

# I. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Ayam Mirah merupakan salah satu jenis ayam lokal yang berasal dari Kabupaten Simalungun, Sumatera Utara. Ayam juga Mirah diketahui mirip dengan ayam hutan merah Sumatera atau *Gallus-gallus*. Ayam Mirah yang berarti ayam jantan juga memiliki makna membangunkan warga untuk memulai aktivitas pada pagi hari. Ayam Mirah memiliki ciri khas yaitu warna bulunya yang indah, membuat harga jualnya yang sangat tinggi sehingga sebagian masyarakat tertarik untuk memelihara Ayam Mirah (Siagian *et al.*, 2013). Ayam tersebut juga menjadi makanan khas pada saat kegiatan adat etnis Simalungun.

Baru – baru ini, pihak Pemerintah Kota Pematangsiantar melalui Dinas Tata Ruang dan Permukiman membangun tugu Ayam Jantan Merah (Dayok Mirah). Dayok Mirah adalah bagian dari ciri khas etnis Simalungun yang merupakan simbol wibawa, kekuatan, dan kekuasaan. Namun Ayam Mirah (Dayok Mirah) lebih digunakan sebagai kuliner tradisional (makanan khas etnis Simalungun) atau yang sering disebut Dayok Nabinatur. Ayam Mirah bukan sekedar berwarna merah untuk dijadikan kuliner tradisional. Saat ini masakan Dayok Binatur ini dipercaya untuk kesuksesan dalam meraih cita – cita (Anonimus, 2020).

Namun seiring berjalannya waktu, populasi Ayam Mirah semakin menurun karena terjadinya perkawinan silang dengan jenis ayam lainnya yang menyebabkan populasi Ayam Mirah semakin menurun dan sulit ditemukan Ayam Mirah yang murni. Ayam Mirah hanya muncul secara tidak terduga, sebagai keturunan ayam yang mengandung gen Ayam Mirah (Siagian *et al.*, 2013). Disisi lain, permintaan konsumen akan Ayam Mirah yang semakin tinggi menyebabkan harga jual yang semakin tinggi juga. Harga jual Ayam Mirah jantan empat kali lipat dari harga jual ayam kampung biasa.

Sebagai ayam lokal khas daerah, dibutuhkan pelestarian Ayam Mirah. Salah satu cara yang dilakukan adalah memanfaatkan ayam berciri eksterior Ayam Mirah yang dinyatakan sebagai ciri penotip Ayam Mirah yaitu: ayam jantan dengan pola bentuk ekor kemudi terangkai panjang dan bulu ekor yang paling panjang menekuk kebawah, warna bulu diselimuti warna merah keemasan.

Jengger tunggal dan besar, bergerigi berwarna merah (Siagian *et al.*, 2013). Ada bintik putih pada muka dan sekelompok lain tidak memiliki bintik putih, untuk ayam betina memiliki bulu berwarna coklat keputihan dengan total coklat yang lebih gelap, 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. Ayam Mirah juga termasuk golongan ayam petelur karena Ayam Mirah memiliki gen prolaktin reseptor yang menstimulir kebiasaan mengeram. Fungsi Hormon prolaktin menyebabkan sifat mengeram dan berhentinya produksi telur. Hormon prolaktin pada ayam secara alami disekresi pada akhir periode bertelur.

Reseptor Prolaktin (PRLR) telah terseleksi sebagai gen kandidat untuk sifat mengeram karena merupakan bagian penting berfungsinya neuroendocrin yang menstimulir kejadian mengeram (Sharp,1997). PRLR juga penting untuk pematangan oosit (Bole- Feysot *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 2001), pada ayam penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa gen PRLR menarik sebagai kandidat gen untuk mengeram pada ayam (Dunn *et al.*, 1998) telah memetakan gen PRLR ayam sebagai kandidat gen untuk kontrol kekeruhan, karena gen utama yang terlibat dalam kerentanan terhadap kekeruhan diperkirakan berada pada kromosom Z ayam dan bermanifestasi sebagai sifat terpaut seks. Gen yang mengkode PRLR pada ayam terletak pada kromosom Z dan terdiri dari 15 ekson (Ensembl ENSGALG00010014796). Gen tersebut menunjukkan sex linkage dengan sifat mengeram (Safkj *et al.*, 1979).

Namun, hubungan antara variasi gen PRLR dan sifat produksi telur pada ayam belum pernah dilaporkan. PRL adalah hormon hipofisis yang memberikan efek dengan bergabung dengan PRLR).

Prolaktin reseptor yang terikat membran terkait erat dengan reseptor hormon pertumbuhan dan merupakan anggota keluarga reseptor sitokin (Bole-Feysot *et al.*, 1988). Konsisten dengan efeknya yang beragam, Prolaktin reseptor diekspresikan ditubuh pada ayam (Leclerc *et al.*, 2007 a,b) dan tingkat reseptor dalam jaringan target naik dan turun diatur sebagai respons terhadap perubahan konsentrasi prolaktin yang bersirkulasi. Pada sekitar waktu penetasan, sekresi

prolaktin secara signifikan meningkat pada ayam dan kalkun bersamaan dengan peningkatan prolaktin reseptor.

Penelitian tentang gen PRLR pada Ayam Mirah menarik untuk dilakukan. Karena di Indonesia belum ada yang meneliti tentang gen PRLR pada Ayam Mirah. Untuk menelusuri ragam fenotipik dan ragam genotipik Ayam Mirah, dilakukanlah penelitian ini dengan judul “Identifikasi Keragaman Indel 79-bp Gen Prolaktin Reseptor dan Asosiasinya Dengan Ukuran Tubuh Ayam Mirah.

### **1.2 Identifikasi Masalah**

Berapa besar mutasi keragaman indel 79-bp gen prolaktin reseptor dan asosiasinya dengan ukuran tubuh Ayam Mirah.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keragaman mutasi indel 79-bp gen prolaktin reseptor

Mengkaji asosiasi mutasi tersebut dengan ukuran tubuh Ayam Mirah.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Untuk mempermudah peternak melakukan seleksi pada ayam upaya memperoleh keturunan yang memiliki keragaman genetik yang berpengaruh nyata.

Untuk mengetahui akurasi gen PRLR sebagai kandidat penciri genetik Ayam Mirah berdasarkan gen PRLR.

### **1.5 Kerangka Pemikiran**

Ayam Mirah merupakan ayam lokal yang berasal dari Kabupaten Simalungun, Masyarakat juga sangat suka memelihara Ayam Mirah, karena memiliki warna bulu yang indah, serta lebih tahan terhadap serangan penyakit daripada jenis ayam lainnya (Siagian *et al.*, 2013).

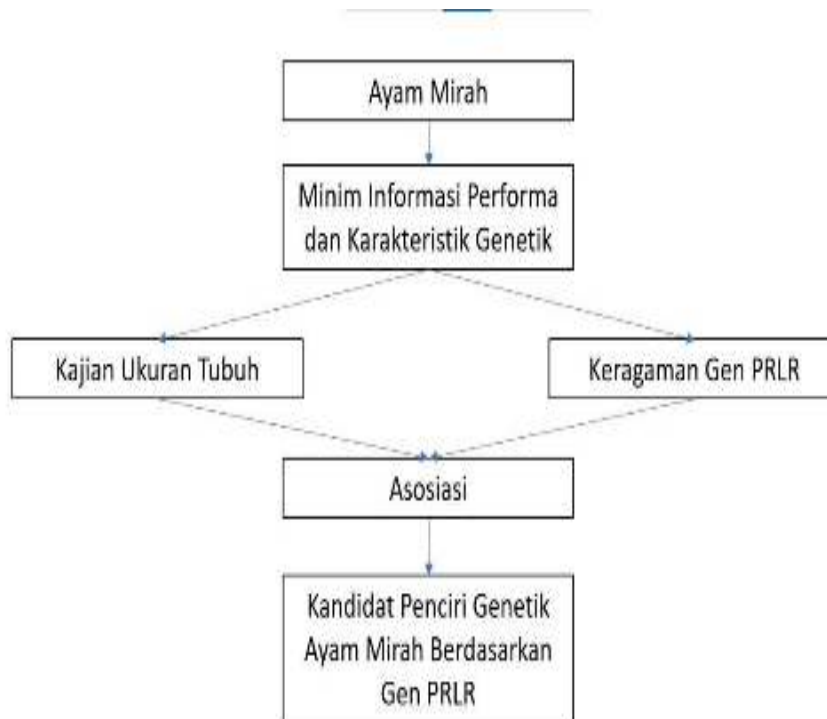
Seiring berjalannya waktu, perkawinan Ayam Mirah dengan jenis ayam lainnya telah memberikan efek negatif, yaitu sulit menemukan Ayam Mirah murni. Ayam Mirah hanya muncul secara tidak terduga, sebagai keturunan ayam yang mengandung gen Ayam Mirah (Siagian *et al.*, 2013). Penduduk sekitar juga

menyebut Ayam Mirah berbeda dengan ayam yang lainnya, ayam mirah ini juga merupakan potensi kekayaan plasma nutfah dari Simalungun yang masih kurang diperhatikan, baik pemerintahnya maupun peneliti.

Untuk pengembangan dan pelestariannya sendiri harus diketahui kondisi atau karakteristik genotipnya terlebih dahulu sebelum dilanjutkan potensi produksi, dan reproduksi. Langkah yang paling mudah dilakukan adalah harus mengetahui potensi genetik Ayam Mirah tersebut yang terkait dengan sifat reproduksi. Sehingga diperlukannya kajian pada tingkat gen untuk mengetahui keragaman genetik dan potensi genetik Ayam Mirah, terutama terkait sifat reproduksi, salah satunya melalui gen PRLR. reseptor prolaktin pada kromosom Z memacu reseptor sebagai gen kandidat untuk sifat mengeram, menjadi gen PRLR yang berhubungan dengan sifat mengeram (Dunn *et al.*, 1998).

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

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa jika dibandingkan dengan SNP varian indel memiliki efisiensi yang lebih tinggi dan aplikasi yang lebih luas karena kelebihan deteksi yang nyaman dan efek yang kuat (Li *et al.*, 2017). Ukuran genom juga dapat dipengaruhi oleh relatif kejadian indels, yang telah diakui sebagai parameter kunci yang mengatur evolusi ukuran genom. Selain itu, karena penggunaannya dalam rekonstruksi filogenetik dan peran penting mereka dalam evolusi genomik, indel semakin menarik minat (Paško *et al.*, 2011). Fakta bahwa variasi indel memainkan peran penting dalam banyak aspek pertumbuhan hewan dan sifat karkas telah diungkapkan oleh penelitian terkait (Wang *et al.*, 2019a, b). Dalam penelitian ini, polimorfisme indel 80-bp pada 3'-UTR gen PRLR ayam terungkap untuk pertama kalinya.



**Gambar 1. Diagram alir**

### 1.6 Hipotesis

Terdapat keragaman genetik PRLR pada ayam Mirah yang berasosiasi terhadap ukuran tubuh ayam.

### 1.7 Defenisi Operasional

1. Ayam Mirah adalah ayam lokal yang berasal dari daerah Simalungun. Ayam Mirah diketahui mirip dengan ayam hutan merah Sumatera atau *Gallus-gallus*.
2. Mutasi indel adalah istilah biologi molekuler untuk insersi (penyisipan) atau delesi (penghapusan) basa nukleotida, sementara mutasi adalah yang menggantikan salah satu nukleotida tanpa mengubah jumlah keseluruhan dalam DNA.
3. Prolaktin Reseptor adalah gen yang terletak pada kromosom Z di intron 14 dan terdiri dari 15 ekson pada ayam.
4. Ukuran tubuh pada ayam adalah mengukur bagian-bagian badan tertentu yang akan digunakan untuk analisis data pada ayam seperti,

- a) Tinggi jengger diukur dari pangkal jengger diatas kepala sampai ujung jengger yang paling tinggi dengan menggunakan pita ukur (satuan cm).
  - b) Maxilla diukur dari pangkal sampai ujung paruh bagian atas dengan menggunakan pita ukur (satuan cm).
  - c) Panjang dada diukur dari pangkal atas ujung dada dengan menggunakan pita ukur (satuan cm).
  - d) Panjang sayap diukur dengan merentangkan bagian sayap terlebih dahulu, dan dimulai dari pangkal humerus sampai ujung phalanges dengan menggunakan pita ukur (satuan cm).
  - e) Panjang jari ketiga diukur dari pangkal jari ketiga sampai ujung jari dengan menggunakan pita ukur (satuan cm).
  - f) Lingkar kaki diukur dengan cara melingkarkan pita ukur pada bagian tengah kaki (satuan cm).
  - g) Panjang kaki diukur dari pangkal sampai ujung kaki dengan menggunakan pita ukur (satuan cm).
  - h) Panjang paha bawah diukur dari ujung paha atas sampai ujung paha bawah dengan menggunakan pita ukur (satuan cm).
  - i) panjang paha atas mengukur jarak antara pangkal dan ujung paha atas menggunakan pita ukur (satuan cm).
5. 79 bp adalah ukuran panjang mutasi indel pada gen PRLR.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Ayam Mirah

Ayam Mirah adalah ayam lokal yang berasal dari daerah Simalungun. Ayam Mirah diketahui mirip dengan ayam hutan merah Sumatera atau *Gallus-gallus*. Ayam Mirah yang berarti ayam jantan juga memiliki makna membangunkan warga untuk memulai aktivitas pada pagi hari. Ayam Mirah memiliki nilai ekonomis yang sangat tinggi, dikarenakan syarat utama pada kegiatan adat etnis Simalungun. Masyarakat juga sangat suka memelihara Ayam Mirah, karena memiliki warna bulu yang indah, serta lebih tahan terhadap serangan penyakit daripada jenis ayam lainnya (Siagian *et al.*, 2013).

Seiring berjalannya waktu, perkawinan Ayam Mirah dengan jenis ayam lainnya telah memberikan efek negatif, yaitu sulit menemukan Ayam Mirah murni. Ayam Mirah hanya muncul secara tidak terduga, sebagai keturunan ayam yang mengandung gen Ayam Mirah. Disisi lain, permintaan konsumen akan Ayam Mirah yang semakin tinggi menyebabkan harga jual yang semakin tinggi juga. Di daerah Simalungun Ayam Mirah juga merupakan ayam kampung.

Klasifikasi Ayam kampung sebagai berikut (Suprijatno,2005) :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Aves
Subkelas	: Neornithes
Super ordo	: Neognathae
Ordo	: Galliformes
Famili	: Phasianidae
Genus	: Gallus
Spesies	: <i>Gallus gallus</i>



Gambar 2. Ayam Mirah Sumber: Koleksi Pribadi

Menurut pendapat Rohdian Purba Sekretaris Patuah Muajana (PMS) dari Tribun-Medan.com (2010) suatu lembaga pemangku adat budaya Simalungun mengungkapkan ada makna khusus dari ayam Mirah memiliki makna yang khusus yaitu membangunkan masyarakat untuk memulai aktivitas pada pagi hari. Masyarakat Simalungun mempercayai bahwa Ayam Mirah merupakan simbol wibawa, kekuatan, dan kekuasaan.

Ayam Mirah memiliki manfaat sebagai kuliner khas Kab. Simalungun, yang dahulunya merupakan makanan bangsawan yakni dayok nabinatur. Tidak hanya enak dan unik, dayok nabinatur juga kaya akan filosofi. Sebenarnya dayok nabinatur bisa dibuat menggunakan ayam jenis lokal lainnya. Akan tetapi, Ayam Mirah jantan paling sering dipilih. Alasannya cukup menarik untuk dijadikan pertimbangan. Perawakan Ayam Mirah jantan yang gagah membuatnya menjadi simbol kekuatan, kerja keras, semangat, pantang menyerah, dan tahan banting (Siagian *et al.*, 2013). Karena alasan tersebut Ayam Mirah jantan paling sering dipilih oleh masyarakat Simalungun ketika membuat dayok nabinatur.

## 2.2. Organel Sel Ayam

Dalam tubuh hewan terdapat sel-sel yang membentuk jaringan hewan tersebut. Struktur sel hewan berbeda dari sel eukariotik lainnya, seperti sel tumbuhan, karena tidak memiliki dinding sel dan kloroplas, dan umumnya memiliki vakuola yang lebih kecil atau bahkan tidak ada. Sel manusia merupakan salah satu jenis sel hewan. Sel hewan merupakan organel terkecil dalam tubuh



dengan membran tipis di sekitarnya dan berisi larutan koloid yang mengandung senyawa kimia. Salah satu keunggulannya adalah kemampuannya untuk melakukan duplikasi diri melalui proses pembelahan. Di dalam sel hewan terdapat senyawa penting seperti karbohidrat dan lipid yang berperan dalam proses pembelahan dan 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 (Anonymous, 2023). Berikut adalah beberapa fungsi dan struktur sel hewan yang perlu diketahui:

#### 1. Membran Sel

Membran sel merupakan lapisan tipis yang mengelilingi dan melindungi sitoplasma dan nukleoplasma sel. Membran ini berfungsi sebagai batas antara sel dengan cairan di sekitarnya.

#### 2. Sitoplasma

Sitoplasma adalah kompartemen sel yang terletak di antara membran plasma dan inti sel. Mengandung berbagai zat seperti air, protein, karbohidrat, lemak, mineral, dan vitamin, sitoplasma berperan penting dalam menyimpan dan menghasilkan bahan kimia yang dibutuhkan oleh sel.

#### 3. Retikulum Endoplasma

Retikulum endoplasma adalah jaringan membran yang meliputi seluruh sel dan berhubungan dengan inti sel. Terdiri dari jaringan tabung dan kantong membran yang disebut cisternae, retikulum endoplasma berfungsi dalam sintesis protein, modifikasi protein, serta transportasi bahan di dalam sel.

#### 4. Mitokondria

Mitokondria adalah organel yang berperan penting dalam produksi energi sel melalui respirasi seluler. Memiliki struktur berlapis dengan lipatan-lipatan membran yang disebut kroma, mitokondria menghasilkan adenosin trifosfat (ATP) sebagai sumber energi utama sel.

## 5. Mikrofilamen

Mikrofilamen adalah komponen sitoskeleton yang terdiri dari protein aktin. Berbentuk batang padat dengan diameter sekitar 7 nm, mikrofilamen berperan dalam memberikan dukungan struktural pada sel dan mempertahankan bentuknya.

## 6. Peroxisom

Peroxisom yaitu sebuah kantong kecil yang berisi enzim katalase. Bagian ini biasanya banyak ditemukan di sel hewan, jamur serta tanaman tingkat tinggi untuk mengetahui letak peroxisom dalam sel. peroxisom ini banyak ditemukan pada bagian ginjal dan sel hati.

Fungsi utama bagian ini adalah untuk menguraikan sisa metabolisme yang berupa peroksida yang cenderung bersifat toksik menjadi air dan oksigen. Adapun untuk fungsi lain adalah mengubah lemak menjadi karbohidrat, serta berperan penting dalam penyerapan cahaya dan respirasi.

## 7. Lisosom

Lisosom yaitu organel yang berupa kantong terikat di membran dan berisi kandungan enzim hidrolitik. Kandungan tersebut berfungsi untuk mengontrol pencernaan intraseluler pada berbagai keadaan. Lisosom adalah bagian organel yang memiliki bentuk bulat dan dibatasi dengan membran tunggal, serta terletak pada bagian sel eukariotik.

Fungsi dari sel ini adalah sebagai pemasukan makromolekul dari luar ke dalam sel dengan menggunakan mekanisme endositosis.

## 8. Mikrotubulus

Bagian ini terletak pada sitoplasma yang ditemui pada sel eukariot. Dengan ukuran diameter 12 nanometer, dan diameter luar 25 nanometer, sel ini berbentuk panjang dan berongga. Mikrotubulus terdiri dari tubulin, yaitu molekul berbentuk bulat protein globular. Dalam keadaan tertentu, secara spontan tubulin akan berbentuk silindris yang panjang dan berongga. Dengan sifatnya yang kaku, mikrotubulus berfungsi untuk melindungi sel, memberikan bentuk sel serta berperan dalam pembentukan silia, flagela dan sentriol.

## 9. Ribosom

Ribosom merupakan organel sel yang berbentuk padat dan kecil dengan diameter 20 nm. Ribosom terletak pada bagian sitoplasma dan hanya bisa dilihat dengan bantuan mikroskop elektron. Ribosom bekerja dengan menerjemahkan mRNA untuk membentuk rantai protein dengan menggunakan asam amino dibawa tRNA saat proses translasi.

Dalam sel ini terikat dengan retikulum kasar dan membran inti sel. Ribosom berfungsi sebagai tempat berlangsungnya sintesis protein.

## 10. Sentriol

Sentriol merupakan bagian sel yang berbentuk tabung dan dapat ditemukan pada sel eukariota. Sepasang sentriol yang membentuk struktur gabungan dinamakan dengan sentrosom. Sel hewan yang tidak memiliki sentriol, maka flagela atau silia akan berkembang dengan fungsional. Sentriol juga mengambil peran saat pembelahan sel dan flagela serta silia.

Adapun fungsi bagian ini adalah untuk mengontrol pembentukan benang-benang gelendong ketika dalam proses pembelahan sel. Selain itu, bagian ini juga berfungsi untuk membentuk silia dan flagela.

## 11. Badan Golgi

Badan golgi/ aparatus golgi/ kompleks golgi merupakan organel yang sering dikaitkan dengan fungsi sekresi sel. Badan golgi bisa ditemukan pada setiap sel eukariotik yang memiliki fungsi ekskresi seperti ginjal. Bagian ini berbentuk kantong pipih dengan ukuran kecil hingga besar yang sangat terikat dengan membran.

Fungsi dari badan golgi adalah membentuk vesikula untuk ekskresi, membentuk lisosom dan membran plasma serta memproses protein.

## 12. Nukleus

Nukleus yaitu bagian inti sel yang mengatur dan mengendalikan aktivitas sel saat proses metabolisme hingga pembelahan sel. Nukleus terdiri dari membran

nukleus, anak inti dan juga matriks. bagian sel ini terdapat pada sel eukariotik yang mengandung DNA dan kromosom. DNA terdiri dari nukleotida yang memudahkan saat pembentukan protein serta proses translasi dan transkripsi. Karena nukleus berperan penting dalam aktivitas sel, maka hampir setiap sel memiliki nukleus.

### 13. Nukleolus

Nukleolus merupakan bagian dalam inti sel yang bertugas dalam pembentukan protein menggunakan RNA. Fungsi dari bagian ini adalah untuk bertanggung jawab dalam pembentukan protein dalam tubuh.

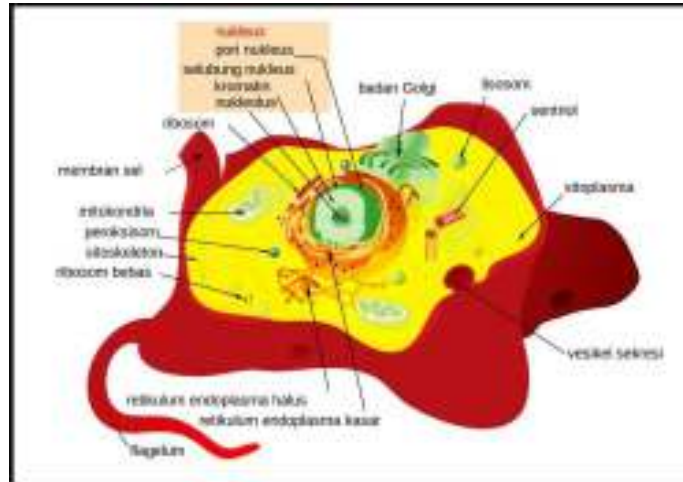
### 14. Sitoskeleton

Bagian ini merupakan organel sel yang berupa jalinan filamen protein dan bulu halus terletak di antara nukleus dan membran. Sitoskeleton terbagi dalam 3 jenis yaitu filamen dan intermediet, mikrotubul dan mikrofilamen.

Fungsinya yaitu untuk memberikan bentuk pada sel serta membantu pengangkutan bahan-bahan dalam sel. Sitoskeleton juga berfungsi menjadi rangka sel dan mengatur pergerakan sel dan organel serta menjaga bentuk sel.

### 15. Membran Inti

Membran inti yaitu susunan struktural utama nukleus yang membungkus seluruh bagian organel serta memisahkan antara daerah inti dan sitoplasma. fungsi dari membran ini adalah untuk melindungi inti sel dan menjadi tempat pertukaran zat materi inti dan sitoplasma.



**Gambar 3. Sel Pada Ayam**

(Sumber : Anonymous, 2023)

### 2.3 Mutasi Gen

Mutasi adalah 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.

Istilah mutasi pertama kali digunakan oleh Hugo de Vries, untuk mengemukakan adanya perubahan fenotipe yang mendadak pada bunga *Oenothera lamarckiana* dan bersifat menurun. Penelitian ilmiah tentang mutasi dilakukan pula oleh Morgan (1910), dengan menggunakan *Drosophila melanogaster* (lalat buah). Akhirnya murid Morgan yang bernama Herman Yoseph Muller berhasil dalam percobaannya terhadap lalat buah, yaitu menemukan mutasi dengan menggunakan sinar X (Anonim, 2009).

Penyebab mutasi DNA Penyebab mutasi DNA terbagi menjadi dua topik besar, yaitu alami dan buatan. Mutasi alami disebut juga mutasi spontan yang terjadi tanpa diketahui penyebabnya dan tanpa campur tangan manusia. Beberapa hal yang diduga memicu mutasi spontan antara lain radiasi sinar ultraviolet, radiasi kosmik dari luar angkasa, zat radioaktif yang masuk ke tubuh, dan kesalahan replikasi DNA. Sedangkan jenis yang kedua yaitu mutasi buatan atau induced mutation. Peristiwa satu ini sengaja dilakukan untuk kepentingan tertentu. Biasanya untuk melakukannya, peneliti menggunakan bahan fisik, kimiawi, dan biologis.

Peristiwa terjadinya mutasi disebut mutagenesis. Makhluk hidup yang mengalami mutasi disebut mutagen. Mutasi bersifat acak, 90% sesungguhnya bersifat merugikan bagi individu atau populasi suatu spesies. Dikatakan bersifat merugikan karena mutasi menimbulkan perubahan suatu karakter dari keadaan yang biasanya padahal karakter itu sudah beradaptasi selama jutaan tahun terhadap lingkungan. Dengan adanya perubahan, maka makhluk itu harus beradaptasi lagi.

#### **2.4 Gen Prolaktin Reseptor**

Prolaktin (PRL) berperan dalam mempertahankan perilaku mengeram (broody behavior) dengan adanya aksi gen reseptor prolaktin. Gen reseptor prolaktin sangat menarik dipelajari sebagai gen kandidat, karena merupakan gen mayor yang berperan pada keberhasilan mengeram. Gen yang mengkode PRLR pada ayam terletak pada kromosom Z dan terdiri dari 15 ekson (Ensembl ENSGALG00010014796). Gen tersebut menunjukkan sex linkage dengan sifat mengeram (Safkj *et al.*, 1979).

Situs pengikatan atau reseptornya tersebar luas di seluruh vertebrata (Bole-Feysot *et al.*, 1998). PRLR dicirikan oleh kemampuannya mengaktifkan janus kinase 2 dan transduser sinyal dan aktivator transkripsi, dan mereka juga termasuk dalam keluarga yang lebih besar yang dikenal sebagai superfamili reseptor kelas-1 sitokin. yang saat ini memiliki lebih dari 20 anggota (Thompson *et al.*, 1997; Bole-Feysot *et al.*, 1998. Fleenor *et al.*, 2006). Ketiadaan PRLR pada mencit betina mengakibatkan berkurangnya ovulasi dan pembuahan serta berbagai kelainan reproduksi.

Penelitian pendahuluan Ohkubo *et al.* (1998a) mengemukakan bahwa tidak terdapatnya sifat mengeram pada ayam WL tidak dipengaruhi oleh respons prolaktin terhadap prolactin-releasing hormone vasoactive intestinal polypeptide (VIP) yang merangsang pengeluaran prolaktin. Hal tersebut diperlihatkan dari jumlah PRLR mRNA terbanyak tidak berbeda nyata antara ke-2 breed yaitu terdapat pada otak, kelenjar pituitary, basal hypothalamus dan preoptic hypothalamus. Jumlah PRLR mRNA terkecil pada kedua breed juga tidak berbeda nyata yaitu terdapat pada forebrain, cerebellum dan optic lobes. Jumlah mRNA reseptor prolaktin terdistribusi sangat luas pada jaringan peripheral juga tidak berbeda nyata antara kedua breed. Analisis Southern blotting menggunakan 4 enzim restriksi dan probe cDNA.

Dalam proses pemuliaan buatan ayam petelur komersial, perhatian khusus diberikan pada sifat reproduksi, sedangkan pemilihan ayam pedaging komersial berfokus pada sifat kualitas daging. Oleh karena itu, seiring dengan perubahan genetik yang disebabkan oleh diferensiasi populasi yang terjadi selama proses domestikasi, berbagai alel menguntungkan telah terfiksasi pada breed-breed komersial khusus ini. Kita dapat menyimpulkan bahwa selama proses domestikasi unggas dan dalam perkembangan breed dan populasi produksi komersial baru-baru ini, seleksi buatan telah membentuk jumlah dan distribusi variasi genetik (Jia *et al.*, 2016).

## **2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

PCR merupakan suatu metode *in vitro* dalam sintesis DNA. Prinsip dasar metode ini adalah perbanyakkan fragmen DNA menggunakan enzim polymerase pada temperatur yang tinggi yang dilakukan secara berulang. Pada proses PCR dibutuhkan oligonukleotida pendek (primer DNA) yang berperan dalam mengawali proses ini. Primer akan menempel atau hybrid pada untai tunggal DNA saat temperatur diturunkan setelah terjadi pemisahan untai ganda 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:

### **2.5.1 Denaturasi**

Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya 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).

### **2.5.2 Annealing**

Annealing primer merupakan pengenalan suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai dan konsentrasi primer itu sendiri. 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.

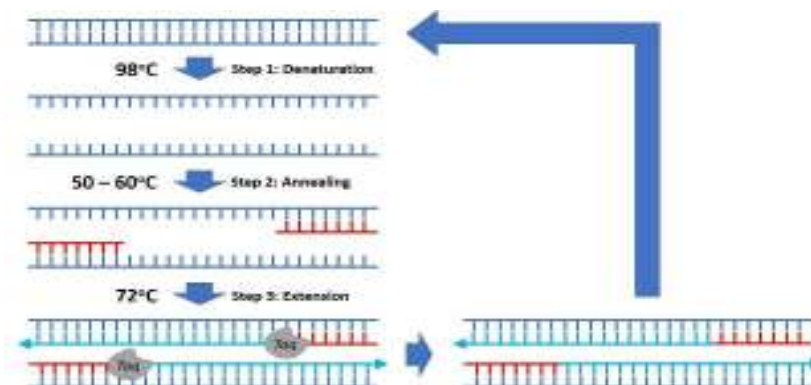
Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperature penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C (Yusuf, 2010).

### **2.5.3 Pemanjang Primer (Extention)**

Pada tahap extention ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang menempel di urutan basa nukleotida DNA target bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Metode ini terdiri atas menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan



cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif (Yusuf, 2010). Proses skema PCR dapat dilihat pada gambar 3.



**Gambar 4. Proses skema PCR**

(Sumber:<https://r.search.yahoo.com>)

## 2.6 Morfometri

Ayam kampung adalah ayam lokal yang tidak memiliki karakteristik khusus. Masyarakat umumnya memelihara ayam kampung untuk mendapatkan daging, telur maupun sebagai tabungan. Bila dibandingkan dengan ayam ras, produktivitas beberapa galur ayam lokal tersebut masih tergolong rendah. Salah satu usaha untuk meningkatkan produktivitas ternak adalah melalui seleksi. Namun demikian, perlu dilakukan karakterisasi sebagai dasar untuk melakukan seleksi terhadap ayam lokal. Karakterisasi merupakan langkah awal dalam pemuliaan ternak dalam rangka mengidentifikasi sifat-sifat penting yang bernilai ekonomis seperti bobot badan dan pertambahan bobot badan atau sifat-sifat penciri rumpun ternak yang bersangkutan. Karakterisasi ayam lokal dapat dilakukan dengan cara mengidentifikasi morfometrik.

Fungsi dari morfometrik digunakan untuk memprediksi bobot badan 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 dapat digunakan sebagai kriteria seleksi untuk meningkatkan produktivitas 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, 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).

Variabel-variabel morfometrik tersebut dapat menjadi penciri ukuran dan bentuk tubuh ayam lokal yang berguna untuk memprediksi potensi produksi, peluang peningkatan produktivitas ternak, dan sebagai acuan standarisasi sifat-sifat ayam lokal secara lengkap seperti pada ayam kedu jengger merah dan jengger hitam generasi pertama (Ashifudin *et al.*, 2017).

Penelitian dilakukan pengukuran dengan metode pengukuran berdasarkan kerangka tubuh ayam (Sartika, 2013) dan cara pengukurannya adalah:

- a) Panjang paha atas diukur berdasarkan tulang femur (cm) diukur pada sepanjang tulang paha pada bagian ujung distal yang berartikulasi dengan tibia, fibula, dan patella dengan menggunakan jangka sorong (Sartika, 2013; Suhardi, 2012).
- b) Panjang paha bawah diukur berdasarkan tulang tibia (cm) diukur dari patella sampai ujung tibia dengan menggunakan jangka sorong (Sartika, 2013; Suhardi, 2012).
- c) Panjang kaki diukur berdasarkan tulang tarsometatarsus atau shank (cm) diukur sepanjang tulang tarsometatarsus dengan menggunakan jangka sorong.
- d) Lingkaran kaki diukur berdasarkan tulang tarsometatarsus (cm) diukur dengan melingkari tulang tarsometatarsus (shank) pada bagian tengah dengan menggunakan pita ukur yang kemudian dikonversi ke jangka sorong (Sartika, 2013; Suhardi 2012).
- e) Panjang jari ketiga (cm) diukur dari pangkal jari ketiga sampai ujung jari dengan menggunakan jangka sorong.
- f) Panjang sayap (cm) diukur dengan merentangkan bagian sayap terlebih dahulu dan dimulai dari pangkal humerus sampai ujung phalanges dengan menggunakan pita ukur dan kemudian dikonversi ke jangka sorong.

- g) Panjang maxilla (cm) diukur dari pangkal sampai ujung paruh bagian atas dengan menggunakan jangka sorong (Sartika, 2013; Suhardi, 2012).
- h) Tinggi jengger (cm) diukur dari pangkal jengger di atas kepala sampai ujung jengger yang paling tinggi dengan menggunakan jangka sorong (Sartika, 2013; Suhardi, 2012).
- i) Panjang dada diukur berdasarkan tulang sternum (cm) diukur sepanjang tulang dada bagian depan mulai dari pangkal atas hingga ujung dada dengan menggunakan pita ukur kemudian dikonversi ke jangka sorong.

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan pada bulan Maret 2023 sampai dengan April 2023 dimulai dari Kecamatan Tiga Panah yaitu pengambilan sampel darah Ayam Mirah dan dilanjutkan di Gedung Genomik, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Jl. Jakarta – Bogor No. 32, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

#### 3.2. Materi Penelitian

##### 3.2.1. Sampel DNA

Penelitian ini menggunakan sampel DNA dari ayam Mirah sebanyak 50 ekor yang digunakan dari peternak yang berbeda di daerah Simalungun. Dimana setiap satu ekor ayam akan di ambil darahnya minimal 1 ml sebagai sampel. darahnya disimpan di tabung EDTA.

##### 3.2.2 Data Berat Badan dan Morfometri

Berat badan ayam Mirah jantan dewasa diukur menggunakan timbangan digital crane. Selanjutnya sebanyak sepuluh data morfometri diukur pada masing-masing meliputi tinggi jengger (TJ), panjang dada (PD), panjang paruh (PP), panjang sayap (PS), panjang jari ketiga (PJK), lingkaran kaki(LK), panjang kaki (PK), panjang paha bawah (PPB) dan panjang paha atas (PPA) seperti pada Gambar 3 berikut:



**Gambar 5.** Skema pengukuran pada ayam

Skema pengukuran pada ayam meliputi:

- |                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| a. Panjang Dada        | f. Panjang kaki       |
| b. Panjang Paruh       | g. Panjang paha atas  |
| c. Panjang sayap       | h. Panjang paha bawah |
| d. Panjang jari ketiga | i. Maxilla            |
| e. Lingkar kaki        |                       |

### 3.2.3 Bahan dan Peralatan Penelitian

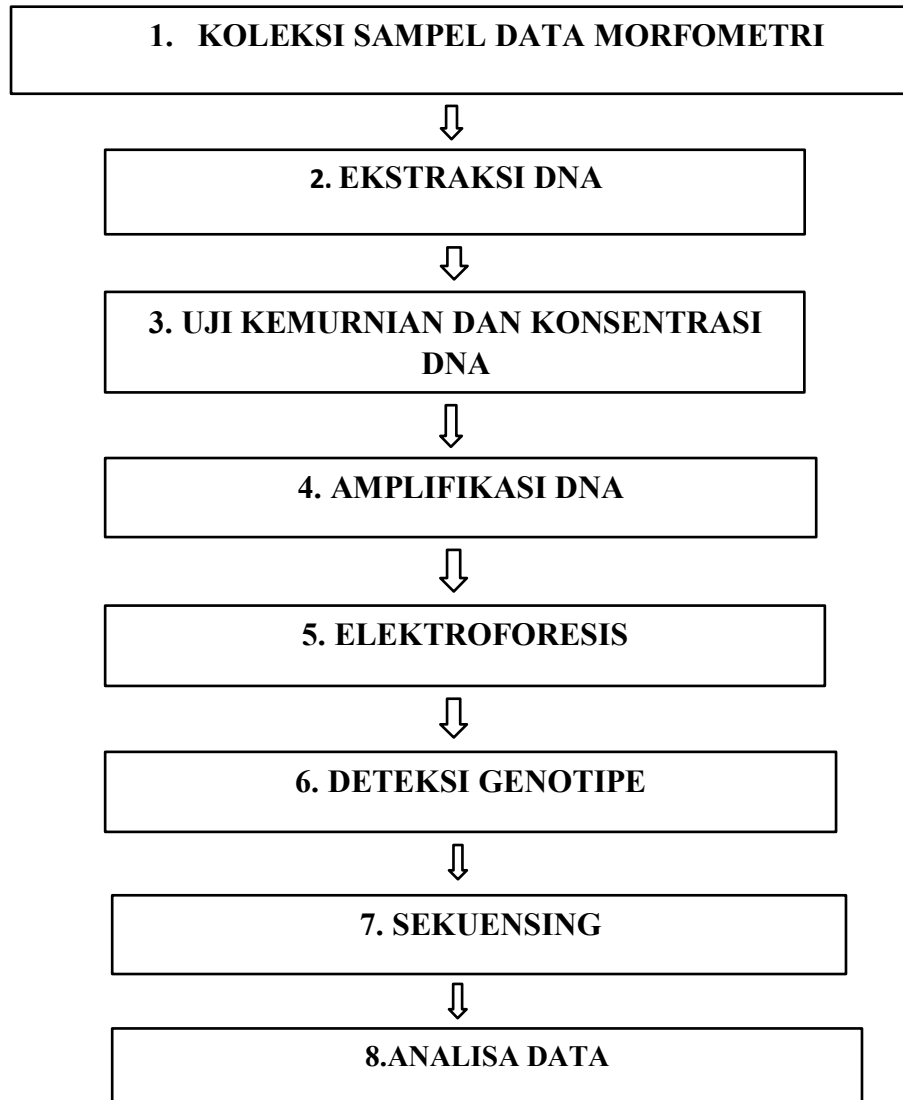
**Amplifikasi DNA.** Bahan yang digunakan: PCR mix (GoTaq Green Mastermix, Promega), Sepasang primer, DW (Destilated Water) free-nuclease, DNA template ayam Dayok Mirah. Alat yang digunakan: mesin PCR Mastercycler gradient (Veriti, USA), mesin mini sentrifuse, spin-down, micro pipet (ukuran 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L), tips (white tips 10  $\mu$ L, yellow tips 100  $\mu$ L, blue tips 1000  $\mu$ L) PCR tube 0,2 ml, raktube, gloves, mesin visualisasi UV G Box (Syngene, UK).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung EDTA digunakan untuk menampung darah yang diambil menggunakan spuit dari pembuluh vena, spuit 5 ml digunakan untuk mengambil darah dari pembuluh vena, coller box digunakan untuk menyimpan sampel yang diambil dari kandang penelitian ke laboratorium.

**Elektroforesis.** Bahan yang digunakan adalah Produk PCR, DNA Ladder100bp plus (vivantis), *Loading dye*6x (vivantis), larutan TBE(tris base, boric acid and EDTA)10x (Thermo scientific, (EU)Lithuania), agarose (Vivantis, USA) .Alat yang digunakan: Mesin elektroforosis 100v (Mupid-x), timbangan analitik 252g/0,1g (Libra Mas), *spin-down micro pipet* (ukuran 10  $\mu$ L), *Gel Tray*, *rak tube*, *magnetic stirrer*, botol kaca 500 ml, gelas ukur 100 ml.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Prosedur Penelitian



**Gambar 6. Prosedur Penelitian**

##### a. Pengambilan darah

Seluruh protokol yang melibatkan hewan pada penelitian ini dilakukan dengan mematuhi kaidah-kaidah kesejahteraan hewan. Pengambilan darah (*venesection*) merupakan salah satu hal yang terpenting dari kegiatan peternakan. *Vena pectoralis* merupakan pembuluh darah yang terletak pada bagian bawah sayap unggas. *Vena pectoralis* banyak mengandung pembuluh darah dan dari luar pembuluh terlihat berwarna biru.

Prosedur pengambilan sampel darah pada unggas ialah, menyiapkan unggas dalam posisi terbaring sambil dipegang, selanjutnya menahan kepala unggas ke satu sisi dan membuka sayap. Bagian yang akan diambil darahnya dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol, setelah itu darah diambil menggunakan jarum suntik dan menusukkan jarum di *Vena pectoralis* yang berada dibawah sayap. Lalu darah ditampung menggunakan Tabung EDTA dan disimpan didalam coolbox.

#### **b. Ekstraksi DNA**

Prosedur ekstraksi DNA dilakukan sesuai petunjuk gSYNC DNA Extraction Kit (Genaid) langkah ekstraksi DNA berdasarkan protokol tersebut adalah diawali dengan 300  $\mu$ L darah ditambahkan dengan 900  $\mu$ L RBC Lysis Buffer lalu kocok menurut angka 8(tidak di vortex) dan inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Sampel kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Endapan yang diperoleh ditambahkan dengan 100  $\mu$ L RBC Lysis Buffer, 200  $\mu$ L GB Buffer kemudian di vortex. Kemudian inkubasi pada suhu 60  $^{\circ}$ C selama 10 menit, selama inkubasi tube digoyang atau di bolak-balik setiap 3 menit. Bersamaan dengan inkubasi tersebut, lakukan juga inkubasi pada Elution Buffer untuk digunakan pada saat elution.

Setelah inkubasi, larutan sampel ditambahkan dengan EtOH absolut sebanyak 200  $\mu$ L, dan segera di vortex selama 10 detik. Lalu pindahkan ke GD Column, sentrifugasi pada 14000-16000xg selama 5 menit, lalu buang supernatant. Tambah W1 Buffer sebanyak 400 $\mu$ L kedalam GD Column, sentrifugasi 14000-16000xg selama 1 menit dan buang supernatant. Tambah Wash Buffer (yang sudah ditambah EtOH) sebanyak 600  $\mu$ L kedalam GD Column, sentrifugasi 14000-16000xg selama 1 menit lalu buang supernatant, dan sentrifugasi kembali 14000-16000xg selama 3 menit lalu buang supernatant. Setelah itu pindah GD Column ke microtube yang berukuran 1,5 ml. tambah 100 $\mu$ L Elution Buffer (sudah di pre-heat) ditengah-tengah GD Column, lalu diamkan selama 3 menit agar terserap. Setelah itu sentrifus 14000-16000xg selama 1 menit. Sampel siap digunakan atau disimpan di freezer(-20 $^{\circ}$ C).

### c. Uji Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Uji kualitas DNA merupakan salah satu teknik dasar dalam Biologi Molekuler yang bertujuan untuk menentukan ada tidaknya kontaminasi protein dan RNA. Tes kuantitas DNA dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer. Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur konsentrasi senyawa berdasarkan kemampuannya menyerap cahaya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan perbedaan kemurnian DNA yang diukur dengan Nanodrop Spektrofotometer.

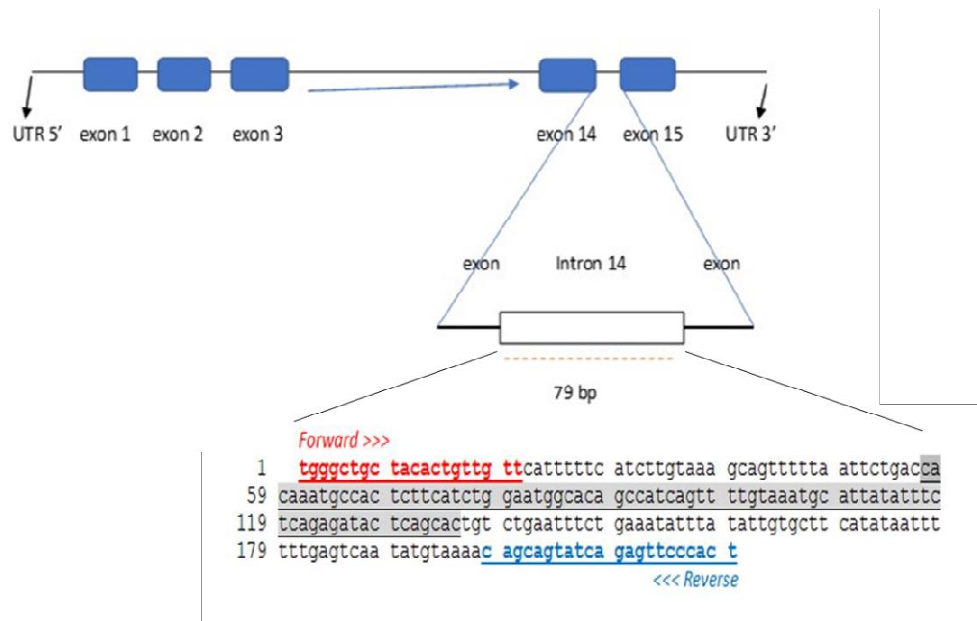
### d. Amplifikasi DNA

PCR pada gen Prolactin reseptor dilakukan pada volume total 10  $\mu$ L terdiri dari; DNA 2  $\mu$ L, primer yang digunakan pada gen prolaktin reseptor adalah primer forward dan reverse masing-masing sebanyak 0,5  $\mu$ L, GoTaq Green Master Mix sebanyak 5  $\mu$ L dan DDW sebanyak 2  $\mu$ L. Primer yang digunakan untuk amplifikasi intron 14 gen prolaktin reseptor menggunakan desain primer menurut Liang *et al.*, (2019) yaitu PRLR-F 5'- GGG CTG CTA CAC TGT TGT T -3' dan R 5'- AGT GGG AAC TCT GAT ACT GCT G -3'. Target panjang sekuen gen PRLR ayam (GenBank: AC\_192388.1/ AC\_190411) dalam penelitian ini sebesar 139 bp (delesi) atau 219 bp (insersi) meliputi region intron 14 (Gambar 4). Program PCR yang digunakan mengikuti hasil gradient PCR yang akan dilakukan. Proses amplifikasi dijalankan dengan 35 siklus menggunakan mesin Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem) dengan program mesin sebagai berikut:

Tabel 1. Program PCR untuk amplifikasi gen PRLR pada ayam Mirah

Tahapan	Suhu	Waktu
Predenaturasi	95 <sup>0</sup> C	2 Menit
Denaturasi	95 <sup>0</sup> C	10 Detik
Annealing	60 <sup>0</sup> C	30 Detik
Ekstensi	72 <sup>0</sup> C	30 Detik
Ekstensi Akhir	72 <sup>0</sup> C	5Menit





Gambar 7. Peta gen PRLR *Gallus gallus*, posisi target 79-bp indel di intron 14, dan posisi penempelan primer.

#### e. Elektroforesis

Proses elektroforesis dilakukan untuk melihat fragmen DNA hasil PCR, pada agarose gel 2% pada tegangan 100V selama 35 menit. Volume reaksi loading dye sebanyak 2  $\mu$ L, PCR product sebanyak 10  $\mu$ L. selain itu digunakan juga staining sebanyak 3  $\mu$ L, dan marker sebanyak 5  $\mu$ L. Pada Tahap elektroforesis diperlukan agarose dengan konsentrasi 2,0% yang dibuat dengan cara menambahkan bubuk agarose 2,0gr kedalam 100 ml larutan TBE 100 ml. Larutan tersebut dipanaskan oleh microwave oven 2 menit. Larutan yang masih cair ditambahkan staining sebanyak 3  $\mu$ L, lalu dituangkan ke dalam pencetak gel sebanyak 50ml serta sisir ditempatkan di dekat tepian gel dan dibiarkan mengeras. Sisir dicabut setelah gel mengeras sehingga terbentuk sumur-sumur. Gel selanjutnya ditempatkan ke dalam gel *tray elektroforesis* yang sudah berisi larutan *buffer* TBE 100 ml.

Produk PCR sebanyak 5  $\mu$ L dicampur dengan *loadingdye* sebanyak 2  $\mu$ L, dengan menggunakan mikropipet dimasukkan dalam sumur-sumur gel. Marker sebanyak 5  $\mu$ L ditaruh dalam sumur paling kiri sebagai penanda. Gel tray selanjutnya dialiri listrik 100 volt selama 35 menit, molekul DNA yang bermuatan negatif pada pH netral akan bergerak (bermigrasi) ke arah positif. Setelah

elektroforesis selesai, gel agarose diambil untuk dilihat panjang pita DNA dengan menggunakan sinar ultraviolet dalam mesin Visualisasi. Pembacaan fragmen DNA dilakukan dengan menarik garis lurus antara posisi pita dari masing-masing sampel DNA dengan posisi pita DNA marker.

### **3.3.2. Deteksi Genotipe**

Penentuan genotipe gen PRLR dilakukan berdasarkan Liang et al. (2019), yang mendeteksi adanya tiga genotype, yaitu II (homozigot insersi), DD (homozigot delesi), dan ID (heterozigot insersi-delesi). Genotipe II dan DD ditunjukkan dengan pita tunggal pada gel dengan ukuran masing-masing sekitar 219 dan 139 bp. Sedangkan genotype ID ditunjukkan dengan adanya pita ganda berukuran 219 dan 139 bp.

### **3.3.3. Sekuensing**

Sekuensing digunakan untuk memverifikasi posisi mutasi indel yang terjadi di intron 14 gen PRLR. Sekuensing dilakukan pada 1 sampel dengan genotipe ID pada volume 25  $\mu$ L melalui jasa 1<sup>st</sup> Base (Malaysia).

## **3.4 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).

### 3.4.1 Perubahan Yang Diamati

#### 3.4.1.1 Frekuensi Genotipe

Frekuensi genotipe merupakan rasio dari jumlah suatu genotipe terhadap 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.

N = jumlah individu sampel.

#### 3.4.1.2 Frekuensi Alel

Frekuensi alel merupakan rasio suatu alel terhadap keseluruhan alel pada satu lokus dalam populasi. Frekuensi alel ( $x_i$ ) gen PRLR 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.

#### 3.4.1.3 Heterozigositas

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 :  
 $H_e$  = 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)

#### 3.4.1.4 Alel efektif

Alel efektif merupakan suatu perhitungan yang digunakan untuk mengetahui jumlah alel yang umum dijumpai dalam suatu lokus pada suatu gen. Jumlah alel efektif adalah sebuah ukuran dari jumlah alel efektif yang diperoleh dari masing-masing 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):

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

Keterangan:  
 $n_e$  = jumlah alel efektif.  
 $X_i$  = frekuensi alel i.

#### 3.4.1.5 Polymorphic Informatic Content

*Polymorphic Informatic Content* (PIC) merupakan indeks yang digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik pada suatu lokus gen. Kategori hasil perhitungan PIC menurut Bostein *et al.* (1980) terdistribusi 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:

$$\text{PIC} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n X_i^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n 2X_i X_j}$$

$$= H_e - \frac{\sum_{i=1}^n X_i^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n 2X_i X_j}$$

Keterangan:

PIC = polymorphis informative content.

$X_i$  = frekuensi allel ke-i.

$X_j$  = frekuensi allel ke-j.

$H_e$  = heterozigositas harapan.

### 3.4.1.6 Nilai Chi-square

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

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

Keterangan:

$\chi^2$  = nilai *Chi square*

O = frekuensi observasi

E = frekuensi harapan (*expected*)

p = frekuensi allel A

q = frekuensi allel a

N = jumlah total individu

### 3.4.2. Asosiasi

Model linier diterapkan untuk menganalisis asosiasi variasi gen PRLR dengan sifat pertumbuhan pada Ayam Mirah. Model matematika digunakan untuk analisis:

$$Y_i = \mu + G_i + e_i$$

Keterangan :

$Y_i$  : adalah sifat yang diukur pada masing-masing  $i$  th hewan,

$\mu$  : adalah rata-rata populasi keseluruhan,

$G_i$  : adalah efek tetap terkait dengan genotipe  $i$  dan

$e_i$  : adalah kesalahan acak.

Perangkat lunak SPSS V13.0 (SPSS Inc., USA) digunakan untuk menganalisis hubungan antara genotipe dan ukuran tubuh pada Ayam Mirah. Semua data untuk setiap sifat yang diperoleh dengan analisis statistik disajikan sebagai mean  $\pm$  standard error (mean  $\pm$  SE).  $P < 0,05$  dianggap signifikan secara statistik (Li *et al.*, 2019).