

Seleksi Primer LCO – HCO, Primer bird-f1 – HCO Dan Primer bch – bcl Untuk Amplifikasi Gen COI DNA Mitokondria Itik Magelang (*Anas javanica*)

Sonny Abdi Setiyawan, Anto Budiharjo dan Hermin Pancasakti Kusumaningrum

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Undip
Jl. Prof Soedharto, Tembalang, Semarang – 50275
Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690
Email: sonny_abdi@yahoo.com

Abstrak

Itik Magelang merupakan itik liar asli Indonesia. Keunggulan itik Magelang dibanding itik lokal lainnya selain kemampuan hidup di dataran tinggi dan dataran rendah juga produksi telur dan produksi dagingnya tinggi. Sampai saat ini karakterisasi genetik itik Magelang untuk mengetahui informasi lengkap mengenai genetiknya belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian adalah melakukan seleksi primer untuk melacak gen COI DNA mitokondria itik Magelang menggunakan primer LCO-HCO, primer bird-f1 – HCO, dan primer bch-bcl. Metode penelitian dilakukan dengan isolasi DNA itik Magelang. Selanjutnya dilakukan seleksi primer secara *in silico* untuk melacak kesesuaian primer dengan gen COI DNA mitokondria itik dari data *GenBank* menggunakan program *ClustalX*, *Genedoc* dan *FastPCR*. Seleksi primer selanjutnya dilakukan dengan teknik PCR untuk amplifikasi gen COI DNA mitokondria itik Magelang menggunakan ketiga pasang primer. Hasil analisis homologi primer memperlihatkan hanya sebagian dari ketiga primer yang homolog pada gen target. Hasil amplifikasi menggunakan PCR dengan primer LCO-HCO diduga menghasilkan *primer dimer*. Primer birdf1 – HCO dan primer bch-bcl tidak memunculkan pita hasil amplifikasi daerah gen COI DNA mitokondria itik Magelang.

Kata kunci : itik Magelang, gen COI, DNA mitokondria, primer

Abstract

Magelang duck is a wild type of local duck from Indonesia. The advantages of Magelang duck compare to other local duck from Indonesia are ability to live in the highlands and lowlands and high production of egg and meat. Genetic characterization of Magelang duck still not available until now. The aim of the research is select primers for amplifying COI gene of mitochondrial DNA of Magelang duck using LCO-HCO, bird-f1 -HCO, and bcl-bch primers. The research method was DNA isolation from Magelang duck. Followed by, selection of primer *in silico* to find homology within COI sequence using *ClustalX*, *Genedoc*, and *FastPCR* programs. Amplification of COI gene was performed using PCR with all primer pairs. Result showed partial homology with all primer in COI sequence. The amplification using the LCO-HCO primer produced *primer dimer*. Primer birdf1-HCO and bch-bcl primers showed no amplification.

Key words: Magelang duck, COI gene, mitochondrial DNA, primer

PENDAHULUAN

Penurunan populasi ternak itik di Indonesia terjadi dari tahun ke tahun. Faktor penyebab penurunan ternak itik antara lain adalah, tekanan ekonomi, tidak ada peningkatan mutu genetik yang dikarenakan para peternak itik secara umum masih minim pengetahuan dan penggantian rumpun ternak dan persilangan yang tidak terarah dengan rumpun ternak eksotik (Subandriyo, 2006). Itik Magelang merupakan itik asli Indonesia dan

merupakan sumber daya alam hayati yang sangat potensial untuk dikembangkan dalam rangka pemenuhan kebutuhan pangan. Itik Magelang termasuk dalam golongan itik penghasil telur dan daging yang produksinya tinggi (Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2010). Kemampuan hidup itik Magelang di dataran tinggi dan dataran rendah juga menyebabkan ketahanan tubuhnya lebih baik dibanding itik lain. Karakteristik khas itik Magelang masih terbatas pada fenotip belum

sampai pada tahap karakter genetik. Karakterisasi genetik itik merupakan suatu upaya awal dalam pelestarian itik lokal Indonesia. Variasi antar individu dapat dikarakterisasi secara genetik dengan teknik PCR menggunakan sepasang primer. Permasalahan yang timbul adalah belum adanya primer spesifik untuk amplifikasi gen COI DNA mitokondria itik Magelang.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan memperoleh primer yang bisa digunakan untuk amplifikasi gen COI DNA mitokondria itik Magelang.

Materi dan Metode

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah itik Magelang umur 5 bulan, es batu, bufer digesti, enzim lisozim, sodium dodesil sulfat (SDS), fenol kloroform, sodium asetat 3M pH 5.2, etanol 100%, etanol 70 %, bufer Tris Etilen Diamintetraasetat (EDTA), bufer TE pH 8, akuades, agarosa, bufer Tris, asam asetat glasial dan EDTA(TAE), *loading dye*, *good view*, Ethidium Bromida (EtBr), primer LCO-HCO koleksi laboratorium genetika, primer bird-f1 (Bondoc, 2012), primer bch-bcl atas kebaikan Dr. rer. nat. Anto Budiharjo, S.Si. M.Biotech, *Ampli Taq* (bufer PCR 10x, dNTPs, *TAQ poly*) = 12,5 μ L dan ddH₂O.

Ekstraksi DNA itik Magelang

Ekstraksi DNA itik Magelang dilakukan menggunakan metode Fenol-Kloroform modifikasi Aussubel *et al.*, (1995).

Sampel ditumbuk dengan mortar pastel kemudian ditambahkan bufer digesti sebanyak 6 ml untuk 1 g sampel. Setelah itu ditambahkan enzim lisozim 10 mg/ml sebanyak 10 μ L. Suspensi kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam dalam kondisi diapungkan. Suspensi kemudian ditambahkan SDS 10% sebanyak 1 ml untuk 1 g sampel. Suspensi dihomogenkan dan di inkubasi pada suhu 50° C selama 12 jam, setiap 30 menit sekali dilakukan homogenisasi. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Tahap selanjutnya supernatan diambil dan ditambah dengan fenol : kloroform dengan perbandingan 1:1. Suspensi lalu ditambah dengan sodium asetat 3M pH 5,2 sebanyak 1/10 volume,

fasa atas yang di ambil dan kemudian dihomogenkan. Sampel ditambah dengan etanol 100% sebanyak 2 volume sampel kemudian dihomogenkan. Pelet yang terbentuk ditambahkan etanol 70 % sebanyak 500 μ L dan kemudian disentrifugasi kembali. Pelet akhir yang terbentuk diambil dan dikeringanginkan selama 24 jam. Pelet ditambahkan bufer TE pH 7,6 sebanyak 10-20 μ L dan kemudian disimpan pada *freezer*.

Elektroforesis

Sampel DNA yang didapat di *running* dengan proses elektroforesis. *Running* DNA dilakukan pada gel agarosa 2%. Sampel DNA di ambil sebanyak 5 μ L dan dicampur dengan *loading dye*. Kemudian sampel dimasukkan kedalam sumur cetakan pada gel agarosa. Tangki elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik dan diatur arusnya sebesar 100 Volt selama 10-15 menit. Pengamatan dilakukan di bawah sinar UV dan didokumentasikan.

Amplifikasi DNA dengan PCR

Proses PCR untuk memperbanyak gen COI dari DNA mitokondria yang diperoleh. Primer yang digunakan adalah primer HCO dan primer bird-f1. Kondisi PCR untuk amplifikasi gen COI: denaturasi awal pada suhu 94° C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94° C selama 40 detik, annealing pada suhu 58° C selama 40 detik, elongasi pada suhu 72° C selama 1 menit, elongasi akhir pada suhu 72° C selama 7 menit, suhu akhir pada suhu 4° C, siklus diatur sebanyak 30X.

Pelacakan gen COI DNA mitokondria

Sekuen DNA mitokondria itik pada *GenBank* dipakai sebagai sumber data. Sekuen ini kemudian dianalisis menggunakan program *BLAST* untuk menentukan daerah terkonservasi dan konfirmasi sekuen nukleotidanya. Pelacakan gen COI dilakukan dengan mencari urutan basa dari gen COI beberapa itik yang berkerabat dengan itik Magelang. Sekuen disejajarkan dengan program komputer *Clustal X*, *Genedoc* dan *FastPCR*.

Penyejajaran primer pada urutan basa DNA itik Magelang

Penyejajaran dilakukan dengan beberapa spesies itik hasil penelusuran dengan *ClustalX* untuk selanjutnya dibaca hasilnya menggunakan program *Genedoc*. Pelacakan ini dilakukan dengan primer LCO - HCO, primer bird-f1 – HCO, dan primer bch – bcl.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk pelacakan gen COI

Primer	Urutan Basa Primer (5' ke 3')
LCO	5'- ggtcaacaaatcataaagatattgg -3'
HCO	5'- taaacttcagggtgacccaaaaatca -3'
birdf1	5'- ttctcaaccacaaagacattggcac -3'
bch	5'- taaacttcagggtgacccaaaaatca -3'
bcl	5'- tcaacyaatcayaaagatatyggcac -3'

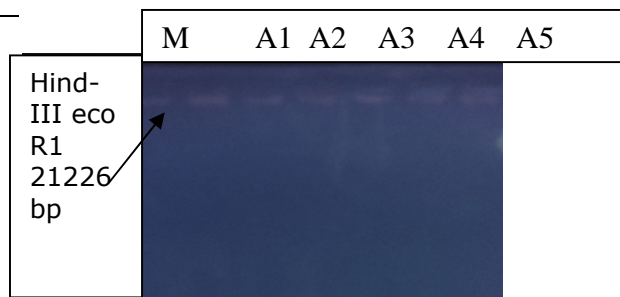
Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan ekstraksi DNA itik Magelang (*Anas javanica*) dilakukan dengan cara mengambil sebagian otot dari bagian sayap itik Magelang. Hal ini dilakukan sesuai dengan metode optimasi perolehan DNA kerang simping (*Amusium pleuronectes*) oleh Sudjito (2012), yang memperoleh konsentrasi DNA sebesar 4500ng/μL. Hasil penelitian kali ini mendapatkan konsentrasi DNA sebesar 8130 ng/μL, nilai ini lebih besar dibanding dengan penelitian Wibowo (2012) pada itik Tegal (*Anas domestica*) yang memperoleh konsentrasi 2610 ng/μL. Nilai kemurnian yang diperoleh sebesar 1,09 masih dibawah nilai kemurnian yang baik. Tingkat kemurnian DNA yang baik pada panjang gelombang $_{260/280}$ yaitu sebesar 1,8-2,0 (Sambrook *et al.*, 1989).

Tabel 2. Konsentrasi dan kemurnian DNA

Sampel	Ulangan	Konsentrasi DNA (ng/ μL)	Kemurnian DNA ($_{260/280}$)
DNA Itik Magelang	1	8100	1,08
	2	8130	1,09
	3	8130	1,09

Nilai kemurnian DNA yang masih dibawah dari standar nilai kemurnian dikarenakan masih terdapat kontaminan pada DNA dari itik Magelang seperti protein yang belum terpresipitasi dengan sempurna. Hal ini terjadi karena proses dari purifikasi DNA yang masih mengandung kontaminan protein. Sedangkan untuk konsentrasi DNA yang di dapat nilainya sudah cukup baik yang memperlihatkan bahwa DNA dapat tervisualisasi dibawah sinar UV dengan baik.



Gambar 1. Visualisasi DNA itik Magelang
Ket: M= marka DNA Hind-III eco R1, A1-A7= DNA itik Magelang

Kenampakan pita tunggal DNA yang memancar pada gel agarosa dibawah sinar UV (Gambar 1) menunjukkan bahwa hasil proses isolasi dan ekstraksi DNA itik Magelang telah berhasil memperoleh DNA itik Magelang. DNA hasil isolasi yang diperoleh jumlahnya memenuhi syarat untuk dapat digunakan pada tahapan amplifikasi yang minimal mempunyai konsentrasi sebanyak 25-50 ng/μL (Sulistyaningsih, 2008).

Pelacakan dan analisis gen COI DNA mitokondria itik Magelang dengan kesesuaian primer LCO dan HCO telah dilakukan secara *in silico* menggunakan program *ClustalX* pada beberapa anggota genus *Anas*.

```

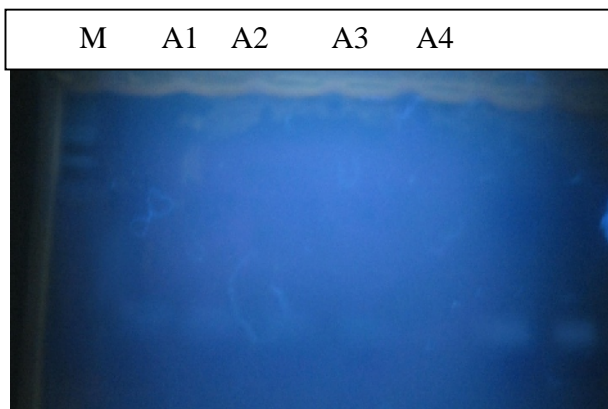
500      *      520      *      540      *      560      *
anas702 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 569
anas685 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 569
anas696 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 561
anas675 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 547
anas730 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 547
anas694 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 561
anas729 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 569
anas705 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 566
anas693 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 561
anas699 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 562
anas788 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 561
anas691 : TGTCTGATCTTAAATACCGCCATCCCTCCCTCTATGACATCCCGTCCCTCCGCGCGATCTCAATCTTAAACCGGAC : 557
LCO : -----GCGGAGAAAGGAAAGTTTGTAAAAAGTAA----- : 25
          tgcataagtcctaat taaccgcatcctgtctctctatcaactccccctctcccgccggcgtctcacttactaaaccgac

660      *      680      *      700      *      720      *      7
anas702 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 702
anas685 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 685
anas696 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 696
anas675 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 675
anas730 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 715
anas691 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 691
anas694 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 694
anas729 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 729
anas705 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 705
anas699 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 699
anas693 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 693
anas691 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 691
anas788 : CCCGAGTCTAATCTTAAATCCCGGAAATTGGAAATATGCTTCCCAACA----- : 697
HCO : -----TCTAATTAATCCAGATCGAATTCGAA----- : 26
          ccagaagtctatactcttactctcccaaggatttggaaatctate tocc

```

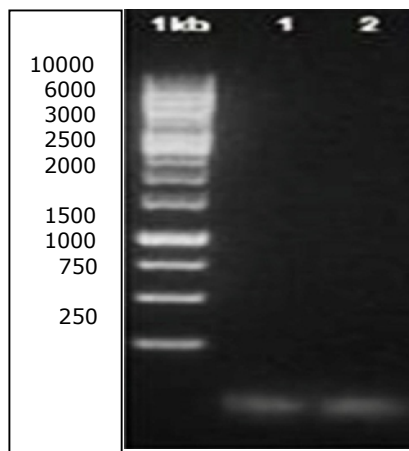
Gambar 2. Penyejajaran primer LCO-HCO dengan sekuen basa genus *Anas*

Homologi primer LCO-HCO apabila digunakan untuk mengamplifikasi daerah gen COI akan memperoleh fragmen sepanjang sekitar 117 bp. Pelacakan gen dengan menggunakan primer LCO-HCO diatas memperlihatkan bahwa primer LCO-HCO bila digunakan untuk amplifikasi DNA itik Magelang masih banyak yang tidak homolog pada pasangan DNA target.



Gambar 3. Visualisasi DNA itik Magelang hasil amplifikasi menggunakan primer LCO-HCO
Ket: M=marka, A5&A6=DNA itik Magelang (A1&A2= itik Tegal, A3&A4=DNA itik Semarang, milik peneliti lain).

Hasil visualisasi DNA itik Magelang menggunakan primer LCO-HCO yang belum jelas antara pita DNA atau *primer dimer* yang terbentuk pada gel agarosa kemudian dilakukan pengujian ulang dengan mengirim sampel DNA hasil amplifikasi ke Laboratorium Genetika *Science* Indonesia yang beralamat di Jl. Duri Raya No. 5D, Jakarta Barat 11510, Indonesia.

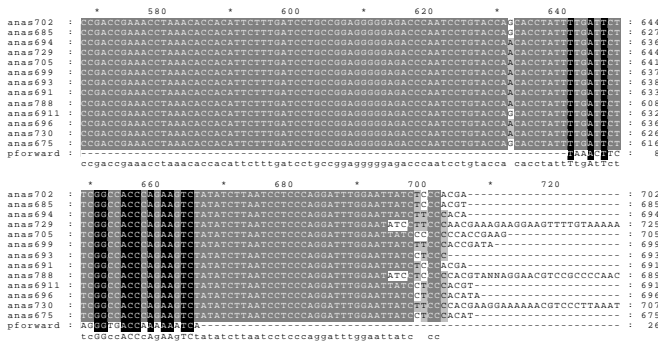


Gambar 5. Visualisasi DNA itik Magelang hasil amplifikasi menggunakan primer LCO-HCO pada Laboratorium Genetika *Science* Indonesia.
Ket: 1&2: *Primer dimer*

Hasil visualisasi dari Laboratorium Genetika *Science* Indonesia memperlihatkan pita DNA yang terbentuk terlalu tipis pada gel agarosanya. Pita yang terbentuk pada Gambar 5. juga memperlihatkan pita tersebut terlihat terlalu jauh di bawah marka yang dipakai. Hal ini menunjukkan bahwa pita yang di dapat hasil amplifikasi tersebut berpeluang besar suatu *primer dimer*. *Primer dimer* merupakan suatu tanda dimana terjadi kesalahan saat amplifikasi yang ditandai dengan terbentuknya suatu pita DNA di bawah panjang marker yang dipakai (Yuwono, 2009).

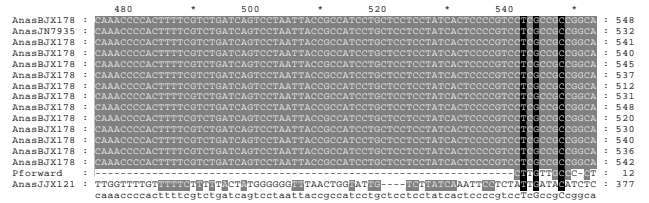
Pelacakan gen COI DNA mitokondria itik Magelang juga dilakukan dengan penyejajaran basa dengan primer degeneratif yang bekerja pada lokus gen COI DNA mitokondria. Primer degeneratif merupakan primer yang mempunyai salah satu susunan basa yang dapat dibaca ganda.

Primer yang digunakan adalah primer *forward* bch dan primer *reverse* bcl.

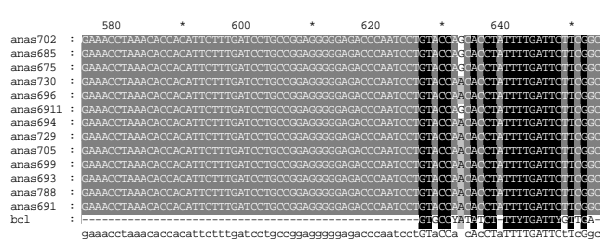


Gambar 6. Penyejajaran primer *forward* bch dengan sekuen basa genus *Anas* dipusat Data *GenBank*.

Ghosh (2011) pada *Anas platyrhynchos*. Primer bird-f1 hanya homolog beberapa sekuen basa pada DNA target (Gambar 8.). Presentase basa G+C pada primer bird-f1 sebesar 48%, dimana presentase ini sudah mendekati syarat keberhasilan proses amplifikasi PCR.



Gambar 8. Penyejajaran primer bird-f1 dengan sekuen basa gen COI genus *Anas* dari pusat data *GenBank*.



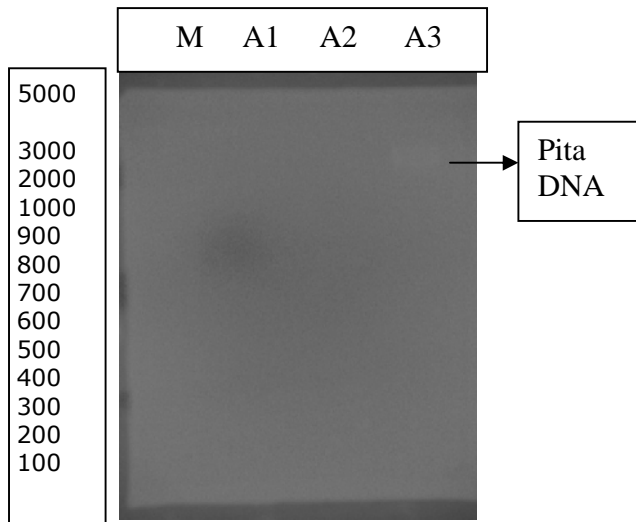
Gambar 7. Penyejajaran primer *reverse* bcl dengan sekuen basa genus *Anas* pada pusat data *GenBank*.

Data mengenai primer yang didapat diatas memperlihatkan bahwa ketiga pasang primer yang digunakan untuk pelacakan gen COI DNA mitokondria itik masih banyak yang kurang homolog pada sekuen basa DNA target. Hal ini dikarenakan sekuen basa dari beberapa itik yang berada di pusat data *GenBank* masih sangat bervariasi, sehingga daerah yang homolog dengan primer juga masih sangat variatif.

Prosentase G+C dalam primer bch sebesar 34,2% dan primer bcl sebesar 38% masih di bawah nilai prosentase yang baik sebesar 50-60% yang merupakan syarat keberhasilan amplifikasi PCR. Homologi primer *forward* bch juga kurang sempurna pada sekuen DNA target. Pada primer bcl mempunyai 5 urutan terakhir basanya yang mengandung basa G dan C sebanyak 3 basa secara berurutan, hal ini juga dapat berpeluang terjadinya *primer dimer*. Urutan basa primer yang mengandung basa G dan C (*GC clamp*) pada 3 urutan terakhir basa primernya dapat mengakibatkan *primer dimer* (Yuwono, 2009).

Pita DNA itik Magelang hasil amplifikasi menggunakan primer bird-f1 - HCO tidak terlihat dikarenakan karena primer yang digunakan tidak dapat homolog secara sempurna pada sekuen basa DNA itik Magelang. Primer *forward* bird-f1 dan *reverse* HCO hanya mendapatkan fragmen gen COI sepanjang sekitar 127 bp saja, dapat dikatakan proses amplifikasi yang diharapkan belum dapat memperoleh pita yang sesuai dengan ukuran gen COI DNA mitokondria. Fragmen gen COI yang didapat tersebut pada saat dilakukan visualisasi di bawah sinar UV (Gambar 9) bila mendapatkan pita DNA pasti berada jauh di bawah marka yang dipakai dan bisa diduga juga sebagai *primer dimer*.

Seleksi primer lain untuk pelacakan gen COI DNA mitokondria itik Magelang menggunakan primer bird-f1 didapat dari penelitian Bondoc (2012). Sebelumnya penelitian menggunakan gen COI DNA mitokondria itik pada *GenBank* hanya dilakukan oleh Ahanthem &



Gambar 9. Visualisasi DNA itik Magelang (Ket. M= DNA marka 100 bp, A1= DNA itik Magelang, A2= kontrol, A3= DNA marka).

Amplifikasi gen COI pada DNA itik menggunakan primer biasanya akan menghasilkan fragmen berukuran antara 400 – 600 bp (Bondoc, 2012). Penelitian yang telah dilakukan ini memperlihatkan bahwa amplifikasi menggunakan primer HCO-LCO, primer birdf1 – HCO dan primer bch-bcl belum dapat menghasilkan fragmen yang sesuai dengan ukuran target gen COI DNA mitokondria. Dengan demikian ketiga primer tidak dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen COI DNA mitokondria pada itik Magelang.

Desain ulang primer sangat diperlukan untuk solusi sebagai upaya untuk mendapatkan primer yang mampu digunakan untuk amplifikasi DNA itik Magelang. Desain ulang primer ini menggunakan bantuan program *pick primer* pada pusat data *GenBank*. Primer yang didapat dari sekuen basa dari *Anas platyrhynchos* untuk panjang basa di atas 600 bp dengan suhu leleh primer sekitar 58 °C pada pusat data *GenBank* memperoleh hasil urutan basa untuk primer *forward* adalah 5'- ttgttggccctccacaaga -3' dan untuk primer *reverse* adalah 5'- cctccggcaggatcaagaa -3'.

Homologi basa primer dengan urutan basa DNA target apabila digunakan untuk mengamplifikasi daerah gen COI akan

mendapatkan fragmen sepanjang sekitar 570 bp. Desain primer yang didapat dari *GenBank* ini mampu menghasilkan fragmen gen COI yang memenuhi syarat untuk dilakukan tahapan sekuensing guna mengetahui informasi genetik itik Magelang pada penelitian selanjutnya. Pengujian spesifitas desain primer ini juga digunakan program *FastPCR* seperti tampak pada Gambar 10.

>anas693

```

acagcttaactaacTTGTTGCCCTCCACAAA
GACgttgggtataacttggctatccatggcccctagaggcgacg
actcattataacgtgatcgtcaccgctcacgctatctaataatctcttc
atggtaatgcccatcataattggagagttcggcagctgattggtccccc
tgataatcggtgccccgcacatagcattcccacgaataaacaacataa
gcatctgactctcccaccatcattcctcttatactgcctcatccactg
taaaagctggcgctgttacgggtgaaccgtatacccactctagcag
gcaacctagcccacgccggagcctcagtgacctggctatcttctcac
ttcacttggctggtgtctctccatctcggagccattaacttcattacca
cagccatcaacataaaacccccgactctcacaataccaaaccccc
ctttctgtctgatcagctctaattaccgcatcctgctctctatcactcc
ccgtctctgcccgccggcatcacaatgctactaacggaccgaaacctta
aacaccacaTTCTTTGATCCTGCCGGAGGgggaga
cccaatcctgtaccaacacctattttgattctcggccaccagaagctc
atatcttaatcctcccaggatttgaattatctctccc

```

Gambar 10. Pengujian spesifitas desain primer menggunakan *FastPCR* pada sekuen basa genus *Anas*

Ket : homologi primer berwarna biru

Primer *forward* – *reverse* akan homolog pada sekuen basa itik pada daerah yang *konserve* dan mendapatkan fragmen gen COI sepanjang 570 bp dengan suhu optimal PCR sebesar 56,5 °C. Prosentase basa G+C dalam desain primer *forward* – *reverse* ini sebesar 50% dan 55%, dimana prosentase ini sudah sangat baik karena telah memenuhi syarat prosentase G+C untuk keberhasilan PCR sebesar 50-60% (Yuwono, 2009).

KESIMPULAN

Penelitian yang telah dilakukan memperoleh kesimpulan bahwa ketiga pasang primer yang digunakan yaitu primer HCO-LCO, primer bird-f1 – HCO, dan primer bch-bcl tidak dapat digunakan

untuk mengamplifikasi gen COI DNA mitokondria itik Magelang (*Anas javanica*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Tim Peneliti Hersugondo, Hermin Pancasakti Kusumaningrum dan Muhammad Zainuri, karena telah memberikan kesempatan untuk ikut dalam proyek Hibah Ibm Dirjen DIKTI Kementerian Pendidikan Nasional tahun 2010 dengan judul Pemanfaatan Limbah Kerang Simping, Cangkang Kepiting, Wideng dan Ikan Rucuh untuk Pengkaya Pakan Guna Meningkatkan Produksi dan Kualitas telur, Derajat Kesehatan itik dan Pendapatan Peternak Itik Kota Tegal untuk membantu penelitian yang telah peneliti lakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahanthem, M. and S.K. Ghosh. 2011. DNA barcoding of domestic fowls from Northeast India, Submitted (27-SEP-2011) Biotechnology, Assam University (Central University), Durgakona, Silchar, Assam 788011, India.
- Aussubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. J. Smith, and K. Struhl. 1995. *Current protocol in molecular biology* Volume I. John Willey and Sons. Canada.
- Bondoc, O. L. 2012. Genetic Diversity and Relationship of Common Poultry Breeds and Strains (Class Aves) in the Philippines Based on the Cytochrome C Oxidase I (COI) Gene Sequence, Submitted (08-JUN-2012) Animal and Dairy Sciences Cluster, College of Agriculture, University of the Philippines Los Banos, ADSC, CA, UPLB, Los Banos, Laguna 4030, Philippines.
- Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Jawa Tengah. 2010. Populasi Ternak Unggas Jawa Tengah 2010.
- Sambrook, J., Fritsch, and T. Maniatis. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Subandriyo. 2006. *Konservasi Sumberdaya Genetik Ternak: Pertimbangan, Kriteria, Metoda dan Strategi*. dalam Lokakarya Nasional Pengelolaan dan Perlindungan Sumber Daya Genetik di Indonesia: Manfaat Ekonomi untuk Mewujudkan Ketahanan Nasional. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor.
- Sudjito, Y.L. 2012. Isolasi DNA Kerang Simping (*Amusium pleuronectes*) Dengan Modifikasi Tahap Lisis Sel. *Kerja Praktik*. Program Studi Biologi, FSM Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sulistyaningsih. 2008. Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Zat Antibakteri dari Cairan Kantung Tanaman Kantung Semar (*Nepenthes ampullaria* Jack). *Laporan Penelitian Mandiri*. Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Wibowo, S.E. 2012. Pelacakan Gen Sitokrom Oksidase Sub Unit I (COI) DNA Mitokondria Itik Tegal (*Anas domesticus*) Menggunakan Primer Universal. *Skripsi*. Program Studi Biologi, FSM Universitas Diponegoro. Semarang.
- Yuwono, T. 2009. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi, Yogyakarta.