

IDENTIFIKASI KERAGAMAN GEN BMPR-1B (Bone Morphogenetic Protein Receptor IB) PADA AYAM ARAB, AYAM KAMPUNG DAN AYAM RAS PETELUR MENGUNAKAN PCR-RFLP

HIDAYATI^{1,2}, ENIZA SALEH² DAN TAHRIR AULAWI²

1) Laboratorium Pemuliaan dan Genetika

2) Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN Suska Riau

JL.HR.Soebrantas KM.15 Simpang Baru Panam Pekanbaru

Email : yati_suska@yahoo.com

ABSTRACT

BMPR-1B gene closely related to the rate of ovulation and follicular maturation. In poultry, BMPR-1B gene is located on chromosome 14th consists of 13 exons. BMPR-1B was expressed in the granulosa cells of the ovary and teca interna poultry. BMPR-1B was able to accelerate the maturation of the follicles so that the ova produced increasingly. BMPR-1B gene diversity was associated with poultry production. DNA isolation was performed using GeneJET Genomic DNA Purification Kit from blood samples derived from 28 native chickens, 20 layer chickens and 10 arab layer chickens. A total of 58 DNA were used as a template in the process of BMPR-1B gene amplification using Polymerase Chain Reaction method. Primers used in this study according to Zhang et al. (2008), Forward primer 5' ATG GCT GGG AAG TCT GGA TG 3' dan Reverse primer 5' TGC CTT CTG TGT TAA CCG C 3' with a length of 581 bp. This primary amplify BMPR-1B gene segment from exon 6 to exon 7 including the entire intron 6 with an annealing temperature of 58°C. BMPR-1B gene diversity was detected using restriction enzymes HindIII were incubated for 2 hours. The results of the study was showed that Hind III restriction enzymes do not cut the BMPR-1B gene segments in the population of native chickens, arab layer chickens and layer chickens, they were monomorphic.

Keywords : BMPR-1B gene, PCR-RFLP, native chicken, arab layer chicken, layer chicken

PENDAHULUAN

Beberapa jenis ayam petelur yang umum dipelihara di Provinsi Riau adalah ayam ras petelur, ayam arab dan ayam kampung dengan tingkat produktivitas yang relatif masih rendah. Ayam ras petelur dan ayam arab merupakan ayam hasil pemuliaan yang memiliki produktivitas relatif seragam yang dicirikan dengan penampilan fisik (warna bulu, bentuk jengger, warna jengger, dan lain lain) yang relatif seragam dalam suatu populasi. Berbeda dengan ayam kampung, tingkat keragaman produksi telur dan penampilan fisik di dalam dan antar populasi relatif masih tinggi sehingga upaya peningkatan produksi telur masih dapat dilakukan melalui seleksi terhadap sifat-sifat yang berhubungan dengan produksi telur melalui eksplorasi keragaman gen-gen yang berhubungan dengan sifat tersebut.

Menurut Siregar dan Sarbani (1980), produksi telur ayam kampung 30-80 butir per tahun dengan berat 37,5 g sedangkan ayam petelur berkisar 200-250 butir per tahun dengan berat rata-rata 55,6 g. Perbedaan umur dewasa kelamin dengan pemeliharaan secara intensif antara ayam kampung dan ayam ras petelur juga telah dilaporkan Wihandoyo dan Mulyadi (1986) yaitu 166,76 hari untuk ayam kampung dan 164,08 hari untuk ayam ras petelur. Hidayati (2008a) melaporkan rata-rata nilai Hen Day Average (HDA) ayam arab *brakel kriel silver* dengan pemeliharaan intensif adalah 40% jauh lebih rendah dari kemampuan produksi ayam arab rata-rata 70-80%. Hal ini diduga disebabkan karena telah terjadi *inbreeding* pada populasi tersebut sehingga terjadi efek penurunan terhadap produksi telur atau dikenal dengan istilah *inbreeding depression* atau tekanan silang dalam (Hidayati, 2008b).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kembali produktivitas dari ayam-ayam petelur adalah dengan menyeleksi tetua unggul, baik jantan atau betina melalui seleksi yang ketat. Salah satunya menggunakan *Marker Assisted Selection* (MAS) yang berkaitan dengan produksi telur. Identifikasi keragaman genetik dilakukan pada taraf *Deoxyribo Nuclei Acid* (DNA) melalui penggandaan sekuens DNA dengan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR). DNA berperan dalam semua aktivitas sel. DNA menyimpan dan mengespresikan informasi genetik yang dapat diwariskan ke generasi berikutnya. Identifikasi keragaman genetik pada tingkat molekuler memberikan keuntungan dilihat dari sisi waktu dan biaya terutama untuk sifat-sifat dengan nilai heritabilitas rendah, sifat-sifat yang muncul setelah ternak dewasa atau untuk sifat-sifat yang baru dapat diamati setelah ternak dipotong atau disembelih.

Keragaman diantara individu dalam spesies yang sama atau antar spesies berbeda merupakan potensi sumber daya genetik yang dapat dimanfaatkan dalam menghasilkan ternak hibrida. Adanya kemajuan teknologi molekuler dapat mempersingkat dan mempercepat waktu seleksi dengan penemuan MAS untuk sifat-sifat yang dijadikan sebagai kriteria dalam seleksi. Salah satu metode identifikasi keragaman genetik yang dapat digunakan adalah menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction-Restricted Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). PCR-RFLP pada prinsipnya adalah suatu metode penentuan mutasi pada sekuens DNA atau gen target menggunakan bantuan enzim restriksi tertentu. Enzim restriksi merupakan enzim yang mampu memotong sekuens DNA pada titik tertentu, atau dikenal dengan istilah titik rekognisi, dimana keragaman yang muncul ditampilkan melalui pita-pita yang terbentuk hasil elektroforesis. Salah satu gen penentu produksi telur adalah gen BMPR-1B (*Bone Morphogenetic Protein Receptor IB*).

Gen BMPR-1B berkaitan erat dengan laju ovulasi dan pematangan folikel (Zhang *et al.*, 2008; Maskur dan Arman, 2010). Gen BMPR-1B pada domba disebut juga gen FecB yang bersifat dominan untuk mempercepat laju ovulasi dan meningkatkan jumlah *litter size* sehingga dikenal juga sebagai marker untuk sifat prolififikasi (Souza *et al.*, 2001; Wilson *et al.* 2001). Pada unggas gen BMPR-1B terletak pada kromosom ke 4 dengan 13 ekson. BMPR-1B diekspresikan pada sel-sel granulosa dan teka interna pada ovarium unggas sehingga mempercepat pematangan folikel sehingga jumlah ovum yang diovulasikan akan semakin banyak. Zhang *et al.* (2008) menemukan satu titik mutasi (T35C) pada daerah ekson 6 merupakan *silent mutation* tidak merubah asam amino glycine dan 4 titik mutasi pada daerah intron 6 yaitu C166T, G224C, A287G dan G303A. Dijelaskan lebih lanjut mutasi pada posisi A287G berhubungan erat dengan produksi telur pada umur 47-56 minggu. Tujuan penelitian ini adalah mengeksplorasi keragaman gen BMPR-1B pada populasi ayam arab, ayam kampung dan ayam petelur.

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi mengenai keragaman gen BMPR-1B dijadikan sebagai informasi dasar bagi pemulia (*breeder*) dalam menemukan MAS pada populasi ayam kampung, ayam arab dan ayam petelur sebagai langkah awal seleksi tetua dalam peningkatan produktivitas ayam lokal petelur unggul. Hipotesis penelitian ini adalah ditemukannya keragaman gen BMPR-1B pada ruas ekson 6-7, pada populasi ayam arab, ayam kampung dan ayam petelur menggunakan metode PCR-RFLP.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian telah dilaksanakan pada Bulan Juli sampai dengan Desember 2015 di Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN Suska Riau. Laboratorium Patologi,

Entomologi dan Mikrobiologi Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN Suska Riau. Pengambilan sampel darah ayam arab berasal dari UPT Unggas Desa Laboy Jaya, ayam kampung dari peternakan rakyat seputaran Kota Pekanbaru dan ayam petelur dari peternakan ayam ras petelur di Kabupaten 50 Kota Sumatera Barat

Materi

Materi yang digunakan adalah sampel darah dari populasi ayam arab (n= 20 ekor), ayam kampung (n=28 ekor) dan ayam ras petelur (n=10). Bahan dan alat yang digunakan untuk pengambilan sampel darah adalah spuit 3 ml, tabung *vacutainer* dengan EDTA 3 ml, ethanol absolut (96%), kapas beralkohol dan *cool box*. Penyimpanan sampel darah ayam kampung dan ayam ras petelur dilakukan pada tabung *vacutainer* dengan EDTA sedangkan ayam arab dengan penambahan alcohol absolut dengan perbandingan 1:1.

Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi DNA terdiri atas DW (*dilution water*), tabung eppendorf 1,5 ml, ethanol absolut (96%), 1 X PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4), pipet tips, disposable gloves, masker dan TE

buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). GeneJET Genomic DNA Purification DNA Kit #K0721 terdiri atas Protainase K solution, RNase A solution, Digestion Solution, Lysis Solution, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 9,0; 0,5 mM EDTA), columns collection tube dan collection tube.

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji kualitatif DNA hasil isolasi adalah gel agarose 1% (0,5 g agarose + 50 ml dalam 1 x TAE, ethidium bromide, loading dye, marker (100 bp) dan *Dilution Water*. Alat-alat yang digunakan adalah timbangan digital, gelas ukur, gelas piala 250 ml, cetakan gel, magnetic stirrer dan hot plate, tangki elektroforesis dan power suplay serta UV GelDOC.

Bahan-bahan pereaksi PCR untuk amplifikasi DNA ruas gen BMPR-1B menggunakan primer menurut Zhang *et al.* (2008) dirancang menggunakan sequence gen bank nomor akses NM_205132 merupakan sequence BMPR-1B mRNA yang mengamplifikasi ruas gen BMPR-1B dari ekson 6 hingga ekson 7 termasuk seluruh intron 6. Susunan primer yang digunakan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Susunan primer dan panjang produk PCR yang dihasilkan

Susunan Primer	Panjang Produk PCR	Sumber
Primer Forward 5' GCT ATG GGG AAG TCT GGA TG 3'	581 bp	Zhang
Primer Reverse 5' TGC CTT TAA TGT CTG CCG C 3'		<i>et al.</i> (2008)

Amplifikasi gen BMPR-1B menggunakan metode PCR menggunakan, DNA genom dan PCR kit *Dream Tag Green PCR Master Mix* dari *thermo scientific*. Alat-alat yang digunakan tabung Eppendorf 0,2 mL, pipet, tip, sentrifuge, timbangan analitik, vortex dan mesin PCR thermal cycler.

Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu (1) pengambilan sampel darah di lapangan, (2) ekstraksi DNA total dan visualisasi DNA hasil isolasi (3) amplifikasi ruas gen BMPR-1B mengguna-

kan PCR (4) visualisasi hasil PCR menggunakan elektroforesis gel agarose 2% (5) identifikasi keragaman menggunakan metode RFLP (6) visualisasi pola pita menggunakan elektroforesis gel agarose 2% (7) analisis data

1. Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah sebanyak 0,5-1 ml, melalui pembuluh *vena* sayap menggunakan spuit dan tabung *vacutainer* yang mengandung EDTA untuk penyimpanan Untuk sampel darah ayam arab disimpan dalam tabung

Eppendorf 1,5 ml dan ditambahkan ethanol absolut (96%) perbandingan 1: 1.

2. Isolasi DNA dan Visualisasi DNA Hasil Isolasi

Ekstraksi DNA genom dilakukan mengikuti prosedur dari GeneJET Genomic DNA Purification DNA Kit #K0721 (Gambar 1). Kualitas DNA hasil isolasi dievaluasi menggunakan elektroforesis pada gel agarose 1% dalam larutan 1 X TAE. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 30 menit.

3. Amplifikasi Gen BMPR-1B Menggunakan Metode PCR

Sampel DNA dari masing-masing individu digunakan sebagai cetakan untuk mengamplifikasi lokus gen BMPR-1B melalui reaksi PCR menggunakan sepasang primer menurut Zhang *et al.* (2008). Larutan mix yang dibuat terdiri atas 10 pg-1µg DNA template, 0,1-1,0 µM primer (forward + reverse), 12,5 µl Dream Tag Green PCR Master Mix dan water nuclease-free hingga 25 µl. Amplifikasi menggunakan mesin PCR thermo cycler dengan kondisi mesin sebagai berikut; Pradenaturasi 93°C selama 3 menit, denaturasi 93°C selama 30 detik, *annealing* 58°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 30 detik dan ekstensi akhir 72°C selama 5 menit dengan jumlah siklus 35 x.

4. Visualisasi Hasil Amplifikasi Gen BMPR-1B Menggunakan Elektroforesis Gel Agarose 2%

Keberhasilan amplifikasi PCR dilihat pada gel agarose 2%; 0,70 g agarose dilarutkan pada 35 ml 1 X TAE, dipanaskan di atas hot plate suhu 200°C dan distirer selama kurang lebih 15 menit hingga membentuk larutan bening. Selanjutnya ditambahkan 2,5 µL ethidium bromide didinginkan. Selanjutnya gel yang dituangkan pada cetakan dan dipasang sisir untuk membentuk sumur, ditunggu mengeras ± 20 menit. Gel yang telah mengeras selanjutnya

dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis (*chamber*) yang sebelumnya sisir dilepas dari cetakan. Pengisian sampel sebanyak 4 µL PCR product dalam 1 µL Loading Dye. Pengisian dilakukan pada sumur ke 2, 3, 415 dan pada sumur pertama dimasukkan DNA leader 100 bp. Selanjutnya elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit (Gambar 3.19) Visualisasi pita dilakukan menggunakan Geldoc selanjutnya didokumentasikan.

5. Identifikasi Keragaman Gen BMPR-1B Menggunakan Metode RFLP

Sebanyak 10 µL produk PCR diinkubasi menggunakan 10 U enzim restriksi HindIII selama 2 jam.

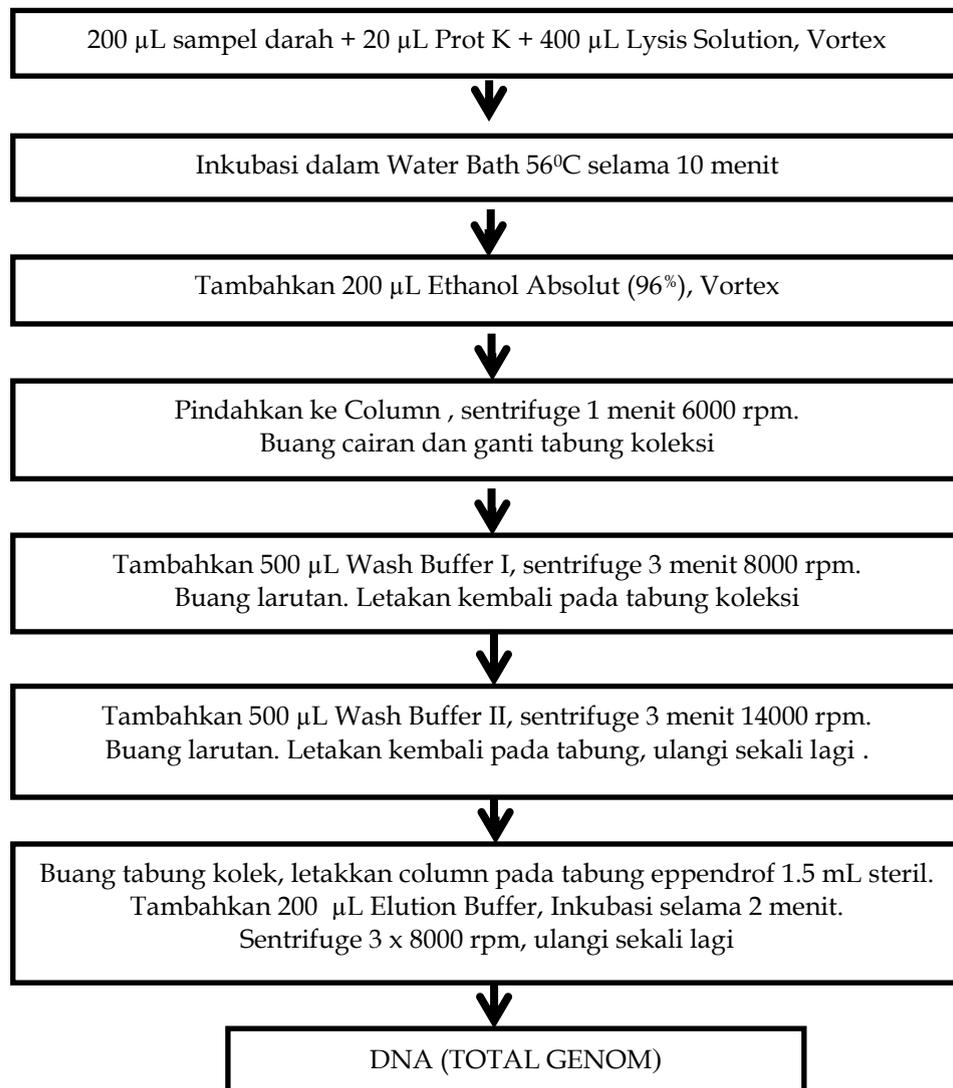
6. Visualisasi Hasil RFLP Menggunakan Elektroforesis Gel Agarose 2%

Visualisasi keragaman diketahui dengan elektroforesis gel agarose 2%. Keragaman ditentukan dengan munculnya beberapa pola pita pada sekuens hasil PCR

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Populasi dan Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan pada daerah pembuluh darah di bawah sayap sebanyak 0,5-1,0 ml menggunakan spuit ukuran 3 ml. Selanjutnya darah disimpan pada tabung vacuntainer yang mengandung EDTA untuk ayam kampung dan ayam petelur serta dalam ethanol absolut 96% untuk ayam arab. Total sampel yang telah dikumpulkan sebanyak 58 sampel, berasal dari ayam umur 6 bulan sampai 2 tahun terdiri dari ayam kampung jantan 8 ekor dan betina 20 ekor, ayam arab betina 20 ekor dan ayam ras petelur sebanyak 10 sampel. Sampel ayam arab yang digunakan berasal dari dua strain yaitu *silver* dan *golden*.



Gambar 1. Prosedur ekstraksi DNA

Keberhasilan Isolasi DNA

Isolasi DNA mengikuti prosedur GeneJet Whole Blood Genomic DNA Purification. Seluruh sampel darah berhasil diisolasi. Isolasi DNA dilakukan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Proses isolasi DNA terdiri atas tiga tahapan penting yaitu penghancuran (*lisis*), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA. Keberhasilan isolasi DNA ditentukan oleh ada tidaknya kontaminan seperti protein dan RNA. Adanya kontaminan ditunjukkan

oleh adanya *smear* pada uji kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose dan nilai kemurnian DNA tidak berada dalam rentang 1,8-2,2 melalui uji menggunakan spektrofotometri.

Tahap awal isolasi DNA adalah proses perusakan atau penghancuran membran dan dinding sel yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel. Pada tahap ini penghancuran membrane dan dinding sel dilakukan cara enzimatik menggunakan proteinase K (Prot K). Prot K berfungsi melisiskan membran pada sel darah, mendegradasi protein globular maupun

rantai polipeptida dalam komponen sel (Brown, 2010).

Pada tahapan ekstraksi DNA, seringkali digunakan *chelating agent* seperti ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) yang berperan menginaktivasi enzim DNase yang dapat mendenaturasi DNA yang diisolasi. EDTA menginaktivasi enzim nuklease dengan cara mengikat ion magnesium dan kalsium yang dibutuhkan sebagai kofaktor enzim DNase. DNA yang telah diekstraksi dari dalam sel selanjutnya perlu dipisahkan dari kontaminan komponen penyusun sel lainnya seperti polisakarida dan protein agar DNA yang didapatkan memiliki kemurnian yang tinggi. Fenol seringkali digunakan sebagai pendenaturasi protein, ekstraksi menggunakan fenol menyebabkan protein kehilangan kelarutannya dan mengalami presipitasi yang selanjutnya dapat dipisahkan dari DNA melalui sentrifugasi. Setelah sentrifugasi akan terbentuk 2 fase yang terpisah yakni fase organik pada lapisan bawah dan fase aquoeus (air) pada lapisan atas sedangkan DNA dan RNA akan berada pada fase aquoeus setelah sentrifugasi sedangkan protein yang terdenaturasi akan berada pada interfase dan lipid akan berada pada fase organik. Selain fenol, dapat pula digunakan campuran fenol dan kloroform atau campuran fenol, kloroform, dan isoamil alkohol untuk mendenaturasi protein. Ekstrak DNA yang didapat seringkali juga terkontaminasi oleh RNA sehingga RNA dapat dipisahkan dari DNA ekstrak dengan cara pemberian RNase.

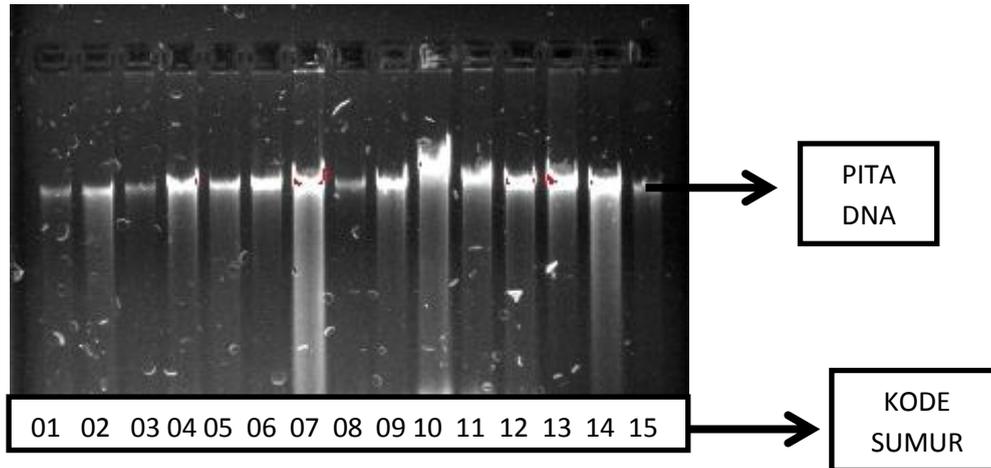
Selanjutnya DNA yang telah diekstraksi, dipresipitasi menggunakan etanol atau isopropanol. Kedua senyawa tersebut akan mempresipitasi DNA pada fase aquoeus sehingga DNA menggumpal membentuk struktur fiber dan terbentuk pellet setelah dilakukan sentrifugasi. Presipitasi juga berfungsi untuk menghilangkan residu-residu kloroform yang berasal dari tahapan ekstraksi. Prinsip-prinsip presipitasi antara lain pertama, menurunkan kelarutan asam nukleat dalam air. Hal ini dikarenakan molekul air yang polar mengelilingi

molekul DNA di larutan aquoeus. Muatan dipole positif dari air berinteraksi dengan muatan negatif pada gugus fosfodiester DNA. Interaksi ini meningkatkan kelarutan DNA dalam air. Isopropanol dapat bercampur dengan air, namun kurang polar dibandingkan air. Molekul isopropanol tidak dapat berinteraksi dengan gugus polar dari asam nukleat sehingga isopropanol adalah pelarut yang lemah bagi asam nukleat; kedua, penambahan isopropanol akan menghilangkan molekul air dalam larutan DNA sehingga DNA akan terpresipitasi; ketiga, penggunaan isopropanol dingin akan menurunkan aktivitas molekul air sehingga memudahkan presipitasi DNA.

Hasil Uji Kualitatif DNA

Keberhasilan isolasi DNA diuji secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose 1% dalam larutan TAE 1X. Hasil uji kualitatif DNA disajikan pada Gambar 2 dan 3. Metode standar yang dapat digunakan untuk identifikasi, pemisahan dan purifikasi fragmen DNA adalah menggunakan elektroforesis gel agarose (Fachtiyah, dkk., 2011). Pewarnaan ethidium bromide (EtBr) digunakan untuk alat identifikasi dan mengukur semi kualitatif fragmen DNA yang terpisah dalam gel agarose. EtBr akan terikat diantara dua untai ganda DNA, sehingga pita DNA dalam gel agarose akan berpendar karena EtBr mengandung zat fluoresen. Ikatan DNA-EtBr akan terekspos pada sinar UV dengan panjang gelombang 300 nm (Fachtiyah, dkk., 2011). Keberhasilan isolasi DNA dapat diketahui melalui munculnya pita DNA.

Migrasi DNA pada elektroforesis gel agarose dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu ukuran dan konformasi molekul DNA, konsentrasi agarose, arus listrik dan suhu. Total genom utuh dielektroforesis dengan agarose 0,8% sedangkan hasil amplifikasi DNA dielektroforesis dengan konsentrasi yang lebih tinggi 1,5-2% (Fachtiyah, dkk., 2011).



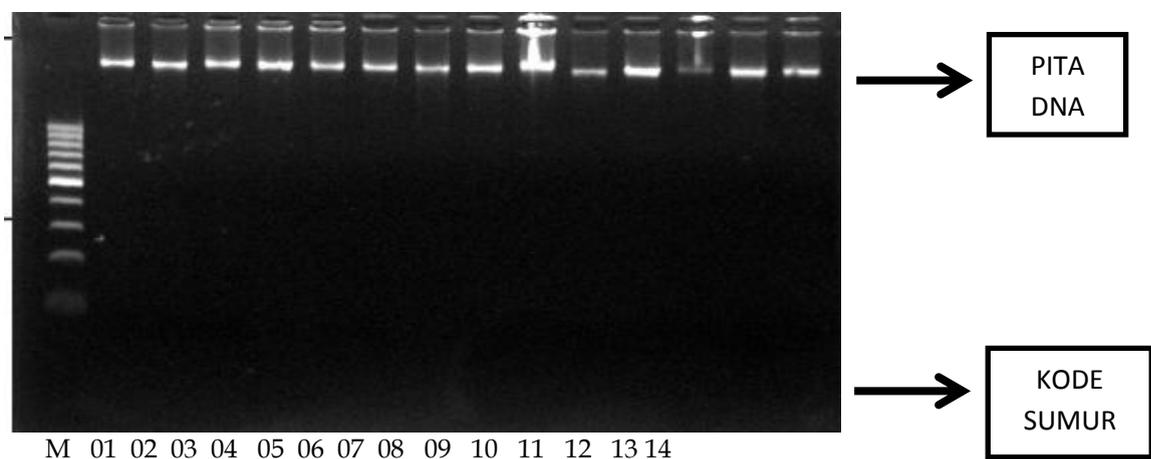
Gambar 2. Hasil isolasi DNA ayam kampung, ayam petelur dan ayam arab

Keterangan:

01, 08	= DNA Sapi Kuantan (pembanding)
02, 03, 05, 06, 09, 10, 11, 12	= DNA Ayam Kampung
04, 07, 14	= DNA Ayam Petelur
13, 15	= DNA Ayam Arab

Pada penelitian ini konsentrasi gel agarose yang digunakan adalah 1% menggunakan larutan TAE 1X. Selain faktor konsentrasi agarose migrasi DNA pada saat elektroforesis ditentukan pula oleh ukuran molekul DNA dimana DNA berbentuk sirkuler akan lebih cepat bermigrasi dibandingkan linear dan fragmen DNA utuh akan lebih cepat bermigrasi dibandingkan genom utuh. Voltase dari alat elektroforesis juga mempengaruhi

kecepatan migrasi DNA pada gel agarose karena DNA merupakan molekul bermuatan negatif. Dalam penelitian ini voltase yang digunakan adalah 100 Volt. Selain voltase, suhu juga mempengaruhi kecepatan migrasi DNA pada saat elektroforesis, suhu tinggi mengakibatkan DNA akan terurai dan akan kembali menyatu pada suhu dingin. Pada penelitian ini suhu yang digunakan pada saat elektroforesis adalah suhu kamar.



Gambar 3. Hasil isolasi DNA ayam kampung

Keterangan:

01, 05, 09, 13	= DNA Domba (pembanding)
02, 03, 04, 06, 07, 08, 10, 11, 12, 14	= DNA Ayam Kampung
M	= DNA Leader 100 bp

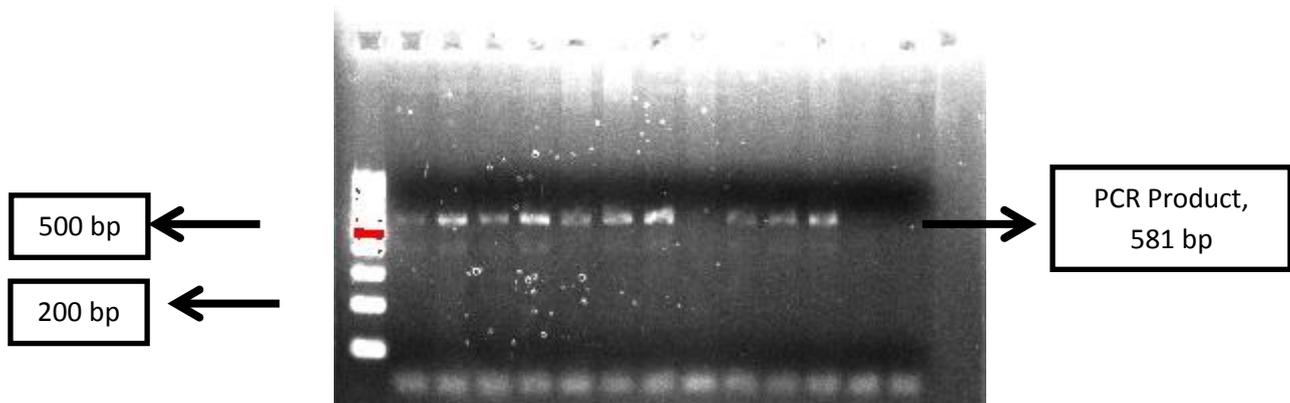
Hasil isolasi DNA menunjukkan DNA dapat diisolasi dengan baik yang ditunjukkan dengan munculnya pita yang jelas dan terang dan berada di atas marker pada semua sumur. Pita tebal dan terang secara kualitatif mengindikasikan konsentrasi hasil isolasi DNA yang dihasilkan tinggi sedangkan pita yang tipis mengindikasikan konsentrasi DNA yang dihasilkan kecil. Kemurnian DNA secara kualitatif dapat diketahui melalui ada tidaknya smear yang terbentuk dan dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang baik.

Secara kuantitatif, keberhasilan isolasi DNA dapat diketahui salah satunya menggunakan alat spektrofotometri. Prinsip dari kuantifikasi DNA menggunakan alat spektrofotometer adalah iradiasi sinar ultraviolet dapat diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan karena adanya basa purin dan pirimidin. Penyerapan iradiasi sinar UV oleh DNA secara maksimal dicapai pada panjang gelombang 260 nm sedangkan penyerapan maksimal protein pada panjang gelombang 280 nm. Pada panjang gelombang 260 nm kepadatan optic (optical density (OD) sama dengan satu, maka konsentrasi molekul DNA heliks ganda setara dengan 50 µg/mL atau 40 µg/mL DNA single heliks atau setara dengan 20 µg/mL oligonukleotida untai tunggal. Nilai OD juga dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA hasil isolasi melalui nilai rasio antara nilai OD₂₆₀ dan OD₂₈₀. Hasil isolasi DNA berhasil jika nilai rasio OD berkisar antara 1,8-2,05. Namun dalam penelitian ini uji kuantitatif tidak dilakukan hanya uji kualitatif.

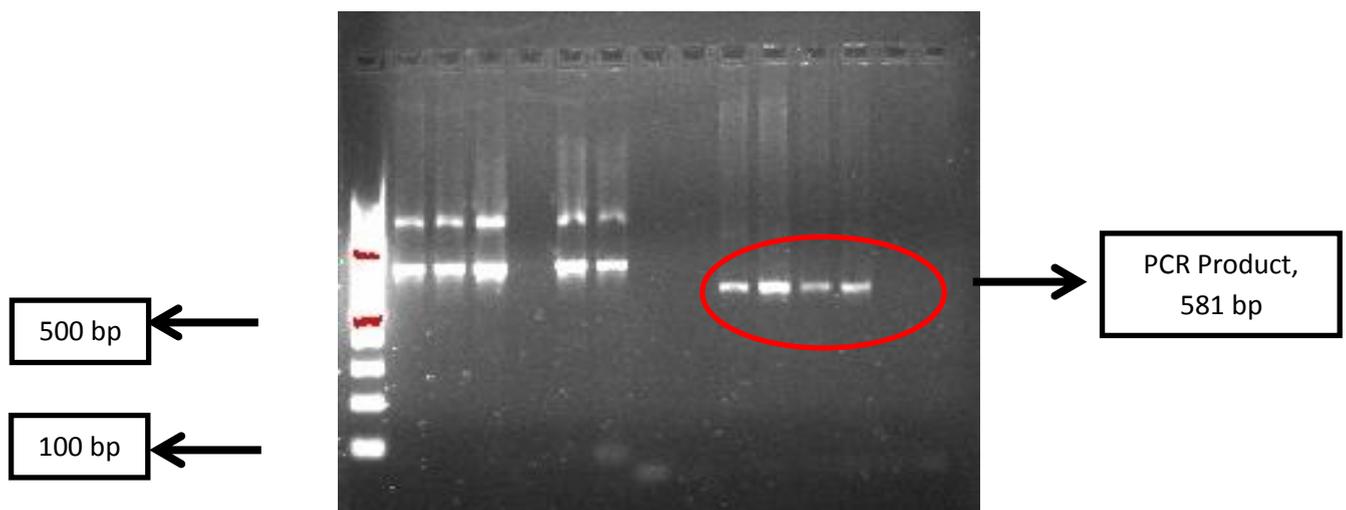
Amplifikasi Fragment Gen BMPR-1B pada Ayam Kampung, Ayam Arab dan Ayam Ras Petelur

Hasil penelitian menunjukkan ruas gen BMPR-1B pada ayam kampung, ayam arab dan ayam ras petelur berhasil diamplifikasi menggunakan metode PCR dengan suhu *annealing* 58°C sesuai dengan rekomendasi Zhang *et al.* (2008) dengan panjang produk 581 bp. Keberhasilan hasil amplifikasi ditunjukkan oleh munculnya satu pita yang jelas dan tegas pada gel agarose 2% dengan panjang 581 bp (Gambar 4 dan 5). Hasil BLAST primer dengan sequence gen BMPR-1B, gen bank nomor akses NM_205132, primer yang digunakan mengamplifikasi ruas gen BMPR-1B dari ekson 6 hingga ekson 7 termasuk seluruh intron 6.

Keberhasilan amplifikasi PCR ditentukan oleh variasi komponen reaksi PCR seperti konsentrasi primer, tempat DNA, dNTP, garam-garam dalam buffer, unit DNA polymerase, temperatur siklus PCR dan jumlah siklus yang digunakan (Asy'ari dan Noer, 2005). Suhu *annealing* adalah suhu dimana primer akan menempel pada DNA template. Suhu *annealing* dapat dihitung berdasarkan nilai melting temperature (T_m) dari masing-masing primer. Pencarian kondisi optimal dari suhu *annealing* sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas produk PCR yang dikenal dengan istilah optimasi. Suhu *annealing* yang biasa digunakan adalah 50°C di bawah suhu *melting*, karena jika suhu *annealing* terlalu tinggi maka penempelan primer pada DNA template akan lepas sehingga produk PCR tidak terbentuk, sebaliknya jika suhu *annealing* terlalu rendah maka akan terjadi penempelan primer pada DNA template tidak spesifik sehingga bisa terjadi produk PCR yang tidak spesifik.



Gambar 4. Hasil amplifikasi gen BMPR-1B dengan panjang produk 581 bp



Gambar 5. Hasil Amplifikasi Gen BMPR-1B dengan panjang produk 581 bp pada sumur 10, 11, 12, dan 13

Identifikasi Keragaman Gen BMPR-1B pada Ayam Kampung, Ayam Arab dan Ayam Ras Petelur

Identifikasi keragaman gen BMPR-1B menggunakan metode *Restricted Fragment Length Polymorphisms* (RFLP) yaitu suatu metode identifikasi keragaman DNA menggunakan enzim restriksi (enzim pemotong). Enzim restriksi mengikat sekuen basa spesifik yang disebut sekuen rekognisi, dan setiap enzim memotong DNA pada situs pemotongan. Sekuen rekognisi bersifat *palindrom*, mengandung sekuen yang persis sama bila dibaca dari kedua arah. Enzim restriksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah HindIII. Enzim HindIII berasal dari bakteri *Haemophilus*

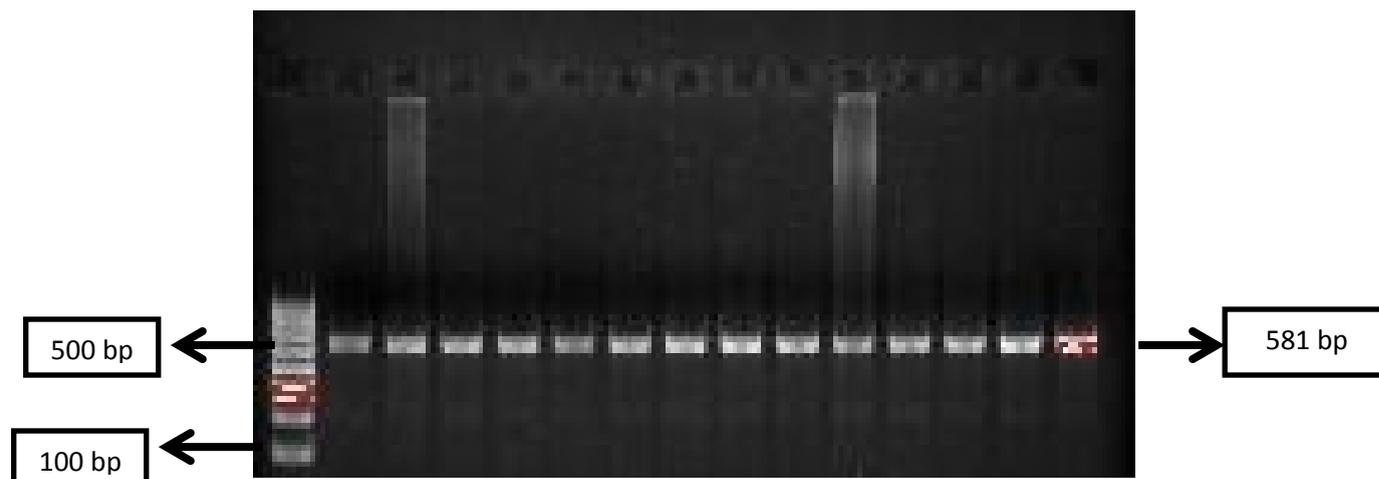
influenza R_d yang memiliki situs pemotongan pada A-T.

Apabila enzim restriksi ditambahkan ke DNA, DNA tersebut dipotong pada banyak posisi sebanyak adanya situs pemotongan untuk enzim itu; DNA tersebut dipotong menjadi fragmen/potongan DNA. Karena situs pemotongan tidak terletak pada jarak yang teratur sepanjang molekul DNA, fragmen tersebut berbeda panjangnya dan oleh karena itu berbeda beratnya. Jika campuran fragmen tersebut ditempatkan pada salah satu bagian ujung gel dan dilakukan elektroforesis, fragmen tersebut bermigrasi sepanjang gel tersebut pada tingkat yang proporsional terbalik dengan

logaritma beratnya. Dalam jangka waktu yang diberikan setelah aliran listrik pertama kali dinyalakan, terdapat banyak pita fragmen DNA yang berbeda di dalam gel sebanyak terdapatnya fragmen berbeda ukuran di dalam campuran asli tersebut di

atas. Posisi dari setiap pita tersebut menunjukkan ukuran setiap fragmen.

Hasil penelitian ini menunjukkan tidak ditemukan keragaman gen BMPR-1B pada sampel yang dianalisis dalam penelitian ini (Gambar 6).



Gambar 6. Hasil elektroforesis gen BMPR-1B pada ayam kampung, ayam arab dan ayam ras petelur menggunakan enzim HindIII.

Hal ini disebabkan relatif sedikitnya sampel yang dianalisis dalam penelitian ini dan jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian hanya berasal dari kelompok ternak yang sama. Jumlah sampel yang besar memungkinkan ditemukannya keragaman pada populasi yang diuji.

Beberapa hasil penelitian sebelumnya menunjukkan ditemukan keragaman gen BMPR-1B pada unggas yaitu pada populasi ayam Jining Bari dan Zang yaitu pada posisi basa 35 T>C, 166 C>T, 224 G>C, 287 A>G dan 303 G>A. Satu SNP pada posisi basa 287 A>G berhubungan dengan produksi telur pada umur 47–56 minggu (Zhang *et al.*, 2008); ditemukan 4 SNPs Gen BMPR-1B pada puyuh yaitu pada posisi basa 165 A>G, 211 C>T, 290 A>T dan 430 A>G (El Tarabany *et al.* 2014.); SNP pada posisi basa A287G gen BMPR-1B, terdeteksi pada ayam fayoumi (ayam lokal di arab) dan ayam Rhode Island Red (RIR) berhubungan erat dengan berat badan umur 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 minggu (Awad dan El Tarabany., 2015) dan ditemukan keragaman gen BMPR-1B A287G pada ayam lokal mandazaran,

namun tidak berpengaruh terhadap 11 sifat yang diamati yaitu berat tetas, bobot badan 8 dan 12 minggu, bobot dewasa kelamin, umur bertelur pertama, jumlah telur yang dihasilkan, berat telur pertama yang dihasilkan, rata-rata berat telur pada umur 28, 30 dan 32 minggu, intensitas produksi dan egg mass (Niknafs *et al.*, 2014).

KESIMPULAN

DNA berhasil diisolasi dari darah ayam kampung, ayam petelur dan ayam baik yang disimpan pada tabung dengan EDTA atau dengan penambahan ethanol absolut (ethanol 96%) yang ditunjukkan dengan munculnya pita yang jelas dan tegas pada gel agarose 1%. Primer gen BMPR-1B berhasil menempel pada DNA template pada suhu annealing 58°C dengan panjang produk PCR 581 bp. Namun hasil pemotongan enzim restriksi *Hind III* pada produk PCR menunjukkan tidak ditemukannya keragaman gen BMPR-1B pada populasi ayam kampung, ayam arab dan ayam petelur yang digunakan dalam penelitian ini berarti monomorfik. Hal ini

diduga karena jumlah sampel yang relatif kecil dan sampel hanya berasal dari beberapa peternak sehingga keragaman tidak ditemukan.

SARAN

Menambah jumlah sampel menjadi minimal 100 ekor (100 DNA sampel) untuk masing-masing populasi ayam dan diusahakan berasal dari beberapa peternak atau peternak tidak terkonsentrasi

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Dekan Fakultas Pertanian dan Peternakan yang telah mendanai penelitian melalui DIPA BLU dengan nomor SK Rektor UIN Suska Riau Nomor : 1262/R/2015

DAFTAR PUSTAKA

- Asy'ari, M dan A. S Noer. 2005. Optimasi konsentrasi MgCl₂ dan suhu annealing pada proses amplifikasi multifragments mtDNA dengan PCR. JKSA. 3(1):24-28.
- Awad, A dan M.S. El-Tarabany. 2015. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in Bone Morphogenetic Protein receptor1B (BMPR-1B).
- Brown, T. A. 2010. Genomes 3. Garland Sci. New York & London.
- Fachtiyah, ELA Rumingtyas, S Widyarti, S Rahayu. 2011. *Biologi Molekular*. Jakarta: Erlangga.
- Hidayati. 2008a. Nilai heritabilitas sifat-sifat produksi persilangan ayam kampung x ayam arab (*Brakel Kriel silver*) di UPTD ayam arab Dinas Peternakan Kabupaten Kampar. Laporan Hasil Penelitian. Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN Suska Riau. Pekanbaru.
- Hidayati. 2008b. Ilmu Pemuliaan Ternak. Suska Press. Pekanbaru.
- Maskur dan C. Arman. 2009. Identifikasi Mutasi gen BMPR-1B dan BMP 15 pada Domba Ekor Gemuk. JITV 15(1): 16-21.
- Niknafs, S., A.N.Javaremi dan M.Sadeghi. 2014. Single nucleotide polymorphisms in BMPR-1B and STAT5B genes and their association with growth and reproductive traits in chicken. Songklanakarin J. Sci Technol. 36(2): 137-142.
- Siregar, A.P. dan M. Sabrani. 1980. Ayam sayur di Indonesia. Perbaikan dan Peningkatan Kualitas Performans dan Populasinya. Poultry Indonesia, No. 10 thn ke-2.
- Souza, C.J., B.K. Cambell, A.S. McNeilly dan D. T. Baird. 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with mutation in the bone morphogenetic receptor type iB (BMPR1B) gene. J.Endocrinol. 169: R1-R6.
- Wihandoyo dan H. Mulyadi. 1986. Ayam buras pada kondisi pedesaan (tradisional) dan pemeliharaan yang memadai. Pengembangan ayam buras di Jawa tengah Temu Tugas Sub sektor peternakan di Sub Balai Penelitian Ternak, Klepu.
- Wilson, T., X.Y.Wu, J.L. Juengel, I.K. Ross, J.M. Lumsden, E. A. Lord, K.G. Dodds, G.A. Walling, J. C. McEwan, A.R. O'Connell, K.P. McNatty dan G.W. Montgomery. 2001. Highly profile Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. Biol. Reprod. 64: 1225-1235.
- Zhang, N.B. H. tang, L.Kang, Y.H. Ma., D.G. Cao, Y.Lu, M. Hou dan Y.L. Jiang. 2008. Associations of single nucleotide polymorphisms in BMPR-IB gene with egg production in a synthetic broiler line. AAJAS. 21(5): 628-632.