

**IDENTIFIKASI TITIK MUTASI PADA GEN PROLAKTIN (PRL)
SEBAGAI KANDIDAT PENANDA GENETIK AYAM KEDU**

SKRIPSI

Oleh

FADIYAH NUR HASNA



**PROGRAM STUDI S1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2025**

IDENTIFIKASI TITIK MUTASI PADA GEN PROLAKTIN (PRL)
SEBAGAI KANDIDAT PENANDA GENETIK AYAM KEDU

Oleh

FADIYAH NUR HASNA
NIM : 23010121130097

Salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Peternakan pada Program Studi S1 Peternakan
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

PROGRAM STUDI S1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2025

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fadiyah Nur Hasna
NIM : 23010121130097
Program Studi : S1 Peternakan

dengan ini menyatakan sebagai berikut:

1. Skripsi yang berjudul: **Identifikasi Titik Mutasi pada Gen Prolaktin (PRL) Sebagai Kandidat Penanda Genetik Ayam Kedu** dan penelitian yang terkait merupakan karya penulis sendiri
2. Setiap ide atau kutipan dari orang lain berupa publikasi atau bentuk lainnya dalam skripsi ini, telah diakui sesuai dengan standar prosedur disiplin ilmu.
3. Penulis juga mengakui bahwa skripsi ini dapat dihasilkan berkat bimbingan dan dukungan penuh dari Pembimbing yaitu: **Ir. Sutopo, M.Sc., Ph.D.** dan **Dr. Dela Ayu Lestari, S. Pt., M. Si.**

Apabila dikemudian hari dalam skripsi ini ditemukan hal-hal yang menunjukkan telah dilakukannya kecurangan akademik maka penulis bersedia gelar sarjana yang telah penulis dapatkan ditarik sesuai dengan ketentuan dari program studi S1 Peternakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

Semarang, September 2025
Penulis,



Fadiyah Nur Hasna

Mengetahui,

Pembimbing Utama



Ir. Sutopo, M.Sc., Ph.D.

Pembimbing Anggota



Dr. Dela Ayu Lestari, S.Pt., M.Si.

Judul Skripsi : IDENTIFIKASI TITIK MUTASI PADA
GEN PROLAKTIN (PRL) SEBAGAI
KANDIDAT PENANDA GENETIK AYAM
KEDU

Nama Mahasiswa : FADIYAH NUR HASNA


Nomor Induk Mahasiswa : 23010121130097

Program Studi/Departemen : SI PETERNAKAN/PETERNAKAN

Fakultas : PETERNAKAN DAN PERTANIAN


Telah disidangkan di hadapan Tim Penguji dan
dinyatakan lulus pada.....2-2-AUG-2025

Pembimbing Utama



Ir. Sutopo, M.Sc., Ph.D.

Pembimbing Anggota



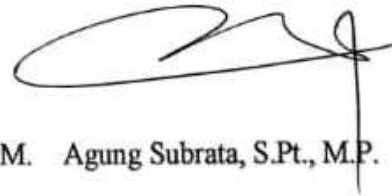
Dr. Dela Ayu Lestari, S.Pt., M.Si.

Ketua Program Studi



Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM.

Ketua Panitia Ujian Akhir Program




Agung Subrata, S.Pt., M.P.



Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D.

Ketua Departemen



Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM.

RINGKASAN

FADIYAH NUR HASNA. 23010121130097. 2025. Identifikasi Titik Mutasi pada Gen Prolaktin (PRL) Sebagai Kandidat Penanda Genetik Ayam Kedu. (Pembimbing: **SUTOPO** dan **DELA AYU LESTARI**).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi titik mutasi pada gen PRL pada ayam Kedu sebagai kandidat *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) yang dapat dijadikan penanda genetik. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari hingga Mei 2025 di Laboratorium Genetika, Pemuliaan, dan Reproduksi, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah.

Materi penelitian yang digunakan adalah 15 ekor ayam Kedu betina umur 5 bulan terdiri dari ayam Kedu hitam jengger merah dan jengger hitam serta ayam Kedu putih. Bahan yang digunakan yaitu kit ekstraksi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), alkohol, etanol, *Phosphate Buffer Saline*, *Tris Borate/Ethylenediaminetetraacetic Acid* (EDTA), taq polymerase, Nuclease-free Water, agarose, DNA stain, loading dye, DNA ladder, dan primer. Alat yang digunakan meliputi spuit 3 ml, mikropipet, tip mikropipet, lateks, vortex, *dry block heater*, *Centrifuge*, Mesin elektroforesis horizontal, mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR), microwave, *gel tray*, *gel combs*, dan *Gel Documentation System*.

Metode yang dilakukan meliputi pengambilan sampel darah, ekstraksi DNA, amplifikasi gen PRL, elektroforesis, sekuensing, dan analisis data. Parameter yang diamati adalah identifikasi titik mutasi, frekuensi genotip, frekuensi alel, dan heterozigositas. Analisis data dilakukan menggunakan MEGA 12 dan dnaSP.v6.

Berdasarkan hasil analisis, didapatkan fragmen gen PRL sepanjang 553 bp yang terletak pada situs ke-7.868 sampai 8.420 sesuai GenBank *accession number* AF288765.2. Titik mutasi ditemukan pada situs ke 454 (g.8321) yang merupakan *parsimony informative sites* karena terdapat dua nukleotida berbeda yang muncul pada lebih dari satu individu. Frekuensi genotip CC sebesar 0,067, sedangkan CT dan TT masing masing adalah 0,666 dan 0,267. Frekuensi alel C sebesar 0,4 dan alel T sebesar 0,6. Nilai heterozigositas sebesar 0,48 yang tergolong sedang. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ditemukan mutasi pada titik ke 454 C > T dengan alel C dan T, serta membentuk genotip CC, CT, dan TT.

KATA PENGANTAR

Ayam Kedu merupakan ayam lokal asli Kecamatan Kedu, Kabupaten Temanggung yang memiliki keunggulan genetik pada pertumbuhan dan produksi telurnya. Genetik dan lingkungan merupakan faktor yang mempengaruhi sifat reproduksi pada ayam Kedu yang dapat mempengaruhi produksi telur. Salah satu faktor genetik yang mempengaruhi sifat reproduksi adalah variasi gen yang terbentuk akibat adanya mutasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi titik mutasi pada gen prolaktin pada ayam kedu yang berpotensi menjadi *Single Nucleotide Polymorphism* sebagai kandidat penanda genetik.

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan penulisan skripsi. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada pihak yang terkait dalam penyelesaian skripsi:

1. Dosen pembimbing Ir. Sutopo, M.Sc., Ph.D. dan dosen pembimbing anggota Dr. Dela Ayu Lestari, S.Pt., M.Si. yang telah memberikan waktu, tenaga, dan ilmunya dalam membimbing penulis hingga selesai masa studi.
2. Dekan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D., Ketua Departemen Peternakan Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM, Ketua Program Studi S1 Peternakan Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM, seluruh staf dan karyawan akademik yang telah berjasa dalam urusan akademik dan segala proses penulis selama menempuh kuliah di Universitas Diponegoro.
3. Bapak Asep Setiaji, S.Pt., M.Si., Ph.D. selaku Koordinator Laboratorium Genetika, Pemuliaan dan Reproduksi,

4. Prof. Dr. Ir. Luthfi Djauhari, M.Sc. selaku dosen wali yang telah memberikan dukungan kepada penulis selama menjadi mahasiswi di Universitas Diponegoro.
5. Dosen dan staf laboratorium Genetika, Pemuliaan dan Reproduksi Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan untuk belajar dan mengembangkan potensi, memberikan waktu, tempat, tenaga, dan penelitian bagi penulis.
6. Kedua orang tua penulis yaitu Bapak Mardoyo dan Ibu Ika serta seluruh keluarga yang selalu memberikan doa dan dukungan kepada penulis.
7. Muhammad Nabil Alfaruq yang selalu memberikan semangat, motivasi, dan dukungan kepada penulis.
8. Seluruh Tim Asisten Laboratoruim Genetika, Pemuliaan dan Reproduksi yang telah membantu kelancaran dan memberi semangat kepada penulis.
9. Seluruh pihak yang terlibat, memberikan dukungan dan memberikan bantuan hingga penulisan skripsi selesai.

Penulis berharap, semoga skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak dan menjadi salah satu referensi bagi pembaca dalam bidang genetika dan pemuliaan ternak.

Semarang, Agustus 2025

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR ILUSTRASI	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Ayam Kedu.....	4
2.2. Mutasi	5
2.3. <i>Prolactin</i> (PRL)	6
2.4. Ekstraksi DNA.....	7
2.5. Elektroforesis	7
2.6. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	8
2.7. Sekuensing DNA	9
BAB III. MATERI METODE.....	11
3.1. Materi Penelitian.....	11
3.2. Metode Penelitian	11
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1. Hasil Sekuensing Gen PRL Ayam Kedu	19
4.2. Identifikasi Titik Mutasi Gen PRL pada Ayam Kedu	20
4.3. Frekuensi Alel Gen PRL Pada Ayam Kedu.....	22
4.4. Frekuensi Genotip Gen PRL pada Ayam Kedu	24
4.5. Heterozigositas Gen PRL pada Ayam Kedu.....	26
4.6. Alternatif Identifikasi SNP pada Hasil Temuan Mutasi	26

BAB V. SIMPULAN DAN SARAN	30
5.1. Simpulan.....	30
5.2. Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	37
RIWAYAT HIDUP.....	43

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Tahapan Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	16
2.	Kromatogram dan Posisi Titik Mutasi Gen PRL.....	21
3.	Nilai Frekuensi Alel, Frekuensi Genotip, dan Heterozigositas Titik Mutasi Gen PRL pada Ayam Kedu.....	23

DAFTAR ILUSTRASI

Nomor	Halaman
1. Proses Pengambilan Sampel Darah Ayam.....	12
2. Proses Pemindahan Sampel pada GS Column yang Sudah Diberi <i>Collection tube</i>	13
3. Proses Pencetakan Gel Agarose untuk Media Elektroforesis.....	14
4. Proses <i>Loading</i> Elektroforesis.....	15
5. Proses Amplifikasi Gen PRL	16
6. Hasil Elektroforesis <i>Quality Check</i> dari PT Genetika Science Indonesia.....	19

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Dokumentasi Sampel Ayam Kedu Betina.....	37
2. Langkah Analisis Sekuen dengan MEGA12.....	38
3. Langkah Analisis Situs Segregasi Menggunakan DnaSP.6.....	39
4. Kromatogram pada Titik Mutasi Tiap Sampel.....	40

BAB I

PENDAHULUAN

Ayam Kedu merupakan ayam lokal asli Kecamatan Kedu, Kabupaten Temanggung, Jawa Tengah, yang dapat dimanfaatkan telur dan dagingnya. Ayam Kedu memiliki keunggulan genetik pada pertumbuhan dan produksi telurnya yang lebih baik daripada ayam lokal lainnya (Arianto *et al.*, 2019). Menurut Rukmana (2003), ayam Kedu dewasa mampu mencapai bobot 2-2,5 kg dan dapat memproduksi telur sebanyak 226 butir/tahun. Menurut Habsari *et al.* (2019), umur bertelur pertama ayam Kedu yaitu 6-7 bulan. Sifat reproduksi tersebut penting untuk keberlangsungan peternakan ayam petelur, sehingga perlu dimaksimalkan karena dapat mempengaruhi produksi telur.

Sifat reproduksi dapat dimaksimalkan melalui seleksi genetik. Seleksi genetik secara konvensional berdasarkan fenotip membutuhkan waktu yang lama dan kurang efisien sehingga perlu dilakukan penelitian secara molekuler yang lebih cepat dan akurat dengan menggunakan penanda genetik, yang salah satunya yaitu dengan identifikasi titik mutasi pada gen yang berhubungan dengan sifat reproduksi ayam Kedu. Mutasi adalah perubahan urutan genetik yang dapat berupa perubahan, penambahan, ataupun pengurangan nukleotida sehingga dapat meningkatkan keragaman suatu organisme (Ochtavia *et al.*, 2024). Mutasi terjadi ketika berubahnya satu atau beberapa pasangan nukleotida dalam sekuens genome sehingga terbentuk variasi sekuens *Deoxyribonucleic Acid* (DNA).

Mutasi dapat mempengaruhi fungsi protein yang dapat mempengaruhi ekspresi gen (Fauziah, 2025). Keberadaan titik mutasi dapat memicu variasi sifat fenotip sehingga titik mutasi dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk seleksi sifat tertentu, salah satunya sifat reproduksi.

Gen *Prolactin* (PRL) adalah gen pengkode hormon prolaktin pada kelenjar adenohipofisis yang berperan pada fungsi reproduksi. Gen PRL mempengaruhi fungsi reproduksi ayam melalui pengaturan sifat mengeram. Peningkatan kadar prolaktin yang memicu perilaku mengeram dapat menyebabkan regresi ovarium dan penurunan produksi telur (Kilatsih *et al.*, 2020). Menurut Rohmah *et al.* (2022) wilayah exon 5 pada gen PRL dapat digunakan untuk penanda genetik dalam program seleksi produksi telur pada ayam IPB-D1. Selain itu, penelitian asosiasi gen PRL dengan sifat reproduksi ayam sudah pernah dilakukan oleh Rosalinda *et al.* (2025) pada persilangan ayam Merawang dengan KUB dan persilangan ayam Murung Panggang dengan KUB. Penelitian mengenai asosiasi gen PRL dengan sifat reproduksi pada ayam Kedu belum pernah dilaporkan, sehingga identifikasi titik mutasi pada gen PRL perlu dilakukan untuk diketahui potensinya sebagai kandidat penanda genetik sifat reproduksi pada ayam Kedu.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi titik mutasi pada gen PRL wilayah exon 5 pada ayam Kedu yang berpotensi menjadi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) yang dapat dijadikan penanda genetik. Manfaat yang diperoleh yaitu untuk memberikan informasi mengenai kandidat SNP sebagai penanda genetik ayam Kedu yang dapat berkontribusi terhadap program seleksi dan pemuliaan yang berkaitan dengan sifat reproduksi sehingga produksi telur

ayam Kedu dapat ditingkatkan. Parameter yang diamati adalah identifikasi titik mutasi, frekuensi genotip, frekuensi alel, dan heterozigositas. Hipotesis penelitian ini yaitu terdapat titik mutasi pada gen PRL wilayah exon 5 yang berpotensi menjadi kandidat SNP sebagai penanda genetik yang berkaitan dengan sifat reproduksi ayam Kedu.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ayam Kedu

Ayam Kedu merupakan unggas lokal asli Kecamatan Kedu, Kabupaten Temanggung, Jawa Tengah, yang dapat dimanfaatkan telur dan dagingnya (Baharudin *et al.*, 2019). Menurut Azizah *et al.* (2021), ayam Kedu merupakan hasil persilangan ayam Dorking dengan ayam Buras yang sudah diseleksi dari daerah Dieng. Ayam Kedu dapat dibedakan berdasarkan warna jengger dan warna bulunya. Berdasarkan warna jengger ayam Kedu dibagi menjadi ayam Kedu hitam jengger merah dan ayam Kedu hitam jengger hitam, sedangkan berdasarkan warna bulunya, ayam Kedu dibagi menjadi ayam Kedu putih, lurik, dan hitam (Latifah *et al.*, 2020).

Ayam Kedu memiliki daya adaptasi yang tinggi dan produktivitas yang relatif lebih tinggi dibanding ayam lokal lainnya. Ayam Kedu dapat dengan mudah beradaptasi dengan lingkungannya menjadikan pertumbuhan dan produksi telur ayam Kedu relatif lebih baik dari pada ayam lokal lainnya (Indriana *et al.*, 2023). Produktivitas telur ayam Kedu lebih tinggi daripada ayam Kampung biasa yaitu mencapai 72% dengan rata rata berat telur 39,2 gram untuk ayam Kedu putih dan 75% dengan berat telur 44,7 gram untuk ayam Kedu hitam (Sujionohadi dan Setiawan, 2016).

2.2. Mutasi

Mutasi adalah perubahan urutan genetik yang dapat berupa perubahan, penambahan, ataupun pengurangan nukleotida sehingga dapat meningkatkan keragaman suatu organisme (Ochtavia *et al.*, 2024). Titik mutasi adalah posisi situs yang mengalami mutasi. Mutasi ada berbagai macam, diantaranya yaitu mutasi nukleotida dan mutasi kromosom. Mutasi nukleotida terdiri dari mutasi titik, insersi, delesi, transisi, dan transversi. Mutasi insersi adalah mutasi yang terjadi penambahan nukleotida pada sekuen genom (Haryati *et al.*, 2023). Mutasi delesi adalah pengurangan nukleotida pada suatu sekuen, hilangnya satu atau dua nukleotida dapat menyebabkan terbentuknya polipeptida yang inaktif (Miraj *et al.*, 2022).

Mutasi transisi adalah mutasi yang terjadi apabila basa pirimidin (sitosin dan timin) diganti dengan pirimidin lain atau basa purin (adenin dan guanin) diganti purin lain (Haryati *et al.*, 2023). Mutasi transisi adalah mutasi yang terjadi apabila basa pirimidin (sitosin dan timin) diganti dengan basa purin (adenin dan guanin) ataupun sebaliknya (Gaina dan Amalo, 2023).

Variasi mutasi titik terdiri dari *singleton* dan *parsimony*. *Singleton* adalah jenis variasi titik mutasi yang perbedaan nukleotidanya hanya ditemukan pada satu individu (Duryadi *et al.*, 2014). *Parsimony informative sites* adalah situs yang memiliki setidaknya dua nukleotida berbeda yang muncul pada setidaknya dua individu (Warseno *et al.*, 2022). Mutasi yang menyebabkan adanya variasi sekuen DNA yang berpotensi menjadi penanda genetik atau DNA yang dapat berperan pada program pemuliaan (Salisu *et al.*, 2018).

2.3. *Prolactin* (PRL)

Prolactin (PRL) adalah gen pengkode hormon prolaktin atau hormon luteotropic (LTH) pada kelenjar adenohipofisis yang berperan pada fungsi reproduksi ayam melalui pengaturan sifat mengeram. Gen PRL terletak pada kromosom 2 yang terdiri dari 5 exon dan 4 intron (Osman *et al.*, 2017). Berdasarkan informasi dari NCBI, gen PRL pada ayam memiliki panjang 9.536 *basepair* (bp) (GenBank AF288765.2). Gen PRL pada ayam terletak di titik awal gen dan berperan penting untuk transkripsi awal, sehingga apabila terjadi mutasi pada area promotor dapat mengganggu pengikatan RNA polimerase sehingga dapat menghambat ekspresi gen (Tu *et al.*, 2023). Berkurangnya ekspresi gen PRL memicu penurunan perilaku mengeram sehingga dapat mempengaruhi sifat reproduksi serta meningkatkan produksi telur.

Penelitian terdahulu menyatakan bahwa gen PRL berasosiasi dengan sifat reproduksi ayam. Rosalinda *et al.* (2025) melaporkan bahwa ditemukan mutasi pada situs ke 8052 T > C, 8187 C > T, 8187 C > T yang berasosiasi signifikan dengan bobot telur dan panjang telur pada persilangan ayam Merawang dengan KUB dan persilangan ayam Murung Panggang dengan KUB. Penelitian lain yang dilakukan Li *et al.* (2013) menunjukkan terdapat mutasi pada situs ke 8052 T > C dan 8113 G > C yang berasosiasi signifikan dengan umur pertama bertelur dan produksi telur 300 hari pertama pada ayam Recessive White dan Qingyuan Partridge. Rohmah *et al.* (2022) juga melaporkan bahwa ditemukan mutasi pada situs ke 8052 T > C yang berasosiasi signifikan dengan HDP pada ayam IPB-D1.

2.4. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA adalah proses pemisahan DNA dari komponen seluler lainnya (Kamagi, 2018). Tahapan ekstraksi DNA yaitu lisis atau perusakan dinding sel, pemisahan DNA, dan pemurnian DNA (Syafaruddin dan Santoso, 2020). Tahapan lisis adalah tahapan penghancuran membran sel menggunakan enzim Proteinase K, enzim tersebut akan merusak protein dan *Sodium Dodecyl Sulfat* untuk mengikat lemak yang menyebabkan isi sel keluar karena membran sel rusak (Kamaliah, 2017). Tahapan pemisahan DNA yaitu tahapan pemisahan DNA dari makromolekul lain seperti lipid, polisakarida, protein, serta sebagian kecil RNA (Wasdili *et al.*, 2022). Tahapan pemurnian yaitu tahapan penghilangan residu dari zat yang digunakan pada proses lisis dan isolasi DNA (Hutami *et al.*, 2018). Setelah ekstraksi DNA, dilakukan elektroforesis menggunakan agarose 1% kemudian hasil elektroforesis dilihat pada *gel documentation system* untuk diketahui keberhasilan ekstraksi DNA. Keberhasilan ekstraksi DNA ditandai dengan adanya band DNA yang tidak *smear* (berbayang) (Hidayati *et al.*, 2016). Hasil dari ekstraksi DNA dijadikan sebagai template DNA untuk amplifikasi gen.

2.5. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan molekul bermuatan listrik berupa kation maupun anion berdasarkan perbedaan tingkat perpindahannya dalam suatu medan listrik yang dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, muatan dari molekul tersebut, serta kekentalan medium (Harahap, 2018). Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui keberhasilan ekstraksi DNA maupun amplifikasi

suatu gen. Metode elektroforesis gel merupakan metode yang biasa digunakan untuk pemisahan DNA dan protein serta metode yang digunakan untuk mengetahui keberhasilan ekstraksi DNA maupun amplifikasi suatu gen pada proses PCR. Prinsip dasar elektroforesis gel yaitu molekul DNA, RNA, atau protein yang bermuatan negatif akan bergerak menuju elektroda positif sehingga molekul molekul tersebut dapat dipisahkan dan laju perpindahannya dipengaruhi oleh ukuran molekulnya (Jumrah, 2024). Penggunaan metode elektroforesis gel memerlukan larutan elektrolit yang memiliki fungsi untuk menghantarkan arus listrik dalam elektroforesis berupa buffer (Ulfin *et al.*, 2016).

2.6. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah proses amplifikasi (memperbanyak) suatu sekuens DNA yang memiliki tahapan pra-denaturasi, denaturasi, *annealing*, dan ekstensi (Shidiq *et al.*, 2023). Denaturasi merupakan proses pemisahan rantai ganda pada DNA menjadi rantai tunggal dengan suhu tinggi sekitar 94°C, *annealing* merupakan proses penempelan primer spesifik pada DNA dengan suhu 50-60°C, ekstensi merupakan proses pemanjangan masing-masing rantai tunggal yang telah ditandai primer sehingga DNA tersebut tereplikasi pada suhu 72°C (Wang *et al.*, 2024). Tahapan PCR akan diulang membentuk siklus dan semakin banyak siklus yang digunakan maka produk PCR yang akan dihasilkan semakin banyak. Menurut Satiyarti *et al.* (2017) dibutuhkan sekitar 25-30 siklus PCR supaya produk amplifikasi yang dihasilkan lebih banyak.

2.7. Sekuensing DNA

Sekuensing merupakan proses untuk mendapatkan urutan nukleotida suatu gen tertentu (Mahindra *et al.*, 2020). Metode Maxam-Gilbert merupakan metode sekuensing generasi pertama dengan cara pelabelan DNA menggunakan bahan kimia radioaktif yang dianjurkan digunakan untuk menganalisis sekuen kurang dari 500 bp (Eren *et al.*, 2022). Metode sekuensing yang sering digunakan saat ini yaitu metode Sanger dan *Next Generation Sequencing* (NGS). Sekuensing metode Sanger sering digunakan untuk mempelajari genome sedangkan NGS merupakan metode sekuensing yang lebih modern dengan preparasi sampel yang mudah dan cepat serta sangat efektif untuk mendiagnosa suatu penyakit (Eren *et al.*, 2022). Menurut Coriu *et al.* (2014) metode NGS lebih sensitif dalam mendeteksi mutasi dan lebih hemat biaya daripada metode Sanger apabila sampel yang digunakan banyak karena kemampuannya untuk menggabungkan banyak analisis dalam satu kali jalankan (*multiplexing*) sehingga biaya per sampel menjadi sangat rendah. Data yang diperoleh dari sekuensing berupa elektrogram dalam bentuk ABI file, setiap nukleotida berbeda akan ditunjukkan dengan warna berbeda pula yaitu warna hijau untuk Adenin, warna biru untuk Sitosin, warna hitam untuk Guanin, dan warna merah untuk Timin (Sjafaraenan *et al.*, 2018).

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian akan dilaksanakan pada 6 Januari – 25 April 2025. Ekstraksi DNA, PCR, dan analisis data penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika, Pemuliaan dan Reproduksi, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Tahapan *sequencing* dilaksanakan melalui PT. Genetika Science Indonesia.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan pada penelitian ini adalah 15 ekor ayam Kedu betina umur 5 bulan yang memiliki tetua berbeda. Ayam yang digunakan terdiri dari 9 ekor ayam Kedu hitam jengger merah, 4 ekor ayam Kedu hitam jengger hitam, dan 2 ekor ayam Kedu putih. Ayam yang digunakan dipilih dari 60 ekor ayam Kedu betina, dan kode ayam yang terpilih adalah 18, 38, 39, 42, 44, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 55, 56, dan 57. Dokumentasi ayam Kedu yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

Alat yang digunakan meliputi *cooling box*, *ice gel*, *OneMed Disposable Syringe* 3 ml, *Vaculab*[®] EDTA. K3 3 ml, *microcentrifuge tube* 1,5 ml, *Collection tube*, *GS column*, mikropipet, mikropipet tip, lateks, *vortex*, *dry Block Heater Thermo*, *High-speed refrigerated Centrifuge eppendorf 5427 R*, *beaker glass* 1000 ml, *erlenmeyer* 50 ml, *Mupid EXu Submarine (Horizontal) Type Electrophoresis System*, mesin *Polymerase Chain Reaction (PCR) Benchmark TC 9639 Thermal Cycler with Multiformat Block*, *microwave*, *plastic wrap*, *selotip*, *magnetic stirrer*,

magnetic stirrer bar, gel tray, gel combs, Labnet Enduro™ GDS Touch II, tisu, serta alat tulis. Bahan yang akan digunakan meliputi alkohol, etanol, Phosphate Buffer Saline (PBS), aquades, sepasang primer forward dan reverse dengan desain forward: 5'-CTGTTCTACACCCAGACAGATTGA-3' dan reverse: 5'-AAGGTATAAGCCATCCCAGCTATT-3' berdasarkan penelitian Rosalinda et al. (2025), bahan bahan lain yang diperlukan adalah Nuclease-free Water, Tris Borate/EDTA, gel agarose, loading dye, FloroSafe DNA stain, my taq polymerase HS red mix, serta Geneaid-gSYNC™ DNA Extraction Kit GS100 yang terdiri dari Proteinase K, GSB Buffer, W1 Buffer, Wash Buffer, dan Elution Buffer.

3.2. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode observasi langsung. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap diantaranya pengambilan sampel darah ayam, ekstraksi DNA, pembuatan gel agarose, elektroforesis, PCR, sekuensing DNA, dan analisis data. Tahapan penelitian dijelaskan sebagai berikut:

3.2.1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel darah ayam Kedu diambil sebanyak 3 ml melalui vena *brachialis* yang terletak di bawah sayap ayam menggunakan spuit (Ilustrasi 1). Darah yang telah diambil dimasukkan dalam tabung vakum EDTA dan segera dihomogenisasi untuk mencegah terjadinya koagulasi, lalu darah disimpan di dalam *cooling box* yang sudah diberi *ice gel* selama distribusi, kemudian darah ditaruh di *freezer* hingga analisis laboratorium dilakukan.



Ilustrasi 1. Proses Pengambilan Sampel Darah Ayam Kedu Putih

1.2.2. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan protocol Geneaid-gSYNCTM DNA *Extraction Kit* yaitu dengan cara sebanyak 15 μ l sampel darah ayam dipindahkan pada *microtube* 1,5 ml menggunakan mikropipet. Kemudian 200 μ l *Phosphate Buffer Saline* (PBS) ditambahkan pada *microtube* tersebut. Selanjutnya 20 μ l *Proteinase K* ditambahkan pada campuran tersebut lalu dihomogenkan menggunakan vortex. Campuran yang sudah homogen diinkubasi menggunakan *dry block heater* dengan suhu 60°C selama 15 menit.

Setelah inkubasi selesai, campuran tersebut diberi reagen GSB sebanyak 200 μ l kemudian dihomogenkan menggunakan vortex lalu diinkubasi kembali menggunakan *dry block heater* selama 30 menit. Secara berulang, setiap 5 menit sekali sampel dihomogenisasi menggunakan vortex.

Selanjutnya 200 μ l ethanol *absolute* ditambahkan pada campuran dan dihomogenisasi menggunakan vortex kemudian sampel dipindahkan pada GS Column yang sudah diberi *collection tube* (Ilustrasi 2). Sampel kemudian disentrifugasi menggunakan *High-speed refrigerated Centrifuge* dengan

kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit, selanjutnya *collection tube* pada GS Column diganti yang baru dan ditambahkan reagen W1 lalu sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.500 rpm selama 5 menit. Setelahnya, pellet dibuang dan *collection tube* dipasang kembali lalu *wash* buffer ditambahkan pada Column. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 5 menit kemudian pellet dibuang dan *collection tube* dipasang kembali. Matriks pada GS Column perlu dikeringkan dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya *collection tube* diganti menggunakan *microtube* 1,5 µl yang sudah diberi kode sampel.

Sebanyak 75 µl elution buffer yang sudah dihangatkan dituangkan di tengah tengah matriks pada GS Column lalu diinkubasi selama 3 menit di atas *ice gel* kemudian sampel disentrifugasi rpm selama 5 menit dengan 11.000. Langkah tersebut dilakukan sebanyak 2 kali. GS Column dibuang, kemudian sampel DNA pada *microtube* dimasukkan ke *freezer* hingga analisis PCR dilakukan.



Ilustrasi 2. Proses Pemindahan Sampel pada GS Column yang Sudah Diberi *Collection tube*

1.2.3. Pembuatan gel agarose

Gel agarose digunakan untuk proses elektroforesis. Gel agarose yang digunakan memiliki konsentrasi 1% yang dibuat dengan cara mencampurkan bubuk agarose yang sudah ditimbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 0,5 gram dengan ditambahkan 50 ml TBE 1X yang dimasukkan pada erlenmeyer. Kemudian erlenmeyer ditutup menggunakan plastik wrap dan diberi lubang kecil di tengahnya. Larutan tersebut kemudian dicampurkan dengan cara dipanaskan menggunakan microwave selama satu menit sebanyak 3x dengan masing masing gelombang yaitu 600λ, 450λ, dan 100λ. Selanjutnya erlenmeyer diambil menggunakan serbet kemudian plastik wrap dibuka dan larutan gel didiamkan selama 3-5 menit hingga tidak terlalu panas kemudian larutan gel diberi 2 μl *FloroSafe DNA stain* dan dihomogenkan. Selanjutnya larutan gel dituang pada *gel tray* yang sudah diberi selotip di pinggirannya dan telah dipasang *gel comb* untuk mencetak sumur. Larutan gel didiamkan hingga mengeras dan berbentuk sesuai cetakan (Ilustrasi 3).



Ilustrasi 3. Proses Pencetakan Gek Agarose untuk Media Elektroforesis

3.2.4. Evaluasi ekstraksi DNA melalui elektroforesis

Evaluasi keberhasilan ekstraksi DNA melalui elektroforesis dilakukan dengan cara ditematkannya gel yang sudah memadat pada mesin elektroforesis horizontal, kemudian diberi larutan TBE 1X sebagai konduktor hingga gel terendam. Sebanyak 3 μ l sampel DNA dicampur dengan 1 μ l loading dye kemudian dimasukkan pada sumur yang terdapat pada gel. Elektroforesis diatur dengan tegangan 100 volt selama 20 menit. Kemudian hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan cahaya UV pada GDS. Proses *loading* atau memasukan sampel DNA hasil ekstraksi saat elektroforesis dapat dilihat pada Ilustrasi 4.



Ilustrasi 4. Proses *Loading* Elektroforesis

3.2.5. Amplifikasi gen PRL

Amplifikasi gen dilakukan dengan cara mencampurkan *MyTaq*TM HS Red Mix sebanyak 25 μ l dengan 1 μ l primer PRL *forward*, 1 μ l primer PRL *reverse*, 5 μ l DNA template, dan 18 μ l *Nuclease-free water*. Campuran tersebut ditempatkan pada *PCR Tube* dan dihomogenkan menggunakan *vortex* lalu diamplifikasi

menggunakan mesin PCR (Ilustrasi 5). Tahapan PCR yang dilaksanakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tahapan Proses (*Polymerase Chain Reaction*) PCR

Tahapan	Suhu ---(°C)---	Waktu ---(detik)---	Siklus
<i>Initial denaturation</i>	95	60	1
<i>Denaturation</i>	95	15	35
<i>Annealing</i>	56	15	35
<i>Extension</i>	72	10	35
<i>Final Extension</i>	72	300	1



Ilustrasi 5. Proses Amplifikasi Gen PRL

3.2.6. Evaluasi amplifikasi gen melalui elektroforesis

Evaluasi keberhasilan amplifikasi gen PRL melalui elektroforesis dilakukan dengan cara menempatkan gel yang sudah memadat pada mesin elektroforesis horizontal yang kemudian diberi larutan TBE 1X sebagai konduktor hingga gel terendam seluruhnya. Selanjutnya sebanyak 3 µl sampel hasil PCR dimasukkan pada sumur gel. Diakhir sumur gel diberi 3 µl DNA ladder supaya panjang sekuen DNA dapat diketahui sehingga keberhasilan amplifikasi gen target dapat

diketahui. Elektroforesis diatur dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Elektroforesis divisualisasikan menggunakan cahaya UV pada GDS.

3.2.7. Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk mendapatkan urutan nukleotida sekuen gen PRL yang sudah diamplifikasi. Tahapan *sekuensing* DNA dilaksanakan melalui jasa pelayanan PT. Genetika Science Indonesia yang dilakukan dengan cara mengirim sampel yang sudah diamplifikasi beserta primer *forward* dan *reverse*. Setiap sampel yang dikirim disegel menggunakan parafilm pada tutup masing masing tube. Setelah itu mengisi form pemesanan terkait kode sampel dan primer. *Quality Check* (QC) dilakukan pada sampel yang dikirim, apabila lolos QC maka sampel akan dilanjutkan sekuensing dengan metode Sanger.

3.2.8. Analisis data

Identifikasi titik mutasi dilakukan menggunakan software MEGA12 dan DnaSP.6. MEGA12 merupakan versi terbaru MEGA11. Software MEGA11 digunakan untuk menganalisis hasil *sekuensing* (Tamura *et al.*, 2021). Analisis keragaman genetik dilakukan dengan menggunakan software DnaSP (Rozas *et al.*, 2017). *Alignment* nukleotida pada gen PRL dilakukan dengan menggunakan ClustalW pada MEGA 12 Cara menggunakan MEGA12 dapat dilihat pada lampiran 2 sedangkan cara menggunakan DnaSP.6 dapat dilihat pada lampiran 3. Frekuensi alel dihitung menurut Prastowo *et al.* (2021) dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$x_i = \frac{(2n_i + \sum n_{ij})}{2N} \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan :

x_i = Frekuensi Alel ke-i

n_i = Jumlah individu bergenotip i

n_{ij} = Jumlah sampel yang bergenotip ij

N = Jumlah individu sampel

Nilai frekuensi genotip dihitung dengan rumus Nei dan Kumar (2000). Frekuensi genotip didapatkan dengan menghitung perbandingan jumlah genotip tertentu dengan jumlah sampel, menggunakan rumus berikut:

$$X_i = \frac{n_i}{N} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan :

X_i = frekuensi genotip ke-i

n_i = jumlah individu bergenotip-i

N = total jumlah sampel yang diamati

Heterozigositas dihitung menurut Prastowo *et al.* (2021) dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n (P_i)^2 \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan :

H = Heterozigositas

N = Jumlah alel

i = Alel

P_i = Frekuensi alel ke i