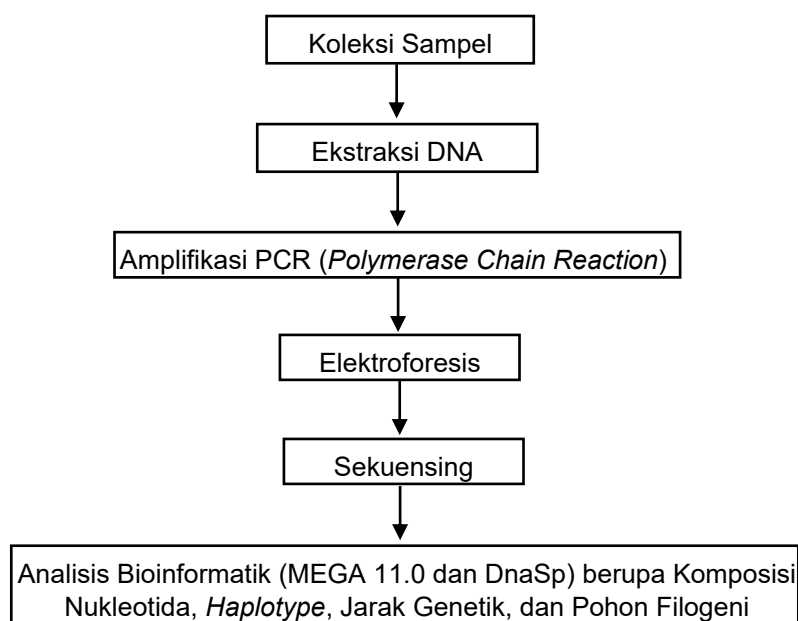
Haplotype adalah pengelompokan fisik varian genomik yang cenderung

diwariskan bersama. *Haplotype* spesifik biasanya mencerminkan kombinasi unik dari varian yang berada berdekatan satu sama lain pada kromosom. *Haplotype* sangat penting untuk digunakan dalam menganalisis keragaman ayam yang dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut seperti pohon filogeni (Simon et al., 2022).

Jarak genetik merupakan tingkat perbedaan genomik (perbedaan gen) di suatu populasi atau spesies yang diukur melalui kuantitas numerik sehingga hasil jarak genetik dapat digunakan untuk mengetahui pohon filogenetik. Dalam analisis jarak genetik menggunakan compute pairwise distance pada aplikasi MEGA (Fatmarischa dkk., 2014).

Pohon filogeni adalah sebuah pendekatan logis untuk menunjukkan hubungan evolusi antara organisme. Pohon filogeni diartikan sebagai model untuk merepresentasikan hubungan nenek moyang antar organisme, sekuen molekul atau keduanya. Tujuan dari penyusunan pohon filogeni adalah untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya (Dharmayanti, 2011).

Prosedur penelitian disajikan pada diagram alir penelitian yang ada pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram Alir Penelitian

2.4 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif untuk mengidentifikasi kekerabatan genetik ayam Alope dengan ayam lainnya. Data ayam Alope yang telah disekuensing kemudian disandingkan dengan data ayam yang diperoleh dari GenBank NCBI. Analisis data dilakukan menggunakan software MEGA 11.0 dengan melakukan perhitungan komposisi nukleotida, jarak genetik, dan

pohon filogeni berdasarkan peruntutan (Clustal W) DNA D-loop sedangkan penentuan *haplotype* menggunakan software DNA *Sequence Polymorphism* (DnaSP). Beberapa rumpun ayam yang diperoleh dari GenBank digunakan sebagai pembanding (*reference genome*) disajikan pada Tabel 4.

Tabel 2. Rumpun Ayam Lain sebagai Pembanding (*Reference Genome*)

Rumpun Ayam	Haplogroup	Tempat Pengambilan Sampel	Nomor Akses GenBank	Sumber
Gallus gallus Spadiceus (Red Junglefowl)	A	Myanmar	GU261700	Miao et al., 2013
Gallus gallus (Wanbei Game Chicken)	A	India	MT762345	Jin, 2020
Gallus gallus (Jiangbian)	B	China	GU261714	Miao et al., 2013
Gallus gallus (Thailand Chicken)	B	Thailand	OM240531	Gondinez et al., 2022
Gallus gallus (Autochth. Chicken)	C	India	GU261680	Miao et al., 2013
<i>Gallus gallus</i> (Red Junglefowl)	C	Myanmar	GU261716	Miao et al., 2013
Gallus gallus Manado	D	Manado	KY039428	Herrera et al., 2016
<i>Gallus gallus</i> (Indigenous Chickens)	D2	Kamboja	OM240439	Gondinez et al., 2022
<i>Gallus gallus</i> (Red Junglefowl)	E	Filipina	MK085054	Gondinez et al., 2019
<i>Gallus gallus</i> (Red Junglefowl)	E	Filipina	MK085053	Gondinez et al., 2019
Gallus gallus (Chigulu)	F	China	GU261717	Miao et al., 2013
<i>Gallus gallus</i> (Indigenous Chickens)	F	Thailand	OM240532	Gondinez et al., 2022
<i>Gallus gallus Sonneratii</i> (Gray Junglefowl)	Outgroup	Japan	DQ834511	Crowe et al., 2006
<i>Gallus Varius</i> (Green Junglefowl)	Outgroup	Japan	KR535995	Ulfah et al., 2015

Sumber: GenBank NCBI