

Keragaman Gen *Heat Shock Protein 70* pada Ayam Kampung, Ayam Arab, dan Ayam Ras

(POLYMORPHISMS OF THE HEAT SHOCK PROTEIN 70 GENE
IN KAMPONG, ARABIC, AND COMMERCIAL CHICKENS)

Mohamad Hasil Tamzil¹, Ronny Rachman Noor², Peni Suprpti Hardjosworo³
Wasmen Manalu⁴, Cece Sumantri²

¹Laboratorium Produksi Ternak Unggas, Fakultas Peternakan, Universitas Mataram,
Jl. Majapahit No. 62 Mataram, Lombok, Nusa Tenggara Barat, 83125.
Telepon: (0370) 633603. email: emhatamsil@yahoo.com

²Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Ternak,

³Laboratorium Produksi Ternak Unggas, Fapet, Institut Pertanian Bogor,

⁴Laboratorium Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB.

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman gen *heat shock protein/HSP-70* ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras. Penelitian menggunakan sampel darah yang diambil dari vena brakhialis/sayap pada sekelompok ayam umur 12 minggu yang dipelihara semenjak umur sehari/*Day Old Chick* (DOC). DOC ayam kampung diperoleh dari hasil penetasan sendiri dengan telur tetas didapatkan dari daerah dataran rendah, sedang, dan dataran tinggi di Pulau Lombok, sedangkan DOC ayam arab diperoleh dari peternak, dan DOC ayam ras dibeli di *poultry shop*. *Genotyping* dilakukan menggunakan analisis *Polymerase Chain Reaction (PCR) - Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)* menunjukkan bahwa gen HSP-70 bersifat polimorfik pada ayam kampung dan ayam arab, sedangkan pada ayam ras monomorfik. Pada ayam kampung terdapat tujuh genotipe HSP-70 yaitu AA, AB, AC, CC, AD, DD, dan BC dengan frekuensi tertinggi genotipe AD, sedangkan pada ayam arab terdapat enam genotipe, yaitu AA, AB, AC, CC, AD, dan BC, dengan frekuensi tertinggi genotipe AC. Pada ayam ras terdapat satu genotipe yaitu DD. Dijumpai tujuh situs (lokasi) polimorfik, yaitu perubahan A→G pada situs 617, perubahan A→G pada situs 628, perubahan G→C pada situs 646, perubahan C→T pada situs 661, perubahan A→G pada situs 699, perubahan G→C pada situs 754, dan perubahan A→G pada situs 792. Mutasi pada situs 628, 646 dan 661 tergolong *silent mutation*. Gen HSP-70 pada populasi ayam kampung dan ayam arab dalam penelitian ini tidak berada dalam keseimbangan, Hardy-Weinberg. Tidak dijumpai adanya perbedaan yang mencolok antara nilai heterosigositas observasi dan heterosigositas harapan, serta nilai *polymorphic informative content* ayam kampung dan ayam arab. Gen HSP 70 bersifat polimorfik pada ayam kampung dan ayam arab, serta monomorfik pada ayam ras.

Kata-kata Kunci: polimorfisme, HSP-70, ayam lokal, PCR-SSCP

ABSTRACT

The aim of the research was to identify the polymorphisms of HSP-70 gene of kampung, Arabic, and commercial chickens. The study used whole blood samples taken from the branchial vein at the age of 12 weeks from a group of chickens that were kept since DOC. Kampung chickens DOC were obtained by hatching the eggs that were collected from lowlands, medium and high altitude areas in Lombok island, while the Arabic chickens DOC were obtained from farmer. DOC of commercial chickens were purchased at the poultry shop. The genotyping results using PCR-SSCP analysis showed that kampung and arabic chickens were polimorphic, while commercial chickens were classified as monomorphic. Kampung chickens had seven genotypes of HSP-70, namely AA, AB, AC, CC, AD, DD, and BC. The AD genotypes had the highest frequency, whereas in arabic chickens had six genotypes, namely AA, AB, AC, CC, AD and BC, which AC genotype had the highest frequencies. However, the commercial chickens contain only one genotype which was DD. There were three polymorphic sites found in amplified area, namely A→G mutation at site 617, A→G mutation at site 628, G→C mutation at site 646, C→T mutation at site 661, A→G mutation at site 699, G→C mutation at site 754, and A→G mutation at site 792. Mutations at sites 628, 646 and 661 were considered as silent mutation. HSP-70 gene in kampung and arabic chicken population in this study was in equilibrium. The value of Ho, He, and PIC of kampung and arabic chickens were not different.

Key Words: polymorphism, HSP-70, native chicken, PCR-SSCP

PENDAHULUAN

Secara umum ada tiga jenis ayam yang berkembang di Indonesia sebagai unggas penghasil daging dan telur konsumsi, yaitu ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras (pedaging dan petelur). Ayam kampung merupakan ayam asli Indonesia, sedangkan ayam arab merupakan ayam pendatang, yaitu ayam *braekel kriel silver* dan *braekel kriel gold* (ayam lokal Eropa) dan di Indonesia lebih dikenal dengan nama ayam arab (Sulandari *et al.*, 2007; Sartika dan Iskandar, 2007). Ayam kampung dan ayam arab mempunyai kemampuan adaptasi dengan lingkungan tropik cukup baik, sementara ayam ras memperlihatkan respons sebaliknya, yaitu cepat stres bila dipelihara di daerah panas. Dalam perkembangannya, ayam kampung berkembang menjadi berbagai macam galur dengan fenotipe dan genotipe yang beragam. Keberagaman ini berdampak pada kemampuan merespons pengaruh lingkungan termasuk suhu lingkungan tempat pemeliharaan. Individu yang memiliki keragaman kombinasi gen tinggi memiliki kemampuan beradaptasi dengan lingkungan lebih baik dibandingkan dengan individu yang komposisi gennya lebih seragam (Noor dan Seminar, 2009). Tingginya keragaman ayam kampung merupakan modal yang dapat dikembangkan ke arah dihasilkannya galur ayam komersial tropik baru yang mampu beradaptasi lebih baik dengan lingkungannya.

Ternak unggas termasuk hewan *homeothermic* (suhu tubuh berkisar antara 41,5-40,5°C) (Etches *et al.*, 2008), tidak memiliki kelenjar keringat serta hampir semua bagian tubuhnya ditutupi bulu. Kondisi tubuh seperti ini menyebabkan ternak unggas kesulitan membuang panas tubuh ke lingkungannya, sehingga sangat rentan terhadap bahaya cekaman panas (Ajakaiye *et al.*, 2010; Zulkifli *et al.*, 2009; Al-Aqil dan Zulkifli, 2009; Al-Ghamdi, 2008, Al-Fataftah dan Abu-Dieyeh, 2007; Lin *et al.* 2005). Oleh karena itu, ternak unggas harus dipelihara pada *zone thermoneutrality*, dan pemeliharaan di atasnya, yaitu pada suhu lingkungan lebih dari 32°C, ternak akan menderita stres panas (Mujahid *et al.*, 2007; Cooper dan Washburn, 1998). Dampak selanjutnya adalah, ternak mengalami penurunan pertumbuhan dan produksi telur, serta munculnya berbagai macam penyakit yang dapat menimbulkan kematian sehingga secara ekonomi merugikan usaha (Sohail *et al.*, 2010,

Virden dan Kidd, 2009; Czarick dan Faichild, 2008; Faisal *et al.*, 2008; Al-Fataftah dan Abu-Dieyeh, 2007; Garriga *et al.*, 2006; Alfataftah, 1987).

Dalam kondisi stres, tubuh terganggu dan tubuh berusaha keras untuk mengembalikan ke kondisi *homeostasis* seperti sebelum terjadi stres. Bila stres terus meningkat dan tubuh tidak mampu mengatasinya, maka akan digunakan jalur genetis, yaitu dengan cara mengaktifkan gen *Heat Shock Protein* (HSP) termasuk HSP-70, yang berfungsi hanya dalam kondisi stres (Noor dan Seminar, 2009). Sejumlah penelitian melaporkan bahwa pada gen ini terdapat beberapa situs polimorfik yang dapat dipakai sebagai penanda ayam yang toleran terhadap suhu tinggi (Gaviol *et al.*, 2008, Zhen *et al.*, 2006, Mazzi *et al.*, 2003). Oleh sebab itu, keberadaan ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras yang berkembang di Indonesia, dengan latar belakang perbedaan asal usul dan tempat pengembangan, akan memperlihatkan genotipe HSP-70 yang berbeda. Penelitian dilakukan untuk mengidentifikasi keragaman gen HSP-70 ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras, dalam upaya penyediaan data untuk pembentukan ayam komersial daerah tropik yang toleran terhadap cekaman panas.

METODE PENELITIAN

Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah 96 ekor ayam kampung, 94 ekor ayam arab, dan 87 ekor ayam ras petelur. *Day Old Chick* (DOC) ayam kampung diperoleh dari hasil penetasan sendiri dengan telur tetas didatangkan dari daerah dataran rendah, sedang, dan dataran tinggi di Pulau Lombok, sedangkan DOC ayam ras dibeli di *poultry shop*, dan DOC ayam arab dibeli pada peternak. Semua anak ayam dari ke tiga jenis ayam tersebut dipelihara dalam kandang pembesaran secara terpisah.

Ekstraksi DNA Genom

Pada saat ayam penelitian berumur 12 minggu, darah diambil lewat vena sayap (vena brakhialis) menggunakan spuit insulin 1 cc dan dimasukkan ke tabung EDTA 5 mL. Ekstraksi DNA genom dilakukan menurut cara kerja Sulandari dan Zein (2003), yaitu DNA genom yang diperoleh dari 250 µL darah dimasukkan ke dalam tabung *ependorf*, dan ditambahkan

250 μL *lysis buffer* dan digoyang dengan tangan selama 15 menit, disentrifugasi pada 8500 rpm dalam suhu kamar selama empat menit. Supernatant yang didapat dibuang dan endapannya ditambahkan 250 μL *rinse buffer* dan digoyang menggunakan tangan sampai endapan larut dan kemudian divorteks. Selanjutnya ditambahkan 250 μL *digestion buffer* dan digoyang menggunakan tangan selama 10 menit dan divorteks, berikutnya sampel diinkubasi dalam penangas air pada suhu 55°C selama 16 jam. Setelah ditambahkan 400 μL phenol, lalu digoyang dengan tangan selama 30 menit dan disentrifugasi pada 14000 rpm dalam suhu kamar selama 10 menit. Supernatant yang berwarna putih telur dipindahkan ke dalam tabung *effendorf* baru dan ditambahkan phenol chloroform dengan perbandingan 1 : 1, dan digoyang menggunakan tangan selama 30 menit serta divorteks. Setelah disentrifugasi selama 10 menit pada 14000 rpm dalam suhu kamar, supernatant dipindah ke tabung *effendorf* baru dan ditambahkan ethanol 100% sebanyak dua kali volume sampel. Sampel digoyang dengan tangan selama 10 menit, dan dimasukkan ke dalam suhu -20°C selama lima menit. Setelah disentrifugasi pada suhu kamar (14000 rpm selama 10 menit), supernatant dibuang dan dicuci menggunakan 600 μL ethanol 75%. Setelah sentrifugasi terakhir, ethanol dibuang perlahan-lahan agar *pellet* tidak ikut terbuang. Tahapan terakhir adalah mengeringkan material/*pellet* DNA pada suhu kamar.

Amplifikasi Polymerase Chain Reaction (PCR) gen HSP-70

Sampel DNA yang diperoleh dari masing-masing ternak dipergunakan sebagai cetakan (*template*) untuk mengamplifikasi lokus-lokus gen melalui PCR menggunakan primer *Forward* 5' AACCGCACCACCCAGCTATG 3' dan *Reverse* 5' CTGGGAGTCGTTGAAGTAAGCG 3' (359 bp) (Mazzi *et al.*, 2003). Metode PCR kondisikan pada volume 10 μL (1 μL 10 X *ex taq buffer*, 0,5 μL primer HSP-70 F dan 0,5 μL primer HSP-70 R, 1 μL dNTP mix, 0,5 μL *template* DNA, 0,07 μL *ex taq* dan 6,43 μL dH_2O). Reaksi PCR dimulai dengan denaturasi awal pada 95°C selama lima menit, selanjutnya dilakukan amplifikasi selama 35 siklus, masing-masing pada 95°C selama 30 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama satu menit, kemudian diakhiri elongasi akhir pada 72°C selama lima menit.

Analisis Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Pelaksanaan analisis *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) mengacu pada metode yang digunakan oleh Mazzi *et al.*, (2003) yaitu dengan cara melarutkan endapan DNA yang didapat ke dalam 15 mikroliter larutan SSCP *buffer* (95% formamide, 20 mM EDTA, 0,05% *bromofenol blue* dan 0,05% xilen sianol). Campuran didenaturasi pada suhu 100°C selama lima menit, kemudian didinginkan selama lima menit dengan es dan dimasukkan ke dalam sumuran gel akrilamid-bis akrilamid 12-20% (49:1). Elektroporesis dilakukan dalam *buffer* 1 X TBE pada 100 volt selama 24 jam kemudian dilanjutkan dengan *silver staining* menurut cara kerja Wright *et al.*, (1996). Penentuan posisi pita DNA pada gel poliakrilamid dilakukan secara manual. Ukuran dan jumlah alel yang muncul pada gel ditentukan berdasarkan asumsi bahwa semua pita DNA dengan laju migrasi yang sama adalah homolog, sedangkan alel dengan migrasi paling lambat ditetapkan sebagai alel A, berikutnya adalah alel B dan seterusnya.

Analisis Sekuensing

Jumlah sampel yang disekuensing sebanyak tujuh sampel (masing-masing satu sampel dari tujuh genotipe gen HSP-70 hasil analisis SSCP). Analisis sekuensing menggunakan produk PCR yang dimurnikan. Produk alikuot murni digunakan untuk kuantifikasi dalam 1% gel agarose dan sekitar 50-100 ng dari produk tersebut digunakan untuk sekuensing dalam reaksi dengan buffer sekuensing (0.5x), 2 μL *Big Dye* (versi 3), 5 pmol primer F atau R dan air steril, sehingga volume akhir mencapai 10 μL . Setelah 35 siklus reaksi (95°C selama 30 detik; 60°C selama 30 detik dan 72°C selama 1 menit), sampel dicuci dengan 80 μL isopropanol 75% selama 15 menit dan disentrifugasi pada 4.500 rpm selama 25 menit pada suhu 20°C. Sampel dicuci menggunakan 200 μL etanol 70% dan disentrifugasi pada 4.500 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C. Sampel tersebut kemudian divakum kering dan dimuat ke gel poliakrilamid di ABI-377 DNA *sequencer* (Perkin Elmer).

Analisis Data

Data keragaman gen HSP-70 yang diperoleh, dicari frekuensi alel dan frekuensi genotipe (Nei, 1987), nilai *Chi-square* (Hartl dan Clark, 1997), nilai heterosigositas observasi dan heterosigositas harapan (Nei 1987) serta nilai *polymorphic informative content* (PIC) (Botstein *et al.*, 1980)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Frekuensi Genotipe dan Alel Gen *Heat Shock Protein-70* (HSP-70)

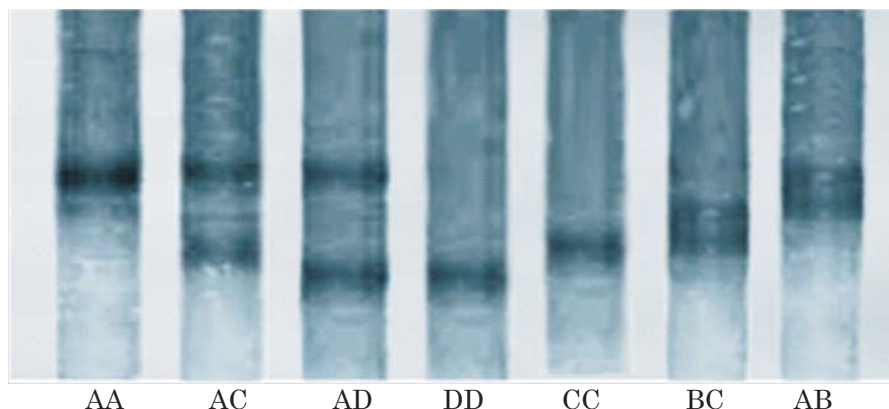
Hasil analisis genotipe gen HSP-70 ayam menggunakan *Single Strand Comformation Polymorphism* disajikan pada Gambar 1, sedangkan hasil sekuensing genotipe HSP-70 disajikan pada Gambar 2.

Hasil *genotyping* memberikan informasi bahwa hasil analisis gen HSP-70 ayam menggunakan PCR-SSCP didapat empat alel, yaitu alel A, B, C, dan D serta tujuh genotipe, yaitu genotipe AA, AB, AC, CC, AD, DD, dan BC. Sebanyak tujuh genotipe terdapat pada ayam kampung, yaitu AA, AB, AC, CC, AD, DD, dan BC, enam genotipe pada ayam arab, yaitu AA, AB, AC, CC, AD, dan BC, serta satu genotipe pada ayam ras, yaitu genotipe DD. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ayam kampung mempunyai keragaman gen HSP-70 yang tertinggi dibandingkan dengan ayam arab dan ayam ras petelur. Tingkat polimorfisme yang ditemukan pada penelitian ini lebih tinggi dibanding yang dilaporkan oleh Mazzi *et al.*, (2003) pada ayam *hubbard*, *label rouge*, *breed PP1* yang hanya mendapatkan tiga alel dan lima genotipe.

Tingginya keragaman kombinasi gen HSP-70 pada ayam kampung dan ayam arab merupakan peluang dilakukannya seleksi untuk mendapatkan genetik ayam yang lebih toleran pada suhu lingkungan yang tinggi, karena ternak dengan keragaman kombinasi gen yang tinggi mempunyai kemampuan beradaptasi lebih baik dengan lingkungan pemeliharaan (Noor dan Seminar, 2009).

Data pada Gambar 2 memberikan informasi bahwa gen HSP-70 yang diperoleh dari hasil

sekuensing mempunyai persamaan dengan gen HSP-70 ayam yang terdapat *di Gene Bank* (no akses AY143693) dan didapat tujuh situs (lokasi) polimorfik, yaitu perubahan A→G pada situs 617, perubahan A→G pada situs 628, perubahan G→C pada situs 646, perubahan C→T pada situs 661, perubahan A→G pada situs 699, perubahan G→C pada situs 754, dan perubahan A→G pada situs 792. Perubahan A→G pada situs 628 menyebabkan perubahan TGC menjadi TCA, perubahan G→C pada situs 646 menyebabkan perubahan CCG menjadi CCC, dan perubahan C→T pada situs 661 menyebabkan perubahan AAC menjadi AAT. Ketiga situs mutasi ini tidak mengubah asam amino, karena TGC dan TCA pada situs 628 sama-sama menyandi asam amino serina; CCG dan CCC pada situs 646, sama-sama menyandi asam amino metionina; AAC dan AAT pada situs 661 sama-sama menyandi asam amino asparagina. Lain halnya dengan mutasi pada situs 617, perubahan A→G menyebabkan perubahan ACA (penyandi asam amino trionina) menjadi GCA yang menyandi asam amino alanina. Mutasi pada situs 699 perubahan A→G menyebabkan GGT yang menyandi asam amino glisina berubah menjadi GAT (penyandi asam aspartat). Pada mutasi di situs 754, perubahan G→C menyebabkan ATG yang menyandi asam amino metionina berubah menjadi ATC (penyandi asam amino isoliosina), sedangkan mutasi pada situs 792, CAG (penyandi asam amino glutamina) berubah menjadi CGG yang menyandi asam amino arginina. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa dari ketujuh situs polimorfik tersebut tiga di antaranya (situs 626, 646 dan 661) tergolong *silent mutation* karena tidak mengubah asam amino protein HSP 70.



Gambar 1. Genotipe *Heat Shock Protein* (HSP)-70 yang diperoleh menggunakan PCR-SSCP

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, frekuensi genotipe tertinggi pada ayam kampung adalah genotipe AD, selanjutnya diikuti oleh genotipe AA, genotipe AC dan DD (frekuensi sama), genotipe AB, dan genotipe CC dan BC (frekuensi sama). Pada ayam arab, frekuensi genotipe tertinggi adalah genotipe AC, selanjutnya diikuti oleh genotipe BC, AB, AD, CC, dan terendah adalah genotipe AA, sedangkan pada ayam ras hanya terdapat satu genotipe, yaitu genotipe DD (Tabel 1).

Frekuensi genotipe HSP-70 ayam kampung setelah dirinci berdasarkan sumber materi genetik, materi genetik yang berasal dari daerah dataran rendah dan sedang didapatkan pola yang sama dengan frekuensi genotipe ayam kampung secara keseluruhan, hanya populasi ayam kampung yang materi genetiknya dari daerah dataran tinggi yang memperlihatkan fenomena yang berbeda, yaitu frekuensi genotipe tertinggi adalah AA, selanjutnya diikuti oleh genotipe AD, DD, AC, AB dan frekuensi terendah adalah genotipe CC dan BC (frekuensi sama) (Tabel 1). Ayam kampung lombok termasuk ayam lokal dengan keragaman genetik dan

ekspansi populasi yang tinggi. Perkawinan antarindividu masih terjadi secara acak dan terbuka, dengan demikian masih mempunyai keragaman genetik yang baik (Zein dan Sulandari, 2008).

Frekuensi alel gen HSP-70 tertinggi pada ayam kampung adalah alel A, diikuti oleh alel D, C, dan B. Pola sebaran alel yang sama juga terjadi pada ayam kampung setelah dirinci berdasarkan sumber materi genetik. Pada ayam arab, frekuensi alel tertinggi adalah alel A dan C (frekuensi sama), selanjutnya diikuti oleh alel B dan D, sementara pada ayam ras hanya terdapat satu alel, yaitu alel D.

Hasil penelitian ini memberikan informasi bahwa terdapat perbedaan jumlah, frekuensi genotipe, dan genotipe dominan serta frekuensi dan alel dominan gen HSP-70 pada ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras. Perbedaan ini menerangkan bahwa antara ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras mempunyai pola keragaman gen HSP-70 yang berbeda, yang sekaligus memperjelas bahwa ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras petelur merupakan tiga jenis ayam yang berbeda. Ayam kampung

Tabel 1. Frekuensi genotipe *heat shock protein* (HSP)-70 ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras

Jenis ayam/sumber materi genetik	n	Frekuensi genotipe HSP-70						
		AA	AB	AC	CC	AD	DD	BC
Ayam kampung	96	0,271	0,083	0,125	0,031	0,333	0,125	0,031
• Dataran rendah	36	0,222	0,083	0,139	0,028	0,361	0,139	0,028
• Dataran sedang	33	0,273	0,091	0,121	0,030	0,364	0,091	0,030
• Dataran tinggi	27	0,333	0,074	0,111	0,037	0,259	0,148	0,037
Ayam arab	94	0,074	0,149	0,415	0,096	0,106	0,000	0,160
Ayam ras	87	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000

Keterangan: n = jumlah sampel

Tabel 2. Frekuensi alel gen *heat shock protein-70* ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras

Jenis ayam/sumber materi genetik	n	Frekuensi alel gen HSP-70			
		A	B	C	D
Ayam kampung	96	0,542	0,057	0,109	0,292
• Dataran rendah	36	0,514	0,056	0,111	0,319
• Dataran sedang	33	0,561	0,061	0,106	0,273
• Dataran tinggi	27	0,556	0,056	0,111	0,278
Ayam arab	94	0,410	0,154	0,383	0,053
Ayam ras	87	0,000	0,000	0,000	1,000

Keterangan: n = jumlah sampel

lombok merupakan ayam lokal yang diturunkan dari *Gallus-gallus* yang didomestikasi dan berkembang biak di Indonesia, sedangkan ayam arab merupakan ayam pendatang, yaitu ayam *braekel kriel silver* dan *braekel kriel gold*, yaitu ayam lokal Eropa dan di Indonesia dikenal dengan nama ayam arab (Sulandari *et al.*, 2007), sedangkan ayam ras merupakan jenis ayam introduksi yang didatangkan dari daerah bersuhu dingin.

Keragaman gen HSP-70 pada beberapa jenis ayam pernah dilaporkan Mazzi *et al.*, (2003) dengan meneliti *breed Hubbard-Pettersen*, *breed PP1* dan *breed Label Rouge*. Dilaporkan bahwa pada *breed Hubbard-Pettersen* terdapat tiga genotipe dengan frekuensi genotipe tertinggi

adalah genotipe HSP-70-1/HSP-70-2; pada ayam PP1 juga terdapat tiga genotipe dengan frekuensi tertinggi adalah genotipe HSP-70-1/HSP-70-1, sementara pada ayam *breed Label Rouge*, hanya didapatkan dua genotipe, dengan nilai frekuensi tertinggi adalah genotipe HSP-70-1/HSP-70-2. Keragaman gen HSP-70 menggunakan SNP pada situs A258G dan C276G telah dilaporkan oleh Zhen *et al.*, (2006). Penelitian itu menggunakan ayam F2 dari silangan *Xinghua* dengan *White Rocks*, silangan ayam *Xinghua* dengan *Taihe Silkies*, serta ayam *Yangshan*, dan dilaporkan bahwa ayam hasil silangan antara *Xinghua* dengan *White Rocks* pada situs A258G didominasi oleh genotipe AG, sedangkan pada situs C276G didominasi oleh genotipe CC. Pada

	605	615	625	635	645	655
AY143693
AA	GGCCGCAAGT	ATGATGACCC	CACAGTGCAG	TCAGACATGA	AGCACTGGCC	TTCCGTGTG
AB	-----	-----	-----	--r-----	-----	s-----
AC	-----	-----	-----	--r-----	-----	-----
CC	-----	-----	-----	--G-----	-----	s-----
AD	-----	-----	-r-----	-----	-----	-----
DD	-----	-----	-----	-----	-----	C-----
BC	-----	-----	-----	--r-----	-----	s-----
	665	675	685	695	705	715
AY143693
AA	GTGAACGAGG	GTGGCAAGCC	CAAGGTGCAG	GTGGAGTACA	AGGGTGTAGAT	AAGACCTTC
AB	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC	-----y-----	-----	-----	-----	-----	-----
CC	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DD	-----	-----	-----	-----	-----r-----	-----
BC	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	725	735	745	755	765	775
AY143693
AA	TTCCCAGAGG	AGATCAGCTC	TATGGTGTCTC	ACCAAGATGA	AGGAGATTGC	GAGGCCTAT
AB	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CC	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD	-----	-----	-----	-----s-----	-----	-----
DD	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BC	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	785	795	805	815	825	835
AY143693
AA	CTGGGAAAAA	AGGTACAGAA	TGCTGTATC	ACAGTGCCCG	CTTACTTCAA	GACTCCCAG
AB	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CC	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AD	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DD	-----	-----r-----	-----	-----	-----	-----
BC	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Gambar 2. Hasil sekuensing gen *heat shock protein* (HSP)-70 ayam

Tabel 3 Nilai χ^2 (Chi-square) ayam kampung dan rincian berdasarkan sumber materi genetik, serta ayam arab dan ayam ras petelur

Tipe ayam/sumber materi genetik	χ^2 (Chi-square)	Taraf nyata
Ayam kampung (gabungan)	18.455	**
· Dataran rendah	7.007	tn
· Dataran sedang	8.192	tn
· Dataran tinggi	8.200	tn
Ayam arab	27.211	**
Ayam ras	-	-

Keterangan: Nilai χ^2 ayam ras tidak dihitung karena hanya terdapat 1 genotipe (monomorfik), ** = Sangat berbeda nyata ($\chi^2_{hitung} > \chi^2_{tabel}$), tn= tidak berbeda nyata ($\chi^2_{hitung} < \chi^2_{tabel}$)

Tabel 4 Nilai heterozigositas pengamatan (Ho), heterozigositas harapan (He), dan nilai PIC gen HSP 70 ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras

Tipe ayam/sumber materi genetik	n	H _{observasi}	H _{expected}	Nilai PIC
Ayam kampung (gabungan)	96	0.573	0.609	0.606
· Dataran rendah	36	0.611	0.627	0.618
· Dataran sedang	33	0.606	0.625	0.596
· Datan tinggi	27	0.598	0.610	0.599
Ayam arab	94	0.830	0.662	0.659
Ayam ras	87	0.000	0.000	0.000

Keterangan: n = jumlah sampel, Ho = heterozigositas pengamatan, He = heterozigositas harapan, PIC = *Polymorphic Informative Content*

kelompok ayam hasil silangan *Xinghua* dengan *Taihe Silkies* pada situs A258G, frekuensi genotipe didominasi oleh genotipe AA, pada situs C276G frekuensi genotipe tertinggi adalah genotipe CC, sedangkan pada ayam *Yangshan* di situs A258G frekuensi genotipe tertinggi adalah AA, dan pada situs C276G frekuensi tertinggi adalah CG.

Keseimbangan Gen dalam Populasi

Pada Tabel 3 terlihat bahwa hasil uji Chi-square (χ^2) terhadap gen HSP 70 pada populasi ayam kampung di Pulau Lombok (gabungan ayam kampung dari dataran rendah, sedang dan tinggi) serta ayam arab, tidak berada pada keseimbangan Hardy-Weinberg ($\chi^2_{hitung} > \chi^2_{tabel}$). Setelah dirinci berdasarkan sumber materi genetik (tempat pengambilan telur tetas), ternyata ayam kampung yang berasal dari daerah dataran rendah, sedang dan dataran tinggi, masing-masing berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg ($\chi^2_{hitung} < \chi^2_{tabel}$). Ayam kampung yang berada di masing-masing daerah pengambilan sampel (dataran rendah,

sedang dan dataran tinggi) mempunyai peluang kawin secara acak di tempat masing-masing, sehingga keragaman gen HSP 70 pada populasi ayam tersebut tidak menyimpang dari rasio harapan. Ayam kampung tergolong ternak unggas yang mempunyai daya jelajah rendah, akibatnya adalah ayam kampung yang berada di daerah dataran rendah, tidak dapat kawin secara acak dengan ayam kampung yang berada di daerah dataran sedang dan dataran tinggi, demikian pula halnya ayam kampung yang berada di daerah dataran sedang tidak dapat kawin secara acak dengan ayam yang berada di daerah dataran tinggi. Hal inilah yang menyebabkan penggabungan populasi ayam yang berasal dari ketiga tempat pengambilan sampel tersebut keragaman gen HSP 70-nya menyimpang dari rasio harapan. Lain halnya dengan gen HSP 70 pada populasi ayam arab yang berada pada keadaan *non equilibrium*. Penyebabnya adalah ayam arab merupakan ayam yang dipelihara dengan pola bibit berasal dari sumber yang sama, serta sudah mengalami seleksi untuk tujuan produksi telur.

Nilai Heterosigositas dan Nilai PIC (*Polymorphic informative Content*)

Nilai heterosigositas pengamatan (H_o), nilai heterosigositas harapan (H_e) dan nilai PIC gen HSP 70 ayam kampung, ayam arab, dan ayam ras disajikan pada Tabel 4. Pada populasi ayam kampung (dataran rendah, sedang, dan tinggi) serta ayam arab, nilai H_o dan PIC tidak menunjukkan perbedaan yang mencolok. Terlihat juga bahwa nilai H_o tidak menunjukkan perbedaan yang besar dibandingkan dengan nilai H_e . Hal ini memberikan petunjuk bahwa frekuensi genotipe HSP 70 yang dianalisis dalam keadaan keseimbangan. Jika terjadi perbedaan yang mencolok antara nilai H_o dan nilai H_e maka kondisi itu dapat dipergunakan sebagai indikator adanya ketidakseimbangan genotipe pada populasi yang dianalisis (Tambasco *et al.*, 2003). Hartl dan Clark (1997) menyatakan bahwa nilai H_o dan nilai H_e dapat dipergunakan sebagai salah satu cara untuk menduga nilai koefisien silang dalam (*inbreeding*) pada suatu kelompok ternak.

Nilai PIC tergolong rendah bila nilainya lebih kecil dari 0,25, tergolong sedang bila nilainya berkisar antara 0,25 sampai dengan 5,0, serta tergolong tinggi bila diperoleh nilai lebih dari 0,5 (Botstein *et al.*, 1980). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ayam kampung dan ayam arab dalam penelitian ini mempunyai tingkat informasi polimorfisme genetik yang tinggi. Nilai PIC selain dapat dipergunakan sebagai dasar penentuan tingkat informasi genetik, juga dapat dipergunakan untuk keperluan penentuan keberadaan alel polimorfik, yaitu fungsi yang sama dengan nilai heterosigositas. Nilai heterosigositas selalu lebih tinggi dibandingkan dengan nilai PIC, karena nilai PIC merupakan nilai heterosigositas yang dikoreksi (Hildebrand, 1992).

SIMPULAN

Gen HSP 70 bersifat polimorfik pada ayam kampung dan ayam arab, serta monomorfik pada ayam ras. Tujuh genotipe, yaitu AA, AB, AC, CC, AD, DD, dan BC, ditemukan pada ayam kampung, dengan frekuensi tertinggi genotipe AD dan alel A. Pada ayam arab, ditemukan enam genotipe, yaitu AA, AB, AC, CC, AD, dan BC, dengan frekuensi tertinggi genotipe AC dan alel A. Pada ayam ras hanya terdapat satu genotipe, yaitu DD. Tujuh situs polimorfik ditemukan pada gen HSP 70, yaitu mutasi A→G

pada situs 617, mutasi A→G pada situs 628, mutasi G→C pada situs 646, mutasi C→T pada situs 661, mutasi A→G pada situs 699, mutasi G→C pada situs 754, dan mutasi A→G pada situs 792. Mutasi pada situs 628, 646 dan 661 tergolong *silent mutation*. Gen HSP 70 pada populasi ayam kampung dan ayam arab berada dalam *non equilibrium*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian mengenai keragaman gen HSP yang lain, dalam upaya mendapatkan data gen ketahanan panas ayam lokal Indonesia

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya disampaikan kepada Dr Muhammad Ali, dan drh Made Sriasih MAgSc, PhD (Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Peternakan Universitas Mataram) atas dukungan dan bantuannya selama penelitian berlangsung. Terima kasih dan penghargaan juga disampaikan kepada Susilawati, SSi dan Dedi Iswaini, SPt (tenaga laboran laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fak. Peternakan Universitas Mataram). Semoga semua bantuannya bernilai ibadah disisi Allah SWT.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajakaiye JJ, Ayo JO, Ojo SA. 2010. Effects of heat stress on some blood parameters and egg production of Shica Brown layer chickens transported by road. *Biol Res* 43: 183-189.
- Al-Aqil A, Zulkifli I. 2009. The changes in heat shock protein 70 expression and blood characteristics in transported broiler chickens as affected by housing and early age feed restriction. *Poult Sci* 88 : 1358-1364.
- Al-Fataftah AA, Abu-Dieyeh ZHM. 2007. Effect of Chronic Heat Stress on Broiler Performance in Jordan. *Int J Poult Sci* 6 (1) : 64-70
- Alfataftah AA, 1987. Effects of high environmental temperature on broiler performance (Review). *J Dirasat* 14 : 177-191.

- Al-Ghamdi ZH. 2008. Effects of commutative heat stress on immunoresponses in broiler chickens reared in closed system. *Int J Poult Sci* 7(10) : 964-968.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of genetic linkage map in human using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32 : 314-331.
- Czaririck III M, Fairchild BD. 2008. Poultry Housing for Hot Climates. In: Nuhad J. Dagher (ed.). *Poultry Production in Hot Climates*. Trowbridge. Cromwell Press, Pp: 81-131.
- Etches RJ, John TM AND Verrinder Gibbins AM. 2008. Behavioural, Physiological, Neuroendocrine and Molecular Responses to Heat Stress. In: Nuhad J. Dagher (ed.). *Poultry Production in Hot Climates*. Pp: 49-69.
- Faisal, B.A., Abdel-Fatah, S.A. El-Hommosany, Y.M. Abdel-Gawad, N.M, Ali M.F.M. 2008. Immunocompetence, hepatic heat shock protein 70 and physiological responses to feed restriction and heat stress in two body weight lines of Japanese quail. *Int J Poult Sci* 7(2) : 174-183.
- Falconer DS, Mackay TFC. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Fourth Ed. New York Longman Inc.
- Garriga C, Hunter RR, Amat C, Planas JM. 2006. Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290 : 195-201.
- Gaviol HCT, Gasparino E, Prioli AJ, Soares MAM. 2008. Genetic evaluation of the HSP70 protein in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Genet Mol Res* 7(1) : 133-139.
- Gunawan, Sihombing DTH. 2004. Pengaruh suhu lingkungan tinggi terhadap kondisi fisiologis dan produktivitas ayam buras. *Wartazoa* 14 (1) : 31-38.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principle of Population Genetic*. Sunderland Sinauer Associates., MA.
- Hildebrand CE, David C, Torney, Wagner RP. 1992. *Informativness of Polymorphic DNA Markers*. Brazil. Los Alamos Sciences.
- Lin H, Zhang HF, Du R, Gu XH, Zhang ZY, Buyse J, Decupere E. 2005. Thermoregulation responses of broiler chickens to humidity at different ambient temperatures. II. Four weeks of age. *Poult Sci* 84 : 1173-1178.
- Machado MA, Schuster I, Martinez ML, Compos AL. 2003. Genetic diversity of four breeds using microsatellite marker. *Rev Bras De Zool* 32 : 93-98.
- Mazzi CM, Ferro JA, Ferro MIT, Savino VJM, Coelho AAD, Macari M. 2003. Polymorphism analysis of the *hsp70* stress gene in Broiler chickens (*Gallus gallus*) of different breeds. *Genet Mol Biol* 26(3) : 275-281.
- Mujahid A, Akiba Y, Toyomi M. Acute Heat Stress Induces Oxidative Stress and Decreases Adaptation in Young White Leghorn Cockerels by Downregulation of Avian Uncoupling Protein. *Poult Sci* 86 : 364-371
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York. Columbia University Press.
- Noor RR 2010. *Genetika Ternak*. Jakarta. Penebar Swadaya. Hal:200.
- Noor RR, Seminar KB. 2009. Rahasia dan Hikmah Pewarisan Sifat (Ilmu Genetika dalam Al-Qur'an). Bogor. Penerbit IPB Press. Hal:109.
- Sartika T, Iskandar S. 2007. *Mengenal Plasma Nutfah Ayam Indonesia dan Pemanfaatannya*. Balai Penelitian Ternak. Bogor. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Bogor.
- Sohail MU, Ijaz A, Yousaf MS, Ashraf K, Zaneb H, Aleem M, Rehman H. 2010. Alleviation of cyclic heat stress in broilers by dietary supplementation of mannan-oligosaccharide and *Lactobacillus*-based probiotic: Dynamics of cortisol, thyroid hormones, cholesterol, C-reactive protein, and humoral immunity. *Poult Sci* 89 : 1934-938
- Sulandari S, Zein MSA, Paryanti S, Sartika S. 2007. Taksonomi dan asal usul ayam domestikasi. *Keanekaragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia. Manfaat dan Potensi*. Bogor Pusat Penelitian Biologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Pp: 5-23.

- Sulandari S dan Zein MSA. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi. Bogor. Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Tambasco, DD, Paz, CCP, Tambasco-Studart, M, Pereira, AP, Alencar, MM, Freitas, AR, Coutinho, LL, Packer, IU, Regitano, LCA. 2003. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos Taurus* x *Bos indicus*. *J Anim Breed Genet* 120 : 51-56
- Vasconcellos LPMK, Talhari DT, Pereira AP, Coutinho LL, Regitano LCA. 2003. Genetic characterization of Aberden Angus cattle using moluculer markers. *Genet Mol Biol* 26 : 133-137.
- Virden WS, Kidd MT. 2009. Physiological stress in broilers: Ramifications on nutrient digestibility and responses. *J. Appl Poult Res* 18 : 338–347.
- Zein MSA, Sulandari S. 2008. Keragaman Genetik Ayam Lombok Berdasarkan Sekuen D-LOOP DNA Mitokondria. *JITV* 13(4): 307-314.
- Zhen FS, Du HL, Xu HP, Luo QB, Zhang XQ. 2006. Tissue and allelic-specific expression of HSP 70 gene in chickens: basal and heat-stress-induced mRNA level quantified with real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Brit Poul Sci* 47 : 449–455.
- Zulkifli I, Al Aqil A, Omar AR, Sazili AQ, Rajion A. 2009. Crating and heat stress influence blood parameters and heat shock protein 70 expression in broiler chickens showing short or long tonic immobility reactions. *Poult Sci* 88 : 471-476.