

**DESAIN PRIMER DAERAH *CODING* DAN 3'UTR GEN HSP70 AYAM
LEHER GUNDUL (LEGUND)**

SKRIPSI

diajukan untuk memenuhi sebagian syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi



Oleh :

Nida Firyal Fauziah

1807598

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA
BANDUNG
2022**

**Desain Primer Daerah *Coding* dan 3'UTR Gen HSP70 Ayam Leher Gundul
(LEGUND)**

Oleh :

Nida Firyal Fauziah
1807598

Sebuah Skripsi yang diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains (S. Si) Pada Program Studi Biologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika Ilmu Pengetahuan Alam

©Nida Firyal Fauziah 2022
Universitas Pendidikan Indonesia
Agustus 2022

Hak Cipta dilindungi undang-undang
Skripsi ini tidak boleh diperbanyak seluruhnya atau sebagian, dengan dicetak ulang, *diphotocopy*, atau cara lainnya tanpa izin dari penulis.

LEMBAR PENGESAHAN

NIDA FIRYAL FAUZIYAH

**DESAIN PRIMER DAERAH CODING DAN 3'UTR GEN HSP70 AYAM LEHER
GUNDUL (LEGUND)**

disetujui dan disahkan oleh pembimbing :

Pembimbing I



Dr. Any Aryani, M.Si.

NIP. 197105302001122001

Pembimbing II



Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si.

NIP. 197008112001122001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi



Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si.

NIP. 197008112001122001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul “**Desain Primer Daerah Coding dan 3’UTR Gen HSP70 Ayam Leher Gundul (LEGUND)**” ini beserta seluruh isinya adalah benar-benar karya saya sendiri. Saya tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan dengan cara-cara yang tidak sesuai dengan etika ilmu yang berlaku dalam masyarakat keilmuan. Atas pernyataan ini, saya siap menanggung risiko atau sanksi apabila di kemudian hari ditemukan adanya pelanggaran etika keilmuan atau ada klaim dari pihak lain terhadap keaslian karya saya ini.

Bandung, Agustus 2022
Yang memberi pernyataan

Nida Firyal Fauziah

Desain Primer Daerah *Coding* dan 3'UTR Gen HSP70 Ayam Leher Gundul (LEGUND)

ABSTRAK

Gen HSP70 merupakan salah satu mekanisme adaptasi tidak terkecuali ayam legund, namun penelitian dan *database* terkait ayam lokal masih jarang, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk melengkapi database yaitu salah satunya dengan membuat primer gen HSP70 pada ayam leher gundul untuk mendeteksi SNP pada daerah *coding* dan 3'UTR sehingga dapat membantu peneliti selanjutnya melakukan penelitian terkait polimorfisme gen HSP70 ayam leher gundul. Penelitian ini, meliputi: desain primer, pengujian secara *in silico* (*BLAST*), dan *in vitro* dengan menggunakan sampel DNA ayam leher gundul yang berasal dari koleksi. Sampel diamplifikasi dan dilihat ukurannya dengan metode elektroforesis, kemudian dilakukan *sequencing*, *BLAST* dan *alignment* menggunakan *MEGA*. *Alignment* dilakukan dengan menempelkan konsensus hasil *sequencing* ke gen HSP70 ayam dengan nomor akses J02579.1, AY178441, AY178442, AY178443. Hasil yang diperoleh didapatkan secara *in silico* primer yang didesain memenuhi kriteria yang diharapkan. Secara *in vitro* hasil dari PCR didapatkan pita tunggal yang memiliki ukuran yang spesifik yaitu 963 bp dan 934 bp dengan suhu optimasi primer 1 60°C dan Primer 2 58°C, hasil *sequencing* didapatkan *chromatogram* satu puncak. *BLAST* memperlihatkan *sequence* homolog dengan *sequence Gallus gallus* pada database NCBI, setelah dipetakan hasil *sequencing* dengan gen J02579.1 terlihat daerah SNP target yang ikut teramplifikasi. Hal ini sejalan dengan hasil *alignment* yaitu terdapat dugaan keberadaan SNP walaupun harus dibuktikan lebih lanjut. Dapat disimpulkan bahwa primer yang didesain merupakan primer gen HSP70 pada ayam leher gundul dan dapat digunakan untuk mendeteksi SNP gen HSP70 ayam leher gundul pada daerah *coding* dan 3'UTR. Penelitian selanjutnya sembilan sampel sisanya untuk melihat polimorfisme dan asosiasi gen HSP70 ayam leher gundul.

Kata kunci : Ayam Leher Gundul, HSP70, Primer, SNP

Primary Design Coding Region and 3'UTR of HSP70 Gene in Naked Neck Chicken (LEGUND)

ABSTRACT

The HSP70 gene is one of the adaptation mechanisms, including legund chickens, but research and databases related to local chickens are still rare, so it is necessary to do research to complete the database, one of which is by making HSP70 gene primers in bare neck chickens to detect SNPs in the coding and 3' regions. UTR so that it can help further researchers carry out research related to the HSP70 gene polymorphism of naked neck chickens. This study includes: primer design, in silico testing (BLAST), and in vitro using naked neck chicken DNA samples from collections. The sample was amplified and measured by electrophoresis method, then sequencing, BLAST and alignment were performed using MEGA. Alignment was performed by attaching the consensus sequenced results to the chicken HSP70 gene with access numbers J02579.1, AY178441, AY178442, AY178443. The results obtained were obtained by primary in silico which was designed to meet the expected criteria. In vitro PCR results obtained a single band that has a specific size, namely 963 bp and 934 bp with a primer optimization temperature of 1 60oC and primer 2 58oC, the sequencing results obtained a single peak chromatogram. BLAST showed homologous sequences with Gallus gallus sequences in the NCBI database, after mapping the results of the sequences with the J02579.1 gene, the target SNP regions were also amplified. This is in line with the alignment results, namely that there is an allegation of the existence of SNP although it must be further proven. It can be concluded that the primer designed is a primer for the HSP70 gene in naked neck chickens and can be used to detect the HSP70 gene SNP in naked neck chickens in the coding and 3'UTR regions. The next study was the remaining nine samples to see polymorphisms and associations of the HSP70 gene in naked neck chickens.

.Keywords : Naked Neck Chicken, HSP70, Primer, SNP

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Pertanyaan Penelitian	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Batasan Masalah	3
1.6 Manfaat Penelitian	4
1.7 Struktur Organisasi Skripsi	4
BAB II KAJIAN TEORI	6
2.1 Ayam Leher Gundul	6
2.3 Mekanisme HSP70 terhadap Cekaman Panas	10
2.4 Primer	10
2.5 Isolasi DNA	13
2.6 Elektroforesis	14
2.7 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	15
2.8 <i>Sequencing</i>	16
2.9 <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP) HSP70	18
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	22
3.1 Jenis dan Desain Penelitian	22
3.2 Populasi dan Sampel Penelitian	22
3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian	22
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	22
3.5 Prosedur Penelitian	24
3.5.3 Mengumpulkan Data <i>Sequence</i>	25
3.5.4 Desain Primer	25
3.5.5 Validasi Primer	26
3.5.4 <i>BLAST</i> Primer	27
3.5.6 Isolasi DNA	27
3.5.7 Optimasi PCR DNA Ayam Leher Gundul	28
3.5.8 Amplifikasi DNA Ayam Leher Gundul	29
3.5.9 Elektroforesis	29
3.5.10 <i>Sequencing</i>	30
3.6 Analisis Data	30
3.7 Alur Penelitian	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Desain Primer	31
4.1.1 Desain Primer secara <i>in silico</i> menggunakan pick primer NCBI	31
4.1.2 Validasi Primer	33

4.1.3 <i>BLAST</i> Primer	35
4.2 Isolasi DNA	42
4.3 PCR	44
4.3.1 Optimasi PCR	44
4.3.2 Hasil PCR	46
4.4 <i>Sequencing</i>	49
4.4.1 Konsensus	50
4.4.2 <i>BLAST</i> Hasil Konsensus	50
4.4.3 Pemetaan SNP Primer Gen <i>HSP70</i> Ayam	52
4.4.4 <i>Aligner</i> Menggunakan MEGA	54
4.5 Penelitian Lanjutan	55
BAB V KESIMPULAN DAN REKOMENDASI	56
5.1. Kesimpulan	56
5.2. Rekomendasi	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Ayam Leher Gundul	7
Gambar 2. 2 Mekanisme HSP0	8
Gambar 2. 3 Mekanisme Heat Shock Protein (HSP)-70 Chaperoning	9
Gambar 2. 4 Ilustrasi Penempelan Primer	12
Gambar 2. 5 Ilustrasi Mekanisme Penempelan Primer	12
Gambar 2. 6 Komplementer Untai DNA	17
Gambar 3.1 Representasi Skema Target Amplifikasi Gen 1	25
Gambar 3. 2 Bagan Alur Penelitian	41
Gambar 4. 2 DNA Sampel Ayam Leher Gundul	43
Gambar 4. 3 Optimasi Suhu Primer 1 dan Primer 2 pada Sampel	46
Gambar 4. 4 Hasil PCR Primer 1	48
Gambar 4. 5 Hasil PCR Primer 2	49
Gambar 4. 6 Representasi Chromatogram Puncak Nucleotida Primer	50
Gambar 4. 7 Representasi Tabel Hasil BLAST Konsensus Primer	51
Gambar 4. 8 Pemetaan SNP Primer	12

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 SNP <i>Gallus Gallus</i>	20
Tabel 3. 1 Daftar Alat yang Digunakan.....	22
Tabel 3. 2 Daftar Bahan yang Digunakan	23
Tabel 3. 3 Karakteristik dan Kriteria Parameter yang Baik	26
Tabel 4. 1 Hasil Desain Primer.....	32
Tabel 4. 2 Validasi Primer <i>Forward</i> Menggunakan <i>Clone Manager 9</i>	36
Tabel 4. 3 Validasi Primer <i>Reverse</i> Menggunakan <i>Clone Manager 9</i>	37
Tabel 4. 4 Hasil <i>BLAST</i> primer dengan <i>kod akses sequence J02579.1</i>	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Desain Primer.....	62
Lampiran 2. Validasi dan <i>BLAST</i> Primer.....	63
Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan.....	65
Lampiran 5. Biodata Penulis.....	67

DAFTAR PUSTAKA

- Alkuraya F. S. (2010). *Homozygosity mapping: one more tool in the clinical geneticist's toolbox*. *Genet Med.* 12(4):236-39
- Aryani, A. (2019). Keragaman Gen Heat Shock Protein 70 pada Beberapa Ayam Lokal Indonesia. Topik Khusus Pascasarjana IPB. Tidak dipublikasikan.
- Aryani, A. *et al.* (2019). *Genetic Diversity of the Structure of HSP70 Gene in Kampung Unggul Balitbangtan (KUB), Walik, and Kate Walik Chickens*. *Tropical Animal Science Journal*, 42(3):180-188. DOI: <https://doi.org/10.5398/tasj.2019.42.3.180>
- Ariyanti, Y & Sianturi S. (2019). Ekstraksi DNA total dari sumber jaringan hewan (Ikan Kerapu) menggunakan metode kit for animal tissue. *Journal of Science and Application Technology (JSAT - Institut Teknologi Sumatera)*. Vol. 3(1) : 40-45.
- Baak-Pablo. *et al.* (2010). Genotyping of DNA Samples Isolated from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues Using Preamplification. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(6), 746–749. doi:10.2353/jmoldx.2010.100047
- Budiarto, B. R. *et al.* (2018). *Genotyping Errors Dengan Performa Diagnostik Molekuler Kanker Berbasis Amplifikasi Asam Nukleat*. Biodidaktika: Jurnal Biologi dan Pembelajarannya Vol. 13(2). p-ISSN: 1907-087X; e-ISSN: 2527-4562
- Borah, P. (2011). Primer Designing for PCR. *Science Vision* 11(3): P. 134 -136.
- Calderwood, S. K. & Gong, J. (2016). *Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket*. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(4), 311–323. doi:10.1016/j.tibs.2016.01.003
- Crawford DC. & Nickerson DA. (2005). *Definition and clinical importance of haplotypes*. *Annu Rev Med.* 56:302-20.
- Claverie J M & Notradame C. (2007) *Bioinformatics for Dummies* 2nd Edition (Indiana: Wiley Publishing Inc Indianapolis)
- Faruque. *et al.* (2010). *Phenotypic characterization of native chicken reared under intensive management system*. *J. Bangladesh Agril. Univ.* 8:79-82.
- Fathi. M.M. (1987). *Effect of naked neck gene on some quantitative characters in chickens*. M.Sc. Thesis, Ain Shams University, Egypt.
- Fathi M.M. *et al.* (2013). *Naked neck and frizzle genes for improving chickens raised under high ambient temperature: I. Growth performance and egg production* *World's Poultry Science Journal*, Vol. 69, 813-832.

doi:10.1017/S0043933913000834

- Figueiredo. *et al.* (2009). *Validation of a reliable set of primer pairs for measuring gene expression by real-time quantitative RT-PCR in equine leukocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology*, 131(1-2), 65–72. doi:10.1016/j.vetimm.2009.03.013. DOI : 10.1016/j.vetimm.2009.03.013
- Gan, J. *et al.* (2015). *Analysis of genetic diversity of the heat shock pro-teín 70 gene on the basis of abundant sequence polymorphisms in chicken breeds. Genet. Mol. Res.* 14:1538-1545. <https://dx.doi.org/10.4238/2015.March.6.1>
- Gariyban, L., & Avashia, N. (2013). *Polymerase Chain Reaction. Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. doi:10.1038/jid.2013.1
- Gong, W.J. & Golic, K.G. (2006). *Loss of HSP70 in drosophila is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neuro degeneration. Genetics*: 172: 275-286.
- Gowe, R.S. & Fairfull, R.W. (1995). *Breeding for resistance to heat stress. In: DAGHIR, N.J. (Ed.) Poultry Production in Hot Climates*, pp. 11-29 (CAB International, UK).
- Handoyo, D. & Rudiretna, A. (2000). Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. *Unitas*, 9(1): P. 17-29.
- Henke. *et al.* (1997). “Betaine Improves the PCR Amplification of GC-Rich DNA Sequences.” *Nucleic Acids Research* 25: 3957–58. doi:10.1093/nar/25.19.3957.
- Hajibabaei M. *et al.* (2015). *Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. Phil Trans R Soc B.* 360: 1959-1967. 2005.
- Kieleczawa, Jan, & Erica Mazaika. 2010. “Optimization of Protocol for Sequencing of Difficult Templates.” *Journal of Biomolecular Techniques* 21: 97–102.
- Kityk, R. *et al.* (2015). *Pathways of allosteric regulation in Hsp70 chaperones. Nat. Commun.* 6, 8308.
- Labbé, C *et al.* (2019). *Semi-automated fact-checking of nucleotide sequence reagents in biomedical research publications: The Seek & BLASTn tool. PLOS ONE*, 14(3), e0213266. doi:10.1371/journal.pone.0213266
- LaFramboise T. (2009). *Single nucleotide polymorphism assay: a decade of biological, computational and technological advances. Nucleic Acids Res.* 37(13): 4181-93
- Lindquist, S.& Craig, E.A. (1988). The heatshock proteins. *Annual Review of Genetics*. 22: 631-677.

- Lorenz, Todd C. 2012. "Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies." *J Vis Exp*, 3998.
- Makarova, O. *et al.* (2012). DNA Bar-Coding for Phytoplasma Identification. *Phytoplasma*, 301–317. doi:10.1007/978-1-62703-089-2_26.
- Mazzi. *et al.* (2003). *Polymorphism analysis of the HSP70 stress gene in broiler chickens (Gallus gallus domesticus) of different breeds. Genetics and Molecular Biology*. 26: 275-281.
- Merat, P. (1986) *Potential usefulness of the Na (naked neck) gene in poultry production. World's Poultry Science Journal* 42: 124-142.
- Miller, G.A. *et al.* (1990). *Introduction to WordNet: an on-line lexical database. International Journal of Lexicography*. 3: 235-312.
- Mulyani Sri Agnes. (2021). *Pengabdian Masyarakat: Pemanasan Global, Penyebab, Dampak Dan Antisipasinya*. Universitas Maranatha. diakses [Online] : <http://repository.uki.ac.id/4908/1/PEMANASANGLOBAL.pdf>
- Morimoto. *et al.* (1986). *Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. Biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 83, 629-633
- Najafi, M., *et al.* (2018). *Genetic analysis of a novel polymorphism in coding region of HSP70 gene and its association with some productive and reproductive traits in Mazandaran native breeder hens. Genet Disord and Genet Med* Vol.2 No.1: 1-6.
- Nataamijaya, A.G. (2006). *Egg production and quality of kampung chicken fed rice bran diluted commercial diet and forages supplement. J. Anim. Prod.* 8(3): 206210
- Nataamijaya, A. G. (2010). *Pengembangan Potensi Ayam Lokal Untuk Menunjang Peningkatan Kesejahteraan Petani. Jurnal Litbang Pertanian*, 29(4), 131-138.
- NCBI. *How to: Design PCR primers and check them for specificity*. Diakses [Online] : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/design-pcr-primers/>
- NCBI. *BLAST (Basic Lokal Alignment Search Tool)*. Diakses [Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Parker, R. (2014). *Concerning poultry: The positive traits of naked neck chickens. Aviculture Europe*. 10:6.
- Pei-Yu, L. & Kelvin, H.L. (2010). *From SNPs to Functional Polymorphism-The Insight Into Biotechnology Application. Elsevier. Biochemical Engineering Journal* 49: 149–158.

- Pradnyanitin, G. *et al.* (2013). Desain Primer Secara *In silico* Untuk Amplifikasi Fragmen Gen RpoB Mycobacterium Tuberculosis Dengan Polymerase Chain Reaction (Pcr). Jurnal Farmasi Udaya. diakses [Online]: <https://media.neliti.com/media/publications/279788-desain-primer-secara-in-silico-untuk-amp-418c442d.pdf>
- Pipan, B. *et al.* (2018). Comparison of six genomic DNA extraction methods for molecular downstream applications of apple tree (*Malus domestica*), Cogent Food & Agriculture, 4:1, 1540094, DOI: 10.1080/23311932.2018.1540094
- Putri, D. A. (2010). Karakteristik Kualitatif dan Kuantitatif Ayam Leher Gundul (Legun) di Kabupaten Subang dan Bogor, Jawa Barat Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Ramlan, M. (2002). Pemanasan Global (Global Warming). Jurnal Teknologi Lingkungan. Vol.3 No. 1, 30-32
- Rees, W. *et al.* (1993). "Betaine Can Eliminate the Base Pair Composition Dependence of DNA Melting." Biochemistry 32: 137–44. doi:10.1021/bi00052a019
- Ristossa, F. (1962). *A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in drosophila. Experientia.* 18: 571-573.
- Sambrooks, J & Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. Third Edition, Vol 1, 1-2272*
- Sidadolog, J. H. P. & Sasongko, H. (1990). Genetika Produksi Telur dan Pertumbuhan pada Ayam Lokal. Laporan Penelitian No. 232/P4M/DPPM/BDXXI/1989. Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Subekti, K. *et al.* (2019). Pengaruh Polimorfisme Gen Heat Shock Protein 70 (HSP70) SacII terhadap Toleransi Panas Itik Lokal Sumatera Barat. Jurnal Agripet. Vol 19 No. 2, 122-128.
- Syamsidi, A. *et al.* (2021). Primer Design and Analysis for Detection of mecA gene . Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry, 5(3), 245–253. <https://doi.org/10.25026/jtpc.v5i3.297>
- Takei, F., & Nakatani, K. (2013). *The Chemistry of PCR Primers: Concept and Application. Israel Journal of Chemistry,* 53(6-7), 401–416. doi:10.1002/ijch.201300027
- Tamura, K. *et al.* (2013). MEGA 6: *Molecular evolutionary genetics analysis version 6. Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

- Kostaman T. (2020). Ayam Leher Gundul: Sejarah, Karakteristik, dan Konservasi. *Majalah Ilmiah Peternakan*. Vol 23 No 1, 22-29
- Trivedi, U. H. *et al.* (2014). *Quality control of next-generation sequencing data without a reference*. *Frontiers in Genetics*, 5. doi:10.3389/fgene.2014.00111
- Wardono, H. P. (2014). Tesis yang berjudul “Analisis Pewarisan Genetik Sifat Kualitatif Dan Kuantitatif Pada Ayam Legund (Naked Neck Fowl)”. Universitas Gajah Mada. diakses [Online] ; <http://etd.repository.ugm.ac.id/penelitian/detail/69143>
- Xia, M. *et al.* (2013). *Identification of duck HSP70 gene, polymorphism analysis and tissue expression under control and heat stress conditions*. *British Poult. Sci.* 54(5): 562-566.
- Yuwono, T. (2005). *Biologi Molekuler*. Penerbit Erlangga. Jakarta. 51-52
- Zhen, F.S. *et al.* (2006). *Tissue and allelic specific expression of HSP70 gene in chickens: basal and heat-stress-induced mRNA level quantified with real-time Reverse transcriptase polymerase chain reaction*. *British Poult. Sci.* 47: 449-455