

**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,



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

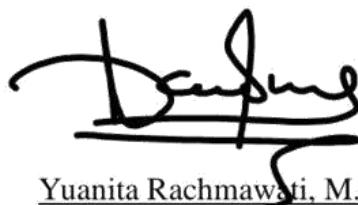
Dosen Pembimbing I



Saiku Rokhim, M.KKK.

NIP. 198612212014031001

Dosen Pembimbing II



Yuanita Rachmawati, M.Sc.

NIP. 198808192019032009

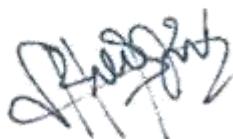
PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

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



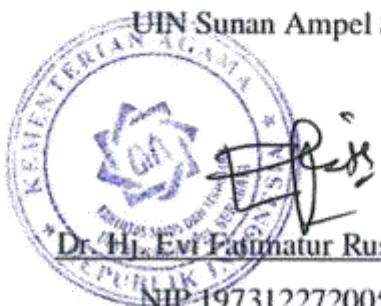
Dr. Moch. Irfan Hadi, S.KM., M.KL.

NIP. 198604242014031003

Mengetahui,

Plt. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Ampel Surabaya





**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 : inggrittyautari@gmail.com

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

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

ANALISIS FILOGENETIK AYAM BEKISAR BERDASARKAN MARKA COI

(CYTOCHROME OXIDASE I)

berserta 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 beesangkutan.

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)

ABSTRAK

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

Penentuan *breed* ayam di Indonesia merupakan hal yang penting guna menetapkan ayam domestik Indonesia serta untuk menelusuri garis keturunannya. Penelitian mengenai penentuan breed ayam di Indonesia perlu dilakukan terutama pada tingkat molekul penyusun materi genetiknya. Salah satu breed ayam Indonesia yang unik adalah ayam bekisar. Ayam bekisar merupakan hasil kawin silang antara ayam hutan hijau dengan ayam domestik Indonesia. Penelitian ini menggunakan marka COI sebagai barcode untuk menentukan filogeni ayam bekisar dan pewarisan karakter indukan. Jenis penelitian ini adalah deskriptif kualitatif dengan menggambarkan hubungan kekerabatan ayam bekisar berdasarkan urutan basa nukleotida daerah COI. Ekstraksi DNA menggunakan kit Promega:wizard genomic purification menghasilkan konsentrasi sebesar 0,563 µg/ml sampai 15,01 µg/ml dan nilai kemurnian sebesar 1,863 hingga 2,142. Amplifikasi PCR dengan pengaturan suhu *pre-denaturation* 96°C selama 3 menit, *denaturation* 94°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 1 menit, *extention* 72°C selama 1 menit, dan *post extention* 72°C selama 5 menit dengan total siklus sebanyak 35 kali. Sekuens dengan hasil analisis sekuens ayam bekisar yang disejajarkan dengan sekuens ayam Indonesia lainnya yang diunduh dari genbank. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan metode neighbor joining dengan 1000x pengulangan dan didukung dengan perhitungan jarak pairwise pada software MEGA 7.0. Hasil konstruksi filogenetik menunjukkan bahwa ayam bekisar memiliki kerabatan yang dekat dengan ayam Indonesia spesies *Gallus gallus* dengan nilai bootrap 100 dan nilai distance pairwise 0,0. Sedangkan nilai jarak genetik ayam bekisar dengan *Gallus varius*, *Gallus sonneratti*, dan *Gallus Lafayettei* sebesar 1,04; 0,98; dan 1,01. Hasil penelitian menunjukkan partial gen COI adalah daerah lestari yang tidak dapat digunakan untuk membedakan perbedaan intra spesies pada ayam Indonesia. Diperlukan penelitian mendukung untuk menganalisis *complete sequence* dari marka COI.

Kata kunci : Analisis Filogenetik, Ayam Bekisar, Marka COI

ABSTRACT
**PHYLOGENETIC ANALYSIS BEKISAR CHICKEN
BASED ON COI (CYTOCHROME OXIDASE I) MARKER**

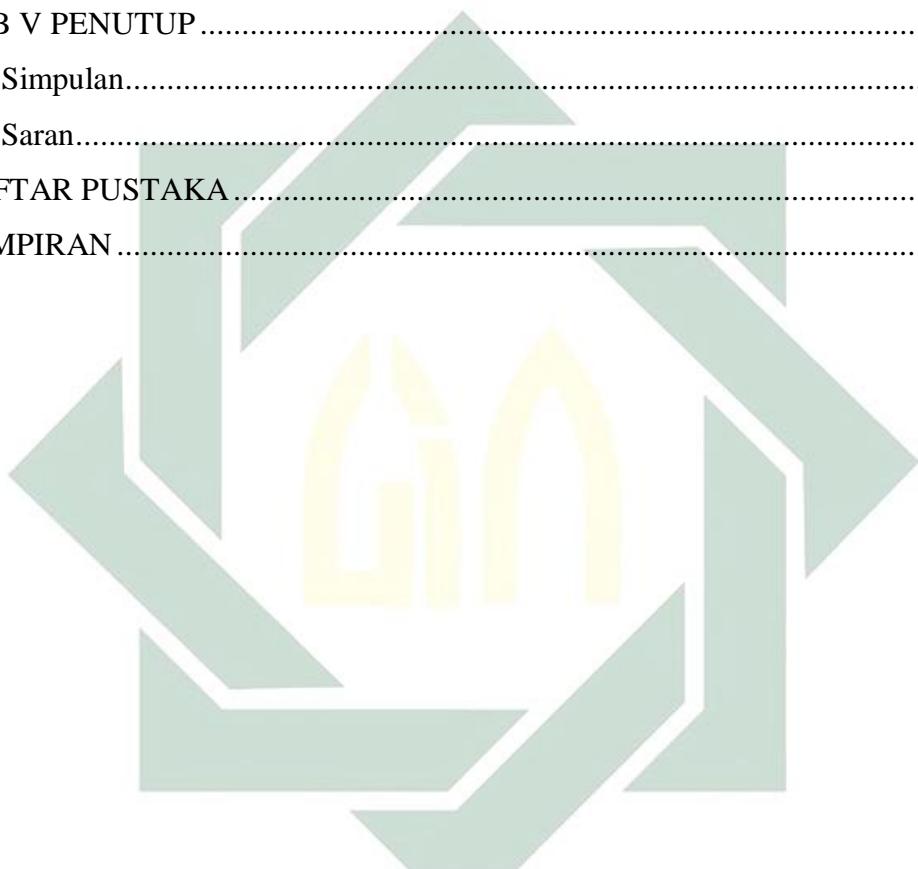
Determination of Indonesian chicken is important things to characterization Indonesian domestic chicken and to record their phylogeny. Advance study is needed to determine chiken breeding in Indonesian especially in their genetic material. One of Indonesian unique chicken is bekisar chicken. Bekisar chicken is breed between green jungle fowl and Indonesian domestic chicken. This study using COI marker as barcode for phylogeny analysis of bekisar chicken that compare with another Indonesian chicken. DNA extraction using Promega:wizard genomic purification kit produced concentration value ranged from 0,563 µg/ml to 15,01 µg/ml and purity value ranging from 1,863 to 2,142. Which continued by PCR amplification with runs *denaturation step* 94°C for 1 minute, *annealing step* 55°C for 1 minute, *extention step* 72°C for 1 minute, *post extention step* 72°C for 5 minutes and total cycle 35 times. Next step is sequencing that alignment the bekisar chicken sequence with other Indonesian chicken sequences that downloaded from genebank. Phylogenetic tree construction was carried out using the neighbor method with 1000x repetitions and supported by pairing distance calculations in MEGA 7.0 software. The phylogenetic construction showed that bekisar chickens had close relation with *Gallus gallus* species with bootstrap value is 100 and pairwise distance value is 0.0. While the genetic value of bekisar chicken with Gallus varius, Gallus sonneratti, and Gallus Lafayettei are 1.04; 0.98; and 1.01. The results showed that some of the COI genes were could not be used to distinguish between species in Indonesian chickens. Advanced study is needed to analyze the complete sequence of COI markers.

Keywords : Phylogenetic Analysis, Bekisar, COI Marker

DAFTAR ISI

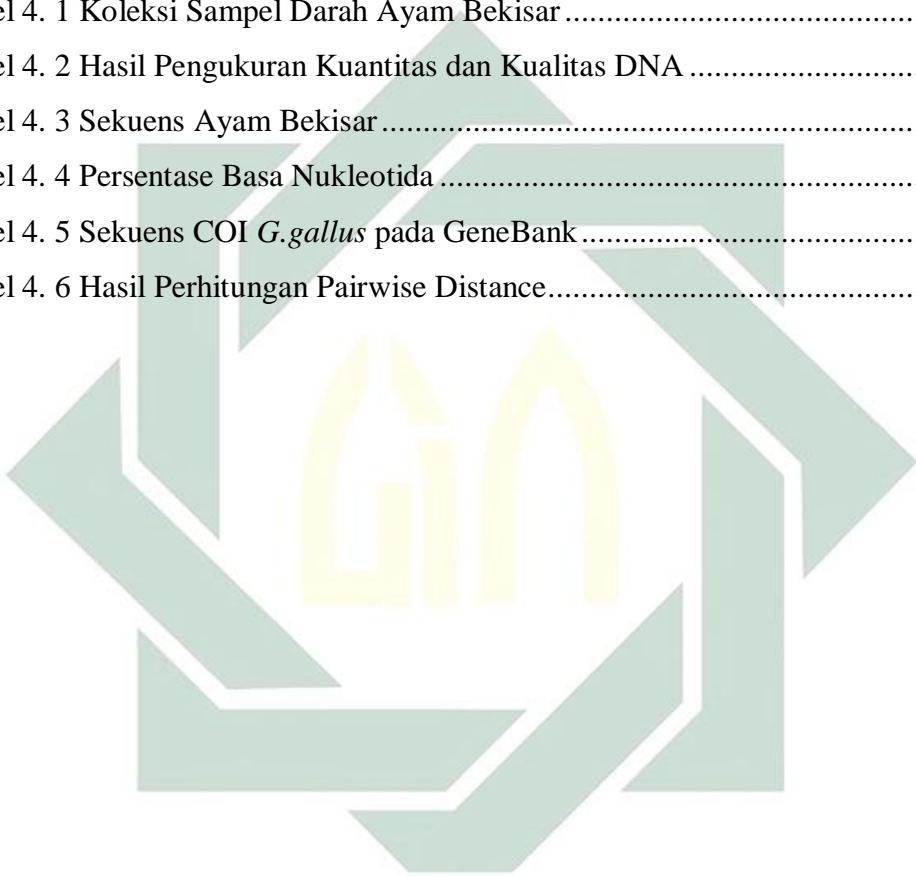
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PENGESAHAN TIM PENGUJI	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Batasan Masalah	5
BAB II KAJIAN PUSTAKA	6
2.1 Domestikasi Ayam Indonesia	6
2.2 Ayam Bekisar	13
2.3 DNA Barcode	21
2.4 Gen Cytochrome Oxydase I (COI)	32
2.5 Filogenetik	34
BAB III METODE PENELITIAN	37
3.1 Rancangan Penelitian	37
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	37
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	38
3.4 Variabel Penelitian	38
3.5 Prosedur Penelitian	39
3.4. Analisis Data	45

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	52
4.1 Pengumpulan Sampel.....	52
4.2 .Ekstraksi DNA Ayam Bekisar.....	54
4.3 Hasil Pengujian Kualitas dan Kuantitas DNA.....	54
4.4 Hasil Amplifikasi PCR.....	58
4.5 Hasil Sekuensing.....	60
4.6 Hasil Analisis Filogenetik	62
BAB V PENUTUP	71
5.1 Simpulan.....	71
5.2 Saran.....	71
DAFTAR PUSTAKA	72
LAMPIRAN	I-1



DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Daftar Ayam Asli Indonesia	11
Tabel 2. 2 Daftar Ayam Lokal Indonesia.....	12
Tabel 3. 1 Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	37
Tabel 3. 2 Urutan Sekuens Primer Forward dan Reverse	38
Tabel 3. 3 Pengaturan Suhu PCR	42
Tabel 4. 1 Koleksi Sampel Darah Ayam Bekisar	53
Tabel 4. 2 Hasil Pengukuran Kuantitas dan Kualitas DNA	55
Tabel 4. 3 Sekuens Ayam Bekisar	61
Tabel 4. 4 Persentase Basa Nukleotida	62
Tabel 4. 5 Sekuens COI <i>G.gallus</i> pada GeneBank	62
Tabel 4. 6 Hasil Perhitungan Pairwise Distance.....	67



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Ayam Bekisar Kangean	13
Gambar 2. 2 Skema Persilangan pada Ayam Bekisar	16
Gambar 2. 3 Skema Persilangan pada Ayam Bekisar dan Ayam Bekuk.....	17
Gambar 2. 4 Ayam Hutan Hijau	18
Gambar 2. 5 Ayam Kampung.....	20
Gambar 2. 6 Sekuensing Metode Maxam Gillbert	28
Gambar 2. 7 Sekuensing Metode Sanger	30
Gambar 2. 8 DNA Mitokondria Ayam Hutan Merah	34
Gambar 3. 1 Contig Sekuens pada Software BioEdit	45
Gambar 3. 2 Contig Sekuens pada Software BioEdit	45
Gambar 3. 3 Contig Sekuens pada Software BioEdit	46
Gambar 3. 4 Contig Sekuens pada Software BioEdit	46
Gambar 3. 5 Contig Sekuens pada Software BioEdit	46
Gambar 3. 6 Blast Sekuens pada laman NCBI.....	47
Gambar 3. 7 Blast Sekuens pada laman NCBI.....	47
Gambar 3. 8 Blast Sekuens pada laman NCBI.....	48
Gambar 3. 9 Pengunduhan Sekuens pada Laman NCBI	48
Gambar 3. 10 Pengunduhan Sekuens pada Laman NCBI.....	49
Gambar 3. 11 Pengunduhan Sekuens pada Laman NCBI.....	49
Gambar 3. 12 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0	50
Gambar 3. 13 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0	50
Gambar 3. 14 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0	50
Gambar 3. 15 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0	51
Gambar 3. 16 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0	51
Gambar 3. 17 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0	51
Gambar 4. 1 Teknik Pengambilan Darah pada Ayam	52
Gambar 4. 2 Sampel Ayam Bekisar.....	53
Gambar 4. 3 Diagram Konsentrasi DNA	56
Gambar 4. 4 Diagram Kemurnian DNA	56
Gambar 4. 5 Hasil Visualisasi Gel Electrophoresis	59
Gambar 4. 6 Pohon Filogenetik Ayam Bekisar.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Sekuens Ayam Bekisar.....	I-1
Lampiran 2 Sekuens Ayam Bekisar.....	II-1

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan kekayaan ragam genetik fauna yang tinggi termasuk di dalamnya adalah keanekaragaman genetik ayam. Ayam Indonesia memiliki persebaran yang merata di seluruh wilayah nusantara. Keragaman jenis dari ayam khususnya ayam bekisar ini dijelaskan dalam Al-Quran surat Fatir ayat 28.

وَمِنَ النَّاسِ وَالدُّوَابِ وَالْأَنْعَامُ مُخْرِفٌ الْوَانِهُ كَذَلِكَ ۝ إِنَّمَا يَخْشَىَ اللَّهَ مِنْ عِبَادِهِ
الْعُلَمَاءُ ۝ إِنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ غَفُورٌ

Artinya : Dan demikian (pula) di antara manusia binatang-binatang melata dan binatang-binatang ternak ada yang bermacam-macam warnanya (dan jenisnya). Sesungguhnya yang takut kepada Allah di antara hamba-hambaNya, hanyalah ulama sesungguhnya Allah maha Perkasa lagi Maha Pengampun (QS. Fatir :28).

Berdasarkan ayat tersebut dijelaskan bahwa keanekaragaman hewan ternak yang termasuk di dalamnya adalah kehendak Allah. Keanekaragaman ini tidak hanya disebabkan oleh faktor lingkungan dan makanannya saja juga dari faktor genetiknya pula yang tidak satu manusia pun yang dapat mengaturnya kecuali atas kehendak Allah SWT. Dijelaskan dalam tafsir Al Misbah mengenai surat Al-Fatir:28 bahwa terdapat berbagai macam bentuk, ukuran, maupun warna pada manusia, dan binatang. Beragamnya perbedaan baik pada bentuk, ukuran, maupun warna ini bukan disebabkan oleh habitat maupun makanannya melainkan oleh perbedaan pada faktor genetik. Oleh

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 pengelompokan *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 sekvens 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.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana hasil analisis filogenetik ayam bekisar berdasarkan marka COI (Cytochrome Oxidase I)?

1.3 Tujuan Penelitian

Menganalisis filogenetik ayam bekisar berdasarkan marka COI (Cytochrome Oxidase I)

1.4 Manfaat Penelitian

- a. Menambah ilmu pengetahuan mengenai ayam bekisar sebagai fauna identitas provinsi Jawa Timur.
 - b. Menambah pengetahuan mengenai basis data DNA ayam bekisar.
 - c. Menjaga kelestarian materi genetik ayam bekisar fauna identitas Provinsi Jawa Timur.

1.5 Batasan Masalah

- a. Amplifikasi PCR menggunakan gen COI.
 - b. Ayam Bekisar menggunakan jenis ayam bekisar kangean.
 - c. Amplifikasi DNA menggunakan primer Gao, *et al*, 2011.

BAB II

2.1 Domestikasi Ayam Indonesia

Ayam merupakan anggota dari Kingdom Animalia, Phylum Chordata, Class Aves, Ordo Galliformes, Family Phasianidae, Genus *Gallus* yang memiliki tubuh ditutupi oleh bulu, memiliki paruh, memiliki jengger di bagian atas kepala serta bagian gelambir atau *wattles* di bawah dagunya. Penamaan *Gallus* dalam bahasa latin memiliki arti *comb* yang berarti jengger yang berbentuk seperti sisir. Pada Genus *Gallus* terdapat 4 spesies diantaranya adalah *Gallus gallus* (ayam hutan merah), *Gallus varius* (ayam hutan hijau), *Gallus sonneratii* (ayam hutan kelabu), dan *Gallus lafayettii* (ayam hutan srilangka). Menurut Al-Nasser *et al.* (2007) Klasifikasi ayam secara lengkap adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Subphylum: Vertebrata

Class : Aves

Ordo : Galliformes

Family : Phasianidae

Genus : *Gallus*

Spesies : *Gallus gallus*

Gallus varius

Gallus sonneratii

Gallus lafeyetii

Gallus gallus memiliki daerah persebaran 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 lafeyetii* 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 diternak 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

dijadikan sebagai salah satu nama surat dalam Al-Quran yaitu surat Al-An'am. Hewan ternak dalam Al-Quran disebutkan sebagai hewan dengan berbagai manfaat. Allah berfirman pada surat Al-Muminun ayat 21-22 sebagai berikut :

وَعَلَيْهَا عَبْرَ دَبْطُونَهَا وَلَكُمْ فِيهَا مَنَافِعٌ كَثِيرَةٌ وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ طَسْقِيْكُمْ لَكُمْ فِي الْأَنْعَامِ مِمَّا فِي
وَعَلَى الْفَلَكِ تَحْمَلُونَ

Artinya : Dan sesungguhnya pada hewan-hewan ternak terdapat suatu pelajaran bagimu. Kami memberi minum kamu dari (air susu) yang ada dalam perutnya, dan padanya juga terdapat banyak manfaat untukmu, dan sebagian darinya kamu makan, di atasnya (hewan-hewan ternak) dan di atas kapal-kapal kamu diangkut.

Ayat tersebutkan menjelaskan bahwa Al-An'am atau hewan ternak memiliki ibrah bagi manusia. Ibrah sendiri ditafsirkan sebagai se suatu pelajaran yang perlu digali dan dieksplorasi lebih lanjut. Manusia sebagai makhluk Allah yang diciptakan sempurna dengan akal pikiran diminta untuk mempelajarai, mengkaji, mengeksplorasi lebih lanjut mengenai hewan ternak, manusia yang menkajian lebih lanjut mengenai Al-An'am ini akan mendapat karunia-Nya. Allah menciptakan segala sesuatunya memiliki maksud dan tujuan semata mata untuk kemaslahatan manusia. Begitu pula hewan ternak diciptakan dengan berbagai manfaat yang digunakan untuk keberlangsungan hidup manusia. Firman Allah surat Al-An'am ayat 142

وَمِنَ الْأَعْمَامِ حَمْوَلَةٌ وَفَرْشًا وَتِكْلُوا مِمَّا رَزَقَكُمُ اللَّهُ وَلَا تَنْتَعِوا خُطْمَيْنٌ إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ الشَّيْطَنُ

Artinya : Dan di antara hewan-hewan ternak itu ada yang dijadikan pengangkut beban dan ada (pula) yang untuk disembelih. Makanlah rezeki yang diberikan Allah kepadamu, dan janganlah kamu mengikuti langkah-

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 dipercaya 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	Seumatera 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

No.	Nama Ayam	Daerah Asal
13	Kukuak balenggek	Solok
14	Lamba	Garut
15	Melayu	Sumatera Utara
16	Nagrak	Sukabumi
17	Nusa penida	Nusa Penida
18	Olagan	Bali
19	Pelung	Cianjur
20	Sedayu	Magelang
21	Sentul	Ciamis
22	Siem	Jawa
23	Sumatera	Sumatera bagian tengah
24	Tolaki	Sulawesi selatan
25	Tukong	Kalimantan Barat
26	Walik	Tersebar
27	Wareng	Jawa

(Sumber : Sartika dan Iskandar, 2007)

Tabel 2. 2 Daftar Ayam Lokal Indonesia

No.	Nama Ayam	Daerah Asal
1	Arab golden	Arab/ Belgia
2	Arab silver	Arab/ Belgia
3	Bangkok	Thailand
4	Delona	-
5	Kedu hitam	Temanggung
6	Kedu putih	Temanggung
7	Marawang	Sumatera Selatan
8	Nunukan	Kalimantan Timur
9	Jepun	Jepang
10	Kate	Cina
11	Kapas	Cina
12	Mutiara	Cina
13	Poland	Polandia
14	Serama	Malaysia

(Sumber : Sartika dan Iskandar, 2007)

Penentuan nama *breed* ayam di Indonesia masih dilakukan berdasarkan karakteristik fenotipnya saja. Sehingga sering ditemukan kerancuan dalam penamaan *breed* ayam. Selain karakter fenotip, penentuan *breed* ayam juga perlu dilakukan berdasarkan karakter genotipnya. Penetapan *breed* ayam ini bermaanfaat untuk pelestarian karakter asli dari ayam tersebut, serta menjaga sumberdaya genetik (SDG) yang berguna untuk pemuliaan ternak ayam di masa mendatang (Ulfah, 2016).

2.2 Ayam Bekisar

Ayam bekisar merupakan ayam buras (bukan ras) dari kelompok ayam asli Indonesia, ayam bekisar dihasilkan dari hibrid parental pejantan ayam hutan hijau (*Gallus varius*) dengan ayam lokal (*Gallus domesticus*) (Handirawan, 2004). Ayam bekisar pada Gambar 2.1 termasuk ayam fancy, terkenal dengan keindahan kokoknya yang melengking. Pada lokok bekisar memiliki irama panjang dan lurus, yang terdiri dari 2 bagian, yaitu bagian depan dengan nada rendah, besar, tebal, dan bersih. Sedangkan pada bagian kokok belakang memiliki nada tinggi, tebal, panjang, lurus, dan bersih (Rusfidra, 2006). Ayam bekisar diketahui berasal dari pulau kecil Kabupaten Sumenep yang disebut dengan Pulau Kangean. Pulau Kangean terdiri dari 3 kecamatan, yaitu Kecamatan Kangayan, Kecamatan Arjasa, dan Kecamatan Sapeken (Bappeda, 2009).



Gambar 2. 1 Ayam Bekisar Kangean

(Sumber : Kangwira, 2014)

Menurut cerita masyarakat setempat, pada Pulau Kangean terdapat Pangeran yang terkenal, yaitu pangeran Parajir. Pangeran Parajir adalah pangeran yang pertama kali menyilangkan ayam hutan hijau dengan ayam kampung. Penamaan bekisar dalam Bahasa Madura “Begika Pembesar” yang memiliki arti “Bagiannya untuk Para Pembesar”. Ayam bekisar atau ayam

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 memiliki ayam bekisar (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 mengawinkilangkan 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 hijau jantan (*Gallus varius*) dengan

ayam kampung betina (*Gallus gallus domesticus*) dengan warna bulu tunggal, seperti coklat, merah, putih, hitam.

b. Ayam Bekisar Multiwarna Solo

Ayam bekisar solo merupakan ayam bekisar hasil persilangan dari ayam hutan hijau jantan (*Gallus varius*) dengan ayam kampung betina (*Gallus gallus domesticus*) yang memiliki warna bulu yang banyak/campuran.

c. Ayam Bekisar Putih Yogyakarta

Ayam bekisar putih yogyakarta merupakan persilangan antara pejantan ayam hutan hijau (*Gallus varius*) dengan betina ayam kampung (*Gallus gallus domesticus*) yang memiliki warna bulu putih pada seluruh tubuhnya.

d. Ayam Bekisar Hitam Parakan

Ayam bekisar hitam merupakan persilangan dari pejantan ayam hutan hijau (*Gallus varius*) dengan betina ayam kedu hitam. Ayam bekisar hitam parakan adalah ayam bekisar yang sangat berbeda dengan bekisar lainnya. Dikarenaka ayam bekisar hitam parakan ini memiliki bentuk tubuh yang tinggi, tegap serta warna bulu hitam pada seluruh tubuhnya mewarisi dari sifat indukan betinanya.

e. Ayam Bekisar Merah Solok

Ayam bekisar merah solok merupakan hasil persilangan antara ayam hutan hijau jantan (*Gallus varius*) dengan betina ayam yungkiloc dari Solok.



Gambar 2. 2 Skema Persilangan pada Ayam Bekisar

(Sumber : Dokumen Pribadi, 2020)

Ayam bekisar ini memiliki suara merdu serta bulu yang indah, akan tetapi populasi ayam bekisar ini masih sedikit karena dalam proses persilangan parental ayam hutan dengan ayam lokal tidaklah mudah, adapun beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan dalam persilangannya yaitu perbedaan antara perilaku ayam hutan dengan ayam lokal, dan perbedaan materi genetik yang menyebabkan ketidak berhasilan sperma pejantan ayam hutan untuk membuahi ovum betina ayam lokal sehingga terjadi kegagalan dalam fertilisasi (Handriawan, 2004). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Ulfah (2016) ayam bekisar merupakan keturunan F1 atau Filial 1, perubahan materi genetik hasil dari persilangan inter spesies ini menyebabkan kegagalan dalam bereproduksi antar bekisar, sehingga banyak peternak bekisar yang mengawansilangkan F1 bekisar jantan dengan ayam kampung betina yang memiliki jenis seperti indukan betinanya atau sering disebut dengan peristiwa backcross. Hasil dari backcross ini disebut dengan ayam bekuk seperti yang

disajikan pada Gambar 2.3. Ayam bekikuk memiliki kesamaan kokok dengan ayam bekisar, namun pada kokok ayam bekikuk pada akhirannya diakhiri dengan “kuk”.



Gambar 2. 3 Skema Persilangan pada Ayam Bekisar dan Ayam Bekikuk
(Sumber : Dokumen Pribadi, 2020)

2.2.1 Ayam Hutan Hijau

Ayam hutan hijau merupakan salah satu spesies ayam dari Genus *Gallus*. Ayam hutan hijau memiliki nama lain ayam alas, ajem alas, canghegar, dan tarattah (Dinas Peternakan Provinsi Jawa Tengah, 2009). Ayam hutan hijau memiliki bulu dan suara kokok yang indah. Persebaran ayam hutan hijau ini meliputi Pulau Jawa, Madura, Bali, Nusa Penida, dan pulau kecil di sekitarnya (Prana *et al.*, 1996). Menurut Al-Nasser *et al.* (2007) klasifikasi ayam hutan hijau adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Subphylum: Vertebrata

Class : Aves

Ordo : Galliformes

Family : Phasianidae

Genus : *Gallus*

Spesies : *Gallus varius*

Ayam hutan hijau memiliki ukuran tubuh yang cukup besar dengan panjang total tubuhnya mencapai 60cm pada ayam jantan, sedangkan pada ayam betina mencapai 42 cm. ayam hutan hijau jantan memiliki tubuh yang unik, jenggernya tidak begerigi dengan warna merah dan warna biru pada bagian tengahnya. Tubuhnya ditutupi oleh bulu bagian leher, tengkuk, dan bagian abdomennya berwarna hijau berkilauan dengan garis tepi berwarna hitam. Sedangkan bulu pada bagian femurnya berwarna kuning keemasan. Tubuh bagian bawahnya ditutupi oleh bulu berwarna hitam, serta ekor dengan bentuk bulu panjang dan meruncing berwarna hitam dengan kilau kehijauan seperti pada Gambar 2.4. Sedangkan ayam hutan hijau betina tubuhnya lebih kecil dibanding dengan ayam jantan, warna bulu pada ayam betina tak seindah pada bulu pejantan, warna bulu ayam betina didominasi dengan bulu berwarna kuning kecoklatan dengan divariasi garis-garis dan bintik hitam (Sudiro, 1993).



Gambar 2. 4 Ayam Hutan Hijau

(Sumber : Tim Avery, 2018)

Habitat ayam hutan hijau di hutan, padang rumput, bukit yang dekat dengan pantai. Ayam hutan termasuk dalam kelompok omnivore, ayam ini memakan rumput, biji-bijian, dedaunan, serangga, serta binatang kecil lainnya. Ayam hutan hijau bereproduksi pada bulan Juni-November. Sarang yang dibentuk sangat sederhana berupa sarang yang dilindungi semak dengan alas tanah yang berlapis rerumputan. Pejantan ayam hutan hijau dapat berokok pada pagi dan sore hari dengan suaranya yang khas (Woodgush, 1971).

2.2.2 Ayam Kampung

Ayam kampung merupakan ayam yang sering dipelihara oleh masyarakat Indonesia, biasanya ayam ini termasuk dalam ayam dwiguna, yang mana masyarakat memeliharanya untuk diambil telur dan dagingnya. Ayam kampung merupakan ayam hasil domestikasi dari ayam hutan merah atau *Gallus gallus domesticus*. Menurut Sarwono (2003) klasifikasi ayam kampung adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Subphylum: Vertebrata

Class : Aves

Ordo : Galliformes

Family : Phasianidae

Genus : *Gallus*

Spesies : *Gallus gallus domesticus*

Ayam kampung memiliki ukuran tubuh yang kecil dengan laju pertumbuhan yang lambat. Namun ayam kampung memiliki kemampuan mengeram yang sangat baik (Mansjoer, 1985). Menurut Lasley (1978) ayam kampung memiliki kromosom dengan jumlah 78 buah. Tersusun atas 38 pasang autosom dan sepasang gonosom. tidak sama dengan kromosom mamalia, kromosom ayam jantan berupa 2 kromosom yang sama yaitu ZZ sedangkan ayam betina memiliki 2 kromosom berbeda yaitu ZW. Ayam kampung memiliki keragaman genetik 50% gen asli dengan bulu liar (e^+), kuning keemasan (ZS), hitam shank (Zid), serta bentuk jengger pea (P).



Gambar 2. 5 Ayam Kampung

(Sumber : Mercier, 2019)

Warna bulu pada ayam kampung sangatlah beragam, beragamnya warna bulu pada ayam kampung ini disebabkan karena adanya pigmen warna. Bulu kuning atau coklat pada ayam dikarenakan adanya pigmen karoten, sedangkan pigmen warna hitam dan merah karena adanya pigmen warna melanin. Serta pada bulu putih pada ayam dikarenakan tidak terdapat adanya pigmen pewarna bulu ayam sehingga tidak terdapat ekspresi warna yang menyebabkan bulu ayam berwarna menjadi putih (Stevens, 1991). Ayam kampung memiliki genotip e+e+

dan e+e untuk tipe liar, tipe bulu warna hitam EE, Ee, Ee⁺, tipe bulu putih II, Ii, tipe bulu kolumbian atau abu-abu ee. Sifat kualitatif lainnya ayaitu dapat berupa bentuk pialnya. Pial kapri PPrr, Prr, pial walnut PPRR, PPRr, PpRR, PpRr, pial ros ppRR, ppRr, serta pial tunggal ppr (Sulandari, 2013).

2.3 DNA Barcode

DNA barcode merupakan teknik identifikasi organisme dari semua bentuk kehidupan mulai dari telur, larva, pupa, hingga organisme dewasa utuh atau potongan jaringan saja yang dilakukan secara molekular menggunakan gen tertentu yang dapat membedakannya pada tingkat spesies (Sutrisno *et al.*, 2013). DNA Barcode pertama kali dipublikasikan oleh Dr. Paul Herbert tahun 2003 pada Workshop Taxonomy and DNA. DNA barcode ini digunakan oleh taksonomiwan dan ahli bidang lainnya seperti kedokteran forensik, industri makanan, karantina, dan sebagainya. Adapun tahapan kerja dari teknik DNA Barcode ini adalah pengambilan sampel, ekstraksi DNA, pemilihan primer, amplifikasi PCR, visualisasi hasil PCR dengan electrophoresis, sekuen fragmen DNA (Sulandari *et al.*, 2013).

Pada tahun 2005 dibentuk konferensi Internation yang membahas akan DNA barcode fauna di seluruh dunia yang disebut dengan “*International Barcode of Life Conference*” (CBOL). Konferensi ini dibentuk untuk mengumpulkan seluruh DNA barcode kehidupan dengan perwakilan dari berbagai negara di dunia. Penelitian pertama CBOL mengenai “*All Birds DNA Barcoding Initiative of Inagural Workshop*” (Sutrisno *et al.*, 2013). Pada konferensi CBOL disepakati gen COI sebagai gen yang digunakan

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 sekruensi.

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

memerlukan beberapa perlakuan untuk menjaga materi genetiknya yaitu menjaga molekul DNA, RNA, maupun enzim agar tidak rusak dan terdenaturasi baik karena lingkungan, suhu, kelembaban, atau mikroorganisme lainnya dengan penambahan bahan kimia untuk mengawetkannya. Sampel dari organisme hidup dapat berupa darah, jarungank, rambut, tulang, gigi.

2.3.3 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dalam DNA barcode bertujuan untuk mendapatkan genom atau DNA dari sampel sehingga dapat mengidentifikasi dari materi genetiknya. Terdapat 3 tahapan dalam ekstraksi DNA yaitu penhilangan debrish berupa pengotor seperti protein dan RNA, pengendapan DNA, pemanenan DNA (Sulandari *et al.*, 2013). Terdapat 3 macam teknik ekstraksi DNA, diantaranya adalah ekstraksi phenol-chloroform, ekstraksi chelex, dan FTA *paper*.

a. Ekstraksi Phenol-Chloroform

Ekstraksi menggunakan bahan organik dengan prinsip mengikat, menarik, dan mengendapkan protein. Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam ekstraksi phenol chloroform yaitu SDS atau dodecylsulfate, proteinase K, larutan fenol/kloroform, dan isopropanol. Hasil dari ekstraksi ini endapan DNA berupa benang putih.

b. Ekstraksi Chelex

Prinsip ekstraksi chelex adalah dengan pertukaran ion resin sebagai suspensi sel, sampel dapat berupa darah, bercak darah, dan

semen. Ion iminodiacetate memindahkan ion magnesium, yang menyebabkan DNA dapat menghancurkan enzim, protein.

c. FTA Paper

Ekstraksi dengan penyerapan selulosa, dilengkapi dengan 4 bahan kimia untuk melindung DNA dari nuklease, serta menjaga kertas agar steril dari bakteri sehingga material DNA pada kertas dapat tersimpan pada kertas dalam kurun waktu tertentu (Sulandari *et al.*, 2013).

2.3.4 Pemilihan Primer

Pemilihan primer untuk amplifikasi DNA merupakan tahapan yang penting, karena salah satu keberhasilan dalam amplifikasi DNA menggunakan metode PCR adalah ketepatan dalam memilih primer. Primer merupakan potongan untai DNA oligo atau pendek dan tunggal. Panjang primer yang biasa digunakan adalah sebesar 10-40 basa. Primer bertugas sebagai pengenal dan penanda fragmen DNA yang teramplifikasi. Beberapa primer dapat digunakan untuk mengidentifikasi beberapa kelompok taksa yang disebut dengan primer universal, sedangkan primer yang didesain secara spesifik untuk mengamplifikasi dan mengidentifikasi dari kelompok tertentu disebut dengan primer spesifik. Pada DNA barcode digunakan primer dari gen COI dengan panjang basa 650. Menurut Chaves *et al.* (2008) tingkat kesuksesan penggunaan primer COI dalam mengidentifikasi suatu organisme mencapai 96,4%.

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 yg 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 komplemen, 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 ada suhu tinggi bekisar 92C-95°C dan waktu 30 detik-1 menit. Penggunaan suhu dan waktu dalam

amplifikasi PCR berbeda setiap organismenya, menurut Sulandari *et al.* (2013) semakin banyak basa Guanin dan Cytosin maka semakin membutuhkan suhu yang tinggi dalam amplifikasi.

b. Annealing

Tahap *annealing* merupakan tahap penempelan primer, digunakan suhu 36°C-65°C untuk menempelkan primer, karena pada suhub tersebut merupakan suhu optimum dari kerja enzim *taq* polimerase untuk menempelkan dan melanjutkan pada tahap perpanjangan DNA.

c. Extension

Tahap pemanjangan untai DNA dilakukan pada suhu 72°C untuk mengaktifkan kerja enzim polimerase dalam menyusun untai DNA. Diperkirakan kecepatan dalam penyusunan nuklotida adalah 35-100 basa/detik.

2.3.6 Electrophoresis

Electrophoresis merupakan teknik yang digunakan untuk memvisualisasi hasil amplifikasi DNA dengan prinsip mengukur laju pergerakan molekul DNA pada aliran listrik. Komponen yang digunakan dalam tahapan ini adalah gel agarose, pewarna ethidium bromide. Laju perpindahan DNA ini dipengaruhi oleh panjang molekul (Sulandari *et al.*, 2013). Molekul DNA yang melewati gel dengan aliran listrik akan terpisah berdasarkan ukurannya. Semakin kecil molekul DNA maka semakin cepat lajunya melewati gel, sedangkan semakin panjang molekul DNA maka semakin lambat laju migrasinya.

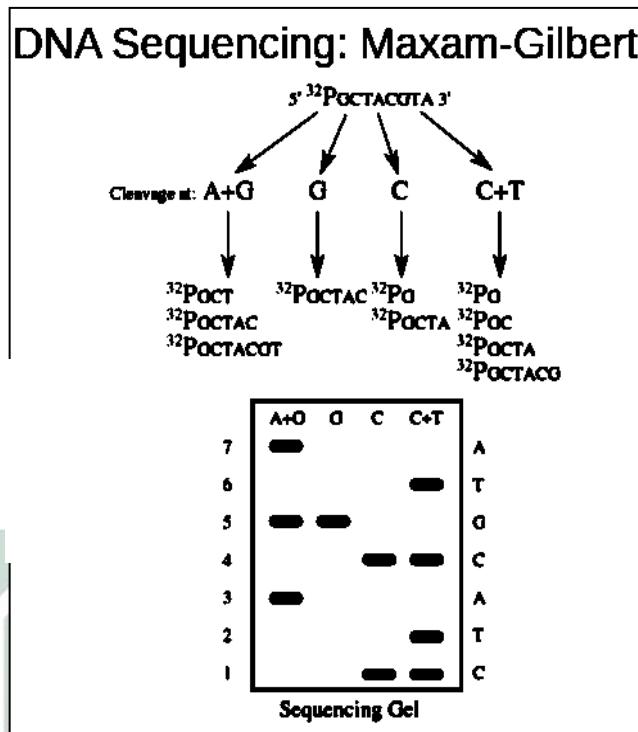
Tegangan listrik dan konsentrasi gel juga mempengaruhi laju migrasi DNA. Semakin besar konsentrasinya maka semakin kecil pori yang terbentuk pada gel, semakin tinggi aliran listrik yang diberikan maka semakin cepat laju migrasi DNA yang membentuk hasil akhir berupa pita dalam gel. Kemudian dilakukan visualisasi gel electroforesis dengan penyinaran sinar UV untuk melihat pita DNA hasil amplifikasi.

2.3.7 Sekuensing

Sekuensing merupakan teknik untuk mengetahui urutans basa nukleotida dari sampel. Pemisahan nuklotida dari DNA ini dapat dilakukan menggunakan gel polyacrilamid electroforesis. Terdapat 2 macam metode sekuensing ini , yaitu:

a. Metode Maxam-Gilbert

Metode Maxam-Gilbert merupakan salah satu metode sekuensing yang diperkenalkan oleh Maxam dan Gilbert tahun 1977. Metode ini juga disebut dengan metode sekuensing kimiawi karena dalam pengaplikasianya menggunakan komponen bahan kimia. Molekul DNA dipotong menggunakan pepiridin, Pada metode ini digunakan label berupa pospat radioaktif pada bagian ujung 3'. Basa nukleotida dimodifikasi dengan beberapa komponen yaitu DMS (dimetil sulfat) untuk basa G, asam format untuk A+G, hidrazin untuk menghidrolisis C dan T, serta garam yang tinggi untuk C. masing-masing diberikan pada 4 tube yang berbeda (Sulandari *et al.*, 2013).



Gambar 2. 6 Sekuensing Metode Maxam Gillbert

(Sumber : <http://web.iitd.ac.in>)

Gambar 2.6 menunjukkan pola migrasi molekul DNA yang ditunjukkan berdasarkan hasil visualisasi gel polyacrilamid electrophoresis. Visualisasi dilakukan sedemikian rupa dengan penempatan urutan seperti pada Gambar 2.6 untuk pembacaannya dengan meperhatikan pada lajur pertama A+G, lajur kedua G, lajur ketiga C, dan lajur keempat C+T. Apabila didapat pita pada lajur pertama tetapi tidak terdapat pula pada lajur kedua, maka pita tersebut menunjukkan basa A, sedangkan bila didapat pita pada jalur pertama dan kedua maka basa tersebut adalah basa A. Begitu pula pada lajur ketiga dan keempat, jika didapati pita pada jalur ketiga dan keempat maka basa tersebut adalah basa C, sedangkan basa T dapat diketahui dari adanya pita pada jalur keempat saja. Dikarenakan pada metode

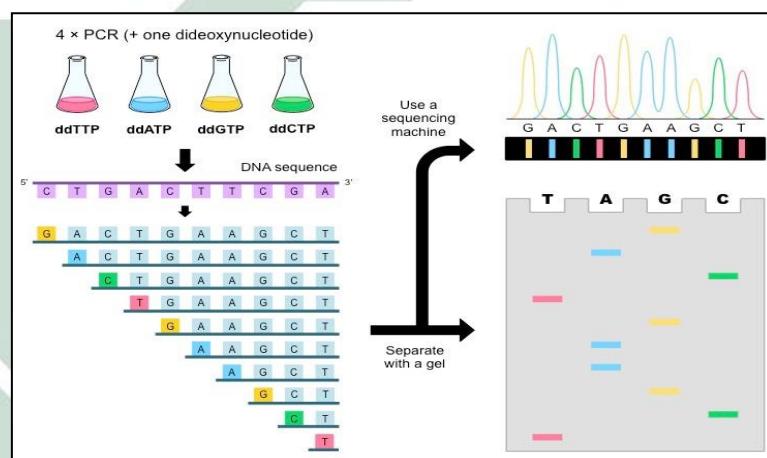
Maxam Gilbert ini menggunakan bahan radioaktif yang bersifat toxic bagi tubuh ini, maka penggunaannya sangat jarang digunakan.

b. Metode Sanger

Metode Sanger merupakan metode sekvensing yang dikenalkan oleh Sanger, Nicklen, Coulson tahun 1977. Metode ini disebut juga dengan metode sekvensing ezymatis 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 sekvensing ini berbeda dengan PCR. Pada metode PCR DNA template diamplifikasi menggunakan sepasang primer, bahan dNTP. Sedangkan pada metode sekvensing 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 sekvensing 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

hidrosil pada atom C nomor 2 gula pentosa sedangkan ddNTP kehilangan gugus hidroksi pada atom C nomor 3 yang mengakibatkan ketidak mampuan gula berikatan dengan fosfodiester (Sulandari *et al.*, 2013). Molekul ddNTP ini membawa basa nukleotida untuk diikatkan dengan ujung molekul DNA. Untuk mengetahui ukuran fragmen hasil sekvensing maka dilakukan electrophoresis menggunakan gel poliacrilamid.



Gambar 2. 7 Sekuensing Metode Sanger

(Sumber : Karki, 2017)

Visualisasi gel poliacrilamid menghasilkan kromatogram yang menunjukkan sekuen yang komplementer dengan DNA template seperti pada Gambar 2.7. Semakin panjang sekuen maka semakin lambat pergerakan migrasinya dari kutub negatif menuju kutub positif, sebaliknya semakin pendek sekuen maka semakin cepat lajurnya migrasinya sehingga band yang terbentuk mendekati kutub positif. Band pada sumuran Timin menunjukkan adanya basa Timin pada ujung 5', begitu pula berlaku pada sumuran A, G, dan C. Pembacaan kromatogram berdasarkan band yang terbentuk pada gel poliacrilamid. Peak yang terbentuk pada kromatogram menunjukkan

nilai keperayaannya. Semakin tinggi peak maka semakin tinggi nilai kepercayan terhadap jenis basa nukleotidannya. Peak dengan bentuk yang tumpuk 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 pemberian sekuen 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 sekuen 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 sekuen yang lengkap berdasarkan fragmen COI dan file penelusuran yang lengkap. Penyimpanan koleksi spesimen disimpan pada intitusi 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 sekruensing berupa sekruens DNA yang dapat digunakan sebagai pembeda pada setiap organisme. Data sekruens ini yang selanjutnya dilakukan analisis dengan menyejajarkan sekruens atau disebut dengan *Sequence alignment*. Hasil sekruensing 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 orgaisme di seluruh dunia yang dapat diakses secara gratis. Adapun *genebank* dikelola oleh *National Center for Biotechnological Information* (NCBI) dan *Barcode 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)

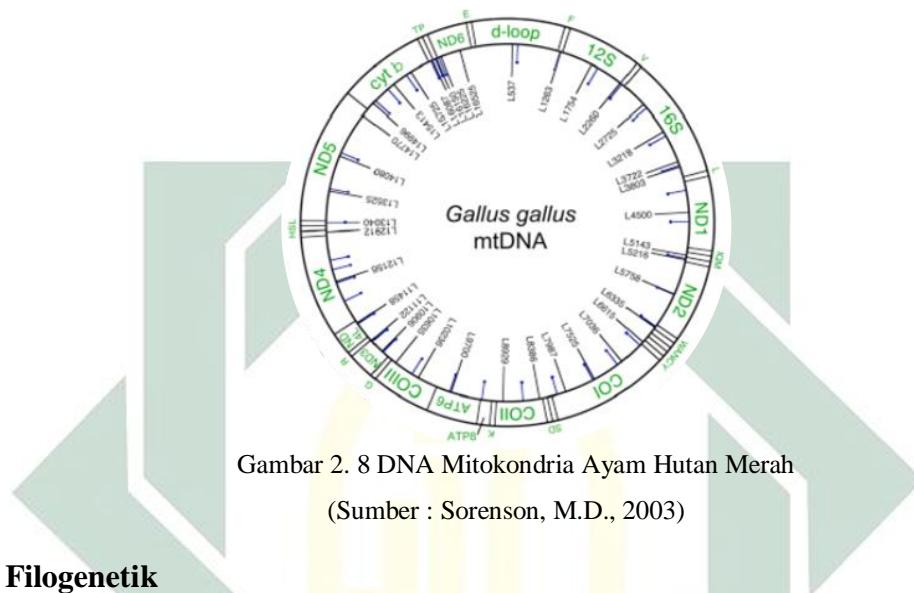
Gen Cytochrome Oxydase I atau yang disingkat dengan COI merupakan salah satu gen yang terdapat dalam mtDNA. Mitokondria merupakan salah satu organel sel yang mengandung materi genetik berupa DNA. mtDNA memiliki bentuk sirkuler, dengan 18.000 pasang basa. DNA mitokondria terdiri dari heavy strand dan 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 sekvens yang tidak terlalu panjang karena untuk mempermudah dalam identifikasi pada sampel berupa potongan jaringan maupun jaringan yang telah rusak. Gen COI

memiliki sifat yang memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam teknik DNA Barcode. Gen COI memiliki panjang yang relative pendek dengan ukuran pajang 648bp, kemudian gen COI memiliki sifat yang stabil, varibialitas rendah bekisar 1-2% serta memiliki jumlah salinan yang banyak sehingga memperbesar peluang untuk teramplifikasi.



2.5 Filogenetik

Filogenetik merupakan kajian mengenai klasifikasi terkait tingkat taksonomi pada organisme 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). Menurut Hills *et al* (1996) dalam Hidayat dan Pancoro (2008) penggunaan materi genetik atau DNA sebagai bahan analisis filogenetik dinilai lebih akurat karena DNA merupakan unit penyimpan informasi, menunjukkan hubungan evolusi dari suatu kelompok, dapat mendeskripsikan evolusi secara komparatif, serta menghasilkan informasi beragam mengenai bukti hubungan kekerabatan.

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 sekuen dengan metode matriks jarak, dan neighbor terdekat. PAUP menganalisis filogenetik menggunakan parsimony dan beberapa metod lain seperti matriks jarak, dan maximum likelihood. Bioedit software yang digunakan sebagai editor pensejajaran sekuen. Software ini memudahkan dalam penentuan titik potong untuk enzim retraksi serta menganalisis suatu sekuen (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 nukleoida yang dianggap sebanding. Metode Bayesian dengan memperhitungkan distribusi priornya. Metode Parsimony adalah metode yang sering digunakan dalam rekonstruksi filogenetik yang perubahan mutasina 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 skors kesamaan dalam alignment 2 sekuens. Skors 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 kuatdrat 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).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan deskriptif kualitatif. Penelitian deskriptif kualitatif ini bertujuan untuk mengetahui urutan basa nukleotida dari ayam bekisar pada daerah COI melalui hasil pembacaan sekuensing yang selanjutnya dijadikan sebagai bahan pembuatan pohon filogenetik. Konstruksi pohon filogenetik dibentuk menggunakan metode Neighbor Joining dengan perhitungan distance pairwise 1000x bootstrap.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama dua belas bulan, yaitu pada Juli 2019 – Juli 2020. Waktu penelitian dilaksanakan sesuai dengan jadwal pelaksanaan penelitian seperti pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Jadwal Pelaksanaan Penelitian

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mikrotube 1,5ml, PCR mikrotube (0,2ml), micropipette, white tip, yellow tip, blue tip, spidol marker, vortex mixer, centrifuge, freezer, mikrotube rack, gloves, masker, disposable syringe, Spektrofotometer Biodrop, thermal cycler Thermal Scientific, tube PCR, electrophoresis thermocscientific., water bath, hot plate, gel documentation, dan PC.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini sampel darah dari 5 ayam bekisar yang berasal dari 5 lokasi berbeda yaitu Surabaya1, Surabaya2 Madura, Gresik, dan Lamongan, Label, larutan EDTA, tabung koleksi darah, seperangkat Wizard® Genomic DNA Purification Kit, larutan ddH₂O, tisu, seperangkat Go Taq Green Master Mix PCR Kit, bubuk agarose, larutan buffer TAE, pewarna gel diamond pasangan primer forward dan reverse AP003323 dengan urutan sekuens seperti yang disajikan pada Tabel 3.2.

Tabel 3. 2 Urutan Sekuens Primer Forward dan Reverse

Tabel 3. 2 Urutan Sekuen Primer Forward dan Reverse						
Gen	Basa Nukleotida	Tm °C	Total Basa	Berat Molekul	Referensi	
COI1F	GCA CAG GAT GGA CAG TTT AC	55.5	20	6165.88	Gao,	<i>et al,</i>
COI1R	ATA GCA TAG GGG GGT CTC AT	55.9	20	6169.89	2011	

3.4 Variabel Penelitian

- a. Variabel Kontrol : Primer COI, Kit isolasi DNA
 - b. Variabel Respon : Hasil Sekuensing, Pohon Filogenetik
 - c. Variabel Manipulasi: Sampel darah ayam bekisar

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengumpulan sampel

Sampel yang digunakan berupa darah ayam bekisar yang berasal dari 4 daerah dengan 5 lokasi yang berbeda di Provinsi Jawa Timur yaitu Madura, Surabaya1, Surabaya2, Gresik, Lamongan. Lokasi pengambilan darah pada bagian vena pectoralis di bagian bawah sayap. Darah ayam bekisar diambil sebanyak 3 ml menggunakan alat dissposable syringe dan disimpan pada larutan EDTA.

3.5.2 Registrasi Sampel

Sampel darah yang didapat kemudian dilakukan registrasi dengan langkah sebagai berikut:

- a. Disiapkan sampel yang akan diregistrasi
 - b. Dilakukan pelabelan pada tiap tabung koleksi
 - c. Dikelola data sampel yang berisikan ID sampel, tanggal pengambilan sampel, lokasi pengambilan sampel, nama kota pengambilan sampel.

3.5.3 Ekstraksi DNA Ayam Bekisar

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode ekstraksi dengan kit. Kit yang digunakan pada penelitian adalah Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Langkah isolasi DNA berdasarkan protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit sebagai berikut:

- a. Sebanyak 300 μ l darah dimasukkan ke dalam tube steril.
 - b. Ditambahkan 900 μ l Cell Lysis Solution pada tube yang berisikan darah.

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

3.5.4 Pengukuran Konsentrasi dan Kuantitas DNA

Pengukuran konsentrasi dan kualitas DNA menggunakan Spektrofotometer Biodrop, langkah pengukuran isolasi DNA sebagai berikut:

- a. Larutan ddH₂O diambil sebanyak 3 µl kemudian diteteskan pada kuvet spektrofotometer.
 - b. Klik tombol measure .
 - c. Tetesan ddH₂O dibersihkan menggunakan tisu steril.
 - d. Sampel hasil ekstraksi DNA diambil sebanyak 3 µl dan diteteskan pada kuvet spektrofotometer.
 - e. Klik tombol measure.
 - f. Dicatat hasil spektrofotometri untuk kemurnian DNA pada absorbansi 260/280.
 - g. Dicatat hasil spektrofotometri untuk konsentrasi DNA atau dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

Konsentrasi DNA ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times 50 \times \text{factor pengenceran}$

3.5.5 Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR

Amplifikasi DNA metode PCR menggunakan alat thermal cycler Thermal Scientific. Kit untuk amplifikasi menggunakan kit amplifikasi Go Taq Green Master Mix. Adapun langkah untuk amplifikasi DNA adalah sebagai berikut:

- a. Disiapkan sampel hail ekstraksi DNA.
 - b. Pembuatan cocktail PCR dibuat dengan total volume 25 µl pada tube PCR Komposisi cocktail PCR adalah sebagai berikut:

- 1) DNA template 5 µl

2) Primer forward 1 µl

3) Primer reverse 1 µl

4) Go taq Green 12,5 µl

5) Nuclease free water 5,5 µl

c. Tube PCR dimasukkan pada alat thermal scientific.

d. Diatur suhu PCR seperti pada Tabel 3.3.

Tabel 3. 3 Pengaturan Suhu PCR

Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus
<i>Pre-denaturation</i>	96°C	3 menit	
<i>Denaturation</i>	96°C	1 menit	
<i>Annealing</i>	55°C	1 menit	35×
<i>Extention</i>	72°C	1 menit	
<i>Post Extention</i>	72°C	5 menit	

3.5.6 Electrophoresis

Ektroforesis dilakukan menggunakan electrophoresis thermoscientific. Terdapat 3 tahapan dalam electrophoresis yaitu:

- a. Pembuatan gel, gel yang digunakan dalam eletroforesis adalah gel dengan konsentrasi 2%. Pembuatan gel agarose sebagai berikut:

 - 1) Bubuk agarose ditimbang sebanyak 2 gram pada Erlenmeyer.
 - 2) Dilarutkan agarose dengan 100mL buffer TAE.
 - 3) Dipanaskan pada hotplate suhu 100°C hingga mendidih dan warna berubah menjadi jernih.
 - 4) Larutan agarose didinginkan pada suhu ruang.
 - 5) Sebanyak 10 µl pewarna diamond ditambahkan pada larutan agarose.
 - 6) Larutan agarose dituang pada cetakan gel electrophoresis untuk 2 gel.

- 7) Dipasangkan *comb* pada sisi ujung cetakan
 - 8) Ditunggu gel hingga memadat

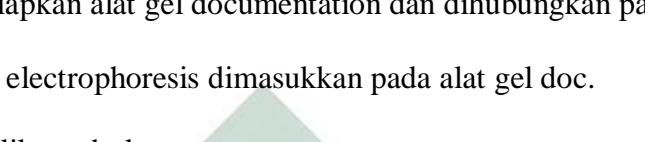
b. *Running electrophoresis*

Running electrophoresis dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Gel agarose dimasukkan pada alat electrophoresis thermal scientific.
 - 2) Ditambahkan larutan buffer TAE hingga gel terbenam.
 - 3) Sebanyak 1 μ l loading dye diteteskan pada double tape.
 - 4) Ditambahkan sebanyak 3 μ l marker pada tetesan loading dye.
 - 5) Dihomogenkan dengan micropipet dengan gerakan menarik dan mengeluarkan.
 - 6) Campuran tersebut dimasukkan dalam sumuran.
 - 7) Sebanyak 1 μ l loading dye diteteskan pada double tape.
 - 8) Ditambahkan sebanyak 3 μ l genome hasil amplifikasi PCR pada tetesan loading dye.
 - 9) Dihomogenkan dengan micropipet dengan gerakan menarik dan mengeluarkan.
 - 10) Campuran tersebut dimasukkan dalam sumuran.
 - 11) Dilakukan *running* electrophoresis dengan tegangan 50 volt selama 70 menit.

c. Visualisasi hasil

Visualisasi dilakukan dengan penyinaran gel electrophoresis hasil *running* menggunakan sinar UV pada alat gel documentation dengan langkah sebagai berikut:

- 
 - 1) Disiapkan alat gel documentation dan dihubungkan pada PC.
 - 2) Gel electrophoresis dimasukkan pada alat gel doc.
 - 3) Diklik tombol on.
 - 4) Pada PC diklik option “ilumination”.
 - 5) Capture gambar yang telah didapat.
 - 6) Disimpan gambar hasil visualisasi pada PC.

3.5.7 Sekuensing

Sekuensing tidak dilakukan di Laboratorium Terintegrasi UIN Sunan Ampel Surabaya melainkan menggunakan jasa perusahaan *1st Base*. Tahapan pengiriman sampel untuk sekuensing adalah sebagai berikut:

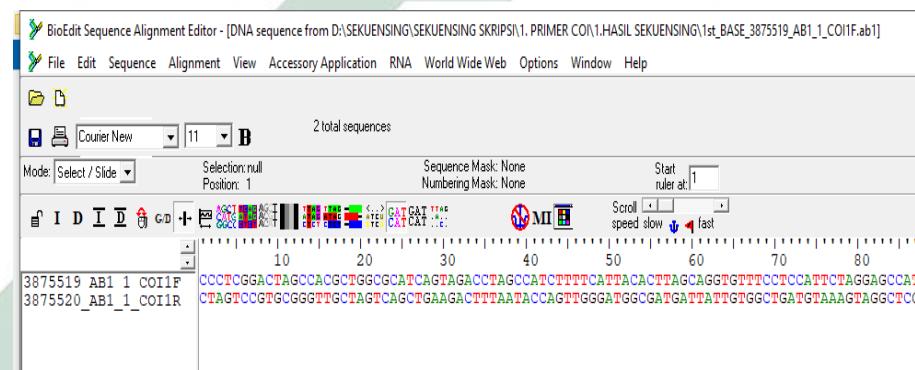
- a. Mengisi soft file form pendaftaran sekuensing.
 - b. Mengirim form melalui email pada *1st Base*.
 - c. Mengirim sampel yang terdiri dari primer dan hasil amplifikasi DNA yang telah dikemas dengan rapi menggunakan parafilm
 - d. Dikirim paket menuju alamat Jalan SP 2/7 Taman Serdang Perdana, Seksyen 2, Seri Kembangan 43300 No.7-4, Selanggor, Malaysia.
 - e. Pengunduhan hasil sekuensing pada web menggunakan order ID dan acces code.

3.4. Analisis Data

3.4.1 Contig Hasil Sekuensing

Hasil sekruensing berupa kromatogram dalam file AB1 dilakukan pencejajaran antara sekruens forward dan reversenya. Pencejajaran ini dilakukan pada software Bioedit. Pencejajaran tersebut menghasilkan consenus dari kedua sekruens.

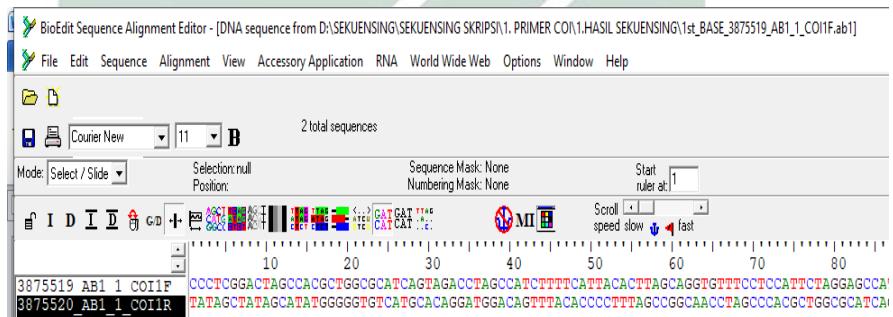
a. Buka file AB1 sekuens forward dan reverse



Gambar 3. 1 Contig Sekuens pada Software BioEdit

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

b. Klik sekuen reverse kemudian klik sequence-> nuclei acid dan pilih reverse complement



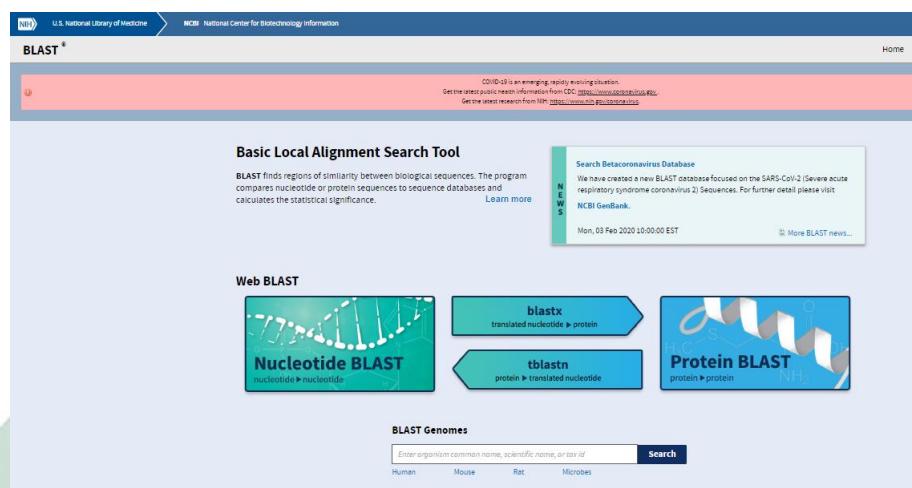
Gambar 3. 2 Contig Sekuens pada Software BioEdit

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

3.4.2 Blast Pada Genbank

Blast dilakukan pada laman blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. blast dilakukan sebagai berikut:

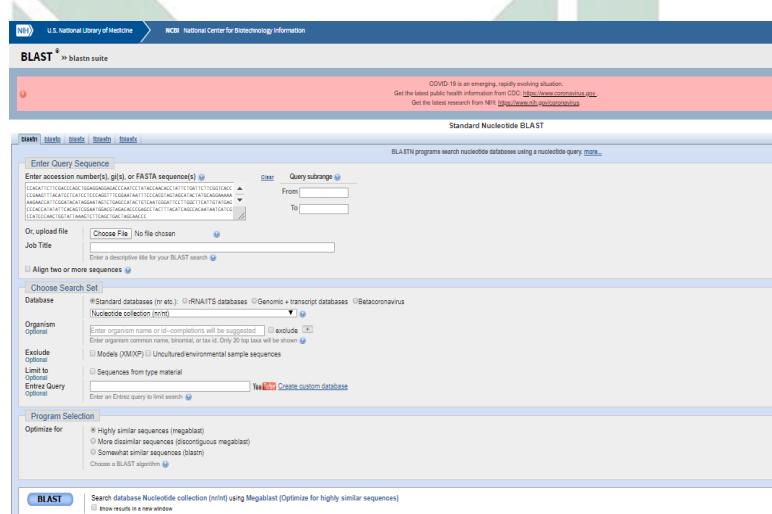
- a. Buka laman blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. kemudian dipilih nucleotide blast



Gambar 3. 6 Blast Sekuens pada laman NCBI

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

- b. Dimasukkan sekuens yang dimiliki kemudian diklik blast



Gambar 3. 7 Blast Sekuens pada laman NCBI

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

- c. Hasil blast berupa berbagai sekuens yang memiliki kemiripan yang dekat

U.S. National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information
Log In

BLAST[®] » blastn suite » results for RID-C6XGJ7J5016

[Home](#)
[Recent Results](#)
[Saved Strategies](#)
[Help](#)

[Edit Search](#)
[Save Search](#)
[Search Summary](#)

[How to read this report?](#)
[BLAST Help Videos](#)
[Back to Traditional Results Page](#)

Job Title
Nucleotide Sequence

RID
C6XGJ7J5016
Search expires on 05-20 14:00 pm
[Download All](#)

Program
BLASTN
[Citation](#)

Database
nt
[See details](#)

Query ID
IclQuery_35501

Description
None

Molecule type
dna

Query Length
565

Other reports
[Distance tree of results](#)
[MSA viewer](#)

Filter Results

Organism
only top 20 will appear
 exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity
E value
Query Coverage

to

to

to

[Filter](#)
[Reset](#)

Descriptions

Sequences producing significant alignments

[Download](#)
[Manage Columns](#)
Show [100](#)
[?](#)

select all
0 sequences selected

[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<i>Galus galus galus</i> voucher whole blood mitochondrion complete genome	1044	1044	100%	0.0	100.0%	MN013407_1
<input type="checkbox"/>	<i>Galus galus</i> isolate DC1-1 mitochondrion complete genome	1044	1044	100%	0.0	100.0%	MK103565_1
<input type="checkbox"/>	<i>Galus galus</i> isolate DC3 mitochondrion complete genome	1044	1044	100%	0.0	100.0%	MK103564_1
<input type="checkbox"/>	<i>Galus galus</i> isolate DF-1 complete sequence mitochondrion complete genome	1044	1044	100%	0.0	100.0%	MK103563_1
<input type="checkbox"/>	<i>Galus galus</i> isolate DT2 mitochondrion complete genome	1044	1044	100%	0.0	100.0%	MK103562_1
<input type="checkbox"/>	<i>Galus galus</i> isolate SG3 mitochondrion complete genome	1044	1044	100%	0.0	100.0%	MK103561_1

Gambar 3. 8 Blast Sekuens pada laman NCBI

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

3.4.3 Pengunduhan Sekuens GenBank

Pengunduhan sekuens dilakukan pada genbank laman www.ncbi.nlm.nih.gov/, pengunduhan dilakukan sebagai berikut:

- a. Buka laman www.ncbi.nlm.nih.gov/, kemudian dipilih nucleotide kemudian dimasukkan keyword “*Gallus gallus* cytochrome oxidase I”

NCBI Resources ▾ How To ▾ Sign in to NCBI

Nucleotide | Nucleotide ▾ | Gallus gallus cytochrome oxidase I | Create alert Advanced Search Help

COVID-19 is an emerging, rapidly evolving situation. Get the latest public health information from CDC: <http://www.cdc.gov/coronavirus>. Get the latest research from NIH: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/coronavirus/>

Species: Animals (651) | Plants (7) | Fungi (35) | Protists (7) | Bacteria (3) | Viruses (1) | Customize ... | Molecule type: genomic DNA/RNA (438) | mRNA (193) | Customize ... | Source databases: INSDC (GenBank) (592) | RefSeq (7) | Customize ... | Sequence Type: Nucleotide (441) | EST (158) | Genetic compartments: Mitochondrion (387)

Summary ▾ | 20 per page ▾ | Sort by Default order ▾ | Send to: ▾ | Filters: Manage Filters

Results by taxon

Top Organisms [Tree]

- Gallus gallus (537)
- Anas platyrhynchos (28)
- Aspergillus lucidulus (5)
- Gallus varius (3)
- Aspergillus fumigatus AF293 (3)
- All other taxa (23)
- More...

Items: 1 to 20 of 599

1. *Gallus gallus* breed Zhenyang Yellow chicken mitochondrial complete genome

Accession: KV087152.1 | GI: 118480586 | Protein | PubMed | Taxonomy | GenBank | FASTA | Graphics

2. *Gallus gallus* breed Nandan mitochondrial complete genome

Accession: KP269089.1 | GI: 75814332 | Protein | Taxonomy | GenBank | FASTA | Graphics

3. *Gallus gallus* isolate YP20092 breed Chigulu mitochondrial complete genome

Accession: GL02171.1 | GI: 283049305 | Protein | PubMed | Taxonomy | GenBank | FASTA | Graphics | PopSet

Find related data Database: Select | Find Similar

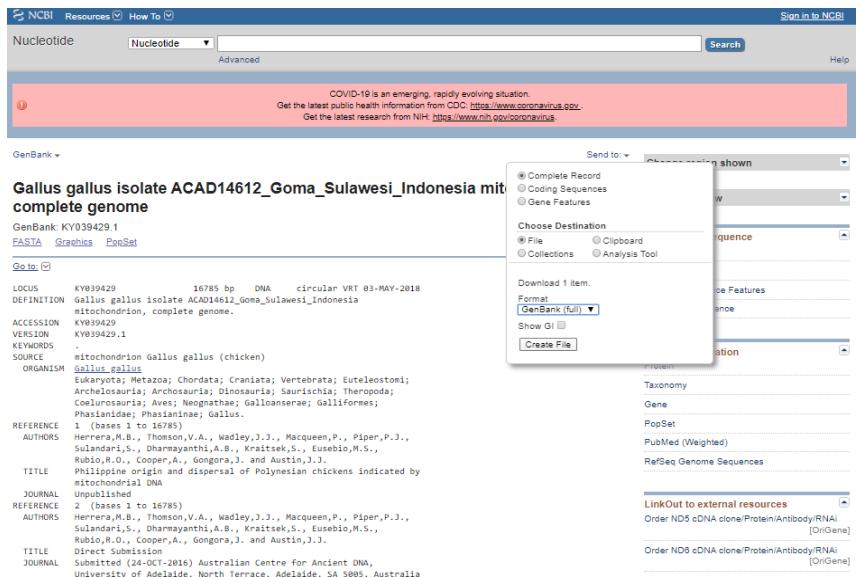
Search details

["Gallus gallus"[Organism] OR Gallus gallus[All Fields] AND mitochondrial[All Fields]]

Gambar 3. 9 Pengunduhan Sekuens pada Laman NCBI

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

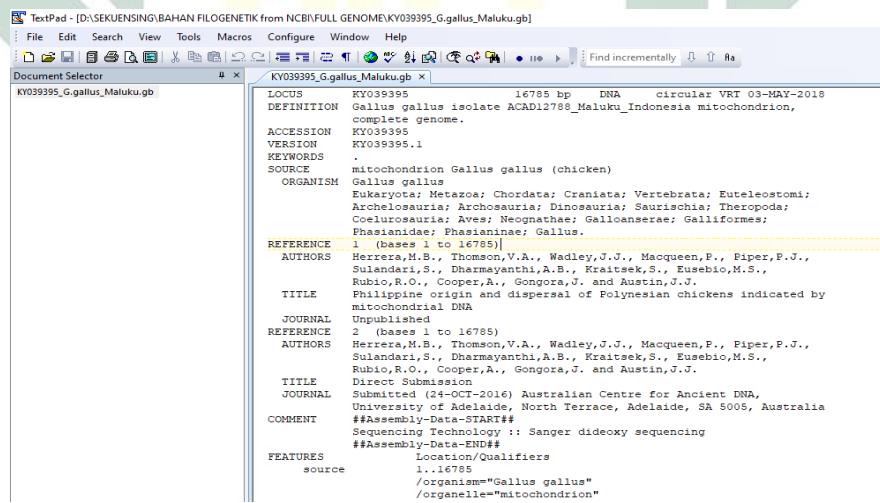
- b. Unduh file dengan klik send to -> gen bank (full) kemudian klik
create



Gambar 3. 10 Pengunduhan Sekuens pada Laman NCBI

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

- c. File hasil unduhan dalam bentuk fasta



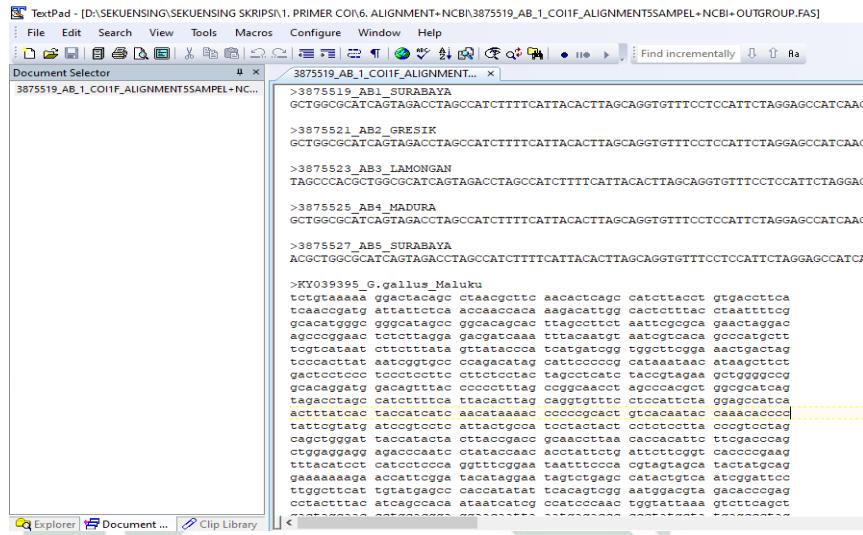
Gambar 3. 11 Pengunduhan Sekuens pada Laman NCBI

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

3.4.4 Alignment Sekuens

Sekuens yang didapat dari genbank diletakkan menjadi satu file dengan sekuens hasil contig. Alignment sekuens dikerjakan menggunakan software MEGA 7.0.

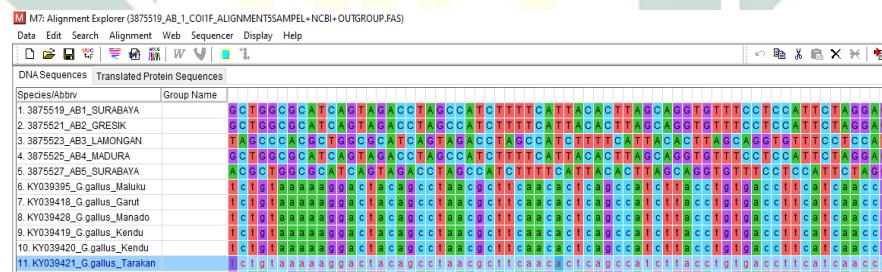
- a. Pemindahan sekuens genbank pada sekuens hasil contig dilakukan dengan coding >(nama spesies)_(asal daerah)



Gambar 3. 12 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

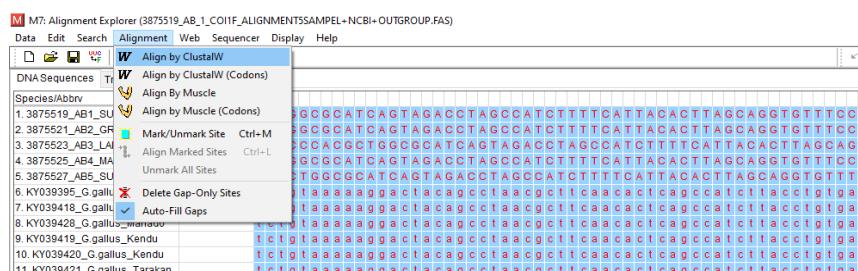
- b. File fasta dibuka dalam software MEGA, klik tombol open dan pilih file yang akan dialignment



Gambar 3. 13 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

- c. Klik seluruh sekvens kemudian klik alignment dan pilih alignment by clustal W



Gambar 3. 14 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

- d. Hasil alignment berupa sekuens yang saling sejajar

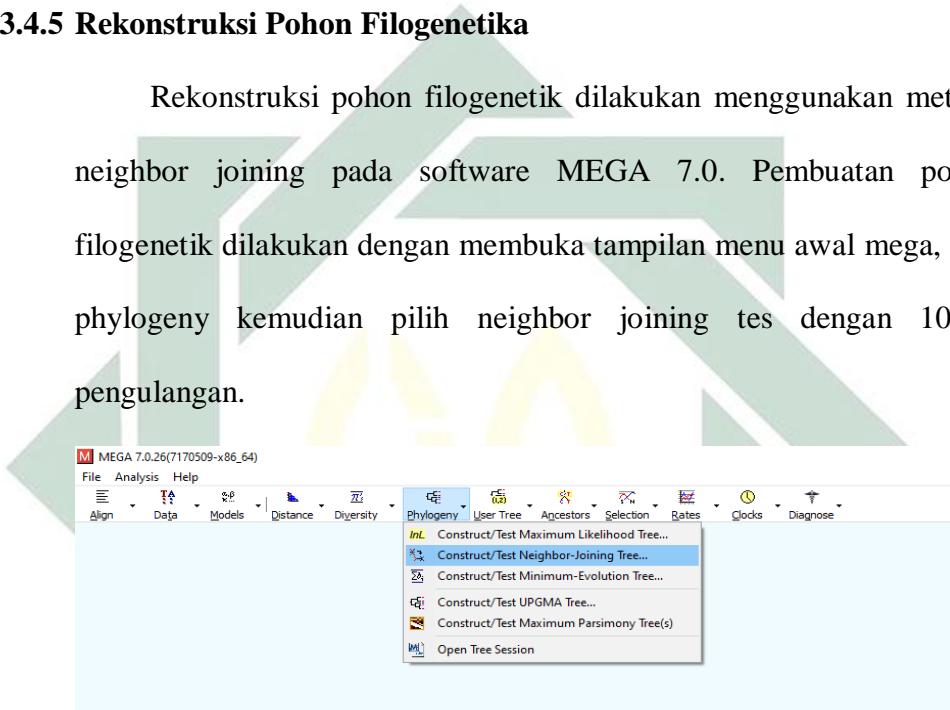
M M7: Alignment Explorer (3875519_AB1_COI1F_ALIGNMENT5SAMPLE+NCBI+OUTGROUP.FAS)	Data	Edit	Search	Alignment	Web	Sequencer	Display	Help
DNA Sequences	Translated Protein Sequences							
Species/Abbrv	Group Name	*	*	*	*	*	*	*
1. 3875519_AB1_SURABAYA	GACAGTTCGGGATGGCGTAGCACCAGCCCTACITIACATCGGCCACATTA							
2. 3875521_AB2_GRESIK	CACAGTTGGGAAATGGCGTAGCACCAGCCCTACITITACATCGGCCACATTA							
3. 3875523_AB3_LAMONGAN	CACAGTTGGGAAATGGCGTAGCACCAGCCCTACITITACATCGGCCACATTA							
4. 3875525_AB4_IMADURA	CACAGTTGGGAAATGGCGTAGCACCAGCCCTACITITACATCGGCCACATTA							
5. 3875527_AB5_SURABAYA	GAGAGTCGGGAAATGGCGTAGCACCAGCCCTACITITACATCGGCCACATTA							
6. KY039418_G.gallus_Maluku	CACAGTTGGGAAATGGCGTAGCACCAGCCCTACITITACATCGGCCACATTA							
7. KY039418_G.gallus_Garut	CACAGTTGGGAAATGGCGTAGCACCAGCCCTACITITACATCGGCCACATTA							

Gambar 3. 15 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

3.4.5 Rekonstruksi Pohon Filogenetika

Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan metode neighbor joining pada software MEGA 7.0. Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan membuka tampilan menu awal mega, klik phylogeny kemudian pilih neighbor joining tes dengan 1000x pengulangan.

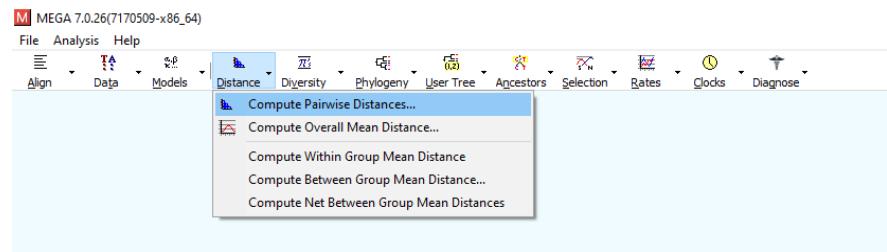


Gambar 3. 16 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

3.4.6 Penentuan Nilai Pairwise Distance

Penentuan nilai distance pairwise dilakukan dengan kembali pada menu awal MEGA 7.0 kemudian klik distance dan pilih compute pairwise distance.



Gambar 3. 17 Alignment Sekuens pada Software MEGA 7.0

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengumpulan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa sampel darah ayam bekisar. Pengambilan darah dilakukan berdasarkan protokol Martoenus, dan Djatmikowati tahun 2015 mengenai teknik pengambilan darah pada beberapa hewan. Pada penelitian ini dilakukan pengambilan darah pada pembuluh darah vena pectoralis tepat di bawah sayap ayam seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1. Vena pectoralis dipilih sebagai tempat pengambilan sampel karena letaknya yang mudah ditemui serta dari permukaan kulit pembuluh vena pectoralis nampak berwarna biru (Martoenus dan Djatmikowati, 2015). Darah yang didapat disimpan dalam vacutainer EDTA. EDTA menjadi inhibitor pada pembekuan darah. EDTA dengan cara mengikat ion Ca^{2+} bebas dalam darah. Ikatan tersebut menonaktifkan mekanisme protombin menjadi thrombin serta menganggu kerja aktifator pada fibrin lunak ketika menjadi fibrin sehingga darah tidak dapat menggumpal (Riswanto, 2010).



Gambar 4. 1 Teknik Pengambilan Darah pada Ayam
(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

Darah digunakan dalam penelitian ini karena darah merupakan substansi penting dalam keberlangsungan hidup sebagian besar makhluk

hidup. Darah terdiri atas beberapa komponen penyusun yaitu 55% plasma darah dan 45% sel darah. Plasma darah adalah cairan penyusun darah yang berada diantara sel-sel darah yang bersifat bebas. Sedangkan sel darah terdiri atas eritrosit, leukosit, dan trombosit (Riswanto, 2010). Sel-sel darah tersebut mengandung material genetik yang berisi urutan basa nukleotida yang memberikan informasi genetik pada setiap organisme.

Sampel dalam penelitian dikumpulkan dari beberapa daerah yaitu Madura, Surabaya¹, Surabaya², Gresik, dan Lamongan. Total sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 5 sampel. Data sampel darah yang digunakan dalam penelitian ini ditampilkan pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.2.

Tabel 4. 1 Koleksi Sampel Darah Ayam Bekisar

No	Sampel ID	Waktu Pengambilan	Lokasi Pengambilan
1.	AB1	12 Oktober 2019	Surabaya
2.	AB2	20 Oktober 2019	Gresik
3.	AB3	27 Oktober 2019	Lamongan
4.	AB4	3 Desember 2019	Madura
5.	AB5	11 Desember 2019	Surabaya



Gambar 4. 2 Sampel Ayam Bekisar

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

4.2 Ekstraksi DNA Ayam Bekisar

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan PROMEGA : Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Kit ini merupakan kit komersial yang sering digunakan pada penelitian bertemakan genetik molecular karena lebih efektif dalam penggunaannya untuk eksstraksi DNA. Prinsip ekstraksi DNA menggunakan kit ini sama halnya dengan prinsip ekstraksi DNA Phenol Khloroform terdiri dari 3 tahapan utama yaitu destruksi, presipitasi/pengendapan, dan rehidrasi.

Destruksi dilakukan dengan larutan cell lysis solution, nuclei lysis solution untuk melisiskan membran nucleus sehingga mempermudah DNA kleuar dari nucleus dan organel lainnya. Presipitasi dilakukan menggunakan larutan RNase, protein precipitation solution dan diberi perlakauan sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan suspensi berdasarkan berat molekulnya yang akan mengendap karena adanya gaya gravitasi (Susilowati, 2019). Larutan isopropanol dan ethanol bekerja untuk membersihkan DNA dari molekul pengotor lainnya seperti lemak, karbohidrat, dsb. Tahapan terakhir adalah rehidrasi dengan larutan DNA rehydration solution yang bertujuan untuk menghidrasi DNA agar DNA tidak rusak selama masa penyimpanan dalam kurun waktu tertentu.

4.3 Hasil Pengujian Kualitas dan Kuantitas DNA

Data kualitas dan kuantitas DNA didapatkan dari pengukuran panjang gelombang pita DNA. Kualitas dan kuantitas DNA dipengaruhi oleh metode isolasinya. Pengujian hasil ekstraksi DNA dilakukan menggunakan alat spektrofotometri UV/VIS (ultra violet) Bio-drop. Kuantitas dan kualitas DNA

sangat berpengaruh pada tahap selanjutnya yaitu amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (Rasyid, 2015). Semakin tinggi dan semakin murni DNA yang didapat maka semakin baik dalam penggunaannya untuk amplifikasi PCR karena DNA yang didapat spesifik. Hasil pengukuran kuantitas dan kualitas DNA disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4. 2 Hasil Pengukuran Kuantitas dan Kualitas DNA

Lokasi	Kode Sampel	Panjang Gelombang (nm)				Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	$\text{A}260/\text{A}280$	$\text{A}260/\text{A}230$
		$\text{A}230$	$\text{A}260$	$\text{A}280$	$\text{A}320$			
Surabaya1	AB1	0.045	0.022	0.010	0.001	1.127	2.139	0.495
Gresik	AB2	0.072	0.075	0.037	0.005	3.991	1.909	1.039
Lamongan	AB3	0.174	0.306	0.167	0.006	15.01	1.863	1.785
Madura	AB4	0.031	0.001	0.005	0.010	0.563	2.142	0.273
Surabaya2	AB5	0.094	0.134	0.072	0.003	6.568	1.894	1.438

Berdasarkan hasil uji kualitas dan kuantitas DNA menggunakan spektrofotometri UV/VIS didapatkan nilai konsentrasi berkisar 15,01 hingga 0,563 µg/ml dan nilai kemurnian berkisar 1,863 hingga 2,142. Nilai konsentrasi dan kemurnian DNA ini merupakan parameter penentu kuantitas dan kualitas DNA. Kuantitas DNA ditunjukkan oleh nilai konsentrasi DNA. Semakin tinggi nilai konsentrasi maka semakin banyak pita DNA yang menyerap pada panjang gelombang 260nm, tetapi DNA yang didapat belum tentu murni karena pada panjang gelombang tersebut tidak hanya diserap DNA adapun molekul lainnya seperti protein, senyawa fenol, dsb.

Penentuan Kualitas DNA didapat dari nilai kemurnian DNA. DNA yang baik kualitasnya adalah DNA dengan kemurnian berkisar antara 1.8-2. Pada sampel AB1 dan AB4 didapat nilai lebih dari 2 yaitu 2,139 dan 2,142 yang menunjukkan adanya kontaminan DNA, selisih 0,1 ini masih dapat digunakan untuk tahap selanjutnya amplifikasi PCR karena nilai kemurnian DNA dipengaruhi oleh nilai panjang gelombang 280nm yang menunjukkan

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 ketika 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 $\text{A}230$ nm menunjukkan kontaminasi dari kelompok peptida. Kontaminasi lainnya dapat diketahui pada nilai kemurnian $\text{A}260/\text{A}280\text{nm}$ 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).

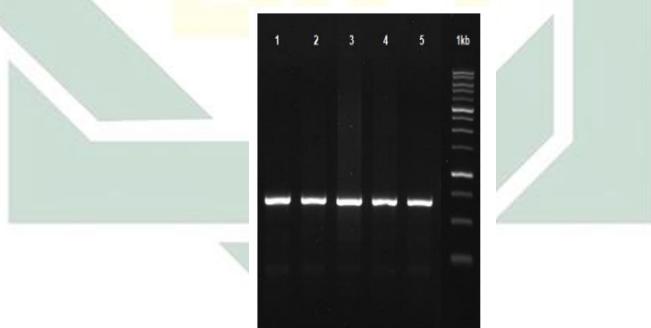
4.4 Hasil Amplifikasi PCR

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. Penetuan suhu *annealing* dilakukan berkisar $5^\circ\text{C}+\text{Tm}$ atau $\text{Tm}-5^\circ\text{C}$. Suhu *annealing* yang tidak sesuai akan menyebabkan kegagalan dalam penempelan primer sehingga tidak ada DNA yang teramplifikasi sehingga pada tahap visualisasi hasil PCR tidak ditemukan *band* yang diinginkan. Polymerase

DNA membantu dari kelanjutan perpanjangan primer dengan dNTPs yang terdiri dari dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Perpanjangan primer dilakukan pada 35 siklus, yang menunjukkan DNA target akan meningkat secara eksponensial sebanyak siklus tersebut

Hasil amplifikasi PCR dilakukan visualisasi menggunakan gel electrophoresis. Proses electrophoresis dilakukan menggunakan Gel electrophoresis dengan konsentrasi 2% dengan pelarut buffer TAE 10x, serta pewarna DNA *Diamond Nucleic Acid*. Electrophoresis berjalan dengan tegangan 50 volt selama 70 menit. Tujuan dari proses electrophoresis adalah untuk memisahkan, mengidentifikasi, serta mempurifikasi fragmen DNA (Sudjadi, 2008). Gel hasil running electrophoresis kemudian disinari dengan sinar UV pada alat gel documentation. Hasil penyinaran sinar UV pada gel electrophoresis disajikan pada Gambar 4.5.



Gambar 4. 5 Hasil Visualisasi Gel Electrophoresis

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2020)

Gambar tersebut menunjukkan hasil electrophoresis sampel AB1, AB2, AB3, AB4, AB5 baik amplifikasi menggunakan gen COI. Pada sampel 1-5 *band* sejajar pada daerah ~600bp. Digunakannya gen dari DNA mitokondria karena pada DNA dari mitokondria memiliki angka copy tinggi yang memiliki angka copy sebesar 103 molekul DNA sehingga

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

Sampel 1-5 merupakan amplikon 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 putusnya 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

elektroforesis untuk mengetahui panjang fragmen hasil sekuensing pada gel polyacrilamid. Hasil pembacaan sekuens berupa urutan basa nukleotida yang selanjutnya digunakan sebagai bahan penyusun pohon filogeni.

Hasil sekuensing berupa urutan basa nukleotida dalam bentuk file AB1 yang terdiri dari hasil pembacaan sekuens 2 arah, yaitu berdasarkan primer forward dan primer reverse. Hasil sekuensing kemudian dilakukan alignment pada kedua basa nukleotida yaitu berdasarkan pembacaan dari arah forward dan pembacaan dari arah reverse yang telah dilakukan reverse complement sebelumnya hingga didapat hasil berupa contig. Contig merupakan kesuluran DNA yang tumpang tindih hasil dari alignment dua sekuens. Adapun hasil contig hasil sekuensing disajikan pada Tabel 4.3

Tabel 4. 3 Sekuens Ayam Bekisar

Sampel	Sekuens
AB1/COI1	GCTGGCGCATCAGTAGACCTAGCCATCTTTCATTACACTTAGCAG GTGTTCCCTCATTCTAGGAGCCATCAACTTATCACTACCACATCAT CAACATAAAACCCCCCGCACTGTCACAATACCAAACACCCCTATT CGTATGATCCGTCCCTATTACTGCCATCCTACTACTCCTCTCCTTAC CCGTCTAGCAGCTGGGATTACCATACTACTTACCGACCGCAACCT TAACACCAACATTCTCGACCCAGCTGGAGGAGGAGACCCAATCCT ATACCAACACCTATTCTGATTCTCGGTACCCCCGAAGTTACATC CTCATCCTCCCAGGTTTGGAAATAATTCCCACGTAGTAGCATACT ATGCAGGAAAAAAAAGAACCATTCGGATACATAGGAATAGTCTGA GCCATACTGTCAATCGGATTCCCTGGCTTATTGTATGAGCCCACC ATATATTACAGTCGGAATGGACGTAGACACCCGAGCCTACTTTA CATCAGGCCACAATAATCATCGCCATCCAACTGGTATTAAAGTCTT CAGCTGACTAGCAACCC

Hasil sekuensing didapat sekuen 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 Indentict
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 sekuen dari spesies *Gallus gallus*. Max score menunjukkan keakuratan alignment sekuen berupa jumlah kesamaan urutan basa nukleotida dari database yang cocok dengan urutan basa nukleotida yang telah diinput. Query Coverage merupakan

persentase dari panjang basa nukelotida yang sama dengan database, sedangkan E-Value adalah nilai hipotesis yang menunjukkan statistika pada signifikansi kedua sekvens. Semakin rendah nilai E-Value menunjukkan semakin tinggi tingkat kehomologan senkuens (Dhiantika, 2010).

Tabel tersebut menunjukkan kemiripan sekvens dengan berbagai spesies *Gallus gallus*. Ayam hutan merah merupakan nenek moyang dari ayam kampung Indonesia hasil dari domestikasi dengan kurun waktu yang cukup lama. Hingga saat ini terdapat berbagai macam jenis breed dari ayam kampung Indoensia hasil dari pemuliaan ternak, perkawinan silang dan sebagainya. Beragamnya jenis hewan di bumi ini telah disebutkan dalam AL-Quran surat Al-Fatir:28

وَمِنَ النَّاسِ وَالدَّوَابِ وَالْأَنْعَامِ مُخْتَلِفٌ الْوَانُهُ كَذَلِكَ ۝ إِنَّمَا يَخْشَىَ اللَّهَ مِنْ عِبَادِهِ
الْعُلَمَاءُ ۝ إِنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ غَفُورٌ

Artinya : Dan demikian (pula) di antara manusia binatang-binatang melata dan binatang-binatang ternak ada yang bermacam-macam warnanya (dan jenisnya). Sesungguhnya yang takut kepada Allah di antara hamba-hambanya, hanyalah ulama sesungguhnya Allah maha Perkasa lagi Maha Pengampun (QS. Fatir :28).

Ayat tersebut menunjukkan bahwasanya Allah menciptakan berbagai macam bentuk dan rupa makhluk hidup. Allah menciptakan hewan pula dengan bentuk tubuh, ukuran, kulit yang beragam baik dalam jenis satu dengan jenis lainnya, ataupun organisme satu dengan organisme lainnya dalam satu jenis. Mukhtalifun dalam ayat tersebut diartikan para ulama sebagai bukti terdapat keragaman pada seluruh makhluk hidup ciptaan Allah (Shihab, 2002). Seperti halnya pada beragamnya jenis ayam. Keragaman

jenis ini dimulai dari keragaman genetik dan diekspresikan hingga terbentuk fenotip berupa warna bulu, ukuran tubuh, bentuk jengger dan berbagai keragaman lainnya.

Menurut Shihab (2002) keragaman yang terbentuk ini berasal dari suatu materi yang diibaratkan seperti karakter genotip dan fenotip tiap organismenya. Perbedaan karakter tersebut diekspresikan dari materi genetik yang bervariasi. Variasi tersebut dapat dilakukan pengelompokan berdasarkan kesamaan ciri baik pada karakter genotip maupun fenotipnya. Hasil pengelompokan akan menunjukkan hubungan kekerabatan antara jenis satu dengan jenis lainnya, individu satu dengan individu lainnya dalam satu jenis serta dapat mengetahui asal usulnya.

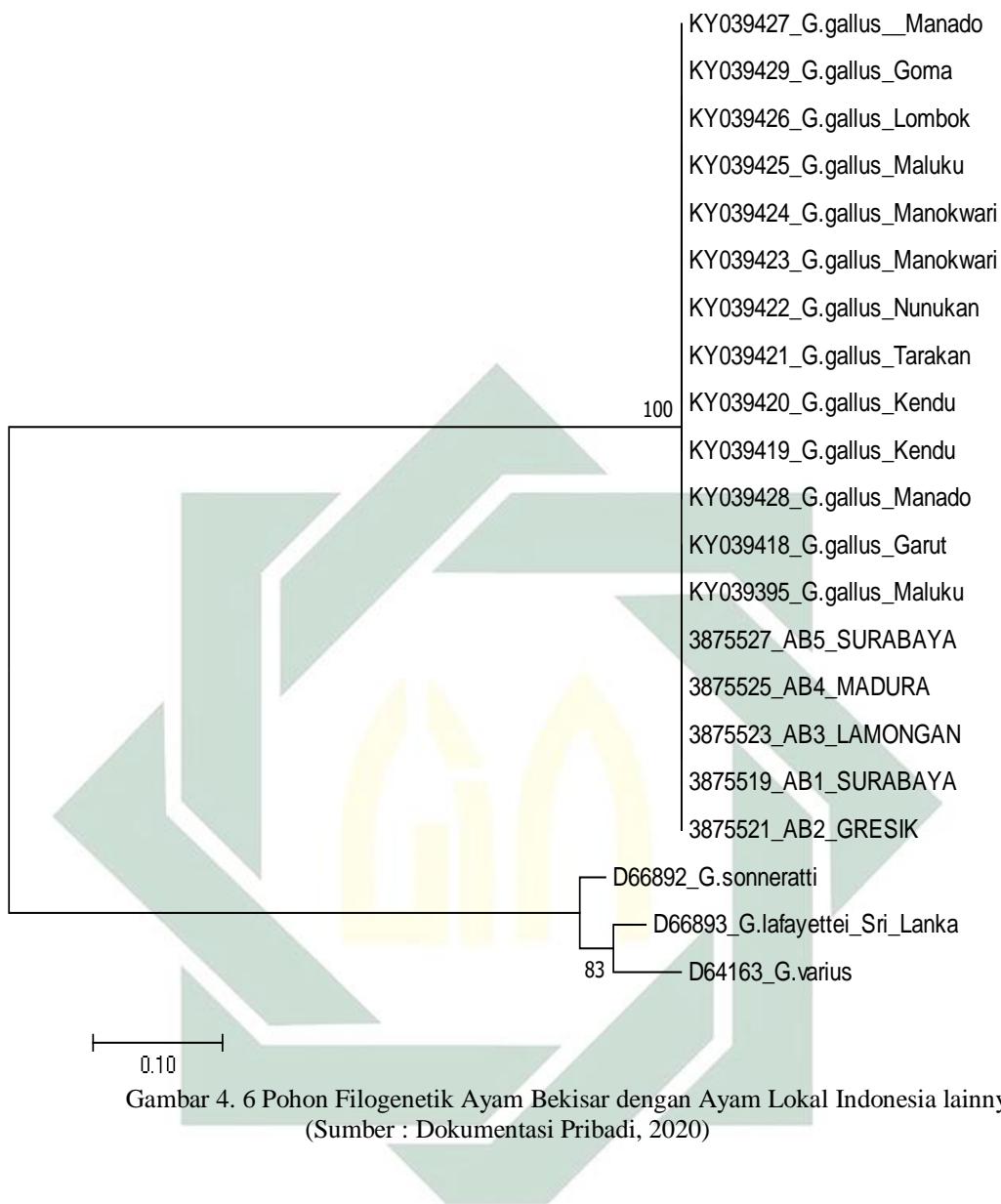
الوسر لاق لكلام : ” طَلْبُ الْعِلْمِ فَرِيْضَةٌ عَلَى كُلِّ مُسْلِمٍ وَمُسْلِمَةٍ ”

Artinya : "Ahmad bin Abdul Wahhâb menceritakan kepada kami bahwa ia berkata Ali bin Iyasy al-Himşî menceritakan bahwa Hâfaş bin Sulaimân menceritakan dari Katsir bin Syanzir dari Muhammad bin Sirin dari Anas bin Malik bahwasanya ia berkata, Rasul saw bersabda : Menuntut ilmu wajib bagi setiap muslim (HR. At-Tabrani : 7).

Hadits tersebut menjelaskan secara umum dalam kitab Al-Sagir bahwa setiap muslim diwajibkan untuk menuntut ilmu dan mencarinya. Allah SWT meninggikan kedudukan orang berilmu dan keutamaan dalam menuntut ilmu. Sama halnya dengan mempelajari ilmu mengenai beragamnya jenis ciptaan Allah khususnya pada ternak yang telah tercantum pada Al-Quran Surat Fatir

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 pengelompokan 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 outgrup sekuens ayam yang berebeda dalam tingkat spesiesnya yaitu *Gallus varius*, *Gallus lafayett*, dan *Gallus sonneratti*. Pohon filogenetik disajikan pada Gambar 4.6.



Tabel 4. 6 Hasil Perhitungan Pairwise Distance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
3875519_AB1_SURABAYA1																						
3875521_AB2_GRESIK	0.00																					
3875523_AB3_LAMONGAN	0.00	0.00																				
3875525_AB4_MADURA	0.00	0.00	0.00																			
3875527_AB5_SURABAYA2	0.00	0.00	0.00	0.00																		
KY039395_G.gallus_Maluku	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00																	
KY039418_G.gallus_Garut	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00																
KY039428_G.gallus_Manado	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00															
KY039419_G.gallus_Kendu	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00														
KY039420_G.gallus_Kendu	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00													
KY039421_G.gallus_Tarakan	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00												
KY039422_G.gallus_Nunukan	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00											
KY039423_G.gallus_Manokwari	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00										
KY039424_G.gallus_Manokwari	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00									
KY039425_G.gallus_Maluku	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00								
KY039426_G.gallus_Lombok	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							
KY039427_G.gallus_Manado	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00						
KY039429_G.gallus_Goma	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
D66893_G.lafayettei_Sri_Lanka	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	
D66892_G.sonneratti	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.07	
D64163_G.varius	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	0.08	0.10

Hasil pohon filogenetik menggunakan sekuen Cytochrome Oxidase I menggambarkan sampel ayam bekisar memiliki common ancestor yang sama dengan sekuen pada NCBI pada spesies yang sama. Pohon filogenetik membentuk menjadi 1 clade besar yang terdiri dari sekuen 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 diternak 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 konserv 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 lafeyetti*, *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 behubungan dekat dengan ayam hutan merah (*Gallus gallus*) yang hidup liar di pulua 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 tetpa terjaga kelestariannya.

BAB V

PENUTUP

5.1 Simpulan

Analisis filogenetik ayam bekisar berdasarkan marka COI menunjukkan bahwa ayam bekisar merupakan keturunan dari ayam hutan merah yang telah didometikasi di Indonesia atau ayam kampung. Pewarisan garis keturunan tersebut karena digunakan marka COI yang diwariskan secara maternal melalui parental betina. Penggunaan strain COI daerah 560bp tidak menunjukkan adanya perbedaan pada basa nukleotida antara ayam bekisar dengan ayam lokal Indonesia lainnya.

5.2 Saran

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan sampel ayam bekisar lainnya guna memperkaya sumber daya genetik di Indonesia serta menjawab pertanyaan penentuan *breed* di Indonesia
 - b. Penelitian ini hanya menggunakan marka COI dengan panjang 560 bp oleh karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan *complete sequence* dari COI agar lebih jelas diketahui perbedaan pada intra spesiesnya.
 - c. Perlu juga dilakukan penelitian mengenai sekuen ayam bekisar menggunakan marka lainnya untuk mendapatkan sekuen full genome guna mengetahui keakuratan kekerabatan ayam bekisar dengan ayam lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Manawi , Abdur Rauf , Zainuddin. *At-Taisir Bisyarhi al-Jami' Al-Sagir*. (Riyad, Dar an-Nasyar, 1998

Al-Nasser, H., Al-Khalaifa, A., Al-Saffar, F., Khalil, M.m, AlBahouh, G., Ragheba, A., Al-Hadad, and M. Mashaly. 2007. Overview of Chicken Taxonomy and Domestication. *World's Poultry Science Journal*. 63(2): 285-300.

Aminullah. 2016. *Inilah Penemu "Ayam Bekisar" Kangean Sumenep Madura*. Diakses pada 27 April 2019. <<https://www.emadura.com>>.

Amos, B., and A.R. Hoelzel. 1991. Long Term Preservation of Whale Skin for DNA Analysis. *Reptil International Whaling Commission Special Issue*. 13(1): 99-103.

Ballard, J.W. and M.C. Whitlock. 2004. The Incomplete Natural History of Mitochondria. *Molecular Ecology*. 13(4): 729-744.

BAPPEDA Sumenep (Badan Pembangunan Daerah Sumenep). 2009. *Profil Wilayah Kepulauan Kabupaten Sumenep*. Badan Pembangunan Daerah Sumenep, Sumenep.

Chaves, A.V., Clozato, C.L., Lacerda, D.R., Sari, E.H., and F.R. Santoso. Molecular Taxonomy of Brazilian Tyrant-Flycatchers (Passeriformes: Tyrannidae). *Molecular Ecology Research*. 8(6): 1169-1177.

Dale, J.W., and S. Park. 2004. Molecular Genetics of Bacteria, 4th ed. John Wiley & Sons Inc.

Desjardins, P., dan R. Morais. 1991. Sequence and Gene Organization of The Chicken Mitochondrial Genome. A Novel Gene Order in Higher Vertebrate. *Journal Molecular Biology*. 212(4): 599-634.

Dharmayanti I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. Wartazoa. 21(1). 1-10.

Dhiantika. 2010. Buku Petunjuk Drylab Biosel. Pengenalan National Centre For Biotechnology Information (NCBI). Diakses pada 3 Maret 2020. <<http://dhiantika.staff.ugm.ac.id/files/2010/11/BUKU-PETUNJUK-DRYLAB-BIOSEL-2010.pdf>>.

Dinas Peternakan Provinsi Jawa Tengah. 2009. *Ayam Hutan Hijau*. Diakses pada 24 April 2019. <<http://disnak.jawatengah.go.id>>.

Fachtiyah, Rumingtyas E.L.A., Widyarti, S., Rahayu, S. 2011. Biologi molekular. Erlangga: Jakarta.

FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations). 2008. *Lokal chicken genetic resources and production systems in Indonesia*. Prepared by Muladno. GCP/RAS/228/GER Working Paper No. 6, Rome.

Fumihito, A., Miyake, T., Sumi, S., Takada, M., Ohno, S., and N. Kondo. 1994. One Subspecies of The Red Junglefowl (*Gallus gallus gallus*) Suffices as The Matriarchic Ancestor of All Domestic Breeds. *Proceeding of National Academy of Sciences of The United States of America.* 91(26):12505-12509.

Fumihito, A., Miyake, T., Takada, M., Shingu, R., Endo, T., Gojobori, T., Kondo, N., dan S. Ohno. 1996. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proceeding of National Academy of Science of The United States America*. 93(13): 6792-6795.

Galter, N., Nabholz, B., Glemin, S., Hurst, G. D. D. 2009. Mitochondrial DNA as A Marker of Molecular Diversity: A Reappraisal. *Molecular Ecology*. 18 :4541-4550

Gandasoebrata. 2001. Penuntun Laboratorium Klinik. Dian Rakyat: Jakarta.

Gao, Y.L., Qin, L.T., Pan, W., Wang, Y.Q., Qi, X.L., Gao, H.L. and X.M. Wang. 2010. Avian Leukosis Virus Subgrup J in Layer Chickens, China. *Emerg. Infect. Dis.* 16(10): 1637-1638.

Handiwirawan, E. 2004. Pelestarian Ayam Hutan Melalui Pembentukan Ayam Bekisar Untuk Ternak Kesayangan. *Prosiding Lokakarya Nasional Inovasi Teknologi Pengembangan Ayam Lokal*. Universitas Diponegoro, Semarang.

Handoyo, D., dan Rudiretna, A. 2000. Prinsip Umum Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. Unitas. 9(1):17-29.

Hartl D. 2000. A primer of population genetics. 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

Hebert, P.D., Cywinski, A., Ball, S.L., and J.R. DeWard. 2003. Biological Identification Through DNA Barcode. *Proceedings Biological Sciences*. 270(1512): 313-321.

Hidayat, T. dan Pancoro, A. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. Jurnal AgroBiogen. 4(1):35-40.

Hidayat, T., dan Pancoro, A. 2006. Sistematika dan Filogenetika Molekuler. Kursus Simgkat Aplikasi Perangkat Lunak PAUP dan MrBayes untuk

Penelitian Filogenetika Molekuler SITH-ITB. Diakses pada 5 Februari 2020.

<http://file.upi.edu/Direktori/FPMIPA/JUR._PEND._BIOLOGI/197004101997021-TOPIK HIDAYAT/Makalah Filogenetik Molekuler.pdf.>

Irham, M., dan Y.S. Fitriana. 2013. Pengelolaan Koleksi Spesimen Acuan. In Zein, M.S.A., dan D.M. Prawiradilaga. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Kencana Prenada Media Group, Jakarta.

Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama pada StokHatchery. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Jannah, S.N. 2014. Analisis Sekuens Gen Sitokrom Oksidase I DNA Mitokondria Lalat Buah *Basstrocerus* sp. Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang. Semarang.

Kangwira. 2014. Ayam Bekisar. Diakses pada 26 April 2019.
<<https://www.domesticforest.com/ayam-bekisar>>.

Karki, G. 2017. *Sanger's Method of Gene Sequencing*. Diakses pada 13 Mei 2019. <<https://www.onlinebiologynotes.com>>.

Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2006. *Pedoman Pembibitan Ayam Lokal yang baik (Good Native Chicken Breeding Practice)*. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 49/Permentan/OT.140/10/2006. Kementerian Pertanian Republik Indonesia, Jakarta.

Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weight, L.A., dan D.H. Janzen. 2005. Use of DNA Barcode to Identify Flowering Plants. *Proceedings of National Academy of Science of The United State America*. 102 (32): 8369-8374.

Lasley, J.F. 1978. *Genetics of Livestock Improvement 3rd Edition*. Prentice-Hall of India Private Limited, New Delhi.

Maftuchah, Winaya, A., dan Zainudin, A. 2015. Teknik Dasar Analisis Biologi Molekuler. Deepublish: Yogyakarta.

Mansjoer, S.S. 1985. Pengkajian sifat-sifat produksi ayam Kampung serta persilangannya dengan Rhode Island Red. *Disertasi*. Fakultas Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Martoenus, A. dan Djatmikowati, T.F. Teknik Pengambilan Darah pada Beberapa Hewan. DIAGNOSA VETERINER Buletin Informasi Kesehatan Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner 14(1): 6-12.

- Masir. 2016 . Status Deoxyribonucleic Acid (Dna) Dan Karakteristik Spermatozoa Pasca Penyimpanan Kauda Epididimis Pada Suhu 4oC. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.

Maxam, A.M. and W. Gilbert. 1997. A New Method for Sequencing DNA. *Proceeding of National Academy Science*. 74 (2): 560-564.

Mercier, J.C. 2019. *Red Junglefowl (Domestic Type) Gallus gallus domesticus*. Diakses pada 26 April 2019. <<https://ebird.org/species/redjun>>.

Muralidharan, K. and C. Wemmer. 1994. Transportting and Storing Field Collected Spesimen for DNA without Refrigeration for Subsequent DNA Extraction and Analysis. *BioTechniques*. 17(3): 420-422.

Niu, D., Y. Fu, J. Luo, H. Ruan, XP. Yu, G. Chen & YP. Zhang. 2002. The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. *Biochem. Genet.* 40: 163-174

Norman, J.A., Moritz, C., and C.J. Limpus. 1994. Mitochondrial DNA Control Region Polymorphism: Genetic Marker for Ecological Studies of MarineTurtle. *Molecular Ecology*. 3(4): 362-373.

Owen, D.W., and G.J. Ruiz. 1980. New Methods of Obtaining Blood and Cerebrospinal Fluid from Marine Turtle. *Herpetologica*. 36(1): 17-20.

Pemerintah Republik Indonesia. 2011. *Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 48 Tahun 2011 tentang Sumber Daya Genetik Hewan dan Perbibitan Ternak*. Pemerintah Republik Indonesia, Jakarta.

Prana M.S., Utami, E.B., Prahara, W., Suwito, E., and H.R. Kuswardhani. 1996. *Captive Breeding f Green Jungle Fowl (Gallus varius) in The TMII Bird Park*. Diakses pada 7 Mei 2011. <<http://www.seaza.org>>.

Pratama, P. 2015. Aplikasi Real-Time PCR untuk Mendeteksi Bakteri Salmonella sp. pada Hasil Perikanan. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Purwanto, A. Erwan, dan Sulistyastuti. 2007. Metode Penelitian Kuantitatif untuk Administrasi Publik, dan Masalah – Masalah Sosial. Gaya Media: Yogyakarta.

Ratnayani, Wirajana, dan Laksmiwati. 2007. Analisis Variasi Nukleotida Daerah D-Loop DNA Mitokondria pada Satu Individu Suku Bali Normal. *Jurnal Kimia* 1(1):7-14.

Roon, D.A., Waits, L.P., and K.C. Krndall. 2003. A Quantitive Evaluation of Two Methods for Preserving Hair Samples. *Molecular Ecology Notes*. 3(1): 163-166.

- Rusfidra. 2006. Pengembangan riset bioakustik di Indonesia; studi pada ayam kokok balenggek, pelung dan bekisar. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan Pengembangan MIPA*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.

Sanger, F., Nicklen, S., and A.R. Coulson. 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitor. *Proceedings of National Academy Science*. 74(12): 5463-5467.

Sartika, T. dan S. Iskandar. 2007. *Mengenal Plasma Nutfah Ayam Indonesia dan Pemanfaatannya*. Balai Penelitian ternak. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor.

Sarwono, B. 2003. *Beternak ayam buras*. Penebar Swadaya, Jakarta.

Sasmito, D.E.K., Kurniawan, R., dan Muhammadiyah, I. 2014. Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V. Fakultas Teknologi Industri, Universitas Islam Indonesia. Yogyakarta.

Schmidt H. 2003. Phylogenetic Trees From Large Datasets. Inaugural Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Düsseldorf University.

Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir al-Misbah; Pesan, Kesan, dan Keserasian Alquran Vol. 5*. Lentera Hati, Jakarta.

Sidadolog, J.H.P. 2007. Pemanfaatan dan Kegunaan Ayam Lokal Indonesia. In Dwiyanto, K., dan S.N. Prijono. *Keanekaragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia: Manfaat dan Potensi*. LIPI Press, Jakarta.

Siswanto, J.E., Berlian, T., Putricahaya, E., Panggalo, L.V., Yuniani, L. 2016. Isolasi DNA pada Sampel Darah Tepi dan Swab Buccal pada Bayi Penderita ROP: Perbandingan Hasil Uji Konsentrasi dan Indeks Kemurnian. *Sari Pediatri*. 18(4): 270-277.

Sorenson. M.D. *Avian mtDNA Primers*. Diakses pada 29 April 2019. <<http://people.bu.edu/msoren/primers.html>>.

Stevens, L. 1991. *Genetics and Evolution of The Domestic Fowl*. Cambridge University Press, Victoria.

Sudiro, F. 1993. *Aneka Ayam Hias dan Piaraan*. Kanisius, Yogyakarta.

Sudjadi. 2008. Bioteknologi Kesehatan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.

- Sukartiningrum, S.D. 2012. Penentuan Pohon Filogenetik Bakteri Xilanolitik Sistem Abdominal Rayap Tanah Berdasarkan 16S rRNA. Skripsi. Fakultas Kimia. Universitas Airlangga. Surabaya.

Sulandari, S., Zein, M.S.A., Paryanti, S., dan T. Sartika. 2007. Taksonomi dan Asal Usul Ayam Domestikasi. In Dwiyanto, K., dan S.N. Priyono. *Keanekaragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia: Manfaat dan Potensi*. LIPI Press, Jakarta.

Sulandari, S., Zein, M.S.A., Sutrisno, H., Dharmayanthi, A.B., dan I. Natalia. 2013. In Zein, M.S.A. dan D.M. Prawiradilaga. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Kencana Prenada Media Group, Jakarta.

Susilowati, T. 2019. Deteksi Kontaminan Dna Babi Pada Sampel Penggilingan Daging Di Pasar Surya Kota Surabaya Menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Sunan Ampel Surabaya.

Sutrisno, H., Zein, M.S.A., dan S. Sulandari. 2013. DNA Barcode. In Zein, M.S.A. dan D.M. Prawiradilaga. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Kencana Prenada Media Group, Jakarta.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.

Tarigan, N., dan S. Hermanto. 1991. *Bekisar: Pemeliharaan dan Pengembangbiakan Secara Modern*. Kanisius, Yogyakarta.

Tim Avery. 2018. *Green Junglefowl Gallus varius*. Diakses pada 26 April 2019. <<https://ebird.org/species/grejun1>>.

Ulfah, M. 2016. Keragaman Genetik Ayam Asli Indonesia yang Langka Berdasarkan Analisis Sekuen Komplit Daerah D-Loop Mitokondria dan Gen Myxovirus (Mx) Resistance. *Disertasi*. Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Wollny, C.B.A. 2003. The Need to Conserve Farm Animal Genetic Resources in Africa: Should Policy Makers be Concerned? *Ecological Economics*. 45(3): 341-351.

Wood-Gush, D.G.M. 1971. *The Behavior of The Domestication Fowl*. Heinemann Educational Book Ltd, London.

Yuwono, T. 2007. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Andi Publisher: Yogyakarta.

Zein, M.S.A., dan S. Sulandari. 2009. Investigasi Asal Usul Ayam Indonesia Menggunakan Sekuens Hypervariable-1 D-loop DNA Mitokondria. *Jurnal Veteriner*. 10(1): 41-49.