

Identifikasi Keragaman Gen Kalpastatin (CAST) pada Ayam Lokal Indonesia

(IDENTIFICATION OF POLYMORPHISM CALPASTATINE GENE
IN LOCAL CHICKEN)

Ahmad Saleh Harahap¹, Cece Sumantri^{2,3},
Niken Ulupi², Sri Darwati², Tike Sartika³

¹Mahasiswa Program Studi Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan,
Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor;
Telp/Faks (0251) 8628379 Email: ahmadsaleh1412@gmail.com

²Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan,
Fakultas Peternakan, IPB
Jln. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680.

³Pusat Antar Universitas, IPB
Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

⁴Balai Penelitian Ternak
Jln Veteran III Ciawi Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16002

ABSTRACT

Calpastatin (CAST) gene is one of the genes that play a role in the process of tenderization of meat. CAST gene serves as an inhibitor of meat tenderness. The purpose of this study was to identify Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in the CAST gene of kampung chickens. A total of 61 kampung chickens used were used in the study including strain cobb, F1 of strain cobb-kampung, merakaw, sentul, nunukan, and pelung, respectively. The method used is extracted DNA from blood samples, then amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and then genotyping by DNA sequencing. The results showed that SNP was identified at position g.42988G> T in the intron 11 CAST gene of merakaw chicken with genotype GG and GT. SNP was not identified in kampung chicken, strain cobb, F1 of strain cobb-kampung, sentul, nunukan, and pelung chicken, respectively. In conclusion, the intron 11 CAST gene region with 482 of product length of merakaw chicken is polymorphic, whereas the other chicken species is monomorphic.

Keywords: CAST gene, SNP, kampung chicken.

ABSTRAK

Gen *Calpastatin* (CAST) merupakan salah satu gen yang berperan dalam proses keempukan pada daging. Gen CAST berfungsi sebagai inhibitor (penghambat) keempukan daging. Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) gen CAST pada ayam kampung. Jumlah ayam yang digunakan 61 ekor ayam kampung, ayam *strain cobb*, F1 ayam *strain cobb-kampung*, ayam merakaw, ayam sentul, ayam nunukan, dan ayam pelung. Metode yang dilakukan adalah ekstraksi DNA dari sampel darah, kemudian dilakukan amplifikasi menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan selanjutnya dilakukan genotiping melalui DNA *sequencing*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen CAST intron 11 pada ayam pengamatan ditemukan SNP posisi g.42988G>T pada ayam merakaw dengan genotip GG dan GT, sedangkan pada ayam kampung, ayam *strain cobb*, F1 ayam kampung dengan *strain cobb*, ayam sentul, ayam nunukan, ayam merakaw dan ayam pelung tidak ditemukan SNP. Simpulan dari penelitian ini memperlihatkan gen CAST daerah intron 11 dengan panjang produk 482 pada ayam merakaw bersifat polimorfik, sedangkan jenis ayam yang lain bersifat monomorfik.

Kata-kata kunci: CAST gene, SNP, ayam kampung.

PENDAHULUAN

Ayam kampung merupakan ayam asli Indonesia yang memiliki peranan penting dalam memenuhi kebutuhan daging bidang industri peternakan. Ayam kampung memiliki warna bulu, bobot badan, pertumbuhan dan produksi telur yang masih beragam dan penyebarannya masih tersebar di seluruh Indonesia. Ayam kampung memiliki keunggulan yaitu tahan terhadap serangan bakteri dan virus (Ulupi *et al.*, 2013; Ulupi *et al.*, 2014; Pagala *et al.*, 2013). Ayam kampung dan ayam lokal di Indonesia menyumbang sebesar 10% dengan konsumsi dagingnya sebesar 0,521 kg/tahun (BPS 2015). Masih adanya minat masyarakat Indonesia dalam mengkonsumsi daging ayam kampung dan ayam lokal diperlukan adanya ketersediaan pemenuhan permintaan dari konsumen. Selain peningkatan ketersediaan daging ayam kampung, perlu juga diperhatikan kualitas dagingnya.

Keempukan merupakan salah satu faktor yang memengaruhi kualitas daging (Taylor *et al.*, 1995). Koohmaraie *et al.* (2002) menyatakan sistem proteolitik kalpain merupakan penyebab utama terjadinya degradasi protein otot yang memengaruhi keempukan setelah pemotongan. Peningkatan kualitas karkas dan daging dapat melalui dengan seleksi pada sifat-sifat karkas dan sifat kualitas daging. Sartika *et al.* (2004) menyatakan *Marker Assisted Selection* (MAS) merupakan teknologi bidang molekuler yang dapat dimanfaatkan sebagai salah satu metode seleksi. Seleksi berdasarkan MAS dapat diperoleh melalui identifikasi gen yang mengontrol sifat kualitas daging pada ayam yaitu salah satunya gen kalpastatin (CAST). Gen CAST merupakan gen yang berperan sebagai inhibitor (penghambat) pada kalpaian (Boehm *et al.*, 1998). Protein kalpastatin (CAST) merupakan anggota kelompok sistem kalpain - kalpastatin. Sistem ini berpengaruh pada banyak proses fisiologis dan patologis (Goll *et al.*, 2003; Kidd *et al.*, 2000; Raynaud *et al.*, 2004).

Gen CAST terletak pada kromosom Z yang terdiri dari 29 intron dan 30 exon dengan panjang basa 60 809 (Ensembl dengan kode akses ENSGALG00000014682). Hu *et al.* (2011) dan Liu *et al.* (2008) melaporkan adanya SNP gen CAST pada ayam di China dan gen CAST memiliki asosiasi pada beberapa sifat karkas yang menggunakan beberapa primer *forward* dan primer *reverse* yang berbeda. Pada ayam kampung dan ayam lokal di Indonesia, kajian

mengenai SNP pada gen CAST belum banyak dilaporkan. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan pengkajian tentang identifikasi SNP gen CAST pada ayam kampung dan ayam lokal Indonesia. Tujuan penelitian adalah untuk mengidentifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) gen CAST pada ayam lokal di Indonesia menggunakan metode DNA *sequencing*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2015 sampai Januari 2016. Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika Moluker Ternak dan Laboratorium Lapang, Bagian Pemuliaan dan Genetika Ternak, Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

Materi yang digunakan sebagai objek pengamatan adalah sampel darah ayam kampung sebanyak 61 ekor. Sampel darah koleksi dari Laboratorium Genetika Molekuler ternak yaitu ayam *strain cobb* (6 ekor), ayam F1 kampung-*strain cobb* (6 ekor), ayam sentul (5 ekor), ayam merawang (5 ekor), ayam nunukan (5 ekor) dan ayam pelung (6 ekor). Keragaman gen CAST pada ayam *broiler strain cobb*, F1 kampung-*strain cobb*, sentul, merawang, nunukan dan pelung dijadikan sebagai pembanding keragaman dengan ayam kampung Indonesia.

Koleksi sampel darah ayam diekstraksi untuk memperoleh DNA yang dilakukan berdasarkan acuan Sambrook *et al.* (1989) yang dimodifikasi. Sebanyak 200 μ L ditambahkan dengan 1.000 μ L NaCl 0,2%, kemudian divortex hingga homogen dan didiamkan selama lima menit. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama lima menit hingga terbentuk endapan, kemudian bagian supernatan dibuang. Endapan yang didapatkan ditambahkan dengan 10 μ L Proteinase-K (5mg/mL), 350 μ L 1 x sodium tris EDTA (STE) dan 40 μ L sodium dodesil sulfat (SDS) 10%, kemudian dilakukan inkubasi dan *titling* pada suhu 55 C selama dua jam. Setelah itu, larutan yang telah diinkubasi ditambahkan 40 μ L natrium klorida (NaCl) 5 M, 400 μ L phenol dan 400 μ L klorofom iso amil alkohol (CIAA) kemudian dilakukan *titling* pada suhu ruang selama satu jam. Tahapan selanjutnya adalah larutan disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama lima menit. Fase DNA yang terbentuk diambil sebanyak 400 μ L dan

dipindahkan ke tabung 1,5 mL dan ditambahkan dengan 40 μ L NaCl 5 M dan 800 μ L etanol alkohol (EtOH) 96% kemudian *overnight* pada suhu -20°C . Sample DNA kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama lima menit sampai terbentuk endapan putih dan supernatan yang terbentuk dibuang, kemudian endapan ditiriskan sampai kering dan ditambahkan 100 μ L buffer tris elusion (TE) 80%, kemudian disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan pada tahap amplikasi DNA.

Sampel DNA hasil ekstraksi dilakukan proses analisis pada mesin *polymerase chain reaction* (PCR) yang menggunakan primer yang di desain sendiri menggunakan *Designing Tools Program*. Primer yang digunakan dengan *forward* 5' GTC CTG TGG TCT AGC CAA TGC 3' dan primer *reverse* 5' CCC ACA GGT CTC TCC CAC TT 3' yaitu pengambilan sebanyak 0.5 – 1 μ L ditambah 0.35-0.4 μ L primer, 0.3 μ L dNTPs, 1 μ L MgCl_2 , 1.5 μ L 10 x buffer, 0.15 Taq *Polymerase* dan 36-46 μ L *distillation water*. Campuran dari semua tersebut diinkubasi menggunakan mesin PCR *thermocycler*. Proses amfikasi diawali dengan tahap *denaturasi* pada suhu 94°C selama lima menit. Tahap kedua terdiri dari 35 siklus, masing-masing siklus terdiri dari proses *denaturasi* 94°C selama 10 detik, *annealing* primer dengan suhu 57°C selama 20 detik dan ekstensi DNA pada suhu 72°C selama 30 detik. Tahapan selanjutnya adalah pemanjangan primer pada suhu 72°C selama sepuluh menit. Hasil amfikasi DNA tersebut divisualisasi dengan elektroforesis gel agarose 1.5%.

Terhadap sampel DNA yang sudah teramplifikasi, dilakukan sekuensing DNA dengan menggunakan mesin sekuenser (ABI Prims 3100-Avant Genetic Analyzer) pada daerah fragmen primer *forward* dan *reverse* melalui jasa perusahaan sekuensing 1st Base di Selangor, Malaysia. Hasil sekunsing dianalisis untuk menentukan SNP atau titik mutasi yang menggunakan program BioEdit. Kemudian dirunutkan dan disejajarkan dengan runutan baku yang diperoleh dari *GenBank* dengan menggunakan MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Posisi SNP ditentukan berdasarkan posisi titik mutasi pada sekuen gen CAST ayam (*G%allus gallus*) dengan kode akses sekuen CAST ENSGALG00000014682.

Data yang diperoleh dianalisis berdasarkan frekuensi genotipe dan alel untuk menentukan keragaman SNP gen CAST. Frekuensi genotipe

(x_{ii}) adalah perbandingan jumlah genotipe tertentu dengan jumlah individu dalam populasi (Nei dan Kumar, 2000) dengan rumus sebagai berikut: $X_{ii} = n_{ii} \times N^{-1}$

Frekuensi alel (x_i) adalah rasio relatif suatu alel terhadap keseluruhan alel pada suatu lokus dalam populasi (Nei dan Kumar, 2000) dengan rumus sebagai berikut: $X_i = (2n_{ii} + n_{ij}) \times 2N^{-1}$. Dalam hal ini x_{ii} = frekuensi genotipe ii; x_i = frekuensi alel i; n_{ii} = jumlah individu yang mempunyai genotipe ii; n_{ij} = jumlah individu yang mempunyai genotipe ij; dan N = jumlah sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

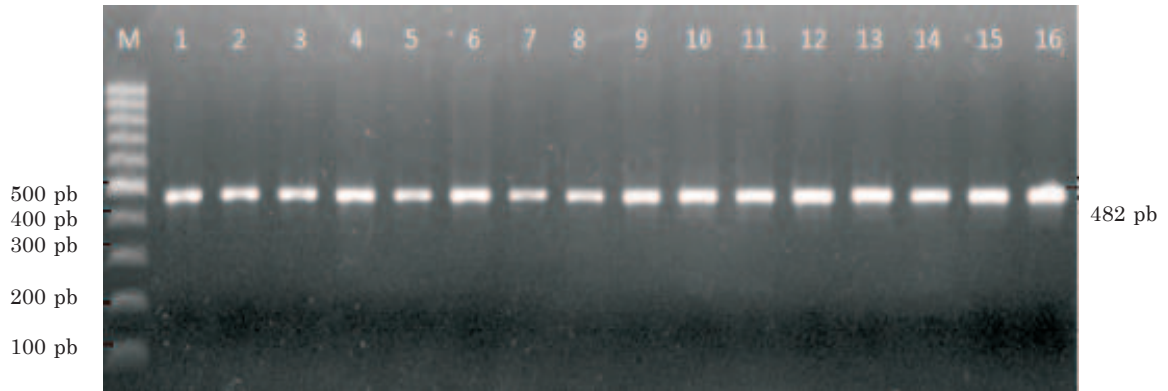
Amplifikasi Gen CAST

Amplifikasi gen CAST telah berhasil pada suhu *annealing* 57°C selama 20 detik. Panjang ampikon gen CAST yang teramplifikasi adalah 482 pasang basa (pb) pada basa ke-42574 sampai basa ke-43055. Gen CAST yang diamati pada ayam ini meliputi daerah *intron 9*, *exon 10*, *intron 10*, *exon 11*, dan *intron 11*. Hasil amplifikasi gen CAST disajikan pada Gambar 1.

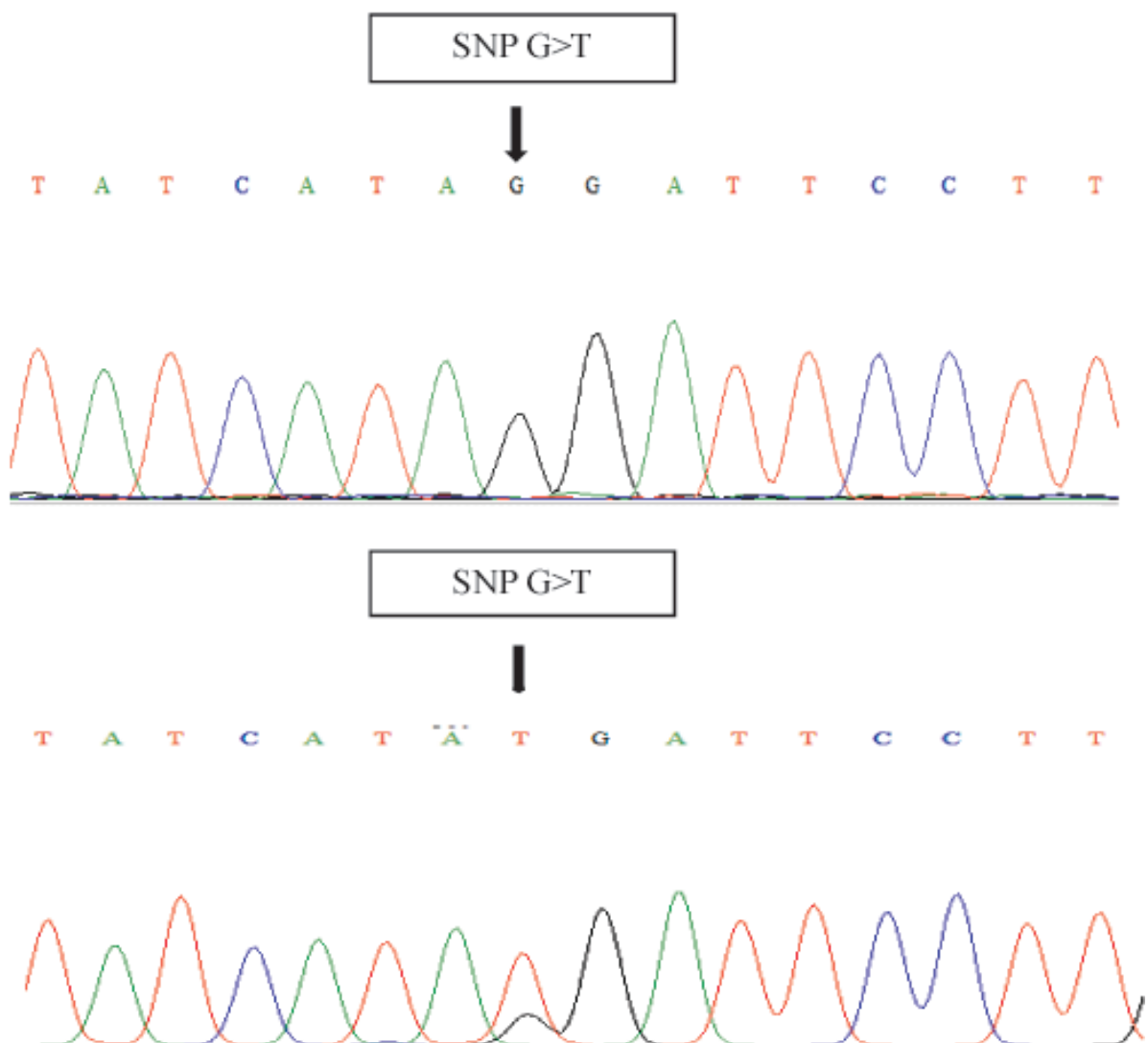
Single nucleotide polymorphisms (SNP) merupakan perubahan komposisi nukleotida (adenin, timin, guanin, sitosin) di dalam susunan rangkaian susunan DNA pada satu posisi tertentu. Hasil dari penentuan SNP pada ayam yang menggunakan metode DNA *sequencing* melalui program Bioedit disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil sekuensing bahwa fragmen gen CAST yang dianalisis menggunakan program MEGA ditemukan adanya satu SNP yaitu posisi g.42988G>T yang berada di *intron 11* dari semua ayam yang diamati pada penelitian ini. Perunutan dan pensejajaran hasil sekuensing dari sekuen gen CAST dengan nomor akses ENSGALG00000014682. Hasil ini berbeda dengan SNP yang dilaporkan Hu *et al.* (2011) yang menyatakan adanya SNP gen CAST posisi c.36127T>C daerah *exon 11* dan g.37868G>A daerah *intron 11* (Nomor akses NC._006127.2) pada daerah target yang sama pada ayam yang teliti. Hasil sekuensing gen CAST pada ayam disajikan pada Gambar 3.

Hasil genotipe dari gen CAST memperlihatkan bahwa SNP pada fragmen basa ke-42574 sampai basa 43055 yaitu posisi g.42988G>T di daerah *intron 11* ditemukan pada ayam merawang, namun tidak ditemukan pada ayam



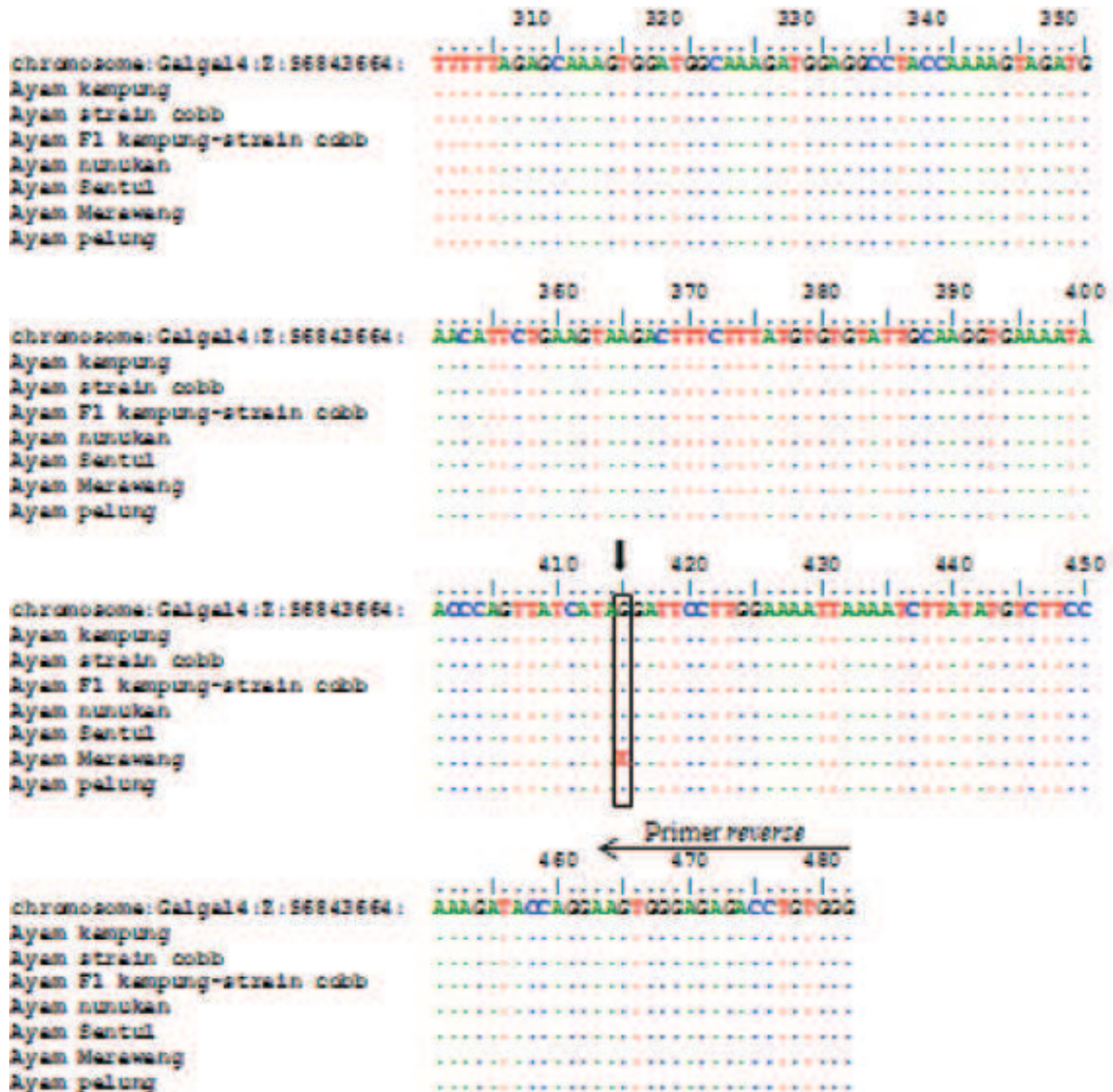
Gambar 1. Elektroforesis produk PCR gen kalpastatin. M= marker 100 bp, 1-12 = sampel ayam.



Gambar 2. Visualisasi penentuan SNP dengan metode *DNA Sequencing* pada posisi g-42988 G>T



Gambar 3. Perunutan sekuen gen CAST pada ayam dengan sekuen dari nomor akses CAST ENSGALG00000014682



Gambar 3 (lanjutan). Peruntukan sekuen gen CAST pada ayam dengan sekuen dari nomor akses CAST ENSGALG00000014682

yang lain yaitu ayam kampung, ayam *strain cobb*, F1 ayam kampung dengan *strain cobb*, ayam sentul, ayam nunukan, dan ayam pelung. Genotipe gen CAST yang ditemukan pada ayam merakawang berjumlah dua yaitu genotipe GG dan GT. Sementara genotipe pada ayam kampung, ayam *strain cobb*, F1 ayam kampung dengan *strain cobb*, ayam sentul, ayam nunukan dan ayam pelung memiliki geno-tipe GG. Berdasarkan *genotyping* ditemukan mutasi basa guanin (G) menjadi basa timin (T) pada lokus g.42988G>T. Perubahan basa ini merupakan jenis mutasi tranversi yaitu perubahan satu basa purin oleh basa pirimidin atau

perubahan satu basa pirimidin oleh basa purin.

Frekuensi Genotipe dan Frekuensi Alel

Nilai frekuensi genotipe dan frekuensi alel menentukan keragaman gen CAST pada ayam lokal yang disajikan pada Tabel 1. Sekuen gen CAST Hasil analisis frekuensi genotipe lokus g.42988G>T menunjukkan bahwa genotipe GG memiliki frekuensi yang lebih tinggi daripada genotipe GT yaitu antara 0,80-1,00 pada ayam merakawang. Nilai frekuensi genotipe GT posisi g.42988G>T memiliki nilai frekuensi sebesar 0,20 pada ayam merakawang. Sementara pada ayam kampung, ayam *strain cobb*, F1 ayam

kampung dengan *strain cobb*, ayam sentul, ayam nunukan dan ayam pelung memiliki nilai frekuensi genotipe masing-masing 1,00. Hal ini menunjukkan bahwa genotipe GG memiliki peluang muncul tertinggi pada semua jenis ayam yang diamati.

Analisis frekuensi alel lokus g.42988G>T memperlihatkan bahwa alel G memiliki frekuensi tertinggi yaitu 1 pada ayam kampung, ayam *broiler (strain cobb)*, F1 ayam kampung dengan *strain cobb*, ayam sentul, nunukan dan ayam pelung. Frekuensi alel G g.42988G>T pada ayam merawang memiliki nilai 0,90. Nilai frekuensi alel T menunjukkan bahwa pada ayam frekuensi tertinggi pada ayam merawang yaitu 0,10.

Berdasarkan frekuensi alel lokus g.42988G>T, ayam kampung, ayam *strain cobb*, F1 ayam kampung dengan *strain cobb*, ayam

sentul, nunukan dan ayam pelung tidak terdapat keragaman gen CAST (monoformik). Hal ini karena tidak terdapatnya SNP pada daerah fragmen target, sedangkan pada ayam merawang terdapat keragaman gen CAST dengan ditemukannya SNP di daerah fragmen target. Allendorf dan Luikart (2007) menyatakan suatu alel bersifat monomorfik apabila memiliki nilai frekuensi salah satu alel pada posisi titik mutasi yang sama mencapai 1,00. Nei dan Kumar (2000) juga menyatakan bahwa suatu alel dinyatakan polimorfik jika frekuensi salah satu alel suatu gen di bawah sama dengan 0,95 atau 0,99. Sifat polimorfik penting untuk dianalisis karena merupakan salah satu syarat agar suatu gen dapat dijadikan sebagai *marker* genetik (Hartl dan Clark, 1997). Keragaman genetik atau polimorfisme genetik adalah terdapatnya lebih dari satu bentuk atau

Tabel 1. Frekuensi genotipe dan alel SNP pada gen CAST (g-42988 G>T)

Jenis Ayam	N	Frekuensi Genotipe			Frekuensi Alel	
		GG	GT	TT	G	T
Kampung	61	1,00 (61)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,00	0,00
Strain cobb	6	1,00 (6)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,00	0,00
F1 Kampung – strain cobb	6	1,00 (6)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,00	0,00
Sentul	5	1,00 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,00	0,00
Merawang	5	0,80 (4)	0,20 (1)	0,00 (0)	0,90	0,10
Nunukan	5	1,00 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,00	0,00
Pelung	6	1,00 (6)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,00	0,00

Keterangan : SNP= *Single Nucleotide Polymorphism*, CAST : kalpastatin

Tabel 2. Keragaman SNP gen CAST posisi c.37752A>T dan g.37868G>A pada ayam hasil penelitian dengan ayam di China

Jenis Ayam	Posisi SNP	Frekuensi Genotipe			Frekuensi Alel		Keterangan	Sumber
Ayam Indonesia	c.37752 A>T	AA 1,00	AT 0,00	TT 0,00	A 1,00	T 0,00	Mono morfik	Hasil penelitian
Ayam China	c.37752 A>T	AA 0,17–0,56	AT 0,11–0,57	TT 0,08–0,50	A 0,36–0,64	T 0,36–0,64	Poli morfik	Hu <i>et al.</i> 2011
Ayam Indonesia	g.37868 G>A	GG 1,00	GA 0,00	AA 0,00	G 1,00	A 0,00	Mono morfik	Hasil penelitian
Ayam China	g.37868 G>A	GG 0,25-0,43	GA 0,18-0,52	AA 0,15-0,42	G 0,45–0,63	A 0,37–0,55	Poli morfik	Hu <i>et al.</i> 2011

Keterangan : SNP= *Single Nucleotide Polymorphism*, CAST : kalpastatin

macam genotipe di dalam populasi. Sumber keragaman genetik disebabkan oleh adanya pengulangan urutan sekuen, insersi, delesi dan rekombinasi di dalam runutan DNA antar individu, kelompok atau suatu populasi (Nei dan Kumar, 2000).

Jumlah genotipe SNP c.37752A>T (Nomor akses NC_006127.2) daerah *exon* 11 pada ayam diamati (ayam kampung, *broiler strain cobb*, F1 kampung dengan *broiler strain cobb*, merawang, sentul, nunukan dan pelung) yaitu 1 (genotipe AA). Hal ini mengakibatkan frekuensi genotipe AA mencapai 100%. Pada posisi yang sama (c.377527A>T), Hu *et al.* (2011) menemukan tiga genotipe pada ayam komersial dan ayam lokal di China yaitu genotipe AA, AT, dan TT. Nilai frekuensi masing-masing genotipe yaitu 0,17–0,56 (genotipe AA), 0,11–0,57 (genotipe AC) dan 0,08–0,50 (genotipe AA).

Hasil pengamatan yang dilakukan pada ayam kampung, *broiler strain cobb*, F1 kampung dengan *broiler strain cobb*, merawang, sentul, nunukan dan pelung frekuensi alel A mencapai 1 pada gen CAST posisi c.37752A>T. Hal ini mengakibatkan keragaman gen CAST posisi g.37868G>A bersifat monomorfik. Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak ada keragaman gen CAST di posisi c.37752A>T pada semua ayam yang diamati. Berbeda dengan laporan Hu *et al.* (2011), posisi SNP c.37752A>T, frekuensi alel A memiliki nilai berkisar 0,45–0,63 dan frekuensi alel memiliki nilai berkisar 0,45–0,63. Hal ini menunjukkan bahwa pada SNP c.37752A>T bersifat polimorfik pada ayam komersial dan ayam lokal di china (Hu *et al.*, 2011).

Genotipe pada daerah target SNP g.37868G>A (nomor akses NC_006127.2), ditemukan hanya 1 genotipe yaitu GG. Hal ini mengakibatkan frekuensi genotipe mencapai 100% pada notipe GG pada semua ayam yang diamati. Hal ini berbeda dengan Hu *et al.* (2011), SNP g.37868G>A yang ditemukan ada tiga genotipe yaitu GG, GA, dan AA. Hu *et al.* (2001) melaporkan frekuensi genotipe pada genotipe GG berkisar 0,25–0,43, frekuensi genotipe pada genotipe GA berkisar 0,18–0,52 dan frekuensi genotipe pada genotipe AA berkisar 0,15–0,42.

Posisi SNP g.37868G>A daerah *intron* 11, frekuensi alel G memiliki nilai berkisar 0,45–0,63 dan frekuensi alel A memiliki nilai berkisar 0,45–0,63. Hal ini menunjukkan bahwa pada SNP g.37868G>A bersifat polimorfik pada ayam komersial dan ayam lokal di china (Hu *et al.*, 2011). Berbeda dengan hasil pengamatan yang

dilakukan pada ayam kampung, *broiler strain cobb*, F1 kampung dengan *broiler strain cobb*, merawang, sentul, nunukan dan pelung keragaman gen CAST posisi g.37868G>A bersifat monomorfik. Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak ada keragaman gen CAST di posisi g.37868G>A pada semua ayam yang diamati. Hal ini karena frekuensi alel G yang mencapai 1 pada posisi g.37868G>A. Keragaman gen CAST pada beberapa jenis ayam berdasarkan Hu *et al.* (2011) dan Liu *et al.* (2008) disajikan pada Tabel 2.

SIMPULAN

Gen CAST daerah *intron* 11 dengan panjang produk 482 pb ditemukan satu SNP yaitu g.42988G>T yaitu mutasi antara G menjadi T dan hanya ditemukan dua genotipe yaitu GG dan GT. SNP pada posisi g.42988G>T hanya ditemukan pada ayam merawang sedangkan pada ayam kampung, ayam *strain cobb*, F1 ayam kampung dengan *strain cobb*, ayam sentul, nunukan dan dan ayam pelung tidak ditemukan SNP.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh kegiatan program Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional (SINAS) 2015 No. 12/SEK/INSINAS/PPK/IV/2015, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Allendorf FW, Luikart G. 2007. *Conservation and The Genetics of Populations*. Oxford. Blackwell Publishing.
- Badan Pusat Statistik. 2015. *Statistik Indonesia*. Jakarta (ID). Badan Pusat Statistik Indonesia.
- Boehm ML, TL Kendall, VF, Thompson and DE Goll. 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *J Anim Sci* 76: 2415-2434.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, W Wei. 2003. The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731-801.
- Hart DL, Clark AG. 1997. *Principles of*

- Population Genetics*. 3rd ed. Sunderland (US), Sinauer Associate Inc.
- Hu YD, Zeng RZ, Qing Z. 2011. Identification and association of the single nucleotide polymorphism in CAST gene with carcass traits in chicken. *Journal of animal and veterinary advances*. 10(22): 2968-2974
- Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. 2000. Proteolytic regulation of apoptosis. Seminar in. *Cell Dev Biol* 11: 191-201
- Koohmaraie M, Kent MP, Shackelford SD, Veiseth E, Wheeler TL. 2002. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat Sci* 62: 345-352
- Liu A, Y liu, X Jiang, L Li, H Di, Q Zhu. 2008. Studies of single nucleotide polymorphism of cast gene and its association with muscle fiber traits in chicken *Acta Veterinaria Zootechnica Sinica* 39: 437-442.
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution And Phylogenetics*. New York. Oxford Uni Press.
- Pagala MA, Muladno, Sumantri C, Murtini S. 2013. Association of Mx gene genotype with antiviral and production traits in tolaki chicken. *International Journal of Poultry Science* 12: 735-739
- Raynaud F, Carnac G, Marcilhac A, Benyamin Y. 2004. m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Exp Cell Res* 298: 48-57.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. USA: CSH Laboratory Press.
- Sartika T, Iskandar S, Prasetyo LH, Takahashi H, Mitsuru M. 2004. Keherabatan genetik ayam kampung, pelung, sentul dan kedu hitam menggunakan penanda DNA mikrosatelit: I. Grup pemetaan pada makro kromosom. *J Ilmu Ternak dan Veteriner* 9: 81-86.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Bio Evol* 30: 2725-2729.
- Ulupi N, Muladno, Sumantri C, Wibawan IWT. 2013. Association of TLR4 gene genotype and resistance against Salmonella enteridis natural infection in kampung chicken. *International Journal of Poultry Science* 12: 445-540
- Ulupi N, Muladno, Sumantri C, Wibawan IWT. 2014. Study of kampung chicken resistance against Salmonella enteritidis using TLR4 gene as marker. *International Journal of Poultry Science* 13: 467-472.