

**LAPORAN AKHIR TAHUN II**

**PROGRAM INSINAS RISET PRATAMA  
INDIVIDU**



**Upaya Pembentukan Galur Itik Lokal Tahan Panas  
Di Sumatera Barat Melalui Studi Genomik dan Transkriptomik  
*Gen Heat Shock Protein 70***

**Tahun ke- 2 dari rencana 2 tahun**

**Dr. Ir. Firda Arlina, M. Si (Ketua)  
Dr. Ir. Sabrina, MP (Anggota)  
Kusnadidi Subekti, S.Pt, MP (Anggota)**

**UNIVERSITAS ANDALAS**

**November, 2018**

## RINGKASAN

Itik lokal (Itik Pitalah, Bayang, Kamang, dan Payakumbuh) merupakan plasma nutfah asli yang hidup dan berkembang di Sumatera Barat. Perubahan pola pemeliharaan dari tradisional menjadi intensif dengan kondisi terkurung minim air menyebabkan itik mengalami kesulitan dalam proses thermoregulasi, ditambah lagi dengan kondisi suhu lingkungan didaerah tropis yang berkisar  $23^{\circ} - 32^{\circ}\text{C}$  melebihi suhu nyaman itik yang berkisar antara  $18,3^{\circ}-25,5^{\circ}\text{C}$  menyebabkan itik mengalami stres/cekaman panas. Stres ini akan bermuara kepada produksi dan produktivitas itik yang tidak optimal. Salah satu upaya untuk mengatasi masalah ini adalah memperbaiki mutu genetik itik lokal dengan menyeleksi itik yang tahan panas dan tidak tahan panas dengan menggunakan marka molekuler gen kandidat yaitu gen *Heat Shock Protein 70* (HSP 70) yang dikenal sebagai gen penyandi tahan panas secara genomik, transkriptomik. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kandidat MAS (*marker assisted selection*) sifat tahan panas itik lokal dengan mengeksplorasi gen HSP 70. Itik lokal yang digunakan yaitu itik Pitalah, Bayang, kamang, dan Payakumbuh. Penelitian akan dilakukan dengan metode eksperimental selama dua tahun. Tahapan penelitian tahun pertama yaitu identifikasi itik lokal tahan panas dan tidak tahan panas dengan menggunakan indikator cekaman panas secara fisiologis. Identifikasi ini juga dilakukan dengan analisis aspek transkriptomik (ekspresi gen HSP 70) serta membandingkannya dalam rumpun itik lokal maupun antar rumpunnya. Penelitian tahun kedua yaitu analisis genomik melalui identifikasi *single nucleotide polymorphisme*/SNP gen HSP 70 pada itik lokal yang tahan panas dan tidak tahan panas. Penelitian tahun pertama didapatkan indikator cekaman panas yang menunjukkan bahwa setiap rumpun memiliki individu itik yang tahan dan tidak tahan panas. Selanjutnya ekspresi mRNA Gen HSP70 di hati menunjukkan bahwa hanya itik Payakumbuh dan Bayang yang menunjukkan ekspresi mRNA yang up-regulated (meningkat) selama perlakuan panas diberikan, sehingga dapat dinyatakan bahwa itik Payakumbuh dan itik Bayang termasuk itik yang tahan panas. Pada penelitian tahun II didapatkan hasil yaitu terdapat 3 SNP yang dapat dikenali dengan metoda PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi. Enzim HhaI mengenali 2 SNP (lokasi G+1410A / g.1696 dan C+1476T / g. 1762) dan SacII 1 SNP (lokasi T+1416G / g.1702). Enzim restriksi HhaI dengan lokasi SNP, G+1410A / g.1696 didapatkan dua alel (A dan G) dengan 3 genotipe yaitu (AA,AG,GG), Lokasi SNP C+1476T / g. 1762 didapatkan dua alel (T dan C) dengan 3 Genotipe (TT, TC, CC). Enzim SacII didapatkan juga 2 alel (T dan C) dengan 3 genotipe ( TT, TC, CC). lokus gen HSP70/HhaI dan HSP70/SacII semuanya polimorfik.

Key word : itik lokal, cekaman panas, gen HSP 70, *marked assisted selection* (MAS)

## PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan berkahNya sehingga Laporan laporan akhir penelitian Insinas Riset Pratama Individu tahun ke-2 tahun 2018 dengan judul **Upaya Pembentukan Galur Itik Lokal Tahan Panas di Sumatera Barat Melalui Studi Genomik dan Transkriptomik Gen *Heat Shock Protein 70*** dapat terlaksana. Kegiatan penelitian ini merupakan salah satu bagian dari Tri Dharma Perguruan Tinggi sebagai aplikasis dari temuan-temuan baru melalui pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi serta meningkatkan kesejahteraan masyarakat dan daya saing bangsa khususnya di bidang Peternakan di Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang. Riset ini merupakan riset dasar guna mencari dan menseleksi itik lokal yang tahan panas.

Laporan ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu kritik dan saran sangatlah dibutuhkan penulis. Semoga laporan akhir ini bermanfaat sesuai dengan maksud dan tujuannya tanpa mengurangi urgensi dan moral akademik.

Padang, November 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN PENGESAHAN	Ii
RINGKASAN	Iii
PRAKATA	Iv
DAFTAR ISI	V
DAFTAR TABEL	Vi
DAFTAR GAMBAR	Vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
BAB 2 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	4
Tujuan	4
Manfaat	4
BAB 3 METODE PENELITIAN	4
Penelitian Tahap I (Tahun I)	5
Pemeliharaan Itik Lokal dan Pengukuran Indikator-indikator Cekaman Panas	5
Analisis Ekspresi Gen dan Proten HSP 70 Itik Lokal Tahan Panas dan Tidak Tahan Panas	6
Penelitian Tahap II (Tahun II)	9
Analisis <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNP) pada Gen HSP70	9
BAB 4 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	11
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	20
Kesimpulan	20
Saran	20
REFERENSI	21
LAMPIRAN	22

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Standar Kondisi Normal dan Stres dari Indikator Cekaman Panas .....	5
2. Primer yang Digunakan dalam Penelitian .....	7
3. Rataan Parameter Fisiologis Itik Lokal Sumatera Barat yang tahan dan tidak tahan Panas .....	12
4. Nilai Frekuensi Alel dan Genotipe Gen HSP70 lokasi SNP 1 .....	15
5. Nilai Heterozigositas (HO dan He) dan <i>chi-square</i> ( $X^2$ ) Genotipe Gen HSP70 Lokasi SNP 1 .....	16
6. Nilai Frekuensi Alel dan Genotipe Gen HSP70/HHal lokasi SNP 2 .....	16
7. Nilai Heterozigositas (HO dan He) dan <i>chi-square</i> ( $X^2$ ) Genotipe Gen HSP70 Lokasi SNP 2 .....	17
8. Nilai Frekuensi Alel dan Genotipe Gen HSP70/HHal lokasi SNP 2 .....	18
9. Nilai Heterozigositas (HO dan He) dan <i>chi-square</i> ( $X^2$ ) Genotipe Gen HSP70 Lokasi SNP 1	18

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Itik lokal yang digunakan dalam penelitian .....	11
2. Ekspresi relatif gen HSP70 pada jaringan hati empat rumpun itik yang diberi perlakuan cekaman panas (0, 1, dan 2 jam). Perbedaan superskrip menunjukkan perbedaan signifikan pada level $P < 0.05$ untuk perlakuan pada bangsa yang sama. ....	13
3. Gel Elektroforesis Produk PCR Gen HSP 70. Marker 100 pasang basa	14
4. Elektroforesis hasil PCR-RFLP HSP 70/HhaI	15
5. Gel Elektroforesis PCR-RFLP Gen HSP 70/SacII	18

## BAB 1. PENDAHULUAN

### a. Latar Belakang

Indonesia kaya dengan keanekaragaman hayatinya yang tersebar hampir diseluruh wilayah Indonesia. Salah satu provinsi di Pulau Sumatera yaitu Sumatera Barat memiliki sumber daya genetik itik lokal yaitu itik Pitalah, itik Bayang, itik Kamang, dan itik Payakumbuh. Keempat jenis itik lokal ini diberi nama sesuai dengan wilayah asalnya dan dua dari empat jenis itik lokal ini telah ditetapkan sebagai rumpun ternak nasional oleh Kementerian Pertanian Republik Indonesia. Itik Pitalah ditetapkan sebagai rumpun ternak itik lokal Indonesia dengan surat Keputusan Menteri Pertanian Nomor 2923/Kpts/OT.140/6/2011 pada tanggal 17 Juni 2011 sedangkan itik Bayang ditetapkan dengan surat Keputusan Menteri Pertanian Nomor 2835/Kpts/LB.430/8/2012 pada tanggal 10 Agustus 2012. Populasi itik pada tahun 2015 di Sumatera Barat mencapai 1.240.190 ekor dengan produksi telur 6.809 ton/tahun dan produksi daging 729 ton/tahun (Kementan, 2015). Dalam upaya pengembangan dan peningkatan efisiensi usaha itik lokal ini kendala yang dihadapi yaitu belum optimalnya produksi dan reproduksi sehingga berimbas kepada penyediaan bibit itik lokal yang berkualitas dengan jumlah yang cukup belum dapat terpenuhi. Salah satu faktor yang dapat diidentifikasi sebagai penyebab belum optimalnya produksi dan reproduksi itik lokal adalah dari kondisi fisiologisnya, dimana itik lokal yang dipelihara di daerah tropis mudah sekali mengalami stres/cekaman terutama yang disebabkan oleh suhu lingkungan.

Peternakan itik lokal di Sumatera Barat didominasi oleh peternak dengan sistem pemeliharaan yang masih tradisional di mana itik digembalakan di sawah dan pada siang hari dan dikandangkan pada malam hari, namun dengan seiring berkurangnya jumlah area persawahan akibat alih fungsi lahan dan semakin sedikitnya sumber makanan itik di area tersebut, membuat sistem pemeliharaan itik secara tradisional perlahan-lahan mulai ditinggalkan dan para peternak beralih secara cepat mengarah pada pemeliharaan secara intensif yang sepenuhnya terkurung. Perubahan pola pemeliharaan dari sistem tradisional menjadi intensif ternyata menimbulkan kendala, dimana pada dasarnya itik terbiasa hidup di kolam air untuk minum dan berenang dalam upaya menurunkan suhu tubuh. Sedangkan

sistem pemeliharaan intensif ini membuat itik minim sekali mendapat akses ke air untuk berenang dan air disediakan hanya untuk minum saja, hal ini membuat itik bermasalah dalam mengatur proses thermoregulasinya.

Itik merupakan hewan *ekstoterm* yaitu hewan yang temperatur tubuhnya bergantung sepenuhnya kepada panas yang berasal dari lingkungannya, memperlihatkan metabolisme sedikit aktif, dan konduksi panasnya tinggi (isolasinya buruk terhadap pengaruh lingkungannya). Kemampuan thermoregulasi itik lebih rendah dibandingkan ayam lokal. Suhu lingkungan Sumatera Barat yang berkisar antara  $23^{\circ} - 32^{\circ}\text{C}$  melebihi suhu nyaman itik yang berkisar antara  $18,3^{\circ} - 25,5^{\circ}\text{C}$ , serta kondisi pemeliharaan minim air menyebabkan itik mengalami stres/cekaman panas. Itik sebagai unggas air memiliki fisiologi yang berbeda dengan unggas lainnya sehingga itik lebih rentan terhadap cekaman panas (Ali *et al.*, 2008). Kondisi ini memaksa ternak untuk mengaktifkan mekanisme thermoregulasi seperti peningkatan frekuensi pernapasan, denyut jantung, dan suhu permukaan tubuh. Cekaman panas akan menyebabkan perubahan-perubahan seperti perubahan tingkah laku, fisiologis dan biokimiawi dalam tubuh. Energi yang seharusnya digunakan untuk produksi dan reproduksi dialokasikan untuk mempertahankan keseimbangan panas tubuh ternak.

Menurut Virden dan Kidd (2009) ternak yang menderita stres mengakibatkan sistem neurogenik langsung diaktifkan, selanjutnya pada fase alarm ditandai dengan peningkatan tekanan darah, otot, sensitivitas saraf, gula darah dan respirasi. Suhu lingkungan tinggi akan memengaruhi tingkah laku ternak serta fungsi beberapa organ tubuh, seperti jantung dan alat pernapasan, serta secara tidak langsung memengaruhi peningkatan hormon kortikosteron, menurunnya hormon triiodotironin dan tiroksin dalam darah (Sohail *et al.*, 2010).

Ternak unggas yang menderita stres panas akan mengurangi konsumsi pakan dan selanjutnya memengaruhi pertumbuhan dan produksi telur serta kualitas telur. Penurunan produksi karena pengaruh stres panas pada ternak unggas terutama pada ternak itik ditandai dengan menurunnya *intake* pakan, sintesis protein, disfungsi endokrin, berkurangnya kapasitas antioksidan, serta terganggunya keseimbangan kalsium dan fosfor dalam darah (Ma *et al.*, 2014).



Peningkatan cekaman panas yang biasanya diikuti dengan turunnya produksi dapat merupakan masalah serius pada pengembangan itik di daerah tropis.

Tubuh ternak unggas yang terganggu karena cekaman panas akan berusaha untuk mengembalikan homeostasis ke kondisi seperti sebelum terjadi cekaman. Noor dan Seminar (2009) menyatakan jika cekaman terus berlanjut dan tubuh tidak mampu mengatasinya, maka akan digunakan jalur genetik, yaitu dengan cara mengaktifkan gen HSP yang berfungsi hanya dalam kondisi cekaman/stres. Gen HSP70 memiliki peran penting dalam biologi sel dan biokimia dan sebagai *chaperone* (protein pelindung), yang dikodekan oleh anggota keluarga *multigene*, yang berperan dalam merespon terhadap cekaman suhu panas (Bukau dan Horwich, 1998). Selanjutnya Etches *et al.*, (2008) menerangkan bahwa gen HSP70 bertujuan untuk melindungi protein yang sensitif terhadap suhu tinggi, melindungi dari degradasi atau mencegah kerusakan protein serta mencegah rusaknya sel secara permanen yang selanjutnya dapat mempengaruhi kelangsungan hidup.

Ekspresi HSP 70 bervariasi pada masing-masing organisme. Organisme yang tumbuh pada kisaran temperatur yang lebar akan memberikan respons maksimum pada suhu 10-15<sup>0</sup> C di atas suhu optimal, sedangkan organisme yang tumbuh pada temperatur sempit akan memberikan respons maksimum pada suhu 5<sup>0</sup>C di atas suhu optimal (Lindquist, 1986; Lindquist dan Craigh 1988). Pada ternak unggas, HSP 70 akan memperlihatkan ekspresinya pada suhu 29,3<sup>0</sup>C dan mencapai angka  $0,15 \pm 86,54 \times 10^7$  *copy* mRNA, namun bila suhu lingkungan meningkat, ekspresi HSP 70 akan semakin meningkat (Tamzil *et al.*, 2013).

Sejak penemuan gen HSP pada tahun 1962, para ilmuwan telah secara aktif melakukan penelitian gen HSP namun sebagian besar penelitian tersebut difokuskan pada mamalia dan ayam. Penelitian gen HSP70 pada itik sebagai kandidat gen untuk peningkatan *thermoadaptive*/daya tahan panas bisa dikatakan sedikit sekali. Berdasarkan pemaparan diatas maka penelitian ini mencoba untuk mempelajari dan mengidentifikasi gen HSP70 pada itik lokal sebagai dasar program seleksi dalam rangka menghasilkan itik lokal yang tahan panas sehingga dapat melindungi ternak itik lokal dari bahaya cekaman/stres panas.

## BAB 2. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### Tujuan Penelitian

1. Menganalisis parameter fisiologis sebagai indikator cekaman panas pada itik lokal yang tahan panas dan tidak tahan panas.
2. Menganalisis ekspresi gen dan ekspresi protein HSP70 terhadap itik lokal yang tahan dan tidak tahan panas, serta membandingkannya dalam rumpun maupun antar rumpun.
3. Mengidentifikasi keragaman *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) gen HSP70 sebagai dasar seleksi (MAS) pada itik lokal Sumatera Barat yang tahan dan tidak tahan panas baik dalam rumpun maupun antar rumpun.

### Manfaat

Selama ini program seleksi ternak unggas terutama itik hanya pada sifat luarnya (fenotipe) saja, sehingga hasil seleksi tidak maksimal. Perkembangan pesat pengetahuan dibidang genetika molekuler saat ini sudah memungkinkan untuk melakukan seleksi sumber pembawa sifat yaitu genotipe melalui marka/penciri genetik (DNA dan gen) secara molekuler. Pada penelitian ini gen HSP 70 sebagai marka/penciri sifat tahan panas tidak hanya strukturalnya saja diidentifikasi secara genomik, namun juga fungsionalnya melalui ekspresi genetiknya (transkriptomik) dan ekspresi protein yang terbentuk dari gen HSP 70 (proteomik). Berdasarkan tiga cara ini diharapkan nantinya didapatkan kandidat gen MAS (*marker assisted selection*) sebagai dasar seleksi sifat tahan panas itik lokal Sumatera Barat sebagai upaya dalam pembentukan galur.

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### Penelitian Tahap I (Tahun I)

#### Pemeliharaan Itik Lokal dan Pengukuran Indikator-indikator Cekaman Panas

##### Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu itik Pitalah, itik Kamang dan itik Payakumbuh masing-masing 70, 50, dan 50 ekor dari itik lokal yang habitat pemeliharannya di daerah ketinggian di Sumatera Barat (>750 M dpl), dan itik Bayang sebanyak 70 ekor yang habitat pemeliharannya berada di dataran rendah/pesisir pantai Sumatera Barat ( $\pm$  4 M dpl). Itik lokal yang digunakan yaitu itik yang berumur 18 sd 20 minggu yaitu itik dara yang akan berproduksi. Suhu pemeliharaan itik sesuai dengan kondisi suhu kota Padang yang berada di dataran rendah yaitu berkisar antara 23 – 32<sup>0</sup>C, suhu kandang diukur sebanyak tiga kali pada pukul 07.00, 13.00, dan 18.00. Sampel darah diambil melalui *vena brachialis* menggunakan spuit insulin 1 cc dan disimpan pada suhu  $\pm$  3<sup>0</sup>C selama 16 jam (sampel untuk pengukuran hormon kortikosteron), sedangkan sampel untuk pengukuran leukosit dan diferensiasinya dimasukkan ke tabung EDTA 5 mL

##### Pengukuran Indikator Cekaman Panas

Parameter indikator cekaman panas yaitu Hormon Kortikosteron, persentase leukosit dan diferensiasinya, indikator lain yang diukur yaitu : 1) suhu rektal, 2) panting, 3) konsumsi pakan dan 4) konsumsi air minum. Adapun batasan atau standar kondisi normal maupun kondisi stres dari indikator-indikator di atas dapat dilihat pada Tabel 1.

#### Analisis Ekspresi Gen HSP70 Itik Lokal Tahan dan Tidak Tahan Panas

##### Hewan Percobaan

Itik lokal yang digunakan yaitu itik lokal yang teridentifikasi memiliki indikator cekaman panas normal (tahan Panas) dan indikator cekaman panas stres (Tidak Tahan Panas) berdasarkan pengukuran indikator cekaman panas sebelumnya. Jumlah itik lokal yang akan digunakan yaitu 24 ekor, masing-masing rumpun (Pitalah, Bayang, Kamang, Payakumbuh) adalah 6 (enam) ekor, terdiri dari 3 ekor tahan panas dan 3 ekor tidak tahan panas.

Tabel 1. Standar Kondisi Normal dan Stres dari Indikator Cekaman Panas

Indikator	Normal	Stres	Sumber
Kortikosteron (ng/ml)	4.94 ± 0.68	10.84 ± 1.36	Ma <i>et al.</i> , 2014
H/L Ratio	2.80 ± 1.85	3.45 ± 1.52	Ismoyowati <i>et al.</i> , 2012
Suhu Rektal (°C)	40.69 ± 0.18 - 41.28 ± 0.23	42.45 ± 0.31 - 43.95 ± 0.33	Marais <i>et al.</i> , 2011
Panting	-	**	Suswoyo <i>et al.</i> , 2014
Feed intake (g/day)	155.78	132.92	Sabrina <i>et al.</i> , 2013
Water Intake (L)	1,8 – 2 kali <i>feed intake</i>	Besar dari 2 kali <i>feed intake</i>	

Keterangan : - tidak panting, \*\* panting 36 – 70 %

### Perlakuan Cekaman Panas

Perlakuan untuk cekaman panas dilakukan dengan metode eksperimen dengan menggunakan rancangan acak kelompok, dengan perlakuan yaitu cekaman panas pada suhu 32 - 35°C yang diperlakukan dengan lama waktu selama 0 jam (kontrol/tanpa cekaman), 1 jam, dan 2 jam. Perlakuan cekaman panas ini dilakukan dengan cara itik ditempatkan pada *environmental chamber* sederhana yang dimodifikasi dengan dinding pembatas terbuat dari mika dan bagian depan diberi kaca dengan ukuran panjang x lebar x tinggi yaitu 35 x 35 x 70 cm. Chamber sederhana ini dilengkapi dengan *heater*, *blower*, thermometer digital, thermostat, tempat makan dan tempat minum. Setelah perlakuan cekaman panas, itik disembelih untuk diambil organ otak, hati dan ginjal menggunakan peralatan steril kemudian dimasukkan kedalam nitrogen cair lalu disimpan pada suhu -80°C, selanjutnya dilakukan analisis total RNA.

### Isolasi dan Ekstraksi Total RNA

Isolasi dan ekstraksi total RNA yang berasal dari jaringan ( hati dan ovarium). Isolasi dan ekstraksi total RNA dilakukan dengan menggunakan reagen GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Lithuania, EU).

### Reverse Transkriptase

RNA di transkripsi ke dalam bentuk *complementary DNA* (cDNA) menggunakan kit *Transcriptor Synthesis First Strand cDNA* (Thermo Scientific, Lithuania, EU).

### Primer Gen HSP70

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi mRNA gen HSP70 dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Primer yang Digunakan dalam Penelitian

Nama Gen		Primer 5' – 3'	Temperatur Annealing	Produk
HSP70	F R	CAATGCCGACCTCTTCCGT CTTTGCCATTGAAGAAGTCCTGTAG	63 <sup>0</sup> C	248 bp
$\beta$ -actin	F R	TGGACTCTGGTGATGGTGTTA CACGCACAATTTCTCTCTCGG	63 <sup>0</sup> C	150 bp

### Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

*Complementary* DNA digunakan untuk kuantifikasi ekspresi gen HSP70 dengan menggunakan *real time* PCR (qRT-PCR) (Analytic Jena, AG qTower 4 kanal, Jerman). Reaksi *real time* PCR menggunakan SYBR *Green Select Master* Kit (Applied Biosystem, USA) yaitu: 10  $\mu$ l reaksi campuran yang digunakan mengandung 5  $\mu$ l *master mix*; 0.25  $\mu$ l masing-masing primer *forward* dan *reverse* (10 pmol); 1  $\mu$ l cDNA dari sampel dan 3.5  $\mu$ l nuklease-bebas air. Kondisi PCR dijalankan sebagai berikut, 95<sup>0</sup>C selama 5 menit, 39 siklus pada 95<sup>0</sup>C selama 10 detik, diikuti dengan 60<sup>0</sup>C selama 20 detik dan 72<sup>0</sup>C selama 30 detik.

Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) menggunakan molekul reporter *fluoresens* untuk memonitor produksi dari produk amplifikasi pada setiap siklus reaksi PCR. Pada qRT-PCR akan diperoleh nilai *cycle threshold* (CT), yaitu siklus ketika intensitas emisi zat warna *fluoresens* melewati nilai *threshold*. Semakin tinggi jumlah awal kopi target asam nukleat, semakin cepat peningkatan *fluoresens* sehingga semakin rendah nilai CT (Bustin, 2005). Ekspresi gen HSP70 dihitung berdasarkan pendekatan jumlah relatif kuantitas mRNA gen target (HSP70) dengan gen kontrol ( $\beta$ -actin) dengan metode perbandingan CT ( $\Delta$ CT). Ekspresi antara gen target dengan gen kontrol dapat dibandingkan dengan persamaan  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , dengan delta CT ( $\Delta\Delta CT$ ) = CT gen target - CT gen kontrol (*house keeping gene*) (Schmittgen dan Livak, 2008).

### Analisis Data

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK). Data yang diperoleh dianalisis ragam (ANOVA). Model yang digunakan adalah sebagai berikut (Mattjik dan Sumertajaya, 2002):

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + P_j + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan:

- $Y_{ijk}$  = nilai pengamatan akibat pengaruh genotipe ke-i dan populasi ke-j pada ulangan ke-k  
 $\mu$  = rata-rata umum  
 $G_i$  = pengaruh genotipe ke-i  
 $P_j$  = pengaruh populasi ke-j  
 $\varepsilon_{ijk}$  = pengaruh galat percobaan dari genotipe ke-i dan populasi ke-j pada ulangan ke-k

## Penelitian Tahap II (Tahun II)

### Analisis *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) pada Gen HSP70

#### Hewan Percobaan

Pada penelitian tahap kedua ini jumlah itik lokal yang digunakan yaitu 96 ekor, masing-masing rumpun (Pitalah, Bayang, Kamang, Payakumbuh) adalah 24 ekor, terdiri dari 12 ekor tahan panas dan 12 ekor tidak tahan panas.

#### Ekstraksi DNA Genom

Dimulai dengan pengambilan sampel darah pada itik Pitalah, Bayang, Kamang, dan Payakumbuh yang teridentifikasi tahan panas dan yang tidak tahan panas. Sampel darah diambil dari vena brachialis, kemudian dimasukkan ke tabung EDTA 5 ml. Ekstraksi DNA genom menggunakan metode *phenol-chloroform* (Sambrook *et al.* 1989).

#### Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) gen HSP70

Amplifikasi fragmen gen HSP70 dilakukan menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Runutan DNA gen HSP70 yang digunakan yaitu berdasarkan Xia *et al* (2013) dengan kode gen bank EU678246.2, pada bagian akhir coding sekuen dari 1438 – 1903. Primer yang digunakan yaitu F: 5' GGGAGACAAGTCCGAGAACG 3' R: 5' CACCCGATCTCTGTTGGCTT 3'.

Reaksi PCR dikondisikan pada volume 10  $\mu$ L (1  $\mu$ L 10 X ex taq buffer, 0.5  $\mu$ L primer HSP 70 F dan 0.5  $\mu$ L primer HSP 70 R, 1  $\mu$ L dNTP mix, 0.5  $\mu$ L *template* DNA, 0.07  $\mu$ L ex taq dan 6.43  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O). Reaksi PCR dimulai dengan

denaturasi awal pada 95<sup>0</sup>C selama lima menit, selanjutnya dilakukan amplifikasi selama 35 siklus, masing-masing pada 95<sup>0</sup>C selama 30 detik, 60<sup>0</sup>C selama 30 detik, dan 72<sup>0</sup>C selama satu menit, kemudian diakhiri elongasi akhir pada 72<sup>0</sup>C selama lima menit. Hasil amplifikasi DNA tersebut divisualisasi dengan elektroforesis gel agarose 1.5%.

### **Elektroforesis Produk PCR**

Produk PCR dipisahkan menggunakan *agarose gel* dengan konsentrasi 1.5%. Sebanyak 0.45 g serbuk agarose ditambahkan dengan 30 ml 0.5 x TBE. Campuran tersebut dipanaskan hingga mendidih dan ditambahkan dengan 2.5 µl EtBr, kemudian dicetak pada cetakan hingga mengeras. Masing-masing sampel DNA hasil PCR sebanyak 5 µl ditambahkan dengan 1 µl *loading dye* dan dimasukkan ke dalam sumur-sumur di dalam *gel*, kemudian dielektroforesis pada larutan 0.5 x TBE dengan voltase 100 volt selama kurang lebih 30 - 45 menit. Pita-pita DNA akan tampak dengan bantuan sinar ultra violet pada mesin UV *Transilluminator*.

### **Sekuensing DNA**

Adanya *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) dideteksi dengan melakukan sekuensing DNA pada fragmen utuh gen HSP70. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan mesin sekuenser (ABI Prims 3100-Avant Genetic Analyzer) pada fragmen primer *forward* dan *reverse* melalui jasa perusahaan sekuensing 1<sup>st</sup> Base di Selangor, Malaysia.

### **Analisis Data**

Analisis data yang dilakukan adalah nilai frekuensi alel dan frekuensi genotipe, keseimbangan Hardy-Weinberg, nilai heterozigositas pengamatan (Ho) dan heterozigositas harapan (He) dihitung berdasarkan rumus berikut :

#### **Frekuensi Alel (Nei dan Kumar, 2000)**

$$X_i = (2N_{ii} + N_{ij}) / 2N ; \quad X_j = 1 - X_i$$

Keterangan :

X<sub>i</sub> = Frekuensi gen ke-i

X<sub>j</sub> = Frekuensi gen ke-j

N<sub>ii</sub> = Jumlah sampel dengan genotipe ii

$N_{ij}$  = Jumlah sampel dengan genotipe ij  
N = Jumlah sampel

**Frekuensi Genotipe** (Nei dan Kumar, 2000)

$$X_{ii} = \frac{N_{ii}}{N} \times 100\%; \quad X_{ij} = \frac{N_{ij}}{N} \times 100\% \quad X_{jj} = \frac{N_{ji}}{N} \times 100\%$$

Keterangan :

$X_{ii}$  = Frekuensi genotipe ke-ii  
 $X_{ij}$  = Frekuensi genotipe ke-ij  
 $X_{jj}$  = Frekuensi genotipe ke-jj

**Keseimbangan Hardy-Weinberg** (Nei dan Kumar, 2000)

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

Keterangan :

$\chi^2$  = chi square test  
O = Frekuensi Genotipe sampel yg diamati  
E = Frekuensi Genotipe harapan

**Heterozigositas** (Weir, 1996 & Nei dan Kumar, 2000)

$$H_o = \sum_{i \neq j} \frac{n_{ij}}{N}$$

Keterangan :

$H_o$  = heterozigositas pengamatan  
 $n_{ij}$  = jumlah individu heterozigot  
N = jumlah individu yang diamati

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^q x_i^2$$

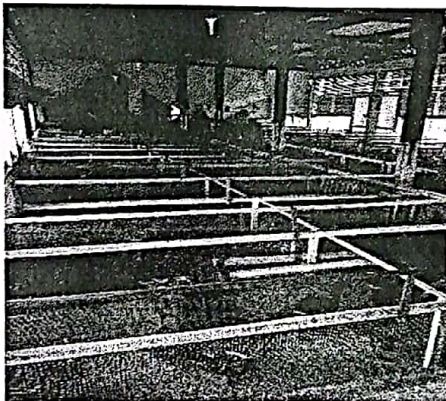
Keterangan :

$H_e$  = nilai heterozigositas harapan  
x = frekuensi alel  
q = jumlah alel



#### BAB 4. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

Hewan percobaan (itik lokal) yang digunakan dalam penelitian ini 240 ekor yaitu itik Pitalah, itik Kamang dan itik Payakumbuh masing-masing 70, 50, dan 50 ekor dari itik lokal yang habitat pemeliharannya di daerah ketinggian di Sumatera Barat (>750 M dpl), dan itik Bayang sebanyak 70 ekor yang habitat pemeliharannya berada di dataran rendah/pesisir pantai Sumatera Barat ( $\pm$  4 M dpl). Itik lokal yang digunakan yaitu itik yang berumur 18 sd 20 minggu yaitu itik dara yang akan berproduksi. Itik ditempatkan pada 20 kandang koloni, dimana satu kandang koloni diisi 10 ekor itik. setiap individu itik pada setiap kandang koloni diberi tanda menggunakan *wing ban*. Itik dipelihara dengan kondisi seragam, Pemberian pakan dilakukan dengan memperhatikan imbalanced protein dan imbalanced energi. Pakan diberikan dua kali dalam sehari dan air diberikan secara *ad libitum*. Suhu pemeliharaan itik sesuai dengan kondisi suhu kota Padang yang berada di dataran rendah yaitu berkisar antara 23 – 32<sup>0</sup>C, suhu kandang diukur sebanyak tiga kali pada pukul 07.00, 13.00, dan 18.00.



Gambar 1. Itik lokal yang digunakan dalam penelitian

#### Pengukuran Indikator Cekaman Panas

Dari 240 ekor itik lokal Sumatera Barat yang dilakukan pengukuran indikator cekaman panas yaitu kadar kortikosteron/kortisol, H/L Ratio, Suhu Rektal, Panting, feed intake dan water intake, berdasarkan parameter fisiologis normal dan stress dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu tahan dan tidak tahan panas. Adapun data indikator cekaman panas dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Rataan Parameter Fisiologis Itik Lokal Sumatera Barat yang tahan dan tidak tahan Panas

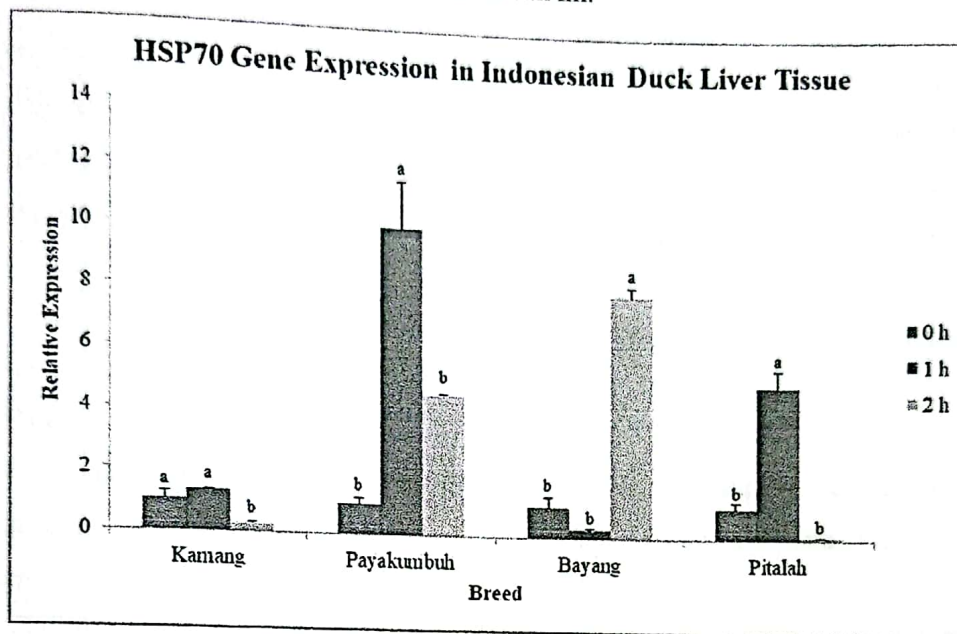
Kondisi	Parameter Fisiologis	Rumpun Itik			
		Pitalah ( 70 ekor )	Bayang ( 70 ekor )	Kamang ( 50 ekor )	Payakumbuh ( 50 ekor )
Tahan Panas	Kortikosteron (ng/ml)	5.48 ± 0.72	4.98 ± 0.54	5.74 ± 0.86	5.94 ± 0.78
	H/L Ratio	3.12 ± 1.48	2.70 ± 1.20	3.26 ± 1.25	3.18 ± 1.42
	Suhu Rektal (°C)	41.57	40.24	41.64	41.36
	Panting	-	-	-	-
	Feed Intake (g/day)	158.22	157.72	158.64	160.32
	Water intake (L)	0.31	0.30	0.31	0.31
Tidak Tahan Panas	Kortikosteron (ng/ml)	11.20 ± 1.34 (42 ekor)	10.76 ± 1.80	11.45 ± 1.65	11.58 ± 1.42
	H/L Ratio	4.30 ± 1.64	3.86 ± 1.30	4.60 ± 1.28	4.52 ± 1.35
	Suhu Rektal (°C)	42.45	41.88	42.72	42.54
	Panting	**	**	**	**
	Feed Intake (g/day)	128.28	134.55	130.46	128.66
	Water intake (L)	0.33	0.32	0.34	0.33

Berdasarkan tabel 3 di atas, bahwa terdapat pada masing-masing rumpun itik individu –individu yang termasuk kedalam kategori cekaman panas normal (tahan Panas) dan cekaman panas stres (Tidak Tahan Panas) berdasarkan standar parameter fisiologis pada Tabel 1. Itik –itik dari keempat jenis ini yang masuk kedalam kategori tahan panas yang akan diuji ekspresi genetik dengan perlakuan cekaman panas, sekaligus ditentukan SNP (*Single nucleotide polymorphisme*) nya masing-masing.

Pada Tabel 3 dapat kita lihat bahwa itik Kamang yang tahan panas memperlihatkan parameter fisiologis yang lebih tinggi dibandingkan dengan ke 3 jenis itik lokal lainnya, dimana rataan parameter fisiologi kadar Kortikosteron  $5.74 \pm 0.86$  (ng/ml), H/L Ratio  $3.26 \pm 1.25$ , Suhu Rektal (°C) 41.64 .

## Analisis Ekspresi Genetik Gen HSP70

Ekspresi mRNA gen HSP70 pada organ hati itik lokal Sumatera Barat yang mengalami cekaman panas akut setelah dilakukan perlakuan cekaman panas yaitu lama pemanasan yaitu 0 jam, 1 jam dan 2 jam yang dilakukan dalam chamber dapat dilihat pada gambar 2 dibawah ini.



Gambar 2. Ekspresi relatif gen HSP70 pada jaringan hati empat rumpun itik yang diberi perlakuan cekaman panas (0, 1, dan 2 jam). Perbedaan superskrip menunjukkan perbedaan signifikan pada level  $P < 0.05$  untuk perlakuan pada bangsa yang sama.

Perlakuan cekaman panas memberikan pengaruh yang signifikan ( $P < 0,05$ ) terhadap ekspresi mRNA gen HSP70 pada setiap rumpun itik di organ hati. Ekspresi mRNA gen HSP 70 relatif terhadap B actin pada setiap rumpun itik menunjukkan ekspresi yang cenderung berbeda pada setiap perlakuannya. Pada itik Payakumbuh dan itik Bayang perlakuan panas menunjukkan ekspresi yang meningkat (up-regulated) sedangkan pada itik Kamang dan Pitalah justru perlakuan panas setiap jamnya menunjukkan ekspresi yang menurun (down-regulated).

Hal ini dapat dinyatakan bahwa pada lama pemanasan tertentu kemampuan setiap rumpun itik untuk mengekspresikan mRNA gen HSP70 berbeda-beda. Dari hasil diatas dapat dinyatakan bahwa itik Payakumbuh dan Itik

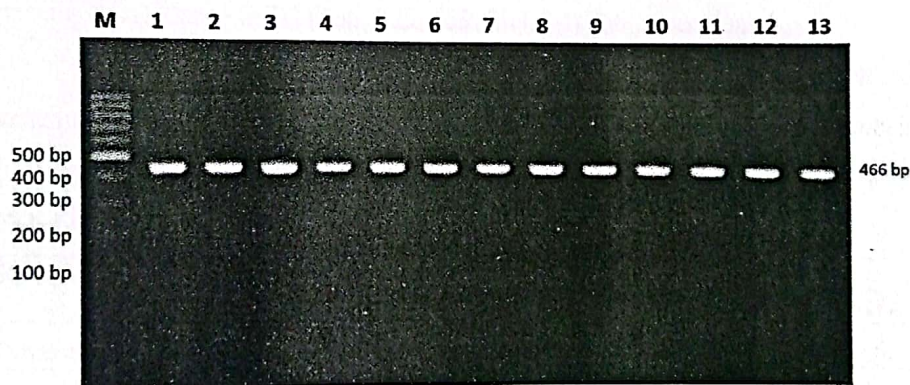
Bayang adalah rumpun itik dengan kemampuan ekspresi mRNA gen HSP70 yang terbaik dengan lama pemanasan sampai 2 jam. Dengan kata lain bahwa rumpun itik Payakumbuh dan Bayang, memiliki toleransi terhadap panas yang baik (tahan Panas).

#### **Analisis *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) pada Gen HSP70**

Pada penelitian ini telah didapat 110 sampel DNA itik lokal Sumatera Barat (Itik Payakumbuh 31 sampel, Pitalah 29 sampel, Kamang 26 sampel, dan Bayang 24 sampel), proses amplifikasi menghasilkan Produk PCR sepanjang 466 pasang basa yang selanjutnya untuk dilakukan analisis SNP menggunakan metode PCR-RFLP dengan menggunakan enzim restriksi HhaI dan SacII. Hasil PCR RFLP juga dilakukan sekuensing dengan menggunakan mesin sekuenser (ABI Prims 3100-Avant Genetic Analyzer) pada fragmen primer *forward* dan *reverse* melalui jasa perusahaan sekuensing 1<sup>st</sup> Base di Selangor, Malaysia.

#### **Polimerasi Chain Reaction (PCR) Gen HSP 70**

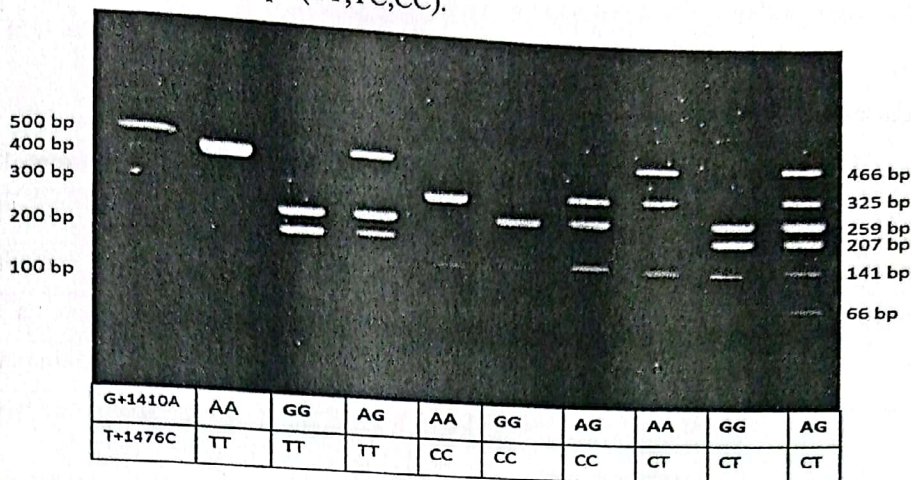
Berdasarkan hasil PCR Gen HSP 70 dapat diketahui bahwa elektroforesis pada gel agarose 1,5% dengan marker 100 pasang basa didapatkan pita DNA hasil amplifikasi sepanjang 466 pasang basa (Gambar 3).



Gambar 3. Gel Elektroforesis Produk PCR Gen HSP 70. Marker 100 pasang basa. PCR-RFLP Gen HSP70/HhaI

Penentuan SNP dengan metode PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi HhaI (GCG|C), didapatkan hasil yaitu adanya 2 *single nucleotide Polymorphism* (SNP) dengan lokasi (G+1410A / g.1696 dan C+1476T / g. 1762) yang berturut-turut disebut SNP 1 dan SNP 2 . Pada SNP 1 didapatkan dua alel (A dan G)

dengan 3 Genotipe (AA,AG,GG) sedangkan pada SNP 2 juga didapatkan 2 alel (T dan C) dengan 3 genotipe (TT,TC,CC).



Gambar 4. Elektroforesis hasil PCR-RFLP HSP 70/HhaI

Dari gambar 4 diatas dapat diketahui adanya kombinasi genotipe dengan panjangnya masing-masing yaitu genotipe AA/TT (466 pasang basa), GG/TT (259, 207 pasang basa), AG/TT (466, 259, 207 pasang basa), AA/CC (325, 141 pasang basa), GG/CC (259, 141, 66 pasang basa), AG/CC (325, 259, 141, 66 pasang basa), AA/TC (466, 325, 141 pasang basa), GG/TC (259, 207, 141, 66 pasang basa), dan AG/TC (466, 325, 259, 207, 141, 66 pasang basa).

Adapun frekuensi alel, frekuensi genotipe, heterozigositas dan keseimbangan *hardy-weinberg* pada lokus Gen HSP70/HhaI untuk masing-masing SNP dapat dilihat pada Tabel 4 dibawah ini.

Tabel 4. Nilai Frekuensi Alel dan Genotipe Gen HSP70 lokasi SNP 1

Rumpun Itik	Jumlah Sampel	Frekuensi alel		Frekuensi Genotipe		
		A	G	AA	AG	GG
Pitalah	29	0,24	0,76	0,10	0,28	0,62
Bayang	24	0,10	0,90	-	0,19	0,81
Kamang	26	0,20	0,80	-	0,41	0,59
Payakumbuh	31	0,18	0,82	-	0,35	0,65

Selanjutnya nilai heterozigositas observasi dan eharapan hasil penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5 .

Alel G pada lokasi SNP 1 lokus gen HSP70 dikeempat rumpun itik lokal Sumatera Barat mendominasi frekuensi alel. Nilai frekuensi alel G pada keempat

rumpun Itik berkisar antara 0,76 – 0,90. Nilai frekuensi alel A berkisar antara 0,10 – 0,24 (tabel 2). Secara keseluruhan dapat diartikan bahwa gen HSP70 pada lokus HhaI bersifat polimorfik (beragam),

**Tabel 5. Nilai Heterozigositas (HO dan He) dan *chi-square* ( $X^2$ ) Genotipe Gen HSP70 Lokasi SNP 1**

Rumpun Itik	HO	He	$X^2$
Pitalah	0,28	0,37	1,77 <sup>ns</sup>
Bayang	0,19	0,17	0,23 <sup>td</sup>
Kamang	0,41	0,33	1,45 <sup>td</sup>
Payakumbuh	0,35	0,29	1,44 <sup>td</sup>

Ket : ns = tidak berbeda nyata,  $X^2_{(0,05, 1)} = 3,84$   
td = tidak dianalisis karena db = 0

Genotipe GG mendominasi frekuensi genotipe gen HSP70/HhaI pada lokasi SNP 1. Nilai frekuensi alel GG pada keempat rumpun itik local berkisar antara 0,59 – 0,81. Frekuensi genotipe AG berada pada kisaran yang lebih rendah yaitu sebesar 0,19- 0,41. Frekuensi genotipe terendah adalah AA yaitu 0,10 (Tabel 3). Pada itik Bayang, Kamang, dan payakumbuh tidak ditemukan genotipe AA.

Nilai heterozigositas pengamatan Ho pada gen HSP 70/HhaI dilokasi SNP 1 pada masing-masing rumpun itik lokal yang dianalisis berkisar antara 0,19 – 0,41, sedangkan nilai heterozigositas harapan berkisar antara 0,17 – 0,37 (tabel 4). Pada itik pitalah nilai HO lebih kecil dibandingkan He, ini menunjukkan telah terjadi seleksi yang cukup intensif itik pitalah dikalangan peternak.

Keseimbangan genotipe gen HSP70 dalam populasi (keseimbangan hardy-weinberg), dianalisis dengan *chi-square* ( $X^2$ ). Nilai  $X^2$  pada itik Bayang, Kamang, dan Payakumbuh untuk gen HSP70/HhaI SNP 1 tidak dianalisis, karena jumlah genotipe yang ditemukan hanya 2 (AG dan GG), sehingga derajat bebas jumlahnya nol.

**Tabel 6. Nilai Frekuensi Alel dan Genotipe Gen HSP70/HhaI lokasi SNP 2**

Rumpun Itik	Jumlah Sampel	Frekuensi alel		Frekuensi Genotipe		
		T	C	TT	TC	CC
Pitalah	29	0,62	0,38	0,41	0,41	0,17
Bayang	24	0,69	0,31	0,43	0,52	0,05
Kamang	26	0,57	0,43	0,32	0,50	0,18
Payakumbuh	31	0,53	0,47	0,26	0,55	0,19

Tabel 7. Nilai Heterozigositas (HO dan He) dan *chi-square* ( $X^2$ ) Genotipe Gen HSP70 Lokasi SNP 2

Rumpun Itik	HO	He	$X^2$
Pitalah	0,41	0,47	0,43 <sup>ns</sup>
Bayang	0,52	0,43	1,07 <sup>ns</sup>
Kamang	0,50	0,49	0,01 <sup>ns</sup>
Payakumbuh	0,55	0,50	0,32 <sup>ns</sup>

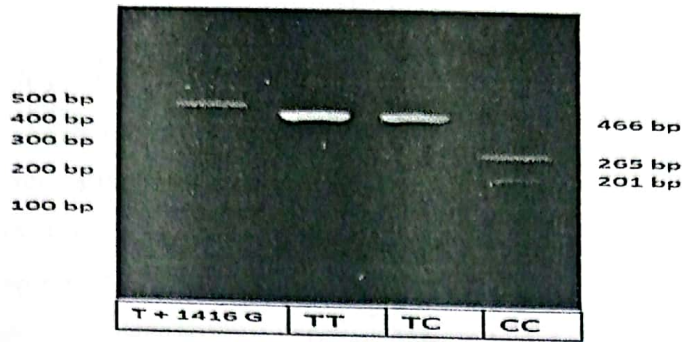
Ket : ns = tidak berbeda nyata,  $X^2_{(0,05, 1)} = 3,84$

Pada gen HSP70/HHaI SNP 2, Alel T dikeempat rumpun itik lokal Sumatera Barat mendominasi frekuensi alel. Nilai frekuensi alel T pada keempat rumpun Itik berkisar antara 0,53 – 0,69. Nilai frekuensi alel C berkisar antara 0,31 – 0,47. Jelas bahwa gen HSP70 pada lokus HhaI SNP 2 bersifat polimorfik (beragam), Genotipe TC mendominasi frekuensi genotipe gen HSP70/HhaI pada lokasi SNP 2. Nilai frekuensi alel TC pada keempat rumpun itik lokal berkisar antara 0,41 – 0,55. Frekuensi genotipe TT berada pada kisaran yang lebih rendah yaitu sebesar 0,26- 0,43. Frekuensi genotipe terendah adalah CC yaitu 0,05 – 0,19 (Tabel 5).

Pada tabel 6 Nilai heterozigositas pengamatan Ho pada gen HSP 70/HHaI dilokasi SNP 2 pada masing-masing rumpun itik lokal yang dianalisis berkisar antara 0,41 – 0,55, sedangkan nilai heterozigositas harapan berkisar antara 0,43 – 0,50. Seperti pada SNP 1 juga terjadi pada itik pitalah nilai HO lebih kecil dibandingkan He, ini menunjukkan telah terjadi seleksi yang cukup intensif itik pitalah dikalangan peternak. Nilai  $X^2$  pada keempat rumpun itik local untuk gen HSP70/HhaI SNP 2 tidak berbeda nyata, hal ini menunjukkan bahwa memang keseimbangan gen dalam populasi dilapangan sulit untuk ditemukan.

#### PCR-RFLP Gen HSP70/SacII

Penentuan SNP dengan metode PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi SacII (CCGC|GG), didapatkan hasil satu SNP dengan lokasi (T+1416C / g.1702) yang selanjutnya disebut SNP. Pada SNP 3 didapatkan alel (T dan C) dengan 3 genotipe (TT,TC,CC). adapun panjang dari tiap-tiap genotipe yaitu genotipe TT (466 pasang basa), TC (466, 265, 201 pasang basa) dan CC (265, 201 pasang basa).



Gambar 5. Gel Elektroforesis PCR-RFLP Gen HSP 70/SacII

Frekuensi alel, frekuensi genotipe, heterozigositas dan keseimbangan *hardy-weinberg* pada lokus Gen HSP70/HhaI untuk SNP 3 dapat dilihat pada tabel 7 dan 8 dibawah ini.

Tabel 7. Nilai Frekuensi Alel dan Genotipe Gen HSP70/HhaI lokasi SNP 2

Rumpun Itik	Jumlah Sampel	Frekuensi alel		Frekuensi Genotipe		
		T	C	TT	TC	CC
Pitalah	29	0,86	0,14	0,76	0,21	0,03
Bayang	24	0,90	0,10	0,79	0,21	-
Kamang	26	0,82	0,18	0,64	0,36	-
Payakumbuh	31	0,82	0,18	0,65	0,35	-

Tabel 8. Nilai Heterozigositas (HO dan He) dan *chi-square* ( $X^2$ ) Genotipe Gen HSP70 Lokasi SNP 1

Rumpun Itik	HO	He	$X^2$
Pitalah	0,21	0,24	0,49 <sup>ns</sup>
Bayang	0,21	0,19	0,32 <sup>td</sup>
Kamang	0,36	0,30	1,20 <sup>td</sup>
Payakumbuh	0,35	0,29	1,44 <sup>td</sup>

Ket : ns = tidak berbeda nyata,  $X^2_{(0,05, 1)} = 3,84$   
td = tidak dianalisis karena db = 0

Pada gen HSP70/SacII, Alel T dikeempat rumpun itik lokal Sumatera Barat mendominasi frekuensi alel. Nilai frekuensi alel T pada keempat rumpun Itik berkisar antara 0,82 – 0,90. Nilai frekuensi alel C berkisar antara 0,10 – 0,18. Jelas bahwa gen HSP70 pada lokus SacII bersifat polimorfik (beragam), Genotipe TT mendominasi frekuensi genotipe gen HSP70/SacII. Nilai frekuensi alel TT pada keempat rumpun itik lokal berkisar antara 0,64 – 0,79. Frekuensi genotipe



TC berada pada kisaran yang lebih rendah yaitu sebesar 0,21- 0,36. Frekuensi genotipe terendah adalah CC yaitu 0,03 (Tabel 7).

Pada tabel 8 Nilai heterozigositas pengamatan  $H_o$  pada gen HSP 70/SacII pada masing-masing rumpun itik lokal yang dianalisis berkisar antara 0,21 – 0,36, sedangkan nilai heterozigositas harapan berkisar antara 0,19 – 0,30. Seperti pada gen HSP 70 lokus HhaI, pada lokus SacII juga terjadi pada itik pitalah nilai  $H_o$  lebih kecil dibandingkan  $H_e$ , ini menunjukkan telah terjadi seleksi yang cukup intensif itik pitalah di Sumatera Barat. Nilai  $X^2$  pada keempat rumpun itik lokal untuk gen HSP70/SacII pada itik Bayang, Kamang, dan Payakumbuh tidak dianalisis, karena jumlah genotipe yang ditemukan hanya 2 (TT dan TC), sehingga derajat bebas jumlahnya nol.

## BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. Berdasarkan parameter fisiologis didapatkan individu –individu dari masing-masing rumpun itik lokal (Pitalah, Bayang, Kamang, Payakumbuh) yang memiliki ketahanan panas.
2. Analisis ekspresi mRNA Gen HSP 70 pada setiap rumpun itik di organ hati menunjukkan bahwa itik Payakumbuh dan Itik Bayang memiliki ekspresi mRNA gen HSP70 yang lebih baik, sehingga berdasarkan ekspresi mRNA Gen HSP70 dapat dinyatakan jika rumpun itik Payakumbuh dan Bayang adalah itik tahan panas.
3. Didapatkan 3 SNP gen HSP 70 menggunakan metode PCR-RFLP. enzim restriksi HhaI mengenali 2 SNP (lokasi G+1410A / g.1696 dan C+1476T / g. 1762) dan SacII 1 SNP (lokasi T+1416G / g.1702). Enzim restriksi HhaI dengan lokasi SNP, G+1410A / g.1696 didapatkan dua alel (A dan G) dengan 3 genotipe yaitu (AA,AG,GG), Lokasi SNP C+1476T / g. 1762 didapatkan dua alel (T dan C) dengan 3 Genotipe (TT, TC, CC). Enzim SacII didapatkan juga 2 alel (T dan C) dengan 3 genotipe ( TT, TC, CC).
4. lokus gen HSP70/HhaI dan HSP70/SacII semuanya polimorfik. Dengan nilai heterozigositas pengamatan yang rendah dibanding dengan nilai heterozigositas harapan, itik Pitalah telah mengalami seleksi yang cukup intensif dikalangan peternak Sumatera Barat.

### Saran

Penelitian lanjutan sangat dibutuhkan demi memastikan proses penetapan MAS untuk rumpun itik lokal yang tahan panas berdasarkan analisis RNA Deep Sequencing.

## REFERENSI

- [Kementan] Kementerian Pertanian. 2015. Data Statistik Peternakan. Kementerian Pertanian Republik Indonesia. [www.pertanian.go.id](http://www.pertanian.go.id)
- Ali, M.S., Yang, H.S., Jeong, J.Y., Moon, S.H., Hwang, Y.H., Park, G.B. & Joo, S.T. (2008). Effect of chilling temperature of carcass on breast meat quality of duck. *Poultry Science*, 87:1860–1867.
- Bukau B, and Horwich AL. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92: 351-366.
- Etches RJ, John TM AND Verrinder Gibbins AM. 2008. Behavioural, Physiological, Neuroendocrine and Molecular Responses to Heat Stress. In: Nuhad J. Dagher (ed.). *Poultry Production in Hot Climates*. Pp: 49-69.
- Ismoyowati, M Samsi and M Mufti. 2012. Different haematological condition, immune system and comfort of muscovy duck and local duck reared in dry and wet seasons. *Journal of Animal Production* 14(2):111-117
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55:1151-1191.
- Lindquist, S. and Craig, E.A., 1988. The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* 22:631- 77.
- Ma X, Lin Y, Zhang H, Chen W, Wang S, Ruan D, Jiang Z. 2014. Heat stress impairs the nutritional metabolism and reduces the productivity of egg-laying ducks. *Anim Reprod Sci.* 145:182-190.
- Marais M, Shane K.Maloney., and David A.Gray. 2011. Ambient temperature modulates the magnitude of LPS-induced fevers in Pekin ducks. *Journal of Thermal Biology* 36. 121–127
- Mattjik, A. A & I. M. Sumertajaya. 2002. Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab. Jilid 1 edisi 2. IPB Press. Bogor.
- Nei M, S Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York (US): Oxford Univ Pr.
- Noor RR, Seminar KB. 2009. Rahasia dan hikmah pewarisan sifat (ilmu genetika dalam Al-Qur'an). Bogor (Indonesia): IPB Press.
- Sabrina, M.H. Abbas, E. Purwati, Y. Heryandi and Robby. 2013. The Effect of Altitude and Dietary Protein Level on Local Ducks Performance. *Pakistan Journal of Nutrition* 12 (10): 917-923
- Sohail MU, Ijaz A, Yousaf MS, Ashraf K, Zaneb H, Aleem M, Rehman H. 2010. Alleviation of cyclic heat stress in broilers by dietary supplementation of mannan-oligosaccharide and Lactobacillus-based probiotic: Dynamics of cortisol, thyroid hormones, cholesterol, C-reactive protein, and humoral immunity. *Poult Sci.* 89:1934-1938.
- Suswoyo I, Ismoyowati and L.H. Sulistyawan. 2014. Benefit of swimming access to behaviour, body and plumage condition and heat stress effect of local ducks. *International Journal of Poultry Science* 13 (4): 214-217
- Tanzil MH, Noor RR, Hardjosworo PS, Manalu W, Sumantri C. 2013. Keragaman gen *heat shock* protein 70 ayam Kampung, ayam Arab dan ayam Ras. *J Vet.* 14:317-326.
- Viriden WS, Kidd MT. 2009. Physiological stress in broilers: ramifications on nutrient digestibility and responses. *J Appl Poult Res.* 18:338-347.
- Weir BS. 1996. *Genetic Data Analysis II : Method for Discrete Population Genetic Data*. 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland.

Xia, M., J. Gan, Q. Luo, X. Zhang & G. Yang, 2013. Identification of duck HSP70 gene, polymorphism analysis and tissue expression under control and heat stress conditions, *British Poultry Science*, 54:5, 562-566.



# SERTIFIKAT

Diberikan kepada:

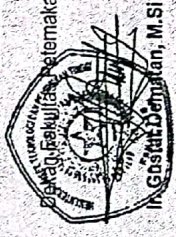
*Dr. Firda Arlina*

Sebagai **Pembicara Utama** pada kegiatan

## SEMINAR NASIONAL PETERNAKAN III

yang diselenggarakan di Kupang pada 14 -15 November 2017

**Tema: Hilirisasi Teknologi Dalam Sistem Peternakan Lahan Kering  
Mendukung Swasembada Daging Nasional**



Direktur Pascasarjana Undana,

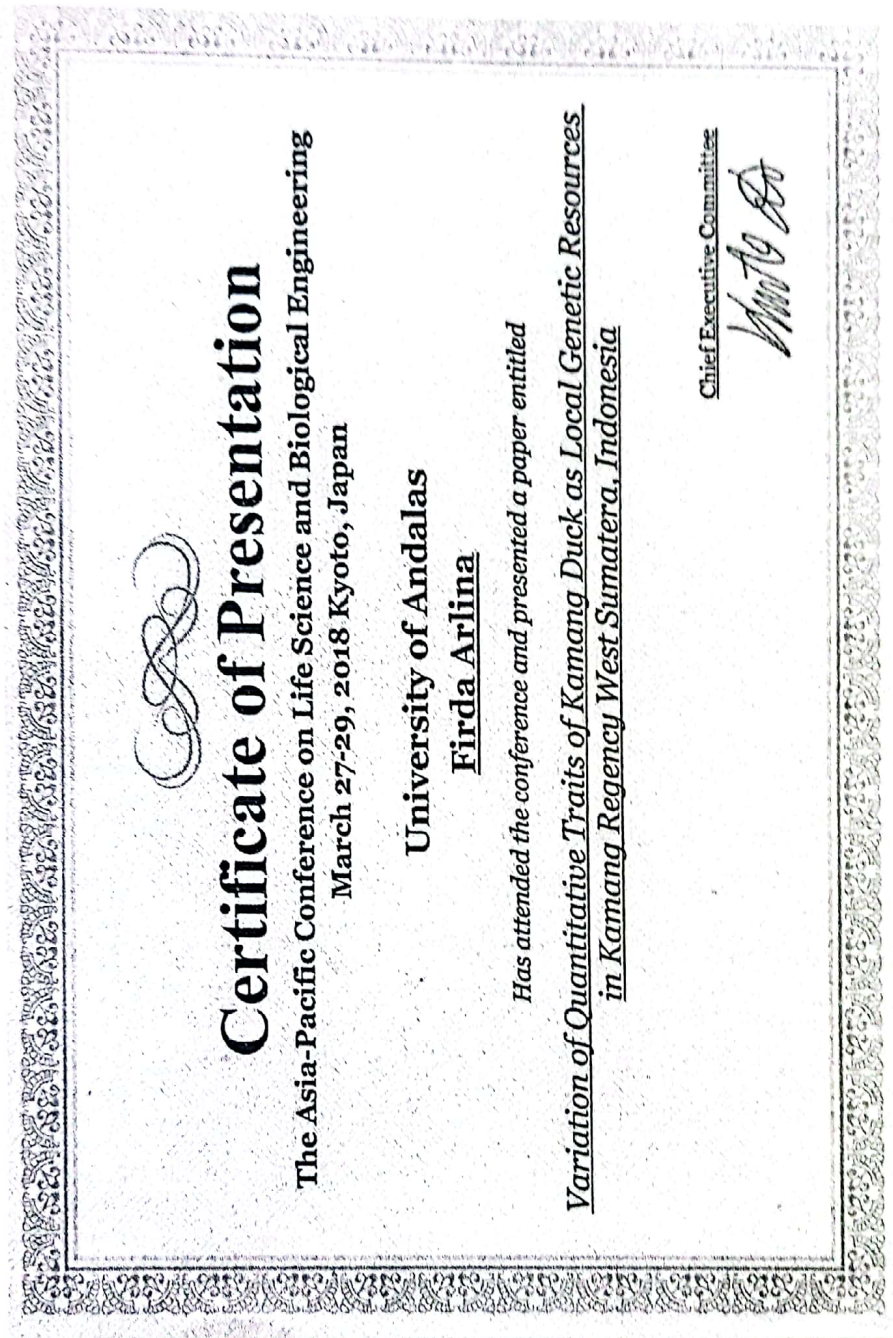
Direktur Pascasarjana Undana,

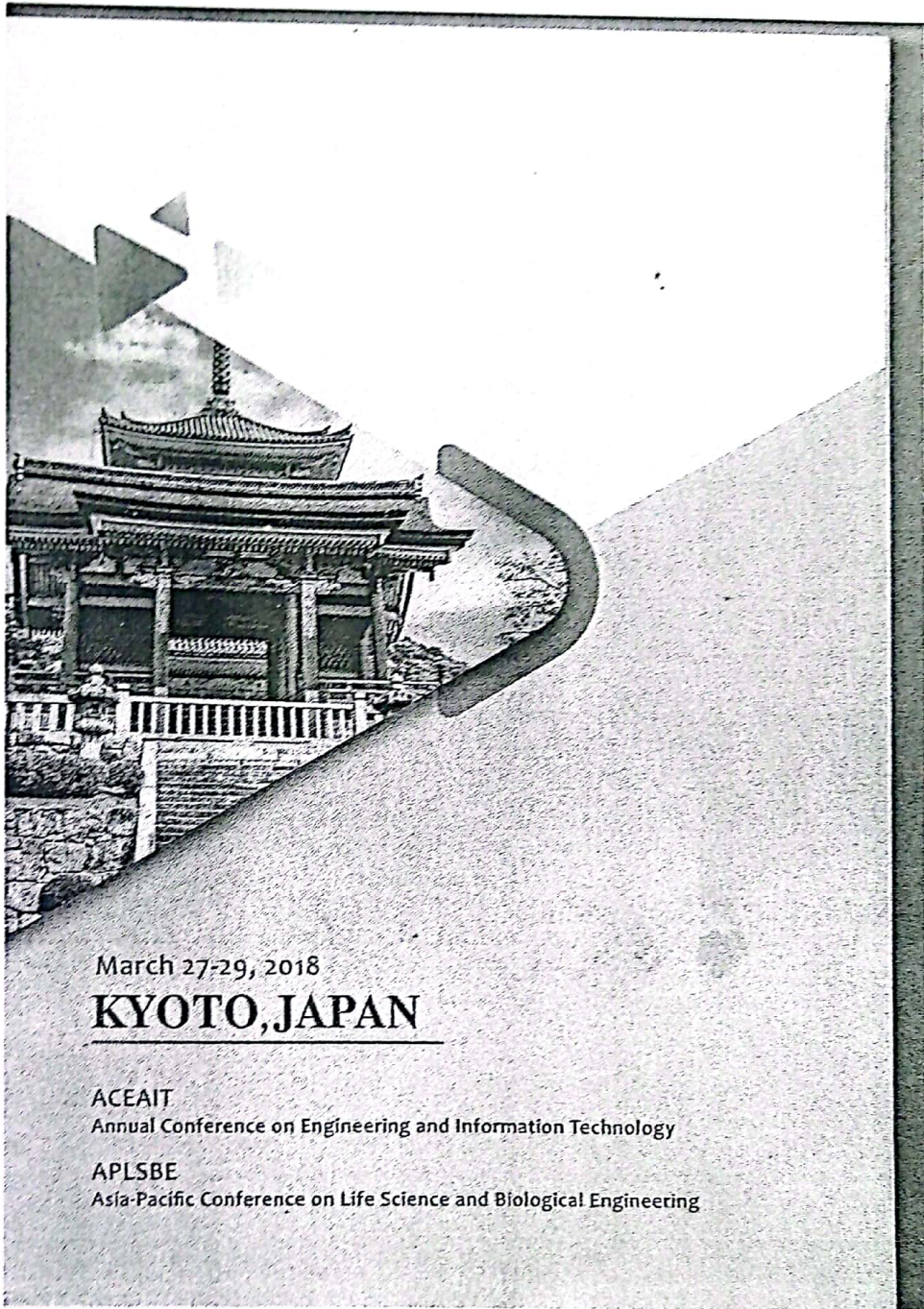
Ketua Panitia,

Prof. Dr. Aloysius Liliweri, M.S

Dr. Marthen L. Mullik

Xia, M., J. Gan, Q. Luo, X. Zhang & G. Yang., 2013. Identification of duck HSP70 gene, polymorphism analysis and tissue expression under control and heat stress conditions, *British Poultry Science*, 54:5, 562-566.





March 27-29, 2018

## KYOTO, JAPAN

**ACEAIT**

Annual Conference on Engineering and Information Technology

**APLSBE**

Asia-Pacific Conference on Life Science and Biological Engineering



Hosted by:  
Universitas Andalas (UNAND)  
co-hosted by:  
Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh

In collaboration with:  
Indonesian Society of Agricultural Engineers



WWW.SFRN2018.COM

# Certificate of Participation

**SFRN**  
2018

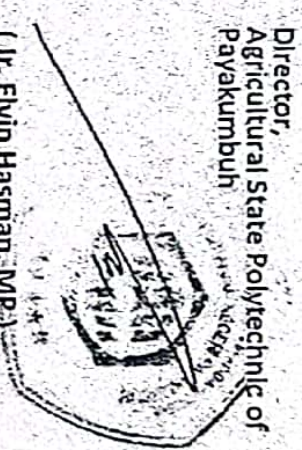
This is to certify that  
**Firda Arlina**  
has Presented a paper titled

## THE VARIABILITY OF LOCAL DUCK PRODUCTIVITY AS GERM PLASM IN WEST SUMATRA UNDER INTENSIVE MANAGEMENT

at The 2<sup>nd</sup> International Conference on Security In Food, Renewable Resources and Natural Medicines 2018 (SFRN 2018)  
Held between 25-26 October 2018, at the Convention Hall, Universitas Andalas, Padang West Sumatra, Indonesia



(Dr.-Ing. Uyung Gatot S. Dinata)



(Ir. Elvin Hasman, MP)



(Dr. Eng. Muhammad Makky)



(Keynote & Invited Speakers from)

Supported by:

