

LEMBAR PENGESAHAN

Yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa :

Nama : PENIJIATILIHU
NPM : 20400023
Judul Penelitian : POLIMORFISME GEN *VESOACTIVE
INTESTINAL PEPTIDE (VIP)* DAN
ASOSIASINYA TERHADAP UKURAN
TUBUH AYAM MIRAH (*Gallus gallus*)
Tanggal Ujian : 21 September 2024

Lulus ujian skripsi dan skripsi tersebut telah diperiksa, diperbaiki dan disetujui oleh dosen pembimbing serta terdaftar di Fakultas Peternakan Universitas HKBP Negeri Manado.

Menyetujui :


Komisi Pembimbing,



Dr. Parsaoran Silalahi, S.Pt., M.Si
Pembimbing I



Prof. Dr. Ir. Masan Sitopus, MS
Pembimbing II



Dr. Widya Pintaka Bayu Putra, S.Pt., M.Sc
Pembimbing III

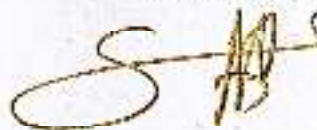
Mengetahui :

Dekan,



Dr. Tunggul Ferry Sitopus, MP

Ketua Program Studi,



Dr. Parsaoran Silalahi, S.Pt., M.Si

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Ayam kampung merupakan salah satu komoditas andalan dari sub sektor peternakan yang diunggulkan oleh pemerintah daerah Provinsi Sumatera Utara dalam memenuhi kebutuhan protein hewani. Peternakan ayam kampung mempunyai peran yang cukup besar dalam mendukung ekonomi masyarakat pedesaan karena mempunyai daya adaptasi yang lebih tinggi terhadap lingkungan dan pemiliharaannya relatif lebih mudah. Hal ini terlihat dari pertumbuhan populasi permintaan ayam kampung yang semakin meningkat dari tahun ke tahun (Bakrie *et al.*, 2003). Konsumsi daging ayam kampung pada tahun 2021 di Sumatera Utara sebesar 16.490 kg/kapita/tahun dan mengalami peningkata pada 2022 sebesar 16.953 kg/kapita/tahun (BPS, 2023).

Kabupaten Simalungun Sumatera Utara mempunyai ayam lokal yakni Ayam Mirah. Ayam Mirah diketahui mirip dengan ayam hutan Sumatera atau *Galus galus*. Ayam Mirah memiliki kelebihan dengan jenis ayam kampung lainnya yaitu menjadi syarat utama pada acara adat bagi masyarakat Simalungun. Ayam Mirah memiliki arti yakni ayam jantan yang bermakna membangunkan warga untuk memulai aktivitas di pagi hari. Ciri khas ayam Mirah mempunyai bulu yang indah dengan warna bulu merah mengekilat untuk ayam jantan dan coklat keputih-putihan, dengan bintik coklat yang lebih tebal untuk ayam betina (Siagian *et al.*, 2013).

Namun seiring berjalan waktu, populasi ayam mirah semakin menurun yang diakibatkan oleh terjadinya perkawinan silang dengan jenis ayam lainnya yang memberikan efek negatif sehingga menyebabkan ayam Mirah murni sulit ditemukan (Siagian *et al.*, 2013). Disisi lain, permintaan konsumen yang semakin tinggi membuat harga ayam Mirah tinggi, jika dibandingkan dengan harga ayam kampung biasa. Untuk harga satu ekor ayam Mirah jantan empat kali lipat dari harga jual ayam kampung biasa.

Untuk menjaga tradisi budaya bagi masyarakat Simalungun dibutuhkan pelestarian ayam Mirah sebagai salah satu ayam lokal daerah, dimana ayam Mirah menjadi makanan khas pada saat acara adat. Salah satu langkah yang bisa dilakukan yakni memanfaatkan ayam Mirah yang berciri eksterior dengan tanda genotip ayam Mirah jantan yaitu pola bentuk bulu ekor berbentuk kemudi terangkai panjang dan bulu ekor yang paling panjang menekuk kebawah, warna bulu merah keemasan yang menyelimuti sebagian besar tubuh ayam, kaki dan paruh berwarna kuning,

jengger besar dan bergerigi serta berwarna merah. Sedangkan untuk ayam Mirah betina memiliki bulu berwarna coklat keputihan dengan totol coklat yang lebih tebal, kaki dan paruh berwarna kuning, dan bentuk bulu ekornya berbentuk kemudi mahkota yang ujungnya berwarna hitam, Ayam tersebut diyakini belum bercampur dengan ayam jenis lain, sehingga memudahkan untuk memperoleh ayam sampel yang lebih murni secara genetik (Siagian *et al.*, 2013).

Salah satu cara yang bisa dilakukan untuk meningkatkan produktivitas ayam Mirah yaitu dengan melakukan seleksi secara konvensional dan molekular. Seleksi molekular merupakan seleksi yang dilakukan dengan menggunakan DNA ayam Mirah untuk melihat keragaman genetik yang sama. Gen *VIP* merupakan salah satu kandidat gen yang berhubungan dengan produksi telur (Zhou M. *et al.*, 2010). Gen *VIP* merupakan peptida asam amino 28 yang termasuk dalam keluarga sekretin/glukagon. *VIP* disintesis dari molekul prekursor (*prepro-VIP*), yang juga mengandung peptida histidin metionin (PHM)/peptida histidin isoleusin (PHI). *Prepro-VIP* ayam mencakup peptida sinyal asam amino 25, peptida PHI matang dengan 27 asam amino, dan peptida *VIP* matang dengan 28 asam amino. Gen ayam *prepro-VIP*, terletak pada kromosom 3, mencakup 7010 bp dan mengandung 7 ekson (McFarlin *et al.*, 1995). Gen ini berhubungan dengan sifat mengeram dengan regulasi sekresi hormon prolaktin.

Gen *VIP* dihasilkan dari bagian utama *hypothalamus* yang mengaktifkan pengeluaran prolaktin dari bagian *pituitary*. Prolaktin mempertahankan kebiasaan mengeram (*broody behavior*) dengan adanya aksi gen reseptor prolaktin. Gen reseptor prolaktin merupakan gen mayor yang berperan pada keberhasilan mengeram, terletak pada kromosom Z. Gen tersebut menunjukkan *sex linkage* dengan sifat mengeram (Safkj dan Inoue., 1979). Pada ayam Ningdu Sanhuang penelitian sebelumnya terdapat mutasi pada intron 1 yang dimana alel C menjadi T pada situs restriksi yang berhasil mendeteksi tiga genotip (CC,CT, TT), dimana dari tiga genotip tersebut genotype CC yang berpengaruh pada produksi telur ayam Ningdu Sanhuang (Zhou M. *et al.*, 2010). Namun permasalahan yang dihadapi dalam pengembangan ayam Mirah yaitu faktor genetik yang belum di manfaatkan dalam pengembangan ayam Mirah.

Selanjutnya yang perlu dilakukan adalah terkait dengan ukuran-ukuran tubuh ayam Mirah. Sehingga perlu dilakukan kajian asosiasi gen *VIP* ayam Mirah dengan bobot badan. Variabel-variabel morfometrik tersebut dapat menjadi penciri ukuran dan bentuk tubuh ayam lokal yang berguna untuk memprediksi potensi produksi, peluang peningkatan produktifitas ternak, dan sebagai acuan standarisasi sifat-sifat ayam lokal secara lengkap (Ashifudin *et al.*,

2017).

Penelitian tentang gen *VIP* pada ayam Mirah menarik untuk dilakukan karena di Indonesia belum ada yang meneliti tentang gen *VIP* ayam Mirah. Untuk menelusuri ragam fenotip dan ragam genotip ayam Mirah, dilakukan penelitian dengan judul “Polimorfisme Gen *Vesovactive Intestinal Peptide (VIP)* dan Asosiasinya Terhadap Ukuran Tubuh Ayam Mirah (*Gallus gallus*)”

1.2. Identifikasi Masalah

1. Apakah terdapat mutasi pada gen *VIP* ayam Mirah?
2. Apakah terdapat asosiasi antara keragaman genetik gen *VIP* dengan ukuran tubuh ayam Mirah?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Untuk mendeteksi adanya mutasi pada gen *VIP* ayam Mirah.
2. Untuk mengetahui asosiasi antara keragaman genetik gen *VIP* terhadap ukuran tubuh ayam Mirah.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi adanya mutasi genetik gen *VIP* ayam Mirah yang dapat digunakan untuk seleksi molekuler pada sifat produksi telur dimasa mendatang.

1.5. Kerangka Pemikiran

Ayam Mirah adalah salah satu ayam lokal khas daerah yang berasal dari kabupaten Simalungun Sumatera Utara. Ayam Mirah diketahui mirip dengan ayam hutan Sumatera atau *Galus galus*. Ayam Mirah memiliki kelebihan dengan jenis ayam kampung lainnya yaitu menjadi syarat utama pada acara adat bagi masyarakat Simalungun (Siagian. *et al.*, 2013).

Namun seiring berjalannya waktu, populasi ayam Mirah semakin menurun yang diakibatkan oleh terjadinya perkawinan silang dengan jenis ayam lainnya yang memberikan efek negatif sehingga menyebabkan ayam Mirah murni sulit ditemukan (Siagian. *et al.*, 2013).

Pemerintah dan peneliti masih kurang perhatiannya terhadap Ayam Mirah ini. Sehingga untuk menjaga tradisi budaya perlu diperhatikan ayam Mirah ini yang merupakan salah satu potensi kekayaan nuftah yang berasal dari Kabupaten Simalungun.

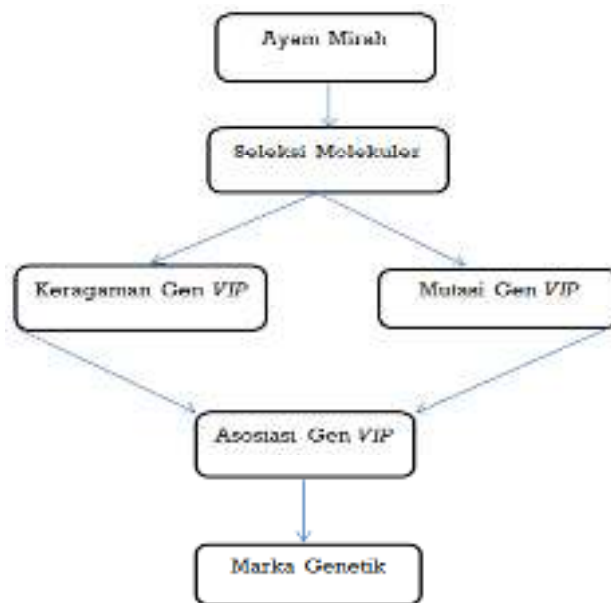
Untuk meningkatkan produktifitas ayam Mirah ini, maka dilakukan seleksi secara konvensional dan seleksi molekuler. Sehingga pengembangan dan pelestariannya sendiri sudah diketahui terlebih dahulu genotipnya melalui seleksi molekuler sebelum dilanjutkan pada tahap produksi dan reproduksi. Langkah yang mudah dilakukan yakni harus mengetahui potensi genetik ayam Mirah tersebut terkait dengan sifat reproduksi. Sehingga diperlukannya kajian pada tingkat gen untuk mengetahui keragaman genetik dan potensi genetik ayam Mirah. Terutama sifat reproduksi, salah satunya melalui gen *VIP* yang merupakan peptida asam amino 28 yang termasuk dalam keluarga sekretin/glucagon yang berhubungan dengan sifat mengeram (Zhou M. *et al.*, 2010).

Selanjutnya yang perlu dilakukan adalah terkait dengan ukuran-ukuran tubuh ayam Mirah. Sehingga perlu dilakukan kajian asosiasi gen *VIP* ayam Mirah dengan bobot badan. Variabel-variabel morfometrik tersebut dapat menjadi penciri ukuran dan bentuk tubuh ayam lokal yang berguna untuk memprediksi potensi produksi, peluang peningkatan produktifitas ternak, dan sebagai acuan standarisasi sifat-sifat ayam lokal secara lengkap (Ashifudin *et al.*, 2017).

Gen *VIP* disintesis dari molekul prekursor (*prepro-VIP*), yang juga mengandung peptida histidin metionin (PHM)/peptida histidin isoleusin (PHI). *Prepro-VIP* ayam mencakup peptida sinyal asam amino 25, peptida PHI matang dengan 27 asam amino, dan peptida *VIP* matang dengan 28 asam amino. Gen ayam *prepro-VIP*, terletak pada kromosom 3, mencakup 7010 bp dan mengandung 7 ekson (McFarlin *et al.*, 1995).

Gen *VIP* dihasilkan dari bagian utama *hypothalamus* yang mengaktifkan pengeluaran prolaktin dari bagian *pituitary*. Prolaktin mempertahankan kebiasaan mengeram (*broody behavior*) dengan adanya aksi gen reseptor prolaktin. Gen reseptor prolaktin merupakan gen mayor yang berperan pada keberhasilan mengeram, terletak pada kromosom Z. Gen tersebut menunjukkan *sex linkage* dengan sifat mengeram (Safkj dan Inoue., 1979). Pada ayam Ningdu Sanhuang penelitian sebelumnya terdapat mutasi pada intron 1 yang dimana alel C menjadi T pada situs restriksi yang berhasil mendeteksi tiga genotype (CC,CT, TT), dimana dari tiga genotype tersebut genotype CC yang berpengaruh pada produksi telur ayam Ningdu Sanhuang

(Zhou M. *et al.*, 2010). Adapun diagram alir penelitian ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Diagram Alir Penelitian.

1.6. Hipotesis

1. Terdapat mutasi pada gen *VIP* terhadap ayam Mirah.
2. Terdapat asosiasi antara keragaman genetik gen *VIP* terhadap ukuran tubuh ayam Mirah.

1.7. Defenisi Operasional

1. Ayam Mirah merupakan ayam kampung khas daerah yang berasal dari Kabupaten Simalungun Provinsi Sumatera Utara. Ayam mirah memiliki kelebihan dengan jenis ayam lainnya yaitu menjadi syarat utama dalam upacara adat bagi masyarakat Simalungun.
2. Gen adalah materi genetik yang terdiri atas sepenggal DNA yang menentukan sifat individu. Unit terkecil materi genetik ini terdapat dalam setiap lokus yang khas pada kromosom. Gen terdiri atas sepenggal DNA yang menentukan sifat individu melalui pembentukan polipeptida. Gen berukuran antara 4 - 8 m (mikron).
3. Gen *VIP* Merupakan singkatan dari *Vesoactive Intestinal Peptide*. Gen *VIP* adalah peptida asam amino 28 yang termasuk dalam keluarga sekretin/glukagon. Gen ini berhubungan dengan sifat mengeram dengan regulasi sekresi hormon prolaktin.

4. Mutasi merupakan perubahan yang terjadi pada bahan genetik (DNA atau RNA) pada urutan nukleotida. Mutasi adalah perubahan materi genetik suatu sel yang diwariskan kepada keturunannya.
5. *Polymerase Chain Reaction-Restriction* (PCR) merupakan suatu metode enzimatik untuk melipat gandakan suatu sekuen nukleotida gen tertentu dengan cara *in vitro*.
6. *Restriction Fragment Length Polimorfisme* (RFLP) merupakan teknik yang digunakan dalam menentukan genotip (Genotip) melalui potongan sekuen RNA dengan enzim restriksi.
7. Sekuensing merupakan salah satu cara dalam pengurutan atau penentuan urutan basa nukleotida dalam fragmen atau rantai DNA yang memiliki empat monomer, yaitu basa nitrogen yang berstruktur molekul cincin purin yang terdiri dari adenine (A) dan guanine (G), serta molekul pirimidin yaitu timin (T) dan sitosin (T).
8. Ukuran tubuh (Morfometrik) merupakan indikator yang baik dan memiliki kolerasi yang cukup erat dengan parameter bobot hidup yang digunakan untuk memprediksi bobot badan dan komposisi karkas ayam.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ayam Mirah

Bagi masyarakat Simalungan, dayok mirah merupakan simbol wibawa, kekuatan, dan kekuasaan. Adapun manfaat dari ayam Mirah ialah sebagai kuliner khas daerah Simalungun. Yang dahulunya merupakan makanan bangsawan yakni dayok nabinatur. Tidak hanya enak dan unik, dayok nabinatur juga kaya akan sejarahnya. Sebenarnya dayok nabinatur bisa dibuat menggunakan ayam jenis apapun. Akan tetapi, ayam kampung jantan paling sering dipilih. Alasannya cukup menarik untuk dijadikan pertimbangan (Siagian *et al.*, 2013).

Seiring berjalannya waktu, perkawinan ayam Mirah dengan jenis ayam lain ternyata telah memberi efek negatif, yaitu sulit menemukan ayam Mirah murni. Saat ini ayam Mirah hanya di jumpai pada beberapa wilayah tertentu di Kabupaten Simalungun dengan populasi terbatas (Siagian *et al.*, 2013). Secara umum klasifikasi ayam menurut Suprijatna (2005) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata
Subfilum : Vertebrata
Kelas : Aves
Subkelas : Neornithes
Superordo : Neognathae
Ordo : Galliformes
Famili : Phasianidae
Genus : Gallus
Spesies : Gallus gallus

Ayam lokal merupakan aset yang sangat berharga dalam pembentukan bibit unggul ayam lokal yang terbukti mampu beradaptasi pada lingkungan setempat (Nataamijaya., 2000). Perawakan ayam kampung jantan yang gagah membuatnya menjadi simbol kekuatan, kerja keras, semangat, pantang menyerah, dan tahan banting. Karena alasan itulah ayam kampung jantan paling sering dipilih oleh masyarakat Simalungun ketika membuat dayok nabinatur. Adapun ciri penotip ayam Mirah yaitu: untuk ayam jantan, pola bentuk ekor adalah kemudi terangkai panjang dan buku ekor yang paling panjang menekuk kebawah, warna bulu diselimuti warna merah keemasan. Jengger tunggal dan besar, bergerigi berwarna merah. Ada bintik putih pada muka untuk sekelompok jantan, sementara sekelompok lain tidak memiliki bintik putih, untuk ayam betina memiliki bulu coklat keputihan dengan totol coklat yang lebih gelap, pola bentuk ekornya kemudi mahkota, yang ujungnya berwarna hitam. Ayam tersebut diyakini belum bercampur dengan ayam jenis lain, sehingga memudahkan untuk memperoleh ayam sampel yang lebih murni secara genetik (Siagian *et al.*, 2013).



Gambar 2. Ayam Mirah (Tarihoran., 2023)

2.2. Organ Sel Ayam

Sel merupakan kumpulan materi paling sederhana yang dapat hidup dan merupakan unit penyusun semua makhluk hidup. Sel mampu melakukan semua aktivitas kehidupan dan sebagian besar reaksi kimia untuk mempertahankan kehidupan berlangsung di dalam sel. Sel hewan adalah organel terkecil dalam tubuh dengan membran tipis disekitarnya berisi larutan koloid yang mengandung senyawa kimia. Dalam sel hewan ada senyawa penting yaitu karbohidrat dan lipid yang berperan dalam proses pembelahan fotosintesis. Karbohidrat sangat penting dalam fotosintesis, sedangkan lipid berfungsi sebagai cadangan makanan seperti lemak dan minyak. Selain itu, terdapat juga protein yang berperan dalam metabolisme tubuh hewan dan tumbuhan, serta asam nukleat yang penting dalam sintesis protein (Juniardi *et al.*, 2023). Berikut ini fungsi dan struktur sel hewan yang perlu di ketahui:

1. Membran Sel

Membran sel adalah struktural supramolekul multikomponen yang rumit, dengan morfologi dan komposisi kimia yang bervariasi dan kompleks. Membran ini juga berfungsi yaitu: 1. Mengatur permeabilitas terhadap senyawa-senyawa atau ion yang lewat di membran, 2. sebagai pembatas antara lingkungan di dalam sel dan lingkungan luar sel, 3. Sebagai penyedia enzim (Juniardi *et al.*, 2023).

2. Sitoplasma

Sitoplasma adalah cairan di dalam sel yang mengelilingi nukleus dan menjadi tempat untuk organel sel menjalankan fungsinya, sitoplasma berada di antara membran plasma dan inti sel. Sitoplasma terdiri dari air, protein, karbohidrat, lemak, mineral, dan vitamin. Sitoplasma berfungsi sebagai tempat untuk penyimpanan bahan kimia sel yang penting bagi metabolisme sel, seperti enzim-enzim, ion-ion, gula, lemak dan protein.

3. Retikulum Endoplasma

Retikulum endoplasma ada dua macam, yaitu RE kasar dan RE halus. Adapun fungsi RE kasar yaitu untuk sebagai lokasi sintesis protein dan modifikasi protein dan RE halus mempunyai fungsi sebagai sintesis lipid, metabolisme karbohidrat, detoksifikasi racun, dan penyimpanan kalsium (Julianti., 2022). Retikulum Endoplasma merupakan organel yang berfungsi untuk menghasilkan dan mengirimkan protein ke bagian sel yang membutuhkan, atau jaringan membran yang meliputi semua sel dan berhubungan dengan inti sel.

4. Mitokondria

Mitokondria merupakan organel sel yang tersebar dalam sitosol organisme eukariot yang berfungsi sebagai penghasil energi sel melalui respirasi seluler. Mitokondria memiliki struktur berlapis yang terdiri dari membran terlipat yang disebut kroma, dan menghasilkan adenosin trifosfat (ATP) sebagai sumber energi utama sel.

5. Mikrofilamen

Mikrofilamen adalah komponen sitoskeleton yang terdiri dari protein aktin. Mikrofilamen berbentuk batang padat dengan diameter sekitar 7 nm dan berfungsi untuk memberikan dukungan struktural pada sel dengan mempertahankan bentuk.

6. Lisosom

Bentuk lisosom yaitu seperti kantong kecil yang berisi hidrolitik yang disebut lisozim, fungsi dari lisosom yaitu sebagai tempat pembuatan enzim-enzim pencernaan (Julianti., 2022). Lisosom adalah organel berbentuk saku yang terikat membran dan mengandung enzim hidrolitik. Kandungan ini membantu mengontrol pencernaan intra seluler dalam berbagai keadaan, melakukan fagositosis untuk mencerna materi, menghancurkan organel sel yang rusak, dan memasukkan makromolekul dari luar sel melalui endositosis.

7. Peroxisom

Peroxisom adalah organel terbungkus oleh membran tunggal dari lipid dwilapis yang mengandung protein pencerap (reseptor). Peroxisom, disebut juga badan mikro, adalah organel kecil yang mengandung enzim katalase. Fungsinya untuk memecah peroksida (H_2O_2) atau metabolit toksik dan mengubah lemak menjadi karohidrat.

8. Ribosom

Ribosom sendiri merupakan organel sel yang berperan dalam sintesis protein (Julianti, 2022). Ribosom merupakan organ yang berukuran kecil dan padat yang ada di dalam sel yang berfungsi sebagai tempat terjadinya sintesis protein. Ribosom pada sel hewan berperan dalam translasi RNA menjadi rantai polipeptida atau protein dengan asam amino.

9. Sentriol

Sentriol adalah struktur tubular yang ditemukan di dekat inti sebagian besar sel eukariotik, sangat penting untuk pembelahan sel dan motilitas sel yang berbentuk tabung. Berperan penting dalam pembelahan sel, sentriol membentuk benang spindel, silia, dan flagela. Dalam bentuk gabungan sentriol yang membentuk sentrosom.

10. Mikrotubulus

Mikrotubulus berperan penting dalam pergerakan sel, terutama dalam mengarahkan pergerakan sel dengan polimerisasi dan depolimerisasi serta sebagian pembentuk dasar alat gerak silia dan flagela. Terdiri dari protein globular bulat yang disebut tubulin, dengan diameter 12 nm dan diameter luas sekitar 25 nm.

11. Badan Golgi

Badan golgi atau aparatus golgi berfungsi untuk menjalankan sistem sekresi, Membentuk enzim yang belum aktif (zimogen/proenzym), Membentuk glikoprotein (musin, mucus/lendir) (Julianti, 2022). Organel ini berada dalam sel eukariotik, seperti ginjal, dan mempunyai struktur berupa kantong pipih yang berukuran bervariasi dan terikat oleh membran.

12. Nukleus

Nukleus adalah organel yang mengatur dan mengendalikan aktivitas sel hewan. Mulai dari metabolisme hingga pembelahan sel, nukleus memiliki peran penting dalam sel. Nukleus mengandung materi genetik dalam bentuk panjang DNA yang membentuk kromosom.

13. Nukleolus

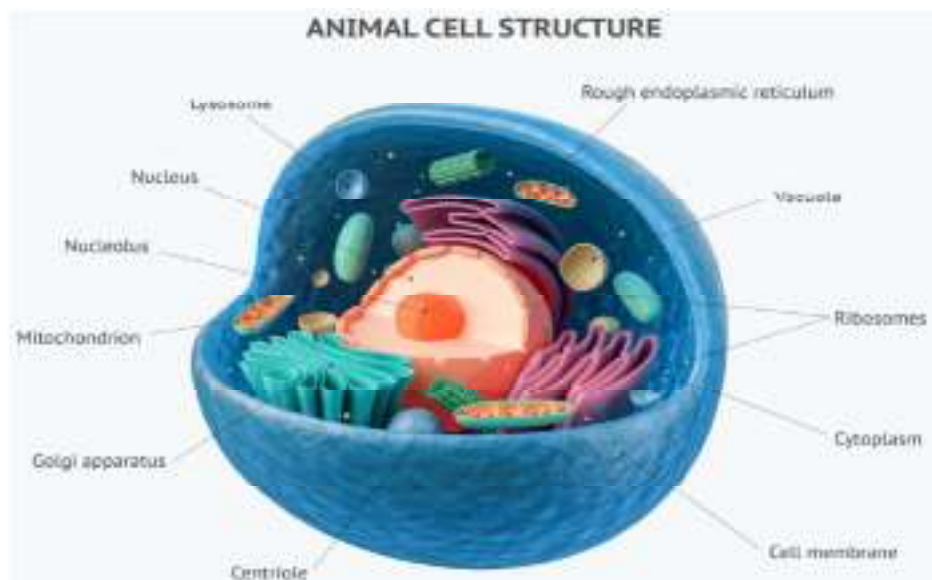
Nukleus atau inti sel merupakan salah satu organel sel yang mempunyai fungsi penting pada sel. Nukleus ini mampu mengendalikan seluruh kegiatan sel serta mengatur pembelahan sel dan juga berfungsi membawa informasi genetik dan replikasi DNA (Julianti, 2022). Nukleolus merupakan penghasil protein bagi hewan. Protein disisi lain merupakan senyawa organik kompleks yang memiliki kapasitas molekul yang sangat tinggi dan menjadi polimer dan monomer asam amino, yang akan dihubungkan satu dengan yang lainnya antarikatan peptida. Nukleus terdiri dari protein dan asam nukleat khususnya RNA ribosom.

14. Nukleoplasma

Nukleoplasma adalah cairan yang terletak di dalam inti sel. Nukleoplasma mengandung serat dan juga kromatin. Fungsinya adalah untuk membentuk kromosom dan gen.

15. Membran inti

Membran inti adalah elemen struktural utama nukleus yang membungkus keseluruhan organel sel hewan. Di samping itu, organel ini berperan sebagai pemisah antara sitoplasma dan daerah inti.



Gambar 3. Sel pada ayam (Putri, 2024)

2.3. Mutasi Gen

Mutasi berasal dari kata *Mutatus* (bahasa latin) yang artinya adalah perubahan. Mutasi merupakan perubahan yang terjadi pada bahan genetik (DNA maupun RNA), baik pada taraf urutan gen (disebut mutasi titik) maupun pada taraf kromosom. Mutasi pada tingkat kromosomal biasanya disebut aberasi. Dikutip dari buku ajar Mutasi genetik oleh Dewi Ayu (2017), mutasi genetik biasanya disebabkan karena adanya kesalahan replikasi materi genetika saat terjadi pembelahan sel atau ketika proses meiosis berlangsung. Mutasi pada gen dapat mengarah pada munculnya alel baru dan menjadi dasar bagi kalangan pendukung evolusi mengenai munculnya variasi-variasi baru pada spesies. Macam-macam mutasi DNA Mutasi jenis pertama adalah mutasi titik atau point mutation. Pada jenis ini, perubahan hanya terjadi pada satu pasang informasi gen atau terdapat penghapusan beberapa informasi gen sehingga mempengaruhi fungsi gen.

2.4. Keragaman Genetik

Keragaman genetik adalah perbedaan DNA antar individu dalam suatu populasi. Identifikasi keragaman genetik dalam suatu populasi digunakan untuk mengetahui dan melestarikan bangsa-bangsa dalam populasi terkait dengan penciri suatu sifat khusus, serta menentukan hubungan antar subpopulasi dapat diketahui dengan melihat persamaan dan perbedaan frekuensi alel dan genotipe diantara subpopulasi (Li *et al.*, 2000). Informasi keragaman genetik suatu bangsa akan sangat bermanfaat bagi keamanan dan ketersediaan bahan pangan yang berkesinambungan (Blott *et al.*, 1998).

Nei dan Kumar (2000), menyatakan bahwa populasi dinilai beragam jika memiliki dua atau lebih alel dalam satu lokus dengan frekuensi yang cukup (biasanya lebih dari 1%). Hukum Hardy-Weinberg menyatakan bahwa frekuensi genotipe suatu populasi yang cukup besar tidak akan berubah dari satu generasi ke generasi lainnya jika tidak ada seleksi, migrasi, mutasi, dan genetik drift. Keadaan populasi yang demikian disebut dalam keadaan equilibrium (seimbang) (Noor, 2008). Keragaman genetik dapat digunakan sebagai parameter dalam mempelajari genetika populasi dan genetika evolusi. Tingkat keragaman dalam populasi dapat digambarkan dari frekuensi alel. Frekuensi alel merupakan rasio relatif suatu alel terhadap keseluruhan alel yang ditemukan dalam satu populasi (Nei dan Kumar, 2000).

2.5. Morfometrik

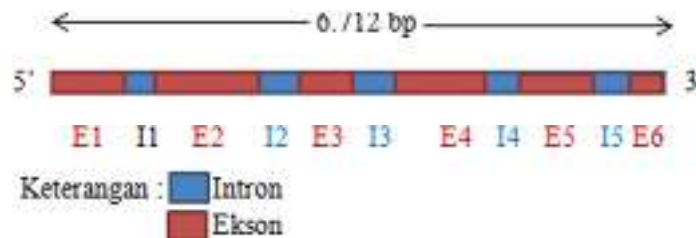
Ayam kampung merupakan ayam lokal yang tidak memiliki karakteristik khusus. Karakterisasi pada ayam lokal dapat dilakukan dengan cara mengidentifikasi morfometrik. Karakterisasi merupakan langkah awal pemuliaan ternak dalam rangka mengidentifikasi sifat-sifat penting yang bernilai ekonomis seperti bobot badan dan pertambahan bobot badan atau sifat penciri rumpun ternak. Fungsi morfometrik digunakan untuk memprediksi dan komposisi karkas ayam. Morfometrik merupakan indikator yang baik dan memiliki kolerasi yang cukup erat dengan parameter bobot hidup (Suparyanto 2004). Pengukuran juga dapat menjadi indikator dalam proses seleksi ayam (kurnianto 2013).

Morfometrik merupakan sifat kuantitatif yang bisa digunakan sebagai patokan untuk melakukan seleksi dalam meningkatkan produktifitas ayam lokal. Sifat kuantitatif ayam lokal berdasarkan morfometrik meliputi panjang badan, panjang leher, panjang sayap, lebar sayap, lingkaran dada, lebar dada, panjang kepala, lebar kepala, panjang paruh, panjang jengger, tinggi jengger, panjang tulang tibia, panjang metatarsus, lingkaran metatarsus, panjang jari terpanjang, panjang femur, panjang maxilla, panjang sternum dan bobot badan ((Ashifudin *et al.*, 2017; Hummairah *et al.*, 2016; Rangkuti *et al.*, 2016).

2.6. Gen *Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)*

Gen *VIP* adalah peptida asam amino 28 yang termasuk dalam keluarga sekretin/glukagon. Hal ini diekspresikan secara luas di seluruh tubuh dan melakukan sejumlah tindakan fisiologis dalam sistem peredaran darah, kekebalan tubuh, reproduksi dan pencernaan (Said, 1986; Gressens *et al.*, 1993). *VIP* adalah faktor pelepas dari PRL pada unggas dan konsentrasi yang tinggi dari *VIP* pada hipotalamus berkorelasi dengan plasma PRL (Kansaku *et al.*, 2001). *VIP* penting dalam meregulasi sekresi prolaktin yang merupakan hormone yang berhubungan dengan tingkah laku mengeram. Kecenderungan terjadinya peningkatan ekspresi gen *VIP* seiring dengan meningkatnya ekspresi gen *VIP* diduga karena *VIP* merupakan faktor pelepas hormone prolaktin. Hiyama (2015) menyatakan bahwa pelepasan hormone prolaktin dari kelenjar pituitaria anterior diawali oleh suatu faktor pelepas yang disebut vasoactive intestinal peptide (*VIP*) yang dikode oleh gen *VIP*. Pada ayam, gen *VIP* terletak di kromosom 3 sepanjang 6.721 bp terdiri dari 6 ekson dan 7 intron (GenBank: NC_052534.1). Panjang Exon satu pada gen *VIP* 113 bp, Exon

dua sepanjang 141 bp, Exon tiga sepanjang 105 bp, Exon empat sepanjang 120 bp, Exon lima sepanjang 115 bp dan Exon enam sepanjang 9 bp (Demir *et al.*, 2020). Ekson adalah bagian DNA genom yang mengandung informasi untuk membuat protein, sedangkan Intron adalah bagian DNA genom yang tidak mengandung informasi untuk membuat protein. Struktur gen *VIP* pada ayam dapat dilihat pada gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Struktur Gen *VIP* pada Ayam

2.7. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida gen tertentu dengan cara *in vitro* (Yuliati *et al.*, 2019). Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Prinsip dasar metode ini adalah memperbanyak fragmen DNA berulang kali menggunakan enzim polimerase pada suhu tinggi. Proses PCR membutuhkan oligonukleotida pendek (primer DNA) yang berperan dalam memulai prosesnya. Ketika suhu diturunkan setelah pemisahan dupleks DNA, primer mengikat atau hibridisasi menjadi suatu untai DNA. Produk hasil PCR dapat diamati menggunakan teknik elektroforesis agarose (Puspitaningrum, 2018). Terdapat tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30 – 40 siklus dan berlangsung dengan cepat, yaitu:

2.7.1. Denaturasi

Denaturasi DNA adalah proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Biasanya diperlukan waktu sekitar 3 menit agar molekul DNA dapat didenaturasi menjadi DNA beruntai tunggal. Denaturasi yang tidak sempurna menyebabkan pelipatan ulang DNA secara cepat (sekali lagi membentuk DNA beruntai ganda), yang menyebabkan kegagalan proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq

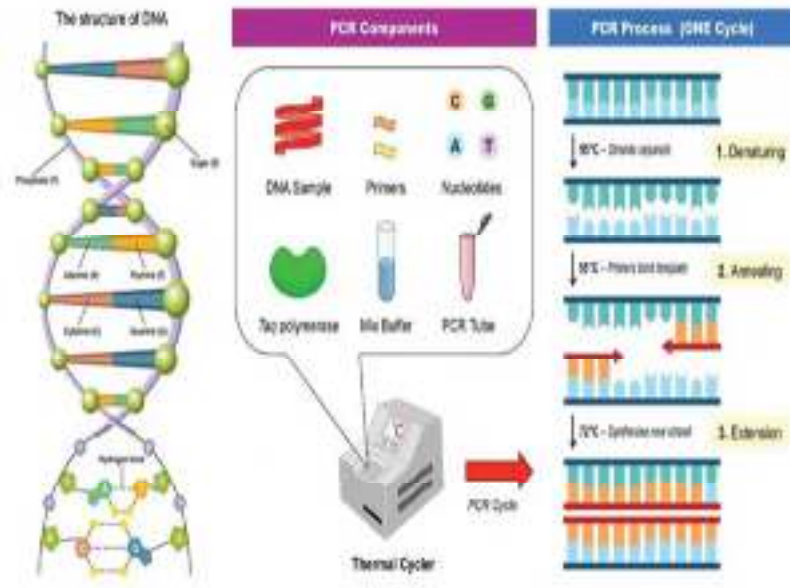
polymerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5°C; 95°C dan 97,5°C (Yusuf., 2010).

2.7.2. Annealing

Annealing adalah tahap penempelan primer pada untai tunggal. Annealing primer akan mengalami hibridasi primer PCR pada sekuen target. Proses ini ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template (Norhayati *et al.*, 2011). Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR (Yusuf, 2010). Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperature penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C (Yusuf, 2010).

2.7.3. Pemanjang Primer (*Extention*)

Ekstensi primer adalah proses sintesis enzimatik untuk memperkuat nukleotida secara *in vitro*. Elektroforesis gel agarosa memungkinkan untuk mengidentifikasi produk PCR berdasarkan ukurannya. Metode ini terdiri atas menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa dan menyatukan sel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif (Yusuf, 2010). Proses PCR dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 5. Proses Skema PCR (Ganefri, 2020).

2.8. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisme*)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) merupakan teknik yang digunakan dalam menentukan genotip (Genotyping) melalui potongan sekuen RNA dengan enzim restriksi (Putri *et al.*, 2021). Analisis *Restriction Fragment Length Polymorphisme* (RFLP) adalah salah satu teknik untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuens DNA. RFLP memanfaatkan enzim restriksi tertentu untuk memberikan informasi keragaman suatu fragmen DNA yang diakibatkan adanya perbedaan lokasi dan jumlah situs potong enzim restriksi atau enzim pemotong (Agung *et al.*, 2017). Enzim restriksi mengikat sekuens basa spesifik yang disebut sekuens rekognisi, dan setiap enzim memotong DNA pada situs pemotongan. Keunggulan Utama PCR-RFLP adalah teknik sederhana, cepat, kuat dan mudah di bandingkan dengan bacode DNA menggunakan sekuensing mtDNA (Anjalina *et al.*, 2019). Selain itu, hanya membutuhkan *thermocycler* PCR dan peralatan elektroforesis, di mana sebagian besar laboratorium dapat menanggung biayanya, hal itu juga merupakan faktor realistis di sebagian besar negara berkembang (Yao *et al.*, 2020).

Teknik RFLP memiliki dua tahapan yang penting (1) memotong DNA dalam pola tertentu dengan menggunakan enzim restriksi dan (2) visualisasi hasil potongan dengan elektroforesis yang akan menghasilkan fragmen yang panjangnya berbeda-beda (Andrew, 2013). Teknik ini baik digunakan karena sampel DNA yang diperlukan sedikit namun dapat menghasilkan data yang akurat (Budiarto, 2015; Yudianto, 2020). Deteksi RFLP didasarkan pada kemampuan

membandingkan profil pita yang dihasilkan setelah pemotongan DNA target dengan enzim restriksi. RFLP bersifat kedominan sehingga dapat mendeteksi adanya heterozigositas dan tidak diperlukan informasi sekuen target.

2.9. Sekuensing

DNA menyimpan informasi genetik dalam bentuk urutan nukleotida. Metode sekuensing merupakan salah satu terobosan utama dalam genetika molekuler yang dapat mensekuensing potongan DNA secara cepat (Muladno, 2002). Sekuensing merupakan salah satu cara dalam pengurutan atau penentuan urutan basa nukleotida dalam fragmen atau rantai DNA yang memiliki empat monomer, yaitu basa nitrogen yang berstruktur molekul cincin purin yang terdiri dari adenine (A) dan guanine (G), serta molekul pirimidin yaitu timin (T) dan sitosin (T). Keempat jenis monomer tersebut akan saling tersusun secara berurutan yang akan membentuk pita DNA, seperti huruf alphabet yang menyusun sebuah kata. Dimana setiap urutan DNA yang mengandung perintah untuk membuat protein yang dikenal sebagai gen (Yunita *et al.*, 2023). Sekuensing DNA bisa di manfaatkan dalam menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragman DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuennya dengan sekun DNA lain yang sudah di ketahui.

Pada dasarnya ada dua macam metode sekuensing yang telah di kembangkan, yaitu metode *Maxm-Gilbert* dan metode *Sanger* yang keduanya di perkenalkan pada tahun 1977. Metode sekuensing yang paling banyak digunakan adalah metode *Sanger*. Selain lebih mudah, prkatis dan efisien, metode Sanger juga banyak digunakan dan jutaan nukleotida dari berbagai spesies telah berhasil disekuensing dengan metode sanger (Muladno, 2002). Pada metode sanger di kenal dengan metode terminasi rantai dan metode *Maxm-Gilbert* dikenal dengan metode degradasi kimia (Brown, 2002).

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan dari bulan Juli 2024 sampai dengan September 2024 pengambilan data lapangan dan sampel darah ayam Mirah dilakukan di Kabupaten

Simalungun Sumatera Utara. Analisa data dilakukan di Pusat Riset Zoologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Jl. Raya Jakarta – Bogor KM 46, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan-bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam proses amplifikasi DNA : PCR mix (Merek: GoTag), Sepasang primer yaitu forward dan reverse, DDW (Destilated Water), dan DNA templet ayam Mirah.

Bahan yang digunakan dalam proses elektroforesis PCR : Produk PCR, DNA Ladder 100 bp plus (vivantis), Loading dye 6x (vivantis), larutan TBE 10x (Tris base), pewarana DNA (1st BASE), agarose (Vivantis, USA).

Bahan yang digunakan dalam proses RFLP : Produk PCR, enzim *HinfI*, 10x buffer, DNA Ladder 100 bp plus (vivantis), Loading dye 6x (vivantis), larutan TBE 10x (Tris base), pewarana DNA (1st BASE), agarose (Vivantis, USA).

3.2.2. Alat-alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam proses amplifikasi DNA : Mesin PCR Eppendorf (Merk : Mastercycler gradient), mesin mini sentrifuse, spin-down, micro pipet (ukuran 10 μ L, 100 μ L), tips (white tips 10 μ L), PCR tube 0,2 ml, rak tube, gloves, mesin visualisasi UV GBox (Syngene, UK).

Alat yang digunakan dalam proses elektroforesis PCR : Bahan yang produk PCR, DNA Ladder 100 bp plus (vivantis), Loading dye 6x (vivantis), larutan TBE 10x (Tris base), pewarana DNA (1st BASE), agarose (Vivantis, USA). Alat yang digunakan: Mesin Elektroforesis 100v (Mupid-ex), timbangan analitik 252g/0,1g (Libra Mas), spin-down, micro pipet (ukuran 20 μ L), Gel Tray, rak tube, botol kaca 500 ml, gelas ukur 100 ml.

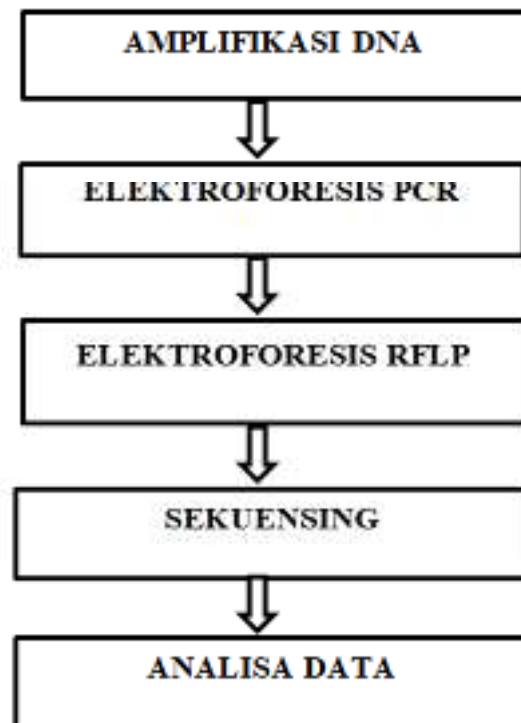
Alat yang digunakan dalam proses elektroforesis RFLP : water bath, Mesin Elektroforesis 100 v (Mupid-ex), timbangan analitik 252g/0,1g (Libra Mas), spin-down, micro pipet (ukuran 20 μ L), Gel Tray, rak tube, botol kaca 500 ml, gelas ukur 100 ml.

3.2. Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel DNA dari ayam Mirah sebanyak 45 sebagai sampel yang digunakan dari peternak yang berbeda-beda di daerah Simalungun. Dimana setiap satu ekor ayam akan di ambil darahnya minimal 1 ml sebagai sampel, disimpan di tabung EDTA warna ungu. Sampel tersebut sudah dikoleksi dan diekstraksi DNA nya oleh BRIN.

3.3. Prosedur Penelitian

Tahapan penelitian di jelaskan pada gambar 6 di bawah ini :



Gambar 6. Prosedur Penelitian

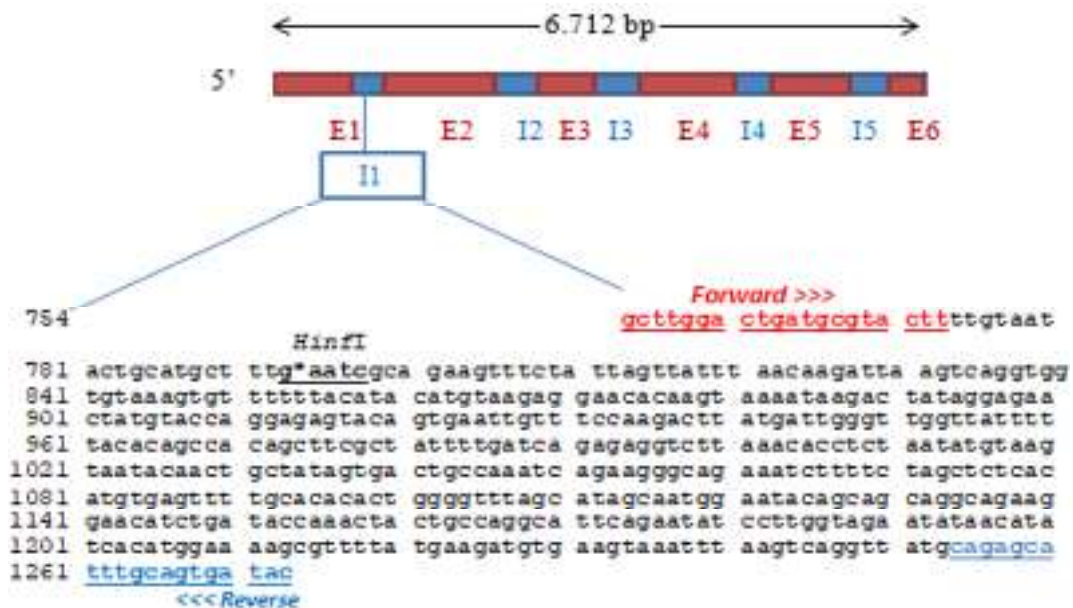
3.3.1. Amplikasi DNA

Amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR pada gen *Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)* dilakukan pada volume total 10 μ L terdiri dari; DNA Templet 3 μ L, primer yang digunakan pada gen *VIP* adalah primer forward dan reverse masing-masing sebanyak 0,2 μ L, GoTaq Green Master Mix sebanyak 5 μ L dan DDW sebanyak 1,6 μ L. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *VIP* menggunakan desain primer menurut Zhou M. *et al*, (2010) yaitu F: 5'-GCTTGGACTGATGCGTACTT-3' dan R 5'- GTATCACTGCAAATGCTCTG-3'.Proses amplifikasi dijalankan dengan 35 siklus menggunakan mesin *Veriti Thermal Cycler (Applied*

Biosystem) dan posisi primer pada situs restriksi *Hin*I pada bagian intron 1 gen *Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)* ayam (GenBank: NC_052534.1) sepanjang 520 bp dengan program mesin sebagai berikut:

Tabel 1. Program PCR untuk Amplifikasi Gen *VIP* Ayam Mirah

Tahapan	Suhu	Waktu
Pre-denaturasi	95°C	1 menit
Denaturasi	95°C	15 Detik
Annealing	50,7°C	15 Detik
Ekstensi awal	72°C	10 Detik
Ekstensi akhir	72°C	4 Menit



Gambar 6. Posisi Primer dan Situs Restriksi *Hin*I Gen *VIP* ayam.

3.3.2. Elektroforesis PCR

Elektroforesis dalam bidang genetika, digunakan untuk mengetahui ukuran dan jumlah basa yang dikandung suatu sekuen DNA tertentu (Klug & Cummings 1994). Tujuan elektroforesis pada penelitian ini yaitu untuk mengetahui adanya gen *VIP* ayam Mirah. Tahapan Elektroforesis PCR pada penelitian ini menggunakan volume 10 μ L yang terdiri dari DNA templet 3 μ L, primer F 0,2 μ L, primer R 0,2 μ L, DDW 1,6 μ L, dan master mix 5 μ L, selanjutnya tahap elektroforesis PCR memerlukan agarosa dengan konsentrasi 1,0%. Larutan yang masih cair dituangkan kedalam cetakan gel sebanyak 60 ml serta sisir di tempatkan di dekat tepian gel

dan di biarkan mengeras. Setelah gel mengeras sisir di cabut hingga terbentuk sumur-sumur. Gel selanjutnya di tempatkan kedalam gel tray elektroforesis yang sudah berisi larutan buffer TBE 100 ml. TBE 100 m dibuat dengan cara menambahkan sebanyak 100 ml TBE 10x dengan 900 ml DDW (double destilated waster). Produk PCR sebanyak 10 μ L dicampur dengan loadingdye sebanyak 2 μ L, dengan menggunakan mikropipet dimasukkan dalam sumur-sumur gel. Marker sebanyak 5 μ L ditaruh dalam sumur paling kiri sebagai penanda. Gel tray selanjutnya dialiri listrik 100 volt selama 30 menit, molekul DNA yang bermuatan negatif pada pH netral akan bergerak (bermigrasi) ke arah positif. Setelah elektroforesis PCR selesai, gel agarose diambil untuk dilihat panjang pita DNA dengan menggunakan sinar ultraviolet dalam mesin visualisa G-Box (Merk: UVITEC).

3.3.3. Elektroforesis RFLP

Elektroforesis RFLP pada penelitian ini merupakan tahap untuk membaca genotipe gen *VIP* ayam Mirah. Tahap elektroforesis RFLP menggunakan komposisi reaksi sebanyak 7,0 μ L yang terdiri dari PCR produk 4,20 μ L, enzim HinfI 0,28 μ L, buffer 0,70 μ L, DDW 1,82 μ L. setelah komposisi reksi tersebut tercampur selanjutnya akan di inkubasi pada *warter bath* pada suhu 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya elektroforesis RFLP memerlukan agarose dengan konsentrasi 2%. Larutam yang masih cair dituangkan kedalam cetakan gel sebanyak 60 ml serta sisir ditemptakan didekat tepian gel dan di biarkan mengeras. Setelah gel mengeras sisir di canbut hingga terbentuk sumur-sumur. Gel selanjutnya di tempatkan kedalam gel tray elektroforesis yang sudah berisi larutan buffer TBE 100 ml. TBE 100 m dibuat dengan cara menambahkan sebanyak 100 ml TBE 10x dengan 900 ml DDW (double destilated water). Produk PCR sebanyak 7,0 μ L dicampur dengan loadingdye sebanyak 2 μ L, dengan menggunakan mikropipet dimasukkan dalam sumur-sumur gel. Marker sebanyak 5 μ L ditaruh dalam sumur paling kiri sebagai penanda. Gel tray selanjutnya dialiri listrik 100 volt selama 45 menit, molekul DNA yang bermuatan negatif pada pH netral akan bergerak (bermigrasi) ke arah positif. Setelah elektroforesis PCR selesai, gel agarose diambil untuk dilihat panjang pita DNA dengan menggunakan sinar ultraviolet dalam mesin visualisa dilakukan menggunakan mesin G-Box (Merk: UVITEC).

3.3.4. Sekuensing

Satu sampel bergenotip heterozigot sebanyak 25 μ L digunakan untuk forward sekuensing melalui First Base Laboratory di Malaysia untuk melihat titik mutasi pada gen *VIP* ayam Mirah.

3.3.5. Analisis Data

Data sekuen yang diperoleh selanjutnya dilakukan pensejajaran sekuen (alignment) dilakukan dengan perangkat lunak BioEdit Sequence Alignment Editor version 5.0.6 (Hall, 2001) dan proses pembuatan pohon fenetik ini menggunakan perangkat lunak Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5) (Tamura *et al.*, 2011). Proses selanjutnya setelah dilakukan analisis sekuen adalah membuat konsensus sekuen dengan menentukan subsekuen dari sekuen DNA (Junior, 2021). Apabila diperoleh adanya titik mutasi, maka dilakukan perhitungan frekuensi genotip, frekuensi alel, Heterozigositas observasi (H_o), Heterozigositas harapan (H_e), Polymorphic Informative Content (PIC), jumlah alel efektif (n_e) dan Chi-square test (Putra *et al.*, 2017).

3.4. Perubahan yang Diamati

3.4.1. Frekuensi Genotipe (X_{ii})

Frekuensi genotipe adalah perbandingan jumlah genotipe dalam suatu populasi dengan menghitung perbandingan antara jumlah genotipe tertentu pada setiap populasi. Rumus menghitung frekuensi genotipe menurut Nei dan Kumar. (2000) adalah sebagai berikut:

$$X_{ii} = \frac{n_{ii}}{N}$$

Keterangan :

X_{ii} = frekuensi genotip ke ii.

n_{ii} = jumlah individu bergenotipe ii.ii

N = jumlah individu sampel

3.4.2. Frekuensi Alel (X_{ii})

Frekuensi alel merupakan rasio suatu alel terhadap keseluruhan alel pada satu lokus dalam populasi. Frekuensi alel (X_{ii}) gen *VIP* dapat dihitung berdasarkan rumus

Nei dan Kumar (2000) seperti di bawah ini:

$$X_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2N}$$

Keterangan :

x_i = Frekuensi alel ke-i

n_{ii} = Jumlah individu bergenotipe ii.

n_{ij} = Jumlah individu bergenotipe ij.

N = Jumlah individu sampel

3.4.3. Heterozigositas (He)

Keragaman genetik dapat diketahui melalui estimasi frekuensi heterozigositas pengamatan yang diperoleh dari masing-masing populasi dengan menggunakan rumus Weir (1996) sebagai berikut:

$$H_e = 1 - \sum_{I=1}^n X_I^2$$

Keterangan :

He = heterozigositas harapan.

X_i = frekuensi alel ke-i.

Heterozigositas Observasi (H_o) dihitung dengan menggunakan rumus Nei dan Kumar (2000):

$$H_o = \sum_{i=1}^n \frac{n_{ij}}{N}$$

Keterangan :

H_o = heterozigositas pengamatan.

N_{ij} = jumlah genotip heterozigot.

N = jumlah pengamatan (total sampel)

3.4.4. Alel Efektif

Alel efektif adalah perhitungan yang menentukan jumlah alel yang sering muncul pada suatu lokus suatu gen. Jumlah alel efektif merupakan ukuran jumlah alel efektif yang diperoleh setiap karakter. Nilai ini adalah nilai resiprok atau nilai kebalikan dari homozigositas. Semakin tinggi nilai n_e , maka semakin banyak individu yang heterozigot. Rumus untuk menghitung nilai n_e adalah sebagai berikut (Nei dan Kumar, 2000):

$$n_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^n X_i^2}$$

Keterangan:

n_e = jumlah alel efektif.

X_i = frekuensi alel i .

3.4.5. Polymorphic Information Content (PIC)

Polymorphic Informatic Content adalah indeks yang digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik pada suatu lokus gen. Kategori hasil perhitungan PIC menurut Bostein et al. (1980) terdiri atas tiga kategori yakni: rendah ($PIC < 0,25$), moderat ($0,25 < PIC < 0,50$) dan tinggi ($PIC > 0,50$). Nilai PIC dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\begin{aligned} PIC &= 1 - \sum_{i=1}^n X_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n 2X_i^2 2X_j^2 \\ &= H_e - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n 2X_i^2 2X_j^2 \end{aligned}$$

Keterangan:

PIC = polymorphis informative content.

X_i = frekuensi alel ke- i .

X_j = frekuensi alel ke- j .

H_e = heterozigositas harapan.

3.4.6. Nilai Chi-square (χ^2)

Nilai Chi-square (χ^2) berguna untuk mengukur keseimbangan Hardy- Weinberg pada suatu populasi (Falconer dan Mackay., 1996). Perhitungan nilai χ^2 adalah sebagai berikut:

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{O_i - E_i}{E_i} \right)^2$$

Keterangan:

X^2 = nilai Chi square

O_i = frekuensi observasi

E_i = frekuensi harapan (expected)

p = frekuensi allele A

q = frekuensi allele a

N = jumlah total individu.