

**ANALISIS FILOGENETIK AYAM BEKISAR
BERDASARKAN MARKA COI (CYTOCHROME OXIDASE I)**

SKRIPSI



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

Disusun Oleh :

**INGGRIT TYAUTARI
NIM : H71216058**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA
2020**

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Inggrit Tyautari

NIM : H71216058

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2016

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: "ANALISIS FILOGENETIK AYAM BEKISAR BERDASARKAN MARKA COI (CYTOCHROME OXIDASE I)". Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 24 Juli 2020

Yang menyatakan,

A green 6000 Rupiah stamp with a signature over it. The stamp features the text "PSTERAI SIMPEL" at the top, "6000" in large digits, and "RUPIAH" at the bottom. There is a small emblem on the right side of the stamp.

Inggrit Tyautari

NIM H71216058

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi oleh

NAMA : INGGRIT TYAUTARI


NIM : H71216058

JUDUL : ANALISIS FILOGENETIK AYAM BEKISAR BERDASARKAN
MARKA COI (CYTOCHROME OXIDASE I)

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 24 Juli 2020

Dosen Pembimbing I



Saiku Rokhim, M.KKK.

NIP. 198612212014031001

Dosen Pembimbing II



Yuanita Rachmawati, M.Sc.

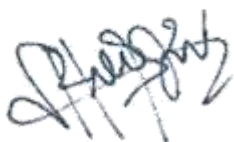
NIP. 198808192019032009

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Inggrit Tyautari ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 24 Juli 2020

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I



Saiku Rokhim, M.KKK.

NIP. 198612212014031001

Penguji II



Yuanita Rachmawati, M.Sc.

NIP. 198808192019032009

Penguji III



Nirmala Fitria Firdhausi, M. Si.

NIP. 198506252011012010

Penguji IV



Dr. Moch. Irfan Hadi, S.KM., M.KL.

NIP. 198604242014031003

Mengetahui,

Plt. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Ampel Surabaya



Dr. Hj. Evi Fatmatur Rusydiyah, M.Ag.

NIP. 197312272005012003



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : INGGRIT TYAUTARI
NIM : H71216058
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI/ BIOLOGI
E-mail address : inggrityautari@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

ANALISIS FILOGENETIK AYAM BEKISAR BERDASARKAN MARKA COI

(CYTOCHROME OXIDASE I)

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara *fulltext* untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 24 Juli 2020

(INGGRIT TYAUTARI)

karenanya peneliti yang mempelajari faktor genetik mengetahui ilmu-ilmu penciptaan dan mencermati hasil ciptaan Allah menjadikan mereka sebagai golongan manusia yang tunduk kepada Allah.

Menurut Sidadolog (2007) ayam Indonesia dimanfaatkan sebagai ayam pedaging, ayam petelur, dan ayam *fancy* yang dipelihara untuk dinikmati keindahan bulunya maupun keindahan kokoknya. Selain dimanfaatkan untuk tujuan tersebut, beberapa jenis ayam juga dimanfaatkan dalam acara keagamaan, pertunjukan, sabung ayam maupun kontes suara kokok ayam. Provinsi Jawa Timur merupakan salah satu daerah di Indonesia yang terkenal dengan budaya kontes kokok ayam. Ayam yang sering diperlombakan keindahan suaranya ini adalah ayam bekisar (Tarigan dan Hermanto, 1991). Ayam bekisar merupakan ayam asli Indonesia, hasil persilangan antara ayam hutan hijau (*Gallus varius*) dengan ayam kampung (*Gallus gallus domesticus*). Ayam bekisar ini diketahui berasal dari Pulau Kangean, pulau kecil di sebelah timur Pulau Madura (Handiwirawan, 2004).

Berdasarkan peraturan Kementerian Pertanian Republik Indonesia tahun 2006 saat ini penentuan *breed* ayam hanya dilakukan berdasarkan karakter fenotipnya. Penentuan *breed* berdasarkan karakteristik fenotip ini menyebabkan keragaman fenotip yang tinggi pada tiap-tiap *breed* ayam, Wollny (2003) menambahkan bahwa selain karakteristik fenotip, juga diperlukan analisis karakteristik genotipnya guna melestarikan *breed* ayam yang dihasilkan. Analisis karakteristik genotip ini digunakan untuk mempermudah dalam pengelompokkan *breed* untuk mengetahui garis keturunannya serta menjawab kerancuan dalam penyebutan *breed* ayam.

Hasil dari pengelompokan dan pelestarian *breed* dimanfaatkan untuk menjaga sumberdaya genetik yang dimanfaatkan dalam program pemuliaan *breed*. Salah satu cara untuk menjaga sumberdaya genetik adalah dengan mempelajari materi genetiknya. Mempelajari dan mengidentifikasi urutan basa nuklotidanya dapat dilakukan menggunakan metode DNA barcode.

DNA Barcode merupakan suatu metode untuk mengidentifikasi sekuens materi genetik suatu organisme dari sampel dengan berbagai bagian tubuhnya. *DNA Barcode of Life* digunakan di berbagai penelitian maupun kehidupan yang berasal dari sekuens DNA dengan region yang sama. Berdasarkan hasil *International Barcode of Life Conference* (CBOL) disepakati gen COI sebagai gen yang digunakan dalam identifikasi pada metode DNA Barcode (Sulandari *et al.*, 2013). Gen Cytochrome oxidase subunit I (COI) merupakan salah satu gen yang terdapat di mitokondria dan menyandi protein sebagai penanggung jawab dalam fosforilasi tahap akhir sebelum pembentukan ATP (Sutrisno *et al.*, 2013). Gen COI memiliki sekuens yang mengalami sedikit delesi dan insersi, memiliki daerah yang konserf, gen COI bersifat stabil yang dapat digunakan sebagai penanda dalam analisis filogenik karena daerah COI jarang mengalami substitusi (Hebert *et al.*, 2003).

Filogenetik merupakan kajian mengenai klasifikasi terkait tingkat taksonomi organisme yang dapat digunakan sebagai petunjuk evolusi (Dharmayanti, 2011). Materi genetik suatu organisme berperan penting dalam proses evolusi. Sejarah evolusi dapat ditunjukkan melalui perubahan karakter pada suatu organisme yang sekaligus menjadi dasar analisis hubungan antar

spesiesnya (Schmidt, 2003). Salah satu pendekatan filogenetika melalui desain pohon filogenetik, tujuan dari penyusunan filogenetika adalah untuk merekonstruksi dan mempelajari hubungan antar organisme serta menganalisis perbedaan yang terjadi dari nenek moyang kepada keturunannya.

Kajian sumber daya genetik ayam di Indonesia telah dilakukan oleh beberapa peneliti, salah satunya adalah Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia pada 2005-2007. Kajian genetik yang bertujuan untuk mengkaji proses domestikasi ayam di Indonesia, hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa Kepulauan Indonesia disebut sebagai salah satu pusat domestikasi ayam di dunia. Selain itu juga terdapat penelitian mengenai analisis partial gen pada mtDNA D-loop yang dilakukan oleh Zein dan Sulandari (2009) yang mengkaji *breed* ayam Indonesia, namun tidak seluruh ayam dikaji dalam penelitian tersebut seperti ayam bekisar yang merupakan fauna identitas Provinsi Jawa Timur. Penelitian mengenai ayam bekisar juga telah dilakukan oleh Ulfah (2016) mengenai keragaman genetik ayam asli Indonesia yang langka berdasarkan analisis sekuens D-Loop dan gen Mx, penelitian tersebut menunjukkan bahwa karakterisasi genetik ayam bekisar memiliki manfaat yang tinggi karena ayam bekisar yang bersifat unik dan memiliki nilai sendiri pada bidang ekonomi, sosial, dan budaya bagi masyarakat Indonesia, terutama masyarakat Madura. Untuk itu perlu dilakukan kajian mengenai kekerabatannya melalui analisis pohon filogenetik ayam bekisar menggunakan gen COI guna mengetahui garis keturunannya, memperkaya data plasma nutfah, serta mendukung program pemuliaan *breed* mendatang.

Gallus gallus memiliki daerah persebarannya di India, China, dan Asia Tenggara. *Gallus varius* memiliki persebaran di Indonesia diantaranya adalah Pulau Jawa, Madura, Bali, Sumba, Flores, dan beberapa pulau kecil lainnya. *Gallus sonneratii* memiliki persebaran di India Selatan dan India Barat, sedangkan *Gallus lafeyettii* memiliki persebaran hanya di Sri Lanka saja (Sulandari *et al.*, 2007). Sejak zaman dahulu masyarakat Indonesia memiliki hubungan erat dengan ayam dalam kesehariannya. Ayam dalam budaya masyarakat Indonesia digunakan sebagai mata pencaharian seperti beternak ayam petelur, ayam pedaging, selain itu ayam juga digunakan dalam upacara adat sebagai sesajen upacara keagamaan, upacara pernikahan, seserahan pada raja, dan sebagainya (Sidadolog, 2007).

Ayam merupakan salah satu hewan yang banyak ditanak di Indonesia selain sapi, kambing, dan itik. Ternak ayam di Indonesia telah dikenal dari jaman dahulu dibuktikan dengan temuan pusat domestikasi ayam di Indonesia dengan proses domestikasi yang melalui kurun waktu cukup lama. Menurut Sulandari *et al.* (2007) Indonesia diyakini sebagai salah satu pusat domestikasi ayam karena ayam di Indonesia berbeda dengan ayam di Asia maupun di benua lainnya, perbedaan ini ditandai dengan letak clade ayam Indonesia yang berbeda dengan ayam lainnya. Ayam Indonesia memiliki keragaman yang tinggi pada bentuk tubuh, bulu, warna, paruh, kulit, dan reproduksinya. Beragamnya jenis ayam ini dipengaruhi oleh faktor lingkungannya dan faktor pewarisan sifat dari generasi ke generasi yang dikarenakan sistem pemeliharaan dan reproduksi yang berbeda (Sidadolog, 2007). Hewan ternak sejak dahulu telah dijelaskan dalam Al-Quran dan

langkah setan. Sesungguhnya setan itu musuh yang nyata bagimu,

Berdasarkan ayat tersebut dijelaskan bahwa terdapat 2 manfaat umum dari Al-An'am yaitu Hamulatan dan Farsya. Hamulatan adalah hewan ternak yang dimanfaatkan sebagai moda transportasi, hewan ternak hamulatan umumnya memiliki bentuk tubuh yang besar, dengan kaki yang kuat seperti sapi, kuda, dan unta. Sedangkan farsya adalah hewan ternak yang dimanfaatkan dagingnya untuk mencukupi pangan manusia. Umumnya bentuk tubuh hewan ternak farsya adalah kecil dengan tubuh yang hampir menyentuh tanah (Shihab, 2020). Berdasarkan tasir tersebut ayam termasuk kategori ternak farsya.

Kata (*Farsya*) yang dimaknai sebagai ternak-ternak kecil karena tubuhnya hampir menyentuh dengan tanah, dan dapat disembelih yaitu seperti kambing, domba dan sapi (Shihab, 2002). Sejalan dengan penafsiran yang dikemukakan dalam penjelasan di atas, bahwa ayam termasuk kategori *farsya* karena bentuk tubuh yang kecil, hampir menyentuh tanah, dapat disembelih dan dagingnya dapat dimakan.

Ayam yang dipelihara oleh masyarakat Indonesia sejak lama merupakan ayam hasil proses domestikasi dengan waktu yang cukup lama. Proses domestikasi berkaitan erat dengan hubungan kekerabatan ayam yang ada di Indonesia. Untuk mempelajari hubungan kekerabatan dapat diketahui dari filogeni atau sejarah evolusinya. Filogeni ini didapat dari data fosil, maupun gen tiap organisme. Suatu spesies memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan spesies lainnya juga dapat dilihat dari karakter

homolognya, kesamaan material genetik, protein struktural, dan jalur metabolisme yang sama (Sulandari *et al.*, 2007).

Proses domestikasi ayam di Indonesia ini diperdebatkan oleh banyak peneliti, berdasarkan teori Darwin mengenai proses domestikasi, terdapat 2 teori domestikasi yaitu teori monophyletic dan polyphyletic. Teori monophyletic menyatakan bahwa ayam hasil domestikasi berasal dari satu nenek moyang yang sama, sedangkan teori polyphyletic menyatakan bahwa ayam domestik berasal dari nenek moyang yang berbeda pada setiap jenisnya (Stevens, 1991). Hasil kajian yang telah dilakukan oleh Fumihito (1994) yang didukung oleh penelitian keduanya pada tahun 1996 menjawab perdebatan nenek moyang dari ayam domestik. Penelitiannya mengenai kontribusi material genetik ayam hutan merah (*Gallus gallus*) terhadap populasi genetik ayam domestik yang tinggi dibandingkan dengan ketiga jenis ayam hutan lainnya dipercayai bahwa nenek moyang ayam domestik adalah ayam hutan merah (*Gallus gallus*).

Didukung oleh penelitian yang telah dilakukan oleh Sulandari *et al.* (2009) mengenai asal usul domestikasi ayam Indonesia yang menyatakan bahwa ayam kampung dan beberapa jenis ayam domestik lainnya yang dipelihara oleh masyarakat Indonesia berasal dari satu ayam hutan (monophyletic) yaitu ayam hutan merah. Hasil domestikasi ini menunjukkan bahwa nenek moyang bangsa Indonesia telah sejak lama melakukan budaya beternak unggas (Sulandari *et al.*, 2007).

Pembagian ayam di Indonesia telah diatur dalam Peraturan Pemerintah No. 48 tahun 2011 tentang Sumber Daya Genetik Hewan dan Perbibitan ternak. Berdasarkan asal usulnya ayam Indonesia dibagi dikelompokkan menjadi 3 yaitu ayam asli, ayam lokal, dan ayam introduksi. Sedangkan FAO (2008) mengelompokkan ayam asli dan ayam lokal dalam satu kelompok ayam buras, serta ayam introduksi dikelompokkan dalam ayam ras yang dipelihara dengan sistem tertentu. Ayam asli merupakan ayam yang proses domestikasinya terjadi di Indonesia, keturunan ayam hutan tipe liarnya dari Indonesia. Berbeda dengan ayam asli, ayam lokal merupakan ayam hasil persilangan yang dilakukan oleh bantuan manusia yang dikembangkan di Indonesia hingga pada generasi kelimanya. Sedangkan ayam introduksi adalah ayam yang berasal dari ras luar negeri yang dipelihara atau diintroduksi oleh masyarakat Indonesia dan mampu beradaptasi di lingkungan Indonesia. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sartika dan Iskandar (2007) terdapat 41 jenis *breed* ayam buras yang teridentifikasi berdasarkan karakter fenotipnya. Keseluruhan *breed* ayam yang telah teridentifikasi terdiri dari 27 ayam asli dan 14 ayam lokal. *Breed* ayam di Indonesia disajikan pada Tabel 2.1 dan Tabel 2.2.

Tabel 2. 1 Daftar Ayam Asli Indonesia

No.	Nama Ayam	Daerah Asal
1	Ayunai (leher gundul)	Papua
2	Banten	Banten
3	Bangkalan	Madura
4	Bekisar	Madura
5	Burgo	Sumatera Selatan
6	Ciparage	Karawang
7	Gaok	Madura
8	Jalak harupat	Bandung, garut
9	Jantur	Subang
10	Kampung	Tersebar
11	Kalosi	Sulawesi selatan
12	Cemani	Temanggung

kangean pada mulanya digunakan sebagai persembahan pada raja-raja Madura, khususnya Kerajaan Sumenep. Bagi masyarakat Kangean dan Madura, ayam bekisar dimaknai sebagai simbol kekayaan, dimana hanya pembesar dan pemuka agama saja yang dapat memilikinya (Aminullah, 2016). Untuk melestarikan ayam bekisar serta mengenang raja-raja Sumenep, ayam bekisar dijadikan fauna khas Sumenep, dan sebagai fauna identitas Jawa Timur. Untuk memperkenalkan fauna identitasnya Pemerintah Provinsi Jawa Timur menetapkan kebijakan untuk mewajibkan adanya ayam bekisar di setiap kantor instansi pemerintah (Sudiro, 1993).

Menurut Handiwirawan (2004) saat ini masyarakat berlomba-lomba untuk mengawinsilangkan ayam hutan dengan berbagai ayam domestik lainnya guna mendapatkan ayam bekisar dengan kualitas yang tinggi. Mengacu pada penelitian yang telah dilakukan, ayam bekisar mewarisi warna bulu dari parental betinanya dengan bentuk ujung bulunya tidak berbentuk meruncing seperti ayam pada umumnya melainkan berbentuk lonjong atau bulat. Semakin indah bulunya serta semakin indah kokoknya, maka semakin tinggi harga jual ayam bekisar. Terdapat 5 jenis ayam bekisar yang terkenal yaitu ayam bekisar kangean, ayam bekisar solo, ayam bekisar yogyakarta, ayam bekisar parakan, dan ayam bekisar solo. Skema persilangan ayam bekisar disajikan pada Gambar 2.2.

a. Ayam Bekisar Kangean

Ayam bekisar Kangean merupakan ayam bekisar yang diperoleh dari hasil persilangan antara ayam hutan hijau jantan (*Gallus varius*) dengan

untuk DNA barcode. Gen COI merupakan gen mitokondria sebagai penyandi protein yang bertanggung jawab pada tahap forforilasi akhir sebelum terbentuknya ATP. Namun juga disepakati beberapa non-COI barcode region dengan beberapa syarat tertentu. Diantara syarat syarat tersebut adalah penolakan COI karena pada beberapa kelompok takson tertentu didapati gen COI yang tidak bervariasi, kesulitan gen COI dalam menyelesaikan pola variasi intra spesifik dan inter spesifik. Oleh karenanya dibutuhkan non-COI barcode region dengan memperhatikan kinerja gen tersebut, seperti penggunaan gen *Cyt b*, ITS, 12SrRNA, 16SrRNA (Kress *et al.*, 2005). Menurut Sulandari *et al.* (2013) tahapan kerja dalam DNA barcode diantaranya adalah koleksi data, pengambilan sampel, ekstraksi DNA, pemilihan primer yang sesuai, amplifikasi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction*, dan sekuensing.

2.3.1 Koleksi Data

Koleksi data dilakukan dengan mengoleksi, memotret, mengumpulkan dan mencatat seluruh data yang dieproleh. Data data tersebut berupa gambar organisme atau gambar sampel, tanggal pengambilan, lokasi pengambilan, nama spesies, nama lokal. Dalam DNA barcode digunakan minimal 5-10 sampel pada setiap individu. Sampel dapat berupa darah, jaringan, rambut, tulang, gigi, saliva, potongan kuku, urine, dan organ.

2.3.2 Pengambilan dan Pengawetan Sampel

Pengambilan sampel dapat dilakukan dari organisme hidup, spesimen museum, maupun fosil. Pengambilan sampel DNA

2.3.5 Amplifikasi PCR

Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR atau *Polymerase Chain Reaction* merupakan metode yang pertama kali ditemukan oleh Kary, B. Mullis tahun 1985. PCR merupakan suatu metode pengamplifikasi atau pelipat gandaan DNA yang dilakukan di luar sel atau secara *in vivo* pada daerah spesifik menggunakan sepasang primer sebagai pembatasnya (Sulandari *et al.*, 2013). Prinsip kerjanya dengan pengenalan DNA template oleh primer yang saling komplement, hingga kedua primer menempel dengan penyediaan gugus –OH bebas pada karbon ke 3'. Diikuti oleh DNA polimerase untuk memperpanjang untai DNA hasil copy dari primer, pada gugus 5' ion pospat dNTP yang dikatalis oleh DNA polimerase. Sehingga reaksi berjalan dari 5' menuju 3'.

Komponen dalam amplifikasi DNA diantaranya adalah DNA template hasil ekstraksi DNA, primer yang terdiri dari primer reverse dan primer forward, *taq* polimerase, larutan buffer (KCL, Tris-Cl, MgCl), MgCl₂. Amplifikasi PCR terdiri dari 3 tahapan berurutan dengan beberapa siklus diantaranya adalah sebagai berikut:

a. *Denaturation*

Pada tahap ini diawali dengan tahapan pre-denaturasi untuk memastikan DNA benar-benar telah terdenaturasi. Tahap ini dilakukan pelepasan ikat ganda DNA menjadi tunggal. *Denaturation* dilakukan pada suhu tinggi berkisar 92C-95⁰C dan waktu 30 detik-1 menit. Penggunaa suhu dan waktu dalam

Maxam Gilbert ini menggunakan bahan radioaktif yang bersifat toxic bagi tubuh ini, maka penggunaannya sangat jarang digunakan.

b. Metode Sanger

Metode Sanger merupakan metode sekuensing yang di kenalkan oleh Sanger, Nicklen, Coulsen tahun 1977. Metode ini disebut juga dengan metode sekuensing ezimatis karena menggunakan enzim dalam pengaplikasiannya. Metode ini yang sampai saat ini masih digunakan karena dinilai lebih efektif. Metode Sanger ini pembacaan urutan nukleotida dengan pemberhentian pada setiap urutan basanya (Sanger *et al.*, 1977). Metode ini menggunakan prinsip sama seperti metode PCR, namun siklus sekuensing ini berbeda dengan PCR. Pada metode PCR DNA template di amplifikasi menggunakan sepasang primer, bahan dNTP. Sedangkan pada metode sekuensing Sanger digunakan satu primer untuk satu arah pembacaannya, digunakan ddNTP modifikasi dNTP untuk memberhentikan amplifikasi dengan menghilangkan gugus hidroksil pada 3'. Hasil pita atau *band* dari sekuensing berupa pita yang terkumpul secara linier, dengan hasil berupa eksponen akumulatif.

Metode Sanger memanfaatkan enzim polimerase yang memiliki fragmen klenow. Fragmen klenow ini memiliki sifat mensintesis DNA dan tidak dapat membedakan dNTP dan ddNTP. dNTP untuk melanjutkan proses amplifikasi dan mengenali ddNTP untuk memberhentikan reaksi. Molekul dNTP kehilangan gugus

nilai keberayaannya. Semakin tinggi peak maka semakin tinggi nilai kepercayaan terhadap jenis basa nukleotidannya. Peak dengan bentuk yang tumpul menunjukkan hasil sekuensing yang kurang baik. Hal ini dapat disebabkan karena kurangnya konsentrasi DNA template serta primer yang kurang efisien berinteraksi dengan template.

Hasil dari pembacaan sekuens urutan basa nukleotida dapat digunakan untuk analisis polymorphism, analisis keragaman genetik melalui mikrosatelit, *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (tRFLP). Hasil sekuensing ini dapat digunakan sebagai database DNA Barcode. Database DNA barcode adalah data yang digunakan mengelola seluruh informasi DNA barcode. Adapun beberapa hal yang harus diperhatikan dalam penyusunan database DNA barcode, yaitu data sekuens yang lengkap berdasarkan fragmen COI dan file penelusuran yang lengkap. Penyimpanan koleksi spesimen disimpan pada institusi yang telah diakui secara internasional, seperti pada hewan Museum Zoologicum Bogoriense (MZB), dan Herbarium Bogoriense untuk tumbuhan (Irham dan Fitriana, 2013).

2.3.8 Analisis Data

Data hasil sekuensing berupa sekuens DNA yang dapat digunakan sebagai pembeda pada setiap organisme. Data sekuens ini yang selanjutnya dilakukan analisis dengan menyejajarkan sekuens atau disebut dengan *Sequence alignment*. Hasil sekuensing berupa grafik

dengan warna dan pucak yang berbeda pada setiap basa nukleotidanya. Grafik hasil sekuensing dapat dikelola menggunakan software BioEdit, Clustal, MEGA, Sequence Alignment Editor (Tamura *et al.* 2007).

Data base hasil DNA Barcode selanjutnya diarsipkan pada *genebank*. Bank data berupa suatu web berisikan data genetik organisme di seluruh dunia yang dapat diakses secara gratis. Adapun *genebank* dikelola oleh *National Center for Biotechnological Information* (NCBI) dan *Barcoding of Life Data* (BOLD) yang merupakan bank *data base* sekuens hasil DNA barcode. *Data base* pada bank DNA berisikan nama author, nama organisme, jenis gen, asal spesimen, bentuk sampel, dan *accession number* yang didapat dari pengajuan *data base* pada *gene bank*.

2.4 Gen Cytochrome Oxydase I (COI)

Gen Cytochrome Oxydase I atau yang disingkat dengan COI merupakan salah satu gen yang terdapat dalam mtDNA. Mitokondria merupakan salah satu organel sel yang mengandung materi genetik berupa DNA. mtDNA memiliki bentuk sirkuler, dengan 18.000 pasang basa. DNA mitokondria terdiri dari heavy strand dan light strand. Berdasarkan pemetaan genom mitokondria yang telah dilakukan oleh Desjardins dan Morais (1990) terdapat 16.775 pasang basa dengan sekitar 1.600 daerah non-coding, dan sisanya mengkode 37 gen, yaitu 13 polipeptida (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, COI, COII, COIII, Cyt b, ATPase6 dan ATPase8), 2 mengkode 12SrRNA dan 16SrRNA, heavy strand mengkode 12 protein, 2rRNA dan 14tRNA. Light strand mengkode protein ND6 dan 8 tRNA.

Penggunaan mtDNA sering digunakan dalam berbagai penelitian dengan sampel yang terbatas, karena mtDNA memiliki salinan yang lebih banyak dibandingkan DNA nuclear sebesar 1000-10.000 (Ratnayani *et al.*, 2007). DNA mitokondria merupakan DNA yang diwariskan secara maternal. Sel sperma yang membuahi sel telur hanya sebagian selnya saja yang menembus sel telur pada proses fertilisasi (Galtier, 2009).

Cytochrome Oxydase Sub Unit I atau COI merupakan salah satu gen dari mtDNA. Gen COI mengkode protein pada subunit dari enzim yang berperan transpor elektron dalam proses transpor pada membran mitokondria. Enzim ini juga berperan bagi organisme eukariotik dalam proses respirasi selulernya (Ballard dan Whitlock, 2004). Gen COI mengkodekan protein sebagai pembentuk inti utama enzim sitokrom oksidase. Cytochrome Oxydase-I mengkodekan enzim sitokrom oksidase. Pada organel nukleus dan mitokondria keduanya memiliki nilai substitusi yang berbeda, dimana mitokondria memiliki nilai substitusi yang tinggi.

Menurut Sulandari *et al.* (2013) penggunaan suatu gen pada teknik DNA Barcode untuk mengidentifikasi suatu spesies harus memenuhi beberapa persyaratan diantaranya adalah sifat konservatif gen, sifat ini dapat digunakan sebagai pembeda antar spesies maupun inter spesies, kemudian daerah gen target mengandung informasi filogenetik guna mempermudah dalam pengelompokannya, syarat selanjutnya adalah memiliki tingkat amplifikasi yang tinggi serta dengan urutan sekuens yang tidak terlalu panjang karena untuk mempermudah dalam identifikasi pada sampel berupa potongan jaringan maupun jaringan yang telah rusak. Gen COI

Terdapat beberapa software yang digunakan dalam penelitian filogenetik ini, di antaranya adalah Bio edit, Clustal, MEGA, PAUP. MEGA atau molecular evolution genetic analysis adalah software yang sering digunakan dalam rekonstruksi filogeni, software ini menggunakan perhitungan metode distance, parsimony, maximum composite likelihood. Clustal dapat digunakan untuk mensejajarkan multiple sekuens dengan metode matriks jarak, dan neighbor terdekat. PAUP menganalisis filogenetik menggunakan parsimony dan beberapa metode lain seperti matriks jarak, dan maximum likelihood. Bioedit software yang digunakan sebagai editor penyejajaran sekuens. Software ini memudahkan dalam penentuan titik potong untuk enzim restriksi serta menganalisis suatu sekuens (Hartatik, 2014).

Salah satu pendekatan filogenetika melalui desain pohon filogenetik, tujuan dari penyusunan filogenetika adalah untuk merekonstruksi dan mempelajari hubungan antar organisme serta menganalisis perbedaan yang terjadi dari nenek moyang kepada keturunannya. Pohon filogenetik terdiri dari 2 bagian yaitu nodus dan cabang. Nodus merupakan bagian yang mewakili tingkat taksonomi individu, spesies, serta populasi. Sedangkan cabang menunjukkan hubungan antara unit taksonomi satu dengan unit taksonomi lainnya.

Pohon filogenetik dibentuk melalui beberapa metode, yaitu metode pendekatan melalui data karakter dan metode pendekatan melalui matriks berdasarkan indeks jarak. Metode pendekatan melalui data karakter termasuk di dalamnya adalah MP (Maximum Parsimony), ML (Maximum Likelihood), dan BI (Bayesian Inference). Metode pendekatan melalui matriks

berdasarkan indeks jarak termasuk di dalamnya adalah UPGMA, Minimum Evolution, dan Neighbor Joining.

Metode Likelihood merupakan metode dengan perhitungan algoritma dengan prinsip perubahan basa nukleotida yang dianggap sebanding. Metode Bayesian dengan memperhitungkan distribusi priornya. Metode Parsimony adalah metode yang sering digunakan dalam rekonstruksi filogenetik yang perubahan mutasinya dianggap berlangsung pada semua arah baik pada 4 basa nukleotida yang berbeda, maupun pada 20 asam amino yang berbeda (Hidayat dan Pancoro, 2006).

Metode UPGMA mengasumsikan bahwa laju evolusi antar sekuens adalah sama. menghitung skor kesamaan dalam alignment 2 sekuens. Skor ini merupakan jumlah sekuens yang posisinya mis match. Gap diabaikan atau dianggap sebagai substitusi (Dharmayanti, 2011). Metode minimum evolution menentukan konstruksi pohon filogenetik melalui cabang terkecilnya. Kuadrat terkecilnya memilih pohon dengan kemampuan meminimalkan kuadrat perbedaannya. Kuadrat terkecil didapat dari perhitungan jarak yang diamati dengan jarak pada panjang cabang. Metode neighbor joining merupakan metode pembuatan pohon filogenetik berdasarkan nilai branch tree lengthnya. Neighbor sendiri memiliki arti cabang kecil atau branch length. Pohon filogenetik hasil dari metode ini berupa pohon dengan nilai tree length dari penjumlahan nilai tree length yang telah diminimalisir. Kerja metode ini dengan menggabungkan sekuens yang memberi nilai terbaik dari panjang cabang yang merefleksikan jarak paling nyata pada sekuens (Abi, 2016).

- c. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
- d. Tube dimasukkan dalam sentrifuge, dan disentrifugasi 16.000×g selama 1 menit.
- e. Pellet yang terbentuk dipisahkan dari supernatan.
- f. Pellet ditambahkan sebanyak 300 µl Nuclei Lysis Solution.
- g. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.
- h. Ditambahkan 1,5 µl RNAse Solution.
- i. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.
- j. Campuran ditambahkan 100 µl Protein Precipitation Solution.
- k. Dilakukan sentrifugasi 16.000×g selama 3 menit.
- l. Dipisahkan antara supernatant dan pellet.
- m. Supernatant ditambahkan 300 µl isopropanol.
- n. Dilakukan sentrifugasi 16.000×g selama 1 menit.
- o. Dipisahkan antara supernatant dan pellet.
- p. Supernatant ditambahkan 300 µl ethanol 70%.
- q. Campuran diinversi perlahan.
- r. Aspirasi dengan membuang perlahan supernatant, agar pellet tidak larut terbang.
- s. Tube diletakkan dengan keadaan terbalik selama 10 menit.
- t. Pellet ditambahkan 100 µl DNA Rehydration Solution dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam.
- u. Hasil ekstraksi DNA disimpan pada suhu 4°C.

Hasil kuantitas DNA berdasarkan pada nilai konsentrasi DNA berupa data yang beragam karena adanya perbedaan waktu penyimpanan sampel. Sampel AB4 merupakan sampel dengan hasil konsentrasi terkecil dengan nilai konsentrasi sebesar 0,563. Hal tersebut karena pengambilan sampel berasal dari Madura dengan jarak tempuh yang jauh serta penyimpanan yang tidak memenuhi standar selama perjalanan pengiriman sampel sehingga sampel darah menggumpal ketika akan dilakukan ekstraksi DNA. Sampel darah berupa *Whole Blood* yang mengandung sel berinti (leukosit) dan sel tak berinti (eritrosit). Waktu penyimpanan yang lama dapat menurunkan degradasi DNA.

Menurut Masir (2016) waktu optimal penyimpanan darah adalah 5 hari pada suhu 5°C. Jarak waktu penyimpanan darah dengan proses ekstraksi DNA yang panjang ini mempengaruhi kualitas darah. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Siswanto *et al* (2016) ekstraksi DNA menggunakan sampel *Whole Blood* menghasilkan DNA yang lebih sedikit dibandingkan menggunakan sampel berupa buffy coat. Sampel *Whole blood* mengandung komponen baik sel darah putih dan sel darah merah yang tidak mengandung DNA inti sel di dalamnya karena pada sel darah merah dewasa tidak ditemukan adanya inti sel, sehingga DNA inti sel hanya didapatkan pada sel darah putih. Sedangkan pada sampel *Buffy Coat* terkonsentrasi hanya sel darah putih yang mengandung DNA genome yang berasal dari inti sel.

Uji kuantitas dan kualitas DNA sangatlah penting dilakukan sebelum melanjutkan pada tahapan amplifikasi PCR agar hasil amplifikasi PCR didapatkan band yang tebal dengan indikasi banyaknya gen target yang telah

teramplifikasi. Nilai λ_{230} nm menunjukkan kontaminasi dari kelompok peptida. Kontaminasi lainnya dapat diketahui pada nilai kemurnian $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ nm dengan nilai lebih kecil dari 1,8 diindikasikan adanya kontaminasi senyawa fenol sedangkan nilai kemurnian lebih dari 2 diindikasikan sebagai kontaminan yang berasal dari protein pada membrane sel, atau kontaminan berupa RNA yang disebabkan ketidak sempurnaan dalam proses pemurnian DNA (Pratama, 2015). Selain hal tersebut kontaminan juga dapat berasal dari kegagalan lisis pada komponen sel pada proses ekstraksi DNA (Fachtiyah *et al*, 2011).

4.4 Hasil Amplifikasi PCR

Hasil ekstraksi DNA kemudian dilakukan amplifikasi menggunakan metode *Polymerase Chain Reactin* atau PCR. Prinsip kerja amplifikasi PCR adalah memperbanyak untai DNA yang dilakukan diluar sel atau secara *in vitro* (Sulandari *et al.*, 2013). Amplifikasi PCR menggunakan sepasang primer yaitu primer Forward dan Reverse. Penggunaan primer dengan desain urutan nukleotida tersebut berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Gao *et al*, 2011: Studied on the DNA Barcoding of Two Newly Discovered Chocken Breeds by mtDNA COI Gene.

Suhu *annealing* sangat berpengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi PCR, karena pada tahapan *Annelaing* terjadi proses penempelan primer. Penentuan suhu *annealing* dilakukan berkisar $5^{\circ}\text{C}+T_m$ atau $T_m-5^{\circ}\text{C}$. Suhu *annealing* yang tidak sesuai akan menyebabkan kegagalan dalam penempelan primer sehingga tidak ada DNA yang teramplifikasi sehingga pda tahap visualisasi hasil PCR tidak ditemukan *band* yang diinginkan. Polymerase

mempermudah dalam peluang amplifikasi gen yang diinginkan (Sasmito, *et al*, 2014).

Sampel 1-5 merupakan amplicon hasil amplifikasi gen target menggunakan primer COI1, digunakan primer tersebut karena COI merupakan daerah konserv yang mewarisi materi genetik secara maternal, serta daerah tersebut memiliki lokus yang berkaitan dengan filogenetik dan evolusinya. Hasil visualisasi gel electrophoresis menunjukkan kualitas karakter genetiknya yang berupa *band*. Kualitas karakter genetiknya dipengaruhi oleh total amplicon DNA yang terbentuk. Semakin banyak amplicon DNA maka semakin tebal *band* yang diperoleh, sebaliknya bila semakin sedikit amplicon DNA yang terbentuk maka semakin tipis *band* yang terbentuk. Menurut Irmawati (2003) menyatakan bahwa *band* yang tebal menunjukkan konsentrasi yang tinggi dengan kondisi utuh pada DNA total hasil proses ekstraksi. *Band* dengan hasil yang menyebar menunjukkan putusannya ikatan antar molekul DNA karena kegagalan dalam proses ekstraksi DNA.

4.5 Hasil Sekuensing

Hasil amplifikasi PCR dikirimkan pada 1st BASE DNA Sequencing, metode sekuensing yang digunakan adalah metode Sanger atau disebut dengan *Chain Termination Method*. Metode Sanger merupakan salah satu metode sekuensing yang prinsip kerjanya sama dengan amplifikasi PCR namun berbeda pada bahan reaksinya. Sekuensing metode sanger ini menggunakan ddNTP yang bertugas membawa pasangan basa nukleotida untuk diikatkan pada ujung molekul DNA. Yang selanjutnya dilakukan

Hasil sekuensing didapat sekuens sepanjang 560bp pada sampel dengan primer COI1. Persentase basa nukleotida hasil sekuensing disajikan pada Tabel 4.4

Tabel 4. 4 Persentase Basa Nukleotida

Sampel	Basa Nukleotida				A+T	G+C
	A	T	G	C		
AB1-COI1	28%	25%	15%	32%	53%	47%
AB2-COI1	28%	25%	15%	32%	53%	47%
AB3-COI1	28%	25%	15%	32%	53%	47%
AB4-COI1	28%	25%	15%	32%	53%	47%
AB5-COI1	28%	25%	15%	32%	53%	47%

4.6 Hasil Analisis Filogenetik

Hasil sekuens gen penyandi Cytochrome Oxidase I dari 5 sampel darah ayam bekisar dilacak homologinya terhadap sekuens Cytochrome Oxidase I lainnya pada GeneBank melalui situs <http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>. Hasil blast dengan 10 sekuens dengan nilai kemiripan yang sama disajikan pada Tabel 4.5.

Tabel 4. 5 Sekuens COI *G.gallus* pada GeneBank

No. Acces	Spesies	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Percent Identict
MN013407.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%
MK163565.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%
MK163564.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%
MK163563.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%
MK163562.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%
MK163561.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%
MK163560.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%
MK163559.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%
MH732978.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%
MH879470.1	<i>Gallus gallus</i>	1044	1044	100%	0.0	100%

Hasil blast menunjukkan kehomologan dengan sekuens dari spesies *Gallus gallus*. Max score menunjukkan keakuratan alignment sekuens berupa jumlah kesamaan urutan basa nukleotida dari database yang cocok dengan urutan basa nukleotida yang telah diinput, Query Coverage merupakan

ayat 28. Orang berilmu menunjukkan takut pada Allah, Orang berilmu pula memberi sumbangsih besar dalam mentransfer ilmu melalui pengajaran pada generasi satu ke generasi lainnya.

Beragamnya jenis ayam dikelompokkan berdasarkan ciri yang sama guna mendapat informasi mengenai kekerabatan dan asal usulnya. Pada penelitian ini pengelompokkan dilakukan berdasarkan pada materi genetiknya berupa sekuens basa nukleotidanya. Pada penelitian ini digunakan beberapa sekuens ayam lokal yang berasal dari wilayah Indonesia saja sebagai pembandingnya. Sekuens COI yang telah dipilih selanjutnya disimpan dalam format FASTA dan dilakukan multiple sequence alignment pada program MEGA7, hasil alignment disimpan dalam format MEGA. Hasil alignment selanjutnya digunakan sebagai bahan pembuatan rekonstruksi pohon filogenetik dengan penambahan outgroup sekuens ayam yang berebeda dalam tingkat spesiesnya yaitu *Gallus varius*, *Gallus lafayett*, dan *Gallus sonneratti*. Pohon filogenetik disajikan pada Gambar 4.6.

Hasil pohon filogenetik menggunakan sekuens Cytochrome Oxidase I menggambarkan sampel ayam bekisar memiliki common ancestor yang sama dengan sekuens pada NCBI pada spesies yang sama. Pohon filogenetik membentuk menjadi 1 clade besar yang terdiri dari sekuens ayam bekisar dan ayam domestik indoneisa lainnya, serta out grup berupa ayam hutan hijau, ayam hutan kelabu, dan ayam hutan Sri Lanka. Pohon filogenetik yang terbentuk disusun berdasarkan metode Neighbor Joining yang memiliki prinsip pengelompokan taksa berdasarkan hasil perhitungan jarak evolusi yang kecepatan evolusinya tidak sama dalam tiap tiap cabangnya (Hartl, 2000). Analisis filogenetik diperkuat dengan nilai perhitungan jarak pairwise. Analisis jarak pairwise memanfaatkan perbedaan basa nukleotidanya untuk menunjukkan adanya substitusi transveris maupun transisinya (Dharmayanti, 2011). Kedekatan jarak hubungan genetik antara ayam bekisar dengan ayam lokal Indonesia lainnya sangat dekat dilihat dari nilai jarak genetiknya, menurut Dharmayanti (2011) semakin rendah nilai pairwise distance maka semakin dekat jarak genetiknya, sebaliknya jika semakin tinggi nilai pairwise distance maka semakin jauh jarak genetiknya.

Pada hasil perhitungan pairwise distance (Tabel 4.6) menunjukkan bahwa keseluruhan jarak genetik yang didapat dari seluruh ayam lokal Indonesia dengan ayam bekisar sebesar 0.0 dengan nilai bootstrap yang berbeda- beda. Tujuan dari penggunaan metode perhitungan bootstrap dalam pembuatan pohon filogenetik adalah untuk menentukan tingkat kepercayaan rekonstruksi filogenetik dengan prinsip distribusi data adalah shotchastic (Jannah, 2014). Berdasarkan nilai bootstrap yang didapat, menunjukkan

bahwa pohon filogenetik memiliki angka kepercayaan yang tinggi sehingga kontruksi pohon filogenetiknya dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kekerabatan ayam bekisar dengan ayam lokal Indonesia lainnya. Untuk nilai jarak genetik yang dekat ini dikarenakan nenek moyang yang berasal dari satu nenek moyang yang sama yaitu ayam hutan merah yang telah melalui proses domestikasi hingga dapat dipelihara dan diternakan pada masa sekarang ini. Hasil kekerabatan menunjukkan kemiripan dengan *Gallus gallus* dikarenakan indukan betina dikarenakan indukan betina ayam bekisar adalah ayam kampung hasil domestikasi dari ayam hutan merah yang dikawinkan dengan ayam hutan hijau. Menurut Galtier (2009) pewarisan materi genetik berasal dari ibu. Pada proses peleburan sel sperma dan sel telur, hanya sedikit material genetik dari sel sperma yang ikut melebur, sebagian lagi tidak masuk dan ikut melebur dalam sel telur. Sel sperma ketika membuahi ovum hanya pada bagian kepala saja yang ikut melebur dalam sel telur, sedangkan pada bagian leher dan alat geraknya ekor atau flagelnya tidak ikut melebur. Bagian tersebut hanya berfungsi sebagai penggerak sel sperma agar dapat sampai pada sel ovum. Bergeraknya flagel tersebut akibat dari energi yang dihasilkan oleh mitokondria pada leher sel. Selain sebagai penghasil energi, mitokondria juga merupakan salah satu organel sel yang mengandung materi genetik. Banyaknya mitokondria ekor dan leher sel yang tidak ikut melebur dalam ovum ini menjadi alasan pewarisan sifat yang didominasi oleh ibu.

Berdasarkan kedua pohon filogenetik yang telah disajikan dapat diketahui bahwa gen Cytochrome Oxydase I memiliki daerah yang konservasi sehingga terjadinya mutasi pada daerah tersebut sangatlah kecil. Adapun

beberapa penelitian yang telah menemukan adanya mutasi pada basa nukleotida dari sekuens COI, namun tidak menimbulkan perubahan asam aminonya. Perubahan tersebut disebut dengan silent mutation. Mutasi tersebut tidak mempengaruhi kerja dan fungsi dari gen COI yang disebut dengan *synonym codon* (Dale dan Park, 2004). Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan Niu *et al* (2002) yang menyatakan bahwa adanya perbedaan yang cukup besar antara *Gallus varius*, *Gallus lafeyyeti*, *Gallus sonneratti*, dan *Gallus gallus*, serta *Gallus gallus domestic* berkerabat dekat dengan *Gallus gallus* Thailand. Didukung oleh Sulandari (2007) mengenai hubungan ayam lokal Indonesia yang dominan dan berhubungan dekat dengan ayam hutan merah (*Gallus gallus*) yang hidup liar di pulau-pulau Indonesia. Penelitian mengenai analisis filogenetik ayam bekisar menggunakan DNA mitokondria ini menambah data sekuens dari ayam lokal Indonesia. Indonesia dengan mega biodiversitasnya dapat menjadi tempat strategis sebagai lahan mempelajari segala bentuk organisme. Serta dapat menambah nilai pada bidang pengembangan ayam lokal di Indonesia agar tetap terjaga kelestariannya.

