

Identifikasi Keragaman Gen *Toll-Like Receptor-4* Ayam Lokal dengan *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*

(THE GENETIC POLIMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTOR-4 GENE IN LOCAL CHICKENS USING POLYMERASE CHAIN REACTION-RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM)

Niken Ulupi¹, Muladno¹, Cece Sumantri¹, I Wayan Teguh Wibawan²

¹Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan,
Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, IPB
Jl Agatis Kampus IPB, Dramaga, Bogor, 16680
Telp/Faksimili : 0251-8628379 e-mail : niken.ulupi@gmail.com

ABSTRAK

Gen *Toll-like Receptor-4* (TLR4) adalah salah satu gen yang mengontrol ketahanan ayam terhadap *Salmonella sp.* melalui respons imun non spesifik. Gen tersebut dapat dijadikan sebagai marka genetik pada ayam lokal Indonesia, apabila diketahui keragamannya. Oleh sebab itu tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi keragaman gen TLR4 pada rumpun ayam lokal Indonesia (ayam kampung, persilangan kampung-pelung, ayam sentul dan ayam tolaki), dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Total sampel yang digunakan ada 136. Tahapan identifikasi meliputi ekstraksi DNA genom, amplifikasi PCR gen TLR4 (220 pb, di *exon 2*), dan metode RFLP, menggunakan enzim restriksi *MscI*. Data yang dianalisis meliputi frekuensi alel dan frekuensi genotipe, nilai heterozigositas, dan *Polymorphic Informative Content* (PIC). Hasil yang diperoleh : gen TLR4|*MscI* bersifat polimorfik, dengan ditemukan dua alel yaitu alel A dan G serta ditemukan tiga macam genotipe yaitu AA, AG, dan GG. Berdasarkan uji χ^2 diketahui bahwa gen TLR4|*MscI* berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg. Nilai Heterozigositas pengamatan berkisar 0,11-0,41, dan Heterozigositas harapan 0,11-0,35. Nilai PIC (0,10-0,29), termasuk kategori rendah sampai sedang. Berdasarkan hasil tersebut gen TLR4|*MscI* dapat digunakan sebagai penciri genetik untuk sifat ketahanan ayam terhadap infeksi bakteri *Salmonella sp.* pada ayam lokal Indonesia.

Kata-kata kunci : keragaman genetik, gen TLR4, *Salmonella sp.*, respons imun non spesifik

ABSTRACT

Toll-like Receptor 4 (TLR4) gene is one of the genes that control resistance of chickens against *Salmonella sp.* through non-specific immune response. These gene can be used as genetic markers in Indonesian local chickens, if known its diversity. Therefore this research was aimed at evaluating the genetic polymorphism of TLR4 gene in several types of Indonesian lokal chickens (kampung, kampung-pelung crossbreed, sentul, and tolaki chicken) using PCR-RFLP. The total of samples were 136. There were three stages of identification : extraction of DNA genom, PCR amplification of TLR4 gene (with size 220 bp on exon 2), and RFLP method using restriction enzym (*MscI*). The data were analyzed include frequency of allele, frequency of genotype, heterozygosity values , and value of Polymorphic Informative Content (PIC). The result showed that TLR4|*MscI* was found polymorphic in all kind of chickens that was genotyped. It were found two alleles (A and G), and three genotypes (AA, AG, and GG). The value of χ^2 showed that TLR4|*MscI* was in Hardy-Weinberg equilibrium. The value of H_o and H_e were 0,11-0,41 and 0,11-0,35. The value of PIC (0,10-0,29) included in the category of low to moderately high. These results declared that TLR4|*MscI* gave hope for used as genetic markers in resistance to *Salmonella sp.* infection in Indonesian local chickens.

Keywords : genetic polimorphism, TLR4 gene, *Salmonella sp.*, non-specific immune system

PENDAHULUAN

Ayam lokal merupakan ternak yang paling banyak dipelihara oleh masyarakat Indonesia khususnya di pedesaan. Saat ini ayam lokal sedikitnya telah teridentifikasi menjadi 31 rumpun (Nataamijaya, 2010). Setiap rumpun memiliki ciri khas dan mempunyai wilayah penyebaran tertentu, kecuali ayam kampung.

Sebagian besar telur yang dihasilkan ayam lokal dimanfaatkan masyarakat Indonesia sebagai jamu atau bagian dari ramuan jamu, yang dikonsumsi secara langsung tanpa melalui pemasakan. Sebesar 44% kasus salmonellosis di dunia disebabkan karena mengkonsumsi telur yang tidak matang secara sempurna (Ochiai *et al.*, 2008), dan hasil isolasi kejadian salmonellosis tersebut ternyata sebagian besar disebabkan oleh bakteri *Salmonella enteritidis* (Velge *et al.*, 2005).

Dengan demikian masyarakat yang mengkonsumsi telur ayam lokal sebagai jamu ini sangat berpeluang tertular salmonellosis. Oleh sebab itu keberadaan telur bebas *Salmonella* menjadi sangat penting. Telur bebas *Salmonella* hanya diproduksi oleh ayam yang memiliki ketahanan tinggi terhadap bakteri tersebut.

Tingginya tingkat ketahanan ayam terhadap *Salmonella* dipengaruhi oleh faktor genetik, faktor lingkungan dan interaksi kedua faktor tersebut. Sebagai faktor genetik, resistensi ayam terhadap *Salmonella* dikontrol oleh banyak gen. Salah satunya adalah gen *Toll-like Receptor-4/TLR4* (Calenge *et al.*, 2010). Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa gen TLR4 merupakan salah satu gen kandidat pada sifat ketahanan ayam terhadap infeksi bakteri *S. enteritidis* (Kramer *et al.*, 2003; Lamont *et al.*, 2002).

Gen TLR4 pada ayam berada pada kromosom 17. Berdasarkan data dari *GenBank* (dengan nomor akses : A Y064697.1), gen TLR4 berukuran 11698 pb. Struktur gen TLR4 diawali oleh wilayah *promoter* (2743 pb), *exon* 1, 2, dan 3 (105, 167 dan 3260 bp), *intron* 1 dan 2 (934 dan 984 pb), dan diakhiri oleh *flanking region* (3505 pb).

Gen TLR4 berperan dalam mengaktivasi respons imun non spesifik. Gen TLR4 mentranskripsi protein yang berfungsi sebagai reseptor permukaan sel fagosit. Protein reseptor ini mampu mengenali lipopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif, termasuk *Salmonella*, dengan demikian gen TLR4 ini

dapat diaktivasi oleh LPS. (Emertcan *et al.*, 2011; Animura *et al.*, 2008; Akira dan Takeda, 2004; Palsson dan O'Neill, 2004; Akashi *et al.*, 2001).

Protein reseptor TLR4 pada permukaan sel fagosit, memengaruhi aktivitas sel tersebut dalam proses fagositosis terhadap bakteri *Salmonella sp.* yang menginfeksi (Kagut *et al.*, 2005). Hal tersebut secara langsung akan berdampak pada respons imun non-spesifik yang ditimbulkan.

Secara tidak langsung gen TLR4 juga memengaruhi respons imun spesifik yang diperantarai oleh limfosit T dan limfosit B, seperti dinyatakan oleh Kabelitz (2007), bahwa gen TLR4 juga dapat berekspresi dalam limfosit T. Gen TLR4 ini berekspresi kuat tidak hanya pada ternak ayam.

Jia *et al.*, (2013) melaporkan bahwa gen TLR4 dapat berkespresi sangat kuat pada ternak itik dalam mengontrol ketahanannya terhadap *Salmonella sp.* Gen TLR4 secara tidak langsung juga mempunyai pengaruh positif dalam mengontrol penyakit koksidiosis pada ayam dan unggas lain yang disebabkan oleh *Eimeria sp.* (Zuoyong *et al.*, 2013).

Pada manusia dan tikus, telah dibuktikan bahwa terjadinya mutasi pada gen TLR4, berdampak terhadap penurunan kemampuan individu dalam mengenali LPS dari bakteri *Salmonella sp.* Individu tersebut menjadi peka dan mudah terinfeksi *Salmonella* (Lorenz *et al.*, 2002). Adanya mutasi menyebabkan gen TLR4 membentuk beberapa genotipe. Abasht *et al.*, (2009) menyatakan bahwa adanya variasi genotipe gen TLR4 pada ayam berpengaruh pada ketahanannya terhadap infeksi bakteri *Salmonella sp.*

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman gen TLR4 pada empat rumpun ayam lokal Indonesia (ayam kampung, persilangan kampung-pelung, ayam sentul, dan ayam tolaki) dengan menggunakan metode PCR-RFLP. Pemilihan empat rumpun ayam lokal yang diidentifikasi dalam penelitian ini berdasarkan beberapa pertimbangan. Ayam kampung tidak mempunyai ciri spesifik, dengan keragaman fenotipik yang tinggi merupakan modal dasar untuk pelaksanaan seleksi. Ayam tolaki yang masih sulit dibudidayakan, hidup secara diumbar, hampir tidak ada campur tangan peternak untuk menseleksi ternaknya. Sebaliknya, pada ayam sentul dan ayam pelung, merupakan contoh ayam lokal yang sudah mulai dipelihara secara komersial dengan

diaplikasikannya program seleksi yang intensif. Apakah perbedaan karakter dan cara pemeliharaan ini ada pengaruhnya terhadap tingkat keragaman gen TLR4 nya.

Hasil penelitian ini diharapkan memperoleh informasi genetik dari beberapa rumpun ayam lokal tersebut, sehingga gen TLR4 dapat digunakan sebagai penciri genetik dalam pelaksanaan seleksi untuk sifat ketahanan ayam terhadap infeksi bakteri *Salmonella sp.*

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dari awal bulan April sampai akhir bulan Mei tahun 2013. Penelitian dilaksanakan di laboratorium Pemuliaan dan Genetika Ternak Molekuler, Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

Total sampel yang diidentifikasi sebanyak 136, terdiri atas ayam kampung, persilangan kampung-pelung, sentul dan tolaki, yang masing-masing sebanyak 50, 36, 18, dan 32 sampel. Ayam persilangan kampung-pelung dan ayam sentul merupakan koleksi dari Bagian Pemuliaan dan Genetika Ternak, Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fapet IPB. Identifikasi keragaman gen TLR4 beberapa rumpun ayam lokal Indonesia dilakukan tiga tahap, yaitu ekstraksi DNA genom (Sambrook *et al.*, 1989), amplifikasi PCR gen TLR4. Tahap ketiga adalah menentukan genotipe gen TLR4 dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Reaksi PCR menggunakan disain primer sebagai berikut : primer *forward* : 5'-GCTCAAATTATTTTTCATCAGTggCC-3' dan primer *reverse* : 5'-ATCTG GACTAAAGC TGCAC-3'. Fragmen gen TLR4 yang diamplifikasi dengan primer tersebut berukuran 220 pb. Primer tersebut didisain menggunakan bantuan *Primer Designing Tools Program* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Amplifikasi DNA dilakukan pada total volume 25 μ L, terdiri dari 2 μ L DNA, 15,75 μ L air bebas ion steril, 2,5 μ L 10x buffer tanpa Mg²⁺, 2 μ L MgCl₂, 0,5 μ L 10 mM dNTP, 0,25 μ L Taq polimerase, 2 μ L primer. Tahap pertama

dilakukan satu siklus, meliputi proses denaturasi awal pada 94°C selama empat menit. Tahap kedua dilakukan 30 siklus. Setiap siklusnya terdiri dari denaturasi (94°C, selama 10 detik), *annealing* (60°C, selama satu menit) dan ekstensi (72°C, selama dua menit). Tahap ketiga adalah ekstensi akhir (72°C, selama tujuh menit). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C hingga digunakan untuk analisis lebih lanjut. Proses amplifikasi ini menggunakan *GeneAmp PCR system 9700 Applied Biosistem*

Penentuan genotipe menggunakan metode RFLP. Fragmen gen TLR4 yang merupakan produk PCR, sebanyak 4 μ L dipotong dengan *restriction endonuclease mix*, yang terdiri dari 2 μ L : dH₂O (1 μ L), buffer (0,7 μ L), dan 0,3 μ L *MscI* selama 16 jam pada suhu 37°C. Produk PCR yang sudah dipotong dengan enzim restriksi, kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 2% dengan buffer 0,5 TBE (Tris Borat EDTA) yang dijalankan pada tegangan 100 V selama 40 menit di bawah UV trans iluminator. Enzim pemotong (*MscI*), mengenali situs potong TGG|CCA.

Analisis Data

Nilai frekuensi alel, frekuensi genotipe, heterozigositas pengamatan (H_o), dan heterozigositas harapan (H_e), dihitung berdasarkan rumus dari Nei (1987). Nilai keseimbangan Hardy-Weinberg dihitung dengan rumus dari Hartl dan Clark (1997), dan nilai *Polymorphic Informative Content* (PIC) dihitung berdasarkan rumus dari Bostein *et al.*, (1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Genotipe Gen *Toll-like Receptor 4* pada Ayam Lokal

Genotyping gen TLR4 dilakukan pada *exon* 2 (basa ke 3898-4117), dengan produk PCR berukuran 220 pb, seperti disajikan pada Gambar 1. Adapun visualisasi hasil elektroforesis dari penelitian ini disajikan dalam Gambar 2.

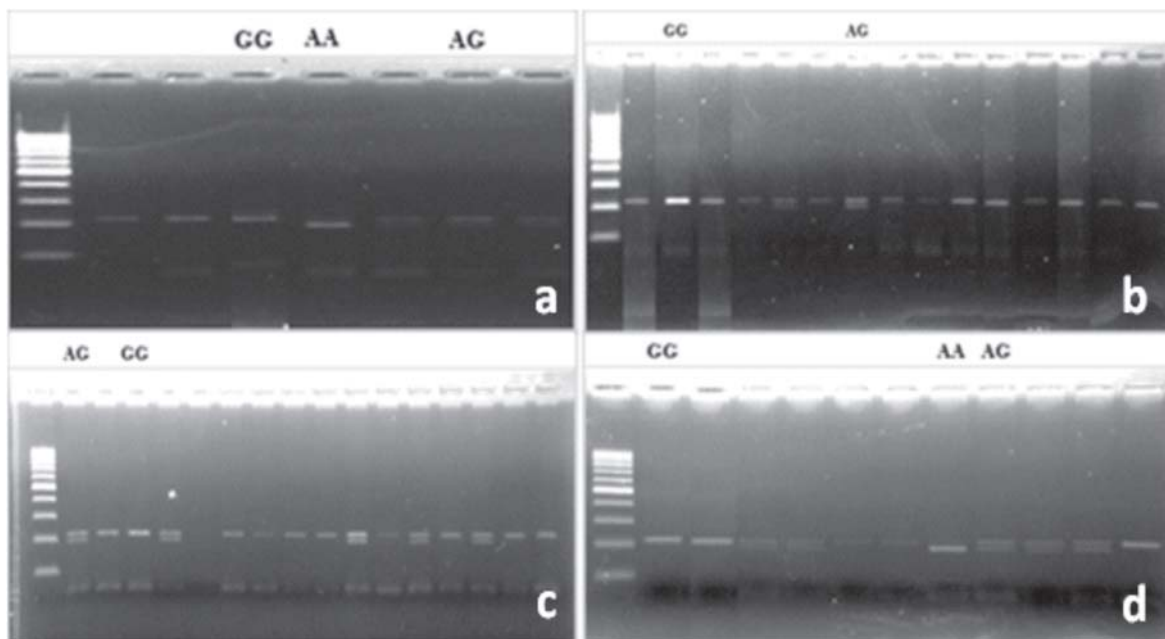
Gambar 1 dan 2 adalah fragmen gen TLR4 yang berukuran 220 pb pada *exon* 2 yang merupakan produk PCR. Selanjutnya dipotong oleh enzim restriksi *MscI*, pada situs ke 3924 dengan posisi titik potong TGG|CCA. Pemotongan oleh enzim *MscI* menghasilkan alel A dan alel G. Alel A berukuran 24 pb dan 196

```

3841 aaatcccaaa caccaccctg gacttggacc tcagtttcaa cagtctgaaa ttgctgagct
3901 caaattatttt ttcattcagta cccgaactgc agttttctgga tctttcaagg taatgggctt
3961 ttttatgtgg ttcttgggtt gtcttcacca tctgggcttc agcgggttct tattttggag
4021 tctcgtggct cttggctggt tctgttttca ctcttgcttc gatccctctg tetctctgca
4081 catgccatgg cagtgatgtg cagctttcag tccaqatact gagtgcacaaac tccgcagagc

```

Gambar 1. Sekuen gen TLR4 yang diamplifikasi (Genbank A Y064697.1). Posisi primer menempel pada nukleutida yang bergaris bawah.



Gambar 2 : a) adalah produk PCR-RFLP gen TLR4 | *MscI* pada ayam kampung
b) adalah produk PCR-RFLP gen TLR4 pada ayam kampung-pelung
c) adalah produk PCR-RFLP gen TLR4 pada ayam sentul
d) adalah produk PCR-RFLP gen TLR4 pada ayam tolaki

pb, dan alel G berukuran 220 pb. Adapun AA, AG, dan GG adalah genotipe gen TLR4 ayam lokal yang diidentifikasi.

Dari hasil *genotyping* ini, terditeksi adanya mutasi pada situs ke 3924. Mutasi ini menyebabkan terjadinya perubahan basa dari guanin (G) menjadi Adenin (A). Perubahan nukleutida ini menyebabkan terjadinya perubahan asam amino, dari asam glutamat (GAA) menjadi lisin (AAA). Hasil penelitian ini serupa dengan yang dilaporkan oleh Beaumont *et al.*, (2003), yang melakukan *genotyping* pada ayam petelur coklat komersial (*commercial brown laying hens*).

Frekuensi Alel dan Frekuensi Genetik

Nilai frekuensi alel dan frekuensi genotipe gen TLR4 pada lokus *MscI* pada beberapa ayam lokal Indonesia disajikan pada Tabel 1.

Alel G pada keempat rumpun ayam lokal tersebut mendominasi frekuensi alel pada gen TLR4. Nilai frekuensi alel G pada keempat rumpun ayam lokal berkisar 0,77-0,94. Nilai frekuensi alel G yang tertinggi terdapat pada ayam sentul, kemudian diikuti oleh ayam persilangan kampung-pelung, ayam kampung dan ayam tolaki. Nilai frekuensi alel A berkisar 0,02-0,23. Hasil *genotyping* ini dapat diartikan bahwa gen TLR4 pada lokus *MscI* bersifat

Tabel 1. Nilai frekuensi alel dan frekuensi genotipe gen TLR4 pada ayam lokal

Rumpun ayam lokal	Jumlah sampel	Frekuensi alel		Frekuensi genotipe		
		A	G	AA	AG	GG
kampung	50	0,02	0,80	0,02	0,36	0,62
kampung-pelung	36	0,08	0,92	-	0,17	0,83
sentul	18	0,06	0,94	-	0,11	0,89
tolaki	32	0,23	0,77	0,03	0,41	0,56

Keterangan : TLR4 : gen *Toll-like Receptor 4*,
 A dan G : alel A dan G
 AA, AG, dan GG : genotipe gen TLR4
 (-) : pada ayam persilangan kampung-pelung dan ayam sentul tidak ditemukan genotipe AA

polimorfik (beragam). Hal ini sesuai dengan pernyataan Nei dan Kumar (2000), bahwa jika terdapat dua alel atau lebih dengan nilai frekuensi relatif dalam populasi lebih dari 0,01 (1%), maka disebut polimorfik. Keragaman gen TLR4 juga telah dilaporkan terjadi pada beberapa bangsa ayam (Ruan *et al.*, 2012), pada ayam ras petelur (Beaumont *et al.*, 2003), pada ayam pedaging (Malek *et al.*, 2004) maupun pada ayam lokal cina (Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2011).

Frekuensi genotipe gen TLR4 pada beberapa ayam lokal juga didominasi oleh genotipe GG (0,56-0,83). Nilai frekuensi genotipe GG yang tertinggi terdapat pada ayam sentul, selanjutnya diikuti oleh ayam persilangan kampung-pelung, ayam kampung dan ayam tolaki. Genotipe AG pada keempat ayam lokal tersebut mempunyai frekuensi sebesar 0,11-0,41. Frekuensi genotipe gen TLR4 terendah adalah genotipe AA. Pada ayam persilangan kampung-pelung dan pada ayam sentul tidak ditemukan genotipe AA. Hasil pengamatan dalam penelitian ini diperoleh bahwa sekitar 93,75 ayam jantan yang dianalisis bergenotipe GG. Pada ayam

betina yang dianalisis, sekitar 71% bergenotipe GG. Hal ini merupakan penyebab genotipe AA ditemukan langka pada ayam lokal yang dianalisis.

Keseimbangan Gen *Toll-like Receptor 4* dalam Populasi

Keseimbangan gen TLR4 dalam populasi (keseimbangan Hardy-Wienberg) diuji dengan *chi-square* (χ^2). Hasil pengujian terhadap gen TLR4 pada lokus *MscI*, disajikan pada Tabel 2.

Ayam persilangan kampung-pelung dan ayam sentul tidak dianalisis. Hal ini disebabkan karena jumlah genotipe gen TLR4 ditemukan dua macam yaitu AG dan GG), dan jumlah alel juga dua (alel A dan alel G). Setelah dihitung berdasarkan rumus dari Allendorf dan Luikart (2007), derajat bebasnya adalah nol, sehingga tidak dianalisis. Pada ayam kampung dan ayam tolaki terlihat bahwa frekuensi genotipe gen TLR4 berada dalam keseimbangan Hardy-Wienberg.

Suatu populasi dinyatakan dalam keadaan keseimbangan Hardy-Weinberg, apabila frekuensi genotipe (p^2 , $2pq$, q^2) dan frekuensi alel (p dan q) adalah konstan dari generasi ke generasi, akibat penggabungan gamet yang terjadi secara acak dalam populasi yang besar (Vasconcellos *et al.*, 2003).

Keseimbangan genotipe dalam populasi yang cukup besar terjadi jika tidak ada seleksi, mutasi, migrasi, dan *genetic drift*. *Genetic drift* adalah perubahan frekuensi genotipe yang diakibatkan oleh fluktuasi acak akibat adanya peluang dalam pola perkawinan, kesalahan pengambilan sampel, dan perubahan frekuensi mendadak akibat adanya faktor lingkungan (misalnya bencana alam). Sebaliknya jika terjadi

Tabel 2. Hasil uji *chi-square* (χ^2) frekuensi genotipe gen TLR4 ayam lokal

Rumpun ayam lokal	Nilai χ^2
kampung	0,78 ^{tn}
kampung-pelung	0,10 ^{td}
sentul	0,21 ^{td}
tolaki	0,58 ^{tn}

Keterangan : TLR4 : gen *Toll-like Resceptor 4*
 tn : tidak berbeda nyata, $\chi^2_{(0,05,1)} = 3,84$
 td : tidak dianalisis karena db=0

Tabel 3. Nilai heterozigositas pengamatan (H_o) dan heterozigositas harapan (H_e) dan nilai *Polymorphic Informative Content* (PIC) genotipe gen TLR4

Rumpun ayam lokal	Jumlah sampel	H_o	H_e	PIC
Kampung	50	0,36	0,32	0,27
Kampung-Pelung	36	0,17	0,15	0,14
Sentul	18	0,11	0,11	0,10
Tolaki	32	0,41	0,35	0,29

Keterangan : TLR4 : gen *Toll-like Receptor 4*
 H_o : heterozigositas pengamatan
 H_e : heterozigositas harapan
PIC : *Polymorphic Informative Content*

akumulasi genotipe, populasi yang terbagi, mutasi, seleksi, migrasi dan perkawinan dalam kelompok yang sama (endogami), dapat menimbulkan ketidakseimbangan frekuensi genotipe atau frekuensi alel dalam populasi tersebut.

Keseimbangan genotipe gen TLR4 lokus *MscI* pada beberapa rumpun ayam lokal (ayam kampung dan ayam tolaki) ini, memperlihatkan bahwa intersitas kejadian mutasi, endogami, seleksi yang intensif serta migrasi pada kedua rumpun ayam lokal tersebut bisa dikatakan sangat rendah. Ayam kampung dan ayam tolaki oleh masyarakat Indonesia dipelihara secara ekstensif (diubur), hal ini memungkinkan terjadinya perkawinan secara acak dari generasi ke generasi.

Nilai Heterozigositas dan *Polymorphic Informative Content*

Nilai heterozigositas merupakan rata-rata persentase lokus heterozigot tiap individu atau rata-rata persentase individu heterozigot dalam populasi (Nei dan Kumar, 2000). Heterozigositas yang tinggi menunjukkan tingginya keragaman genetik dalam suatu populasi dan sebaliknya. Adapun nilai *Polymorphic Informative Content* (PIC) merupakan salah satu parameter yang menunjukkan tingkat informatifnya suatu penciri/*marker* (Botstein *et al.*, 1980).

Hasil analisis pendugaan nilai heterozigositas dan PIC gen TLR4 | *MscI* pada beberapa ayam lokal Indonesia disajikan pada Tabel 3. Nilai heterozigositas pengamatan lokus TLR4 | *MscI* pada masing-masing ayam lokal yang dianalisis berkisar antara 0,11-0,41. Nilai heterozigositas ayam tolaki dan ayam kampung lebih tinggi dari nilai heterozigositas ayam persilangan kampung-pelung dan ayam sentul. Hal ini bisa dipahami, karena intensitas seleksi

yang dilakukan masyarakat terhadap ayam pelung dan ayam sentul lebih tinggi dari pada ayam kampung dan ayam tolaki. Ayam tolaki hingga kini sulit dibudidayakan karena sifat liarnya (Sulandari *et al.*, 2007).

Nilai heterozigositas pengamatan (H_o) dan heterozigositas harapan (H_e : 0,11-0,35) pada lokus TLR4 | *MscI* tidak mengindikasikan adanya perbedaan yang besar. Nilai heterozigositas pengamatan (H_o) dan heterozigositas harapan (H_e) ini dapat digunakan untuk menduga nilai *inbreeding* pada suatu kelompok ternak.

Hasil pendugaan nilai PIC gen TLR4 lokus *MscI* pada ayam lokal yang dianalisis berkisar antara 0,1-0,29. Botstein *et al.*, (1980) menyatakan bahwa kriteria PIC termasuk dalam kelompok rendah jika nilai PIC $d < 0,25$, nilai PIC termasuk katagori sedang adalah antara $0,25 < PIC < 0,5$, dan termasuk kategori tinggi bila nilai PIC $e > 0,5$.

Berdasarkan pernyataan tersebut maka nilai PIC gen TLR4 | *MscI* pada ayam kampung dan ayam tolaki termasuk kategori sedang. Adapun nilai PIC pada ayam persilangan kampung-pelung dan ayam sentul termasuk kategori rendah. Dengan demikian gen TLR4 | *MscI* pada ayam kampung dan ayam tolaki dalam penelitian ini mempunyai tingkat informasi genetik yang lebih tinggi dari pada ayam sentul maupun ayam persilangan kampung-pelung.

SIMPULAN

Gen TLR4 bersifat beragam (polimorfik) pada ayam lokal. Gen TLR4 | *MscI* ayam lokal tidak berada dalam keseimbangan Hardy-Wienberg, dengan nilai informasi genetik

rendah sampai sedang. Berdasarkan hasil penelitian ini gen TLR4|MscI dapat digunakan sebagai penciri genetik untuk sifat ketahanan ayam terhadap infeksi bakteri *Salmonella* pada ayam lokal Indonesia.

SARAN

Diperlukan jumlah sampel ayam yang lebih banyak untuk identifikasi keragaman gen TLR4, terutama ayam persilangan kampung-pelung dan sentul.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ditjen Dikti yang telah membantu mendanai penelitian ini melalui Penelitian Unggulan Strategis Nasional Nomor : 63/IT3.41.2/SPK/2013. Kepada Eryk Andreas SPt, MSi. diucapkan terima kasih atas pendampingannya selama pelaksanaan penelitian di laboratorium molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Abasht B, Kaiser MG, van der Poel J, Lamont SJ. (2009). Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poult Sci* 88: 744–749.
- Akashi SY, Nagai H, Ogata M, Oikawa K, Fukase S, Kusumoto K, Kawasaki M, Nishijima S, Hayashi M, Kimoto, Miyake K. 2001. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int. Immunol.* 13:1595-1599.
- Akira S, Takeda K. 2004. TLR signaling pathways. *Nature Reviews Immunology* 4: 499-511.
- Allendorf FW, Luikart G. 2007. *Conservation and The Genetic of Population*. Blackwell Publishing.
- Animura NS, Saitoh F, Matsumoto S, Akashi T, Miyake K. 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 94–99.
- Beaumont C, Protais J, Pitel F, Leveque G, Malo D, Lantier F, Plisson-Petit F, Colin P, Protais M, Roy PL, Elsen JM, Milan D, Lantier I, Neau A, Salvat G, Vignal A. 2003. Effect of two candidate genes on *Salmonella* carrier state in fowl. *Poult Sci* 82: 721-726.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of genetic linkage map in human using restriction fragmen length polymorphisms. *Amer J Hum Genet* 32 :314-331.
- Calenge F, Kaiser P, Vignal A, Beaumont C. 2010. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl : a review. *Genetics Selection Evolution* 42 : 1-11.
- Emertcan A, Ozturk F, Gunduz K. 2011. Toll-like receptors and skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 11 : 1-7.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principle of Population Genetic*. Sunderland Sinauer Associates, M.A.
- Jia H, Li G, Li J, Tian Y, Wang D, Shen J, Tao Z, Xu J, Lu L. 2012. Cloning expression and bioinformatics analysis of duct TLR4 gene. *Br Poult Sci* 53(2) : 190-197.
- Kabelitz D. 2007. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 19: 39–45.
- Kogut MH, He H, Kaiser P. 2005. Lipopolysaccharide binding protein/ CD14/ TLR4-dependent recognition of *Salmonella* LPS induces the functional activation of chicken heterophils and up-regulation of pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in these cells. *Anim Biotechnol* 16 : 165–181.
- Kramer J, Malek M, Lamont S. 2003. Association of twelve candidate gene polymorphisms and response to challenge with *Salmonella enteritidis* in poultry. *Anim Genet* 34 : 339-348.
- Lamont SJ, Kaiser MG, Liu W. 2002. Candidate genes for resistance to *Salmonella enteritidis* colonization in chickens as detected in a novel genetic cross. *Vet Immunol Immunopathol* 87 : 423–428.

- Li HF, Hu Y, Hu H, Song C, Shu JT, Zhu CH, Zhang SJ, Fan H, Chen WW. 2013. Genetic differ in TLR4 gene polymorphisms and expression involved in *Salmonella* natural and artificial infection respectively in Chinese native chicken breeds. *Mol Biol Rep* DOI: 10.1007/s11033-013-2601-8.
- Liu Y, Chang GB, Bao WB, Wang KH, Zhang XY, Chen GH. 2011. Polymorphism of Exon 2 of TLR4 Gene and Its Correlation with Some Commercial Traits in Anka Chicken. *African Journal of Biotechnology* 10(42) : 8260-8266.
- Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 162 : 1028-1032.
- Malek M, Hasenstein JR, Lamont SJ. 2004. Analysis of chicken TLR4, CD28, MIF, MD2 and LITAF genes in a *Salmonella enteritidis* Resource Population. *Poultry Sci* 83 : 544-549.
- Nataamijaya AG. 2010. Pengembangan potensi ayam lokal untuk menunjang peningkatan kesejahteraan petani. *J Litbang Pertanian* 29 : 131-138.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York. Columbia University Press.
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York. Columbia University Press.
- Ochiai RL, Acosta CJ, Danovaro-Holliday MC. 2008. A Study of Typhoid Fever in Five Asian Countries: Disease Burden and Implications for Controls. *Bulletin of the World Health Organization* 86 : 260-268.
- Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4. *Immunology* 113 : 153-162.
- Ruan WK, Wu JH, An J, Zheng SJ. 2012. Polymorphisms of chicken TLR4, 5, 21 in different breeds. *Poult Sci* 91 : 2512-2516.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual*. United State of America. CSH Lab Pr.
- Sulandari S, Zein MSA, Paryanti S, Sartika T, Astuti M, Widjastuti T, Sujana E, Darana S, Setiawan I, Garnida D. 2007. Sumberdaya genetik ayam lokal Indonesia. Keanekaragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia. Manfaat dan Potensi. Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor. Pp 45-104.
- Vasconcellos LPMK, Talhari DT, Pereira AP, Coutinho LL, Regitano LCA. 2003. Genetic characterization of aberden angus cattle using molecular markers. *Genet Mol Biol* 26 : 133-137.
- Velge P, Cloeckert A, Barrow P. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics : the problems related to *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res* 36 : 267-288.
- Zuoyong Z, Zhiying W, Liting C, Shijun H, Ze Z, Bo Q, Zhili G, Kui N. 2013. Upregulation of chicken TLR4, TLR15 and MyD88 in heterophils and monocyte-derived macrophages stimulated with *Eimeria tenella* in vitro. *Experimental Parasitology* 133(4) : 427-433.