

Investigasi Asal Usul Ayam Indonesia Menggunakan Sekuens Hypervariable-1 D-loop DNA Mitokondria

(*PEDIGREE INVESTIGATION OF INDONESIAN CHICKEN
BY SEQUENCES HYPERVARIABLE-1 D-LOOP MITOCHONDRIAL DNA*)

Moch Syamsul Arifin Zein✉, Sri Sulandari

Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Widyasatwaloka Building, Jalan Raya Jakarta Bogor Km 46. Cibinong Bogor 16911

E-mail: zein_genetic@yahoo.com

ABSTRACT

Chicken taxonomy and pedigree investigation are important parts to understand the domestication process occurred on chicken in Indonesia. The Indonesian native chickens have very different clade with the chickens from other Asian countries and others. This study was conducted to construct phylogeny jungle fowls (red and green jungle fowls) and Indonesian native chickens, in order to know their relationship. Among the available DNA marker, the region D-loop on DNA mitochondria is the most effective marker used in the investigation. Mitochondrial DNA D-loop (hypervariable-1 segment) was PCR amplified and subsequently sequenced for a total 33 individuals of green jungle fowls (*Gallus varius*), 9 individuals of red jungle fowls (*Gallus g. gallus*) from Indonesia, and 30 individuals of Indonesian native chickens (Lombok, Cemani, Kedu, Kedu Putih, Nunukan, Kate, Pelung, Gaok, Merawang, dan Sentul). Seventy two (72) sequences were used for analysis. Seven (7) published reference D-loop sequences of genus *Gallus* from GenBank were also included in the analysis: *Gallus varius* (GenBank accession number D64163 dan D82912), *Gallus gallus* (GenBank accession number AB098668), *G. gallus spadiceus* (GenBank accession number AB007721), *Gallus gallus bankiva* (GenBank accession number AB007718), *Gallus lafayetti* (GenBank accession number D66893), and *Gallus sonneratii* (GenBank accession number D66892). Phylogeny analysis indicates that Indonesia jungle fowls can be grouped into two clades (clades of red jungle fowls/ Indonesia native chicken and green jungle fowls). Monophyletic phylogeny trees of jungle fowls from Indonesia were shown in this study for pedigree investigation of domesticated chickens.

Key words : Hypervariable-1 segment, DNA mitochondria, Pedigree, investigation, Indonesian Chicken

PENDAHULUAN

Ayam lokal Indonesia merupakan ayam yang berkembang dimulai sejak proses domestikasi dimulai, sehingga ayam lokal dikenal sebagai ayam asli atau *native chicken*. Ayam asli Indonesia secara genetik mempunyai *clade* berbeda dengan ayam lain di Asia sehingga kepulauan nusantara diyakini sebagai salah satu pusat domestikasi ayam di Asia (Sulandari, *et al.*, 2007). Sejak jaman dahulu hubungan ayam asli Indonesia dengan masyarakat sangat erat, hal tersebut terlihat dari keberadaan ayam yang hampir dimiliki oleh setiap keluarga di pedesaan. Ayam asli Indonesia mempunyai keragaman sangat besar dan bervariasi dalam warna bulu, kulit, paruh, bentuk tubuh, penampilan produksi, pertumbuhan, dan reproduksinya. Keanekaragaman ayam muncul

dari sistem pemeliharaan dan perkawinan yang tidak terkontrol dari generasi ke generasi serta faktor adaptasi lingkungan. Proses adaptasi dapat memunculkan sifat dan penampilan baru kemudian diwariskan secara genetik dari generasi ke generasi (Sidadolog, 2007), sifat genetik seperti tersebut disebut gen mutasi (Schmitt, 1980). Perjalanan panjang domestikasi telah banyak membentuk *breed* ayam asli Indonesia. Saat ini, diperkirakan terdapat sekitar 31 *breed* ayam asli yang tersebar diberbagai tempat termasuk ayam kampung yang menyebar di semua kepulauan nusantara (Nataamijaya, 1996; 2000).

Kepulauan nusantara juga memiliki plasma nutfah berupa hidupan liar ayam, yaitu *Gallus gallus* (*Red jungle fowl*) terdiri subspecies *G. g. spadiceus* (*Burmese red jungle fowl*) berada di Sumatera bagian utara, *G. g. bankiva* (*Javan*

red jungle fowl) distribusinya meliputi Sumatera, Jawa, dan Bali, serta *G. g. gallus* (*Cochin-Chinese* atau *Indochina red jungle fowl*) sebarannya meliputi Sumatera dan Jawa serta sukses introduksi di Bali dan Sulawesi (Sibley dan Monroe, 1990). Ayam hutan merah (*G. g. gallus*) dari kepulauan nusantara juga sukses introduksi di Filipina, Micronesia, Melanesia, dan Polynesia (Wikispecies, 2006). Selain itu, di Kepulauan Nusantara juga terdapat *G. varius* (*Green jungle fowl*). Distribusi *G. varius* meliputi dataran rendah hingga ketinggian 2400 m di atas permukaan laut di Jawa, Madura, Bawean, Kangean, Bali, Lombok, Sumbawa, Flores, dan Alor serta pulau-pulau kecil disekitarnya (Sibley dan Monroe, 1990).

Hasil kajian molekuler telah membuktikan adanya kontribusi hidupan liar tersebut terhadap populasi ayam hasil domestikasi dan dipercaya secara luas bahwa semua populasi ayam domestikasi di dunia berasal dari satu nenek moyang (*ancestor*), yaitu ayam hutan merah. Posisi hubungan kekeluargaan ayam hutan Indonesia terhadap ayam asli Indonesia sangat menarik sebagai investigasi terjadinya domestikasi ayam asli Indonesia. Gambaran hubungan kekeluargaan ayam hutan Indonesia dapat memberikan informasi strategis tentang sejarah domestikasi ayam asli Indonesia. Oleh sebab itu, penelitian ini mencoba membuat rekonstruksi filogeni ayam hutan dan ayam asli Indonesia hasil domestikasi untuk melihat hubungan kekerabatannya.

Rekonstruksi pohon filogeni ini dilakukan dengan menggunakan sekuen Hypervariable-1 (HV-1) D-loop dari DNA mitokondria. Segmen HV-1 diketahui sebagai daerah *non coding* yang lebih polimorfik dibandingkan dengan daerah mitokondria lainnya (Ishida *et al.* 1994; Quinn dan Wilson, 1993). Hasil kajian rekonstruksi pohon filogeni diharapkan dapat memberi gambaran hubungan kekeluargaan dari semua ayam hutan yang ada di Indonesia. Selain itu memperjelas kontribusi hidupan liar ini terhadap ayam hasil domestikasi di Kepulauan Nusantara. Investigasi ini juga memperjelas peran yang besar dari masyarakat Indonesia dalam melakukan domestikasi ayam serta menggambarkan tingkat kemajuan kebudayaan khususnya dalam budidaya peternakan ayam.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Material DNA yang digunakan adalah 33 sampel ayam hutan hijau (*G varius*), 9 ayam hutan merah (*G. g. gallus*), 30 ayam asli Indonesia yang terdiri ayam lombok, cemani, kedu, kedu putih, nunukan, kate, pelung, gaok, merawang, dan ayam sentul. Selain itu 7 referensi sekuen D-loop DNA mitokondria dari *GenBank* juga digunakan dalam penelitian ini yaitu *G varius* (*GenBank accession number* D64163 dan D82912), *G. gallus* (*GenBank accession number* AB098668), *G. g. spadiceus* (*GenBank accession number* AB007721), *G. g. bankiva* (*GenBank accession number* AB007718), *G. lafayetti* (*GenBank accession number* D66893), and *G. sonneratii* (*GenBank accession number* D66892). Sedangkan 2 referensi terakhir yaitu ayam hutan Sri Lanka (*G. lafayettii*, D66893) dan ayam hutan abu abu (*G. sonneratii*, D66892).digunakan sebagai *outgroup*. Bahan penelitian yang digunakan secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 1.

Ekstraksi DNA dan PCR

Material DNA berupa darah diawetkan dengan menggunakan 100% alkohol. Ekstraksi DNA total dan PCR dilakukan di Laboratorium Genetika, Bidang Zoologi, Puslit Biologi-LIPI Cibinong Bogor. Ekstraksi DNA dilakukan mengikuti metode yang dikembangkan oleh Sambrook *et al.*, (1989). Hasil ekstraksi yang berupa DNA total diamati secara kualitatif dengan proses elektroforesis pada gel agarose 1%, sedangkan pemeriksaan secara kuantitatif dilakukan dengan cara menghitung konsentrasi DNA total menggunakan mesin spektrofotometer.

Amplifikasi segmen HV-1 D-loop DNA mitokondria dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan Thermal Cycler Applied Biosystems Type 2700. PCR dilakukan dengan menggunakan campuran reaksi sebanyak 30 ul yang terdiri dari 50 ng sampel DNA, 0,2 pmol/ul masing-masing *primer forward* L16750: 5"AGGAC-TACGGCTTGAAAAGC3" dan *reverse* CR1b: 5"CCATACACGCAAACCGTCTC3" (Mobegi, 2005), PCR Bufer 1X, 200 uM dNTP, 2 mM MgCl₂, 1 unit *Tag* DNA polymerase (Fermentes,

Tabel 1. Material DNA yang digunakan dalam investigasi asal usul ayam asli Indonesia

No.	Nama ayam	Jumlah	Asal
1.	<i>G. varius</i>	12	Flores
		3	Sumbawa
		4	Jember
		14	Jawa Tengah
2.	<i>G. g. gallus</i>	5	Jawa Tengah
		4	Sulawesi Tenggara
3.	Breed ayam lokal Indonesia		
	Ayam lombok	12	Pulau Lombok
	Ayam cemani	2	Temanggung
	Ayam kedu	2	Temanggung
	Ayam kedu putih	2	Temanggung
	Ayam nunukan	2	Tarakan
	Ayam kate	2	Yogyakarta
	Ayam pelung	2	Cianjur
	Ayam gaok	2	Madura
	Ayam merawang	2	Sumatera Selatan
Ayam sentul	2	Ciamis	
5.	Nama spesies:		GenBank <i>accession number</i> :
	<i>G. varius</i>	2	D64163 dan D82912
	<i>G. gallus</i>	1	AB098668
	<i>G. g. spadiceus</i>	1	AB007721
	<i>G. g. bankiva</i>	1	AB0077118
	<i>G. lafayetti</i>	1	D66893
	<i>G. sonneratii</i>	1	D66892

Native with BSA), dan H₂O hingga campuran reaksi PCR mencapai 30 ul. Kondisi PCR adalah pre denaturasi 94°C selama 5 menit, kemudian denaturasi 94°C selama 45 detik, annealing pada temperatur 60°C selama 45 detik dan extension pada temperatur 72°C selama 90 detik, dengan siklus sebanyak 30 kali. Setelah itu ditambah final extension 72°C selama 10 menit. Pengecekan hasil PCR dilakukan dengan proses elektroforesis pada gel agarose 1%.

Sekuensing fragmen HV-1 D-loop DNA mitokondria

Analisis sekuen HV-1 D-loop DNA mitokondria dilakukan di Laboratorium International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, Kenya dengan menggunakan 3100 genatic analyser (ABI Prism). Produk PCR yang telah dipurifikasi, disekuen untuk mengetahui urutan nukleotida. Amplifikasi segmen HV-1 D-loop DNA mitokondria menggunakan 1 set internal primer sekuensing, yaitu CR-forward 5" TCT ATA TTC CAC ATT

TCT C3" dan CR-reverse 5" GCG AGC ATA ACC AAA TGG3". Kit sekuensing yang digunakan adalah BigDye*Terminator Version 3.1 (Applied Biosystems) dengan total volume 20 il yang mengandung 20 ng produk PCR yang telah dipurifikasi sebagai *template* DNA dan 3.2 pmol primer. Pada setiap tabung reaksi PCR berisi 8 µl *Big Dye terminator ready reaction mix* (campuran dNTP, ddNTP, bufer, enzim, dan MgCl₂), 8 µl air milliQ, 2 µl masing-masing primer CR-forward atau CR-reverse, dan 2 µl *template* DNA. Kemudian tabung divortex sebentar dan disentrifugasi selama 10 detik. Selanjutnya dilakukan reaksi sekuen di mesin PCR (Thermal Cycler Applied Biosystems type 9700). Kondisi PCR untuk reaksi sekuen adalah 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik, dan 60°C selama 4 menit sebanyak 25 siklus. Setelah proses selesai disimpan pada temperatur 4°C sampai siap di purifikasi dengan menggunakan AMPure*PCR purification kit (Agencourt Bioscience Corporation, 500 Cummings Center, Beverly, MA). Purifikasi dilakukan untuk

menghilangkan kelebihan primer, nukleotida, dye-terminator, garam, dan enzim. Selanjutnya proses sekuensing dilakukan menggunakan 3100 genetic analyser (ABI Prism).

Analisis Data Molekuler

Sekuen segmen HV-1 D-loop DNA mitokondria sepanjang 397 bp digunakan untuk analisis dalam penelitian ini. Data sekuen dianalisis dengan menggunakan berbagai macam komputer *software*. Chromas versi 1.45 digunakan untuk *viewing* dan *editing* hasil sekuen. Koreksi antara hasil sekuen *forward* dan *reverse* dilakukan dengan menggunakan BioEdit Sequence Alignment Editor Versi 7.0.1. *Multiple alignment* sekuen digunakan program ClustalX 1.83. Situs polimorfik dianalisis dengan menggunakan DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) versi 4.00. Analisis pohon filogeni menggunakan metoda neighbor-joining, dimana kalkulasi matrik jarak genetik dengan model Kimura-2 parameter yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dalam program Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) *software* Versi 3.1 (Kumar *et al.* 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Polimorfisme Segmen HV-1 D-loop DNA Mitokondria

Hasil 79 sekuen segmen HV-1 D-loop DNA mitokondria sepanjang 397 bp terdiri dari 33 ayam hutan hijau (*G varius*) dikoleksi dari Flores, Sumbawa, Jember, dan Jawa Tengah, sembilan ayam hutan merah (*G gallus*) dikoleksi dari Jawa Tengah, Sulawesi Tenggara, dan ayam asli Indonesia yaitu 12 haplotipe ayam lombok, 2 haplotipe masing masing ayam cemani, kedu putih, dan kedu (Temanggung), nunukan (Tarakan), kate (Yogyakarta), pelung (Cianjur), gaok (Madura), merawang (Sumatera Selatan), dan ayam sentul (Ciamis). Sekuen segmen HV-1 D-loop dari *GenBank*, yaitu *G. varius* (*accession number* D64163 dan D82912), *G. gallus* (*accession number* AB098668), *G. g. spadiceus* (*accession number* AB007721), *G. g. bankiva* (*accession number* AB007718), diselaraskan dengan sekuen consensus *G. gallus* (*accession number* AB098668) menggunakan program CLUSTALX Versi 1.83. Hasil analisis situs polimorfik segmen HV-1 D-loop DNA mitokondria menggunakan DnaSP versi 4. Hasil analisis diketahui terdapat 76 situs polimorfik (*variable site*) yang terdiri dari 15 *singleton*

variable site dan 61 *parsimony informative sites* seperti diperlihatkan pada Gambar 1. Hasil penselarasan sekuen DNA dilanjutkan dengan analisis pohon filogeni sebagai investigasi peran ayam hutan Indonesia terhadap proses domestikasi ayam asli yang tersebar di kepulauan nusantara.

Analisis Pohon Filogeni

Analisis pohon filogeni antara lain mempunyai tujuan merekonstruksi hubungan kekerabatan yang tepat antar organisme (Li dan Graur, 1991). Pohon filogenetik pada penelitian ini (Gambar 2.) merupakan grafik yang digunakan menggambarkan hubungan kekerabatan (genealogi) antar taksa, yaitu antara ayam hutan hijau (*G. varius*), ayam hutan merah (*G. g. gallus*), dan ayam hasil domestikasi yang tersebar di Kepulauan Nusantara. Selain itu, beberapa sekuen ayam hutan hijau dan ayam hutan merah yang diambil dari *GenBank* juga digunakan sebagai referensi, yaitu *G. varius* (D64163 dan D82912), *G. gallus* (AB098668), *G. g. spadiceus* (AB007721), *G. g. bankiva* (AB007718), diselaraskan dengan sekuen konsensus NCBI (AB098668), sedangkan ayam hutan Sri Lanka (*G. lafayettii*, D66893) dan ayam hutan abu abu (*G. sonneratii*, D66892).digunakan sebagai *outgroup*.

Grafik filogenetik tersebut terdiri dari sejumlah nodus (*nodes*) dan cabang (*branches*) Nodus-nodus tersebut mewakili unit-unit taksonomi sedangkan cabang-cabang mewakili hubungan antar unit yang menggambarkan hubungan keturunan dengan leluhur. Pola percabangan yang terbentuk dari suatu pohon disebut sebagai topologi. Panjang cabang (*branch length*) menggambarkan jumlah perubahan evolusioner yang terjadi antara dua nodus.

Unit-unit taksonomi yang direpresentasikan oleh nodus dapat berupa spesies, populasi atau individu (Li dan Graur, 1991; Whelan *et al.*, 2001; Holder dan Lewis, 2003). Nodus-nodus yang terdapat dalam suatu pohon filogenetik dapat dibedakan ke dalam dua jenis, yaitu nodus internal dan nodus eksternal. Nodus internal merepresentasikan unit-unit leluhur/nenek moyang (*ancestral units*), sedangkan nodus eksternal merepresentasikan unit-unit taksonomi yang sedang dibandingkan satu sama lain dan dikenal juga dengan istilah *operational taxonomy unit* (Li dan Graur, 1991).

Gambar 1. Polimorfisme nukleotida yang di analisis pada segmen HV-1 D-loop DNA mitokondria

0000011111	1111112222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222333333	3333333333	333 333
1112303667	7789990111	1122222222	3333344444	5556668999	9999000000	1112234555	677 799	
4786153071	4782393247	8902345679	0468902368	4691581012	4689023469	0570202245	812 327	
#G.gallus.AB098668	ACTCATTGTT	TAATCTCAAT	ACTCATTAC	CCTCTGACGT	TAATTACCAA	AAACTCTCCA	TTTCTAATCA	CTT-TTA
#G.g.spadiceus.AB007721G.....G.....TC.....C.....CC.TT.....C.....T.C...GT.....
#G.g.bankiva.AB007718C.T...C.T.	T...G...T	AT...AG..CC.A...C.....CCTC.....A.C.	
#G.g.gallus.Sulawesi.1G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#G.g.gallus.Sulawesi.2G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#G.g.gallus.Sulawesi.3G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#G.g.gallus.Sulawesi.4G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#G.g.gallus.Yogyakarta.1T.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....G	
#G.g.gallus.Yogyakarta.2G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#G.g.gallus.Yogyakarta.3G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#G.g.gallus.Yogyakarta.4G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#G.g.gallus.Yogyakarta.5G.....G.....T.....T.CC.A...C.....C.TC.....TC.....
#Haplotipe.Ayam.Lombok.AG.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....G	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.BG.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.CG.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.DG.....G.....A.....C.....C.T..GC.....C.TC.....
#Haplotipe.Ayam.Lombok.EA..G.CG.....C.....C.T..GC.....TC.....	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.FG.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.GG.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.HG.....G.....C.....C.T..GC.....CC.TC.....	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.IG.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....G	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.JG.CG.....C.....C.T..GC.....TC.....T	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.KG.....G.....C.G.C.T..GC.....C.TC.....C	
#Haplotipe.Ayam.Lombok.LC.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Pelung.1G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Pelung.2G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Cemani.1G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#Haplotipe.Cemani.2G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Gaok.1G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#Haplotipe.Gaok.3G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#Haplotipe.Kedu.1G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....G	
#Haplotipe.Kedu.2G.....G.....C.....C.T.GGC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Kedu.putih.1	C..G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#HaplotipeKedu.putih.2G.....G.....C.....C...GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Sentul.2G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#Haplotipe.Sentul.3G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Kate.1G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#Haplotipe.Kate.2G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#Haplotipe.Merawang.1G.....G.....C.....C.T..GC.....C.TC.....	
#Haplotipe.Merawang.2G.....G.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#Haplotipe.Nunukan.1G.....C.....C.....C.T..GC.....CCTC.....	
#Haplotipe.Nunukan.2G.CG.....C.....C.T..GC.....TC.....	
#Gallus.varius.D82912C.....	ACC..CC.ACA.T	TACATCGTC.	-TA..TCTAC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-A..
#G.varius.D64163C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	ATATCTC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.1TC.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.2C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.3C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TA..TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.4C.....	CACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TA..TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.5C.....	CACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TA..TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.6C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TA..TC.AC	..C.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.7C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.8TC.....	C.ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TA..TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.9TC.....	ACC..CCCACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.10C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jember.1C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	ATAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.A.	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jember.2C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	ATAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jember.3C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	ATAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jember.5C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	ATATCTC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Sumbawa.1C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	TC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Sumbawa.2C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Sumbawa.3C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.1C.....	ACC..CC.ACA.C	TACGTCG.C	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..CCA.....	..-C-G..
#G.varius.Jateng.2C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.3C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	GCC.ATA.AG	..C.A..C...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.4C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.5C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TA..TC.AC	..T.AGTT..	GCC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.6C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	GCC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.8C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TA..TC.AC	..T.AGTT..	GCC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.9C.....	A.C..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TA..TC.AC	..TT.AGTT..	CC.ATATAG	..C.AC.G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.10C.....	A.C..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..TT.AGTT..	CC.ATATAG	..C.AC.G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.11C.....	A.C..CC.ACA.T	TACATCGTC.	-TAT.TC.AC	..TT.AGTT..	CC.ATATAG	..C.AC.G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.12C.....	A.C..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..CT.AGTT..	CC.ATATAG	..C.AC.G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.13C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGT...	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A.G
#G.varius.Jateng.14C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	GCC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Jateng.16C.....	A.C..CC.ACA.T	TACGTCGTT.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Sumbawa.22C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.12C.....	CACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TA..TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..
#G.varius.Flores.11C.....	ACC..CC.ACA.T	TACGTCGTC.	-TAT.TC.AC	..T.AGTT..	CC.ATA.AG	..C.A..G...	..-C-A..

Sekuen dari segmen HV-I D-loop DNA mitokondria ayam dilakukan analisis filogeni dengan metode *neighbor joining* dengan menggunakan program Mega versi 3.1. Analisis filogeni dengan metode ini ditampilkan dalam bentuk diagram filogram yang menjelaskan pola kekerabatan (pohon filogeni) antar spesies ayam hutan Indonesia (*G. varius*, *G. g. gallus*, *G. g. bankiva*, dan *G. g. spadiceus*) dan posisi ayam asli Indonesia hasil domestikasi (ayam lombok, ayam cemani, kedu putih, kedu, nunukan, kate, pelung, gaok, merawang, dan ayam sentul). Suatu kelompok dikatakan bersifat monofiletik apabila keseluruhan *operational taxonomy unit* yang dikelompokkan lebih dekat satu sama lain secara genealogis (berbagi leluhur yang sama) dibandingkan dengan kelompok lain yang berbeda garis keturunan (tidak berbagi leluhur yang sama). Suatu kelompok monofiletik disebut juga sebagai suatu *clade*.

Hasil analisis sekuen HV-1 D-loop DNA mitokondria dari ayam tersebut terbentuk pohon filogeni monofiletik, yaitu terdapat *clade* dari spesies ayam hutan hijau (*G. varius*) dan *clade* ayam hutan merah (*G. g. gallus*, *G. g. bankiva*, *G. g. spadiceus*, dan ayam asli Indonesia). Selain itu terdapat *clade* ayam hutan abu-abu (*G. sonneratii*) dan ayam hutan srilangka (*G. lafayettii*) yang digunakan sebagai *outgroup*. Semua *clade* yang terbentuk dihubungkan dengan nodus eksternal yang secara geneologis berbeda garis keturunan dan dapat diperbandingkan. Ayam asli Indonesia yang terdiri dari ayam lombok, ayam cemani, kedu, kedu putih, nunukan, kate, pelung, gaok, merawang, dan sentul berada dalam satu *clade* dengan ayam hutan merah, sehingga dapat dikatakan berdekatan secara geneologis (berbagi leluhur yang sama) dengan ayam hutan merah.

Menguji tingkat kepercayaan dari topologi pohon filogeni yang telah direkonstruksi dengan metode *neighbor joining*, dilakukan pengujian dengan metode *bootstrapping* terhadap pohon filogeni tersebut. Hasil pengujian dengan metode *bootstrapping* ditampilkan dalam bentuk diagram kladogram disertai nilai penghitungan *bootstrap* di setiap percabangannya (Gambar 2). Cabang pohon filogeni dari *clade* ayam hutan merah menunjukkan indikasi *bootstrap* probabilitas (100 replikasi) dengan nilai yang tinggi (95%) dan *clade* ayam hutan hijau (100%). Sedangkan ayam asli Indonesia semua berada dalam *clade* ayam hutan merah. Hal ini

menunjukkan bahwa ayam hutan merah Indonesia adalah nenek moyang dari ayam asli Indonesia dan tidak ada kontribusi dari ayam hutan hijau (*G varius*).

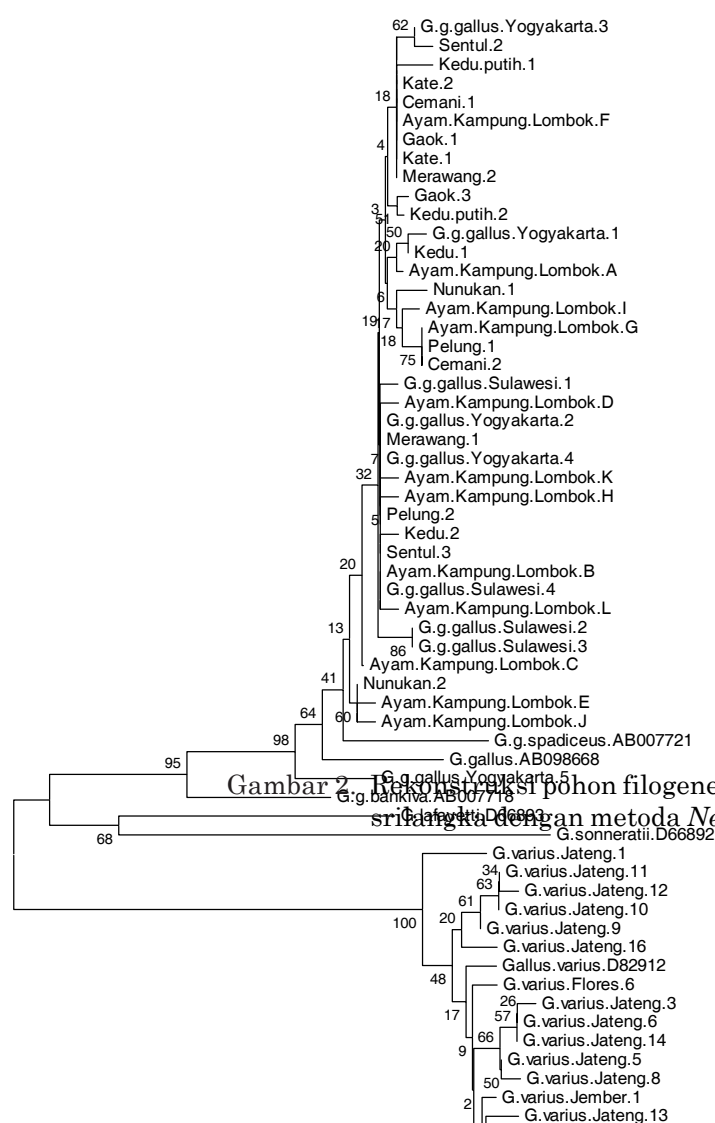
Hasil kajian molekuler telah membuktikan adanya kontribusi ayam hutan merah terhadap populasi ayam hasil domestikasi dan dipercaya secara luas bahwa semua populasi ayam domestikasi di dunia berasal dari satu nenek moyang (*ancestor*) yaitu ayam hutan merah (*G g gallus*) yang berasal dari Asia Tenggara (Furuhito *et al.*, 1994; 1996). Hal ini juga dilaporkan Niu *et al.*, (2002) bahwa domestikasi ayam lokal di China adalah berasal dari *G g gallus* dari Thailand. Hubungan yang dekat antara ayam hasil domestikasi dengan ayam hutan merah, mengakibatkan perdebatan mengenai teori *polyphyletic* dan *monophyletic* tentang asal usul nenek moyang ayam domestikasi telah berakhir. Hasil penelitian DNA molekuler telah menjadi jelas bahwa ayam domestikasi berasal dari satu moyang (*monophyletic*), yaitu spesies ayam hutan merah (Crawford, 1990; Sullivan, 1991; Siegel *et al.* 1992; Romanov dan Wigend, 2001; Hillel *et al.*, 2003; Vaisanen *et al.*, 2005).

Selain itu, hasil penelitian yang dilakukan Sulandari *et al.*, (2007) menunjukkan bahwa ayam asli Indonesia didominasi oleh haplotipe yang berada dalam satu *clade* (75%) dan berbeda dengan *clade* dari populasi ayam lokal di Asia. Hal tersebut merupakan indikator yang kuat untuk mendukung bahwa Kepulauan Nusantara merupakan salah satu pusat dari domestikasi ayam. Kajian telah dilakukan terhadap 15 galur ayam lokal Indonesia dan ayam kampung dari berbagai daerah dengan menggunakan segmen HV-1 D-loop DNA mitokondria. Hasil ini telah memperkuat dugaan bahwa domestikasi ayam telah dilakukan nenek moyang bangsa Indonesia sejak lama. Informasi ini memberikan petunjuk bahwa budidaya peternakan telah lama berkembang di Nusantara dan sebagai indikator kemajuan kebudayaan masyarakat Indonesia.

Selain itu, Indonesia telah diketahui sebagai daerah mega diversitas kedua terbesar di dunia dan sejak lama telah diketahui bahwa populasi ayam hutan merah menyebar mulai dari Sumatera hingga pulau Jawa. Saat ini, ayam hutan merah sukses diintroduksi di Bali dan Sulawesi (Sibley dan Monroe, 1990). Selain itu juga telah sukses introduksi di Filipina, Micronesia, Melanesia, dan Polynesia

Ayam Hutan Merah dan Ayam Asli Indonesia

Ayam Hutan Merah Dan Ayam Asli Indonesia



Gambar 2. Rekonstruksi pohon filogenetik ayam hutan merah, hijau, abu-abu, dan ayam hutan srilangka dengan metoda Neighbor joining menggunakan Mega Software versi 3.1.

(Wikispecies, 2006). Jika dilihat dari sebaran ayam hutan merah sebagai nenek moyang ayam domestikasi yang ada di Nusantara, maka dapat diyakini bahwa domestikasi ayam telah dilakukan oleh para leluhur bangsa Indonesia di pulau Jawa dan Sumatera. Namun demikian secara tepat masih diperlukan bukti arkeologi seperti yang terjadi di pusat domestikasi lainnya, yaitu di sekitar sungai kuning, Henan (China) sekitar 6000 tahun sebelum masehi dan di lembah Indus sekitar 2000 tahun sebelum masehi. Domestikasi di lembah Indus didukung seperti yang diperlihatkan pada stempel kerajaan dari budaya Mahenjo-Daro (3000-2000 SM) di lembah Indus (Mackay, 1938 *cit.* Schmidt, 1985).

Investigasi analisis filogeni ayam Indonesia menunjukkan bahwa hidupan liar, yaitu ayam hutan merah distribusinya meliputi Sumatera dan Jawa berperan terhadap domestikasi ayam asli Indonesia dan memperkuat hasil kajian karakteristik ayam lokal Indonesia yang mempunyai *clade* berbeda dengan ayam lain di Asia. Analisis molekuler dengan menggunakan sampel ayam asli Indonesia dari berbagai tempat dengan jumlah yang lebih besar dapat dilakukan untuk melihat lebih jelas hubungan kekerabatan antara ayam asli Indonesia dan ayam hutan merah.

SIMPULAN

Ayam lokal Indonesia berada dalam satu *clade* dengan ayam hutan merah yang berarti berdekatan secara geneologis (berbagai leluhur yang sama).

Sebaran ayam hutan merah berada di Jawa dan Sumatera, berarti pusat domestikasi berada di kedua pulau tersebut.

Hasil investigasi ini sejalan dengan hasil kajian karakteristik ayam asli Indonesia yang mempunyai *clade* berbeda dengan ayam lainnya di Asia.

Saran:

Konservasi hidupan liar ayam hutan merah sebagai nenek moyang ayam lokal Indonesia perlu ditingkatkan sebagai bagian dari plasma nutfah hidupan liar yang mempunyai nilai strategis untuk kepentingan pemanfaatan gen-gen yang bermanfaat untuk keperluan peningkatan kualitas ayam asli Indonesia.

Konservasi, pemanfaatan, dan pengembangan ayam perlu dilakukan dalam rangka revitalisasi peternakan ayam asli Indonesia.

Perlu dilakukan analisis molekuler dengan menggunakan breed ayam asli Indonesia lebih banyak untuk memberikan gambaran yang lebih jelas terhadap hubungan geneologi antara ayam asli Indonesia dan ayam hutan merah.

DAFTAR PUSTAKA

- Fumihito A, Miyake T, Sumi S, Takada M, Ohno S, Kondo N. 1994. One subspecies of the Red Jungle Fowl (*G. g. gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 12505-12509.
- Fumihito A, Miyake T, Takada M, Shingu R, Endo T, Gojobori T, Kondo N, Ohno S. 1996. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 6792-6795.
- Crawford RD. 1990. *Poultry Biology: Origin and History of Poultry Species*. In: Poultry Breeding and Genetics (Ed. Crawford, R.D.) Elsevier Science Publishing Company Amsterdam and New York, pp:1-42
- Hillel J, Groonen MA, Tixier-Boichard M, Korol AB, David L, Kirzhner VM, Burke T, Barre-Dirie A, Crooijmans RP, Elo K, Feldman MW, Freidlin PJ, Maki-Tanila A, Oortwijn M, Thomson P, Vignal A, Wimmers K, Weigend S. 2003. Biodiversity of 52 chickens populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics, Selection, Evolution* 35: 533-557
- Holder M, Lewis PO. 2003. Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews* 4:275—284.
- Kumar S, Tamara K, Nei M. 2004. Mega3: Integrated software for molecular Evolutionar genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. Henry Stewart publication. Vol 5. No 2. 150-163.
- Li W, Graur D. 1991. *Fundamental of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland: xv + 284 hlm.
- Mobegi VA. 2005. Genetic characterization of African chicken using mitochondrial DNA D-loop sequences (*Thesis*). Nairobi: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Nairobi
- Nataamijaya AG. 2000. The native of chicken of Indonesia. *Buletin Plasma Nutfah* (1). Balitbang Pertanian, DEPTAN

- Nataamijaya AG, Jarmani SN, Sartika T. 1996. Konsep strategi penanganan pelestarian plasma nutfah pertanian secara *ex-situ* ternak ayam buras. Bogor. Proyek Pemanfaatan dan Pelestarian Plasma Nutfah Pertanian.
- Niu D, Fu Y, Luo J, Ruan H, Yu X.P, Chen G, Zhang YP. 2002. The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. *Biochem. Genet.* 40: 163-174.
- Romanov MN, Weigend S. 2001. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. *Poul. Sci.* 80: 1057-1063
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sibley, C.G. and B.L. Monroe. 1990. *Distribution and Taxonomy of Birds of the World.* New Haven & London. Yale University Press. P 1111.
- Schmidt H. 1985. *Handbuch der Nutz- und Rassenhuehner.* Verlag J. Neumann-Newdamm KG, Melsungen.
- Schmitt, F. 1980. Die Haustiere – Nutzungsrichtungen und Rassegruppen. In: Tierzuchtungslehre, Editor, G. Comberg, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Siegel PB, Haberfeld A, Mukherjee TK, Stallard LC, Marks HL, Anthony NB, Dunnington EA. 1982. Jungle fowl – domestic fowl relationship: a use of DNA fingerprinting. *World's Poul. Sci.* 48: 147-155
- Sidadolog JHP. 2007. Pemanfaatan dan kegunaan ayam lokal Indonesia. Dalam buku *Keragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia:Manfaat dan Potensi.* Editor: Kusumo Diwyanto dan Siti Nuramaliati Prijono. Pusat Penelitian Biologi, LIPI. Edisi Pertama. Hal.:27-42.
- Sulandari S, Zein MSA, Paryanti S, Sartika T. 2007. Taksonomi dan asal usul ayam domestikasi. Dalam buku *Keragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia:Manfaat dan Potensi.* Editor: Prof. Kusumo Diwyanto dan Siti Nuramaliati Prijono. Pusat Penelitian Biologi, LIPI. Edisi Pertama. Hal.:7-24
- Sullivan M. 1991. Flock structure in red jungle fowl. *App. Anim. Behav. Sci.* 30:381-386
- Vaisanen J, Hakansson J, Jensen P. 2005. Social interaction in red junglefowl (*Gallus gallus*) and white leghorn layers in stable groups and after re-grouping. *British Poul. Sci.* 46 (2): 156-168
- Wikispecies.2006.Taxonavigation. pp:1-2 www.species.wikimedia.org/wiki/gallus_gallus
- Whelan, S., P. Lio & N. Goldman. 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends in Genetics* 17: 262—272.