

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum tentang Ayam Kampung

Suprijatna dkk. (2005) mengemukakan taksonomi ayam kampung adalah sebagai berikut : Kingdom : Animalia, Phylum : Chordata, Subphylum : Vertebrata, Class : Aves, Subclass : Neornithes, Ordo : Galliformes, Genus : Gallus, Spesies : *Gallus domesticus*. Ayam kampung merupakan salah satu rumpun ayam asli Indonesia (Permentan No.36/Permentan/OT.140/8/2006). Ayam kampung dijumpai di semua propinsi dan di berbagai macam iklim atau daerah. Umumnya ayam kampung dipelihara di daerah pedesaan yang dekat dengan sawah atau hutan secara tradisional (Darwati, 2000). Ayam kampung kemungkinan berasal dari pulau Jawa. Ayam-ayam yang diternakkan saat ini (*Gallus domesticus*) berasal dari ayam hutan (*Gallus varius*) di Asia Tenggara. Saat ini ayam hutan sudah tersebar sampai ke Pulau Nusa Tenggara (Rasyaf, 2006).

Ayam kampung memiliki karakteristik sifat kualitatif yang beragam pada warna bulu, *shank*, bentuk jengger dan cuping telinga. Sulandari *et al.*, (2007) menyatakan sifat fenotip dan genotip ayam kampung masih sangat bervariasi. Wibowo (1996) menambahkan ragam warna ayam kampung mulai dari hitam, putih, kekuningan, kecoklatan, merah tua, dan kombinasi dari warna-warna. Menurut Rasyaf (2006) warna bulu pada ayam kampung tidak dapat diandalkan sebagai patokan yang baku, karena berubah terus-menerus. Misalnya induknya berwarna coklat bintil-bintil hitam dan jagonya berwarna kemerahan campur hitam, tetapi anaknya berbulu putih atau warna campuran pada anak yang lain.

Badan ayam kampung berukuran kecil, baik ayam penghasil telur maupun penghasil daging. Badannya tidak dapat dibedakan karena memang ayam kampung tidak dibedakan atas penghasil telur atau daging (Rasyaf, 2006). Ukuran badan dan kepala ayam kampung betina lebih kecil dibandingkan dengan ayam kampung jantan (Rasyaf, 1990). Produktivitas ayam kampung masih rendah, rata-rata per tahun 60 butir dengan berat telur rata-rata 30 gram/butir. Bobot badan dewasa ayam kampung adalah 1,5-1,8 kg pada jantan dan 1,0-1,4 kg pada betina (Sulandari *et al.*, 2007). Induk betina mulai bertelur saat berumur sekitar 190 hari atau 6 bulan. Induk betina ini mampu mengerami 8 sampai 15 butir telur. Setelah telur menetas induk ayam akan mengasuh anaknya sampai lepas saph. Aisjah dan Rahmat (1989) menyatakan pertambahan bobot badan anak ayam kampung yang dipelihara intensif antara umur 6 sampai 8 bulan rata rata 373,4 g dan yang dipelihara secara ekstensif adalah 270,67 g. Ayam kampung mempunyai 3 periode produksi sebagaimana ayam ras petelur yaitu periode *stater* (umur 1 – 8 minggu), periode *grower* (umur 9 – 20 minggu), dan periode *layer* (umur lebih dari 20 minggu) (Mulyono, 2004).

2.2. Gen Mx

Maeda (2005) telah menemukan gen penciri ketahanan terhadap flu burung pada ayam yaitu gen Mx. Gen Mx (*myxovirus resistance*) adalah kode gen untuk protein dengan aktivitas antivirus. Gen Mx ditemukan di beberapa spesies vertebrata (Haller *et al.*, 2007). Secara khusus, protein MX1 telah menunjukkan memberi perlawanan terhadap virus influenza (Salomon *et al.*, 2007; Tumpey *et al.*, 2007).

Gen Mx merupakan gen kandidat penciri flu burung yang terletak pada kromosom 1, dengan panjang fragmen 20.767 pasang basa (pb), terdiri atas 13 exon, daerah yang mengkode protein (*coding region*) sebanyak 2.115 pb atau 705 asam amino. Resistensi flu burung ditemukan pada exon 13 nukleotida nomor 1.892 yaitu adanya mutasi basa transisi (*single mutation*). Substitusi asam amino pada posisi 631 diidentifikasi dan digunakan untuk menentukan perbedaan antara aktivitas antiviral pada ayam terkait dengan gen Mx. Mutasi basa yang terjadi adalah pasangan basa AT menjadi GC (purin menjadi purin), sehingga menyebabkan perubahan asam amino serin (Ser) menjadi asparagin (Asn). Adanya asam amino asparagin pada nukleotida nomor 1.892 exon 13 menandakan ayam tahan terhadap flu burung ditandai dengan gen Mx⁺. Apabila terjadi mutasi asam amino asparagin menjadi asam amino serin maka ayam rentan terhadap flu burung ditandai dengan Mx⁻. Asam amino asparagin (Asn) berkaitan dengan aktivitas antiviral positif, yang dikenal dengan Mx⁺, sedangkan serin (Ser) berkaitan dengan aktivitas antiviral negatif atau (Mx⁻) (Ko *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006; Seyama *et al.*, 2006; Watanabe, 2007).

Pada awalnya, efek gen Mx belum diketahui secara jelas. Dalam studi *in vitro* gen Mx tidak memiliki aktivitas antivirus terhadap virus influenza pada itik (Bazzigher *et al.*, 1993) dan ayam (Bernasconi *et al.*, 1995). Penelitian gen Mx pada embrio ayam yang menemukan tidak identiknya polimorfisme G/A pada posisi 2.032 cDNA Mx (Nomor Akses Z23168) yang mengakibatkan serin disubstitusi menjadi asparagin pada posisi 631 protein Mx tampaknya mempengaruhi aktivitas antivirus dari molekul (Ko *et al.*, 2002). Namun, tidak ditemukan hubungan antara genotipe Mx polimorfisme G/A dengan kelangsungan

hidup ayam percobaan yang diinfeksi secara *in vitro* dengan virus H7N1 flu burung patogenik tinggi (Sironi *et al.*, 2008). Hasil yang sama diperoleh oleh Benfield *et al.*, (2008) dimana alel Mx Asn631 tidak menghambat replikasi *in vitro* 5 strain influenza. Tetapi kemudian penelitian Ko *et al.*, (2002) menemukan bahwa ayam varian Mx Asn631 memberikan aktivitas antivirus melawan stomatitis vesikuler virus dan virus influenza H5N1 pada transfeksi ke sel-sel T3.

Penelitian Maeda (2005) menunjukkan bahwa pada ayam Asia terdapat gen pembawa sifat resisten dan sifat rentan terhadap flu burung. Di Indonesia ditemukan sebanyak 63% populasi ayam lokal tahan terhadap flu burung dan 37% sisanya rentan terhadap flu burung. Dalam penelitian tersebut, jumlah sampel yang dianalisa adalah 330. Hasil tersebut kemudian dikonfirmasi oleh Sulandari *et al.*, (2009) yang menggunakan metode PCR RFLP pada 492 sampel dari 15 rumpun ayam Indonesia yang berasal dari Jawa, Sumatera, Kalimantan, dan Sulawesi. Hasilnya adalah bahwa frekuensi alel dalam populasi ayam yang resisten terhadap flu burung lebih tinggi daripada frekuensi alel dalam populasi ayam yang rentan terhadap flu burung, dengan rasio 62.73% dibanding 37.27%. Artinya, secara genetik, mayoritas rumpun ayam Indonesia memiliki daya tahan terhadap virus flu burung; dan ini temuan penting dalam konteks industrialisasi ayam ke depan terkait dengan kasus flu burung.

2.3. Analisis Keragaman DNA dengan Metode PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Keragaman genetik juga dapat dilihat pada perbedaan di dalam urutan DNA antara individu, kelompok, atau populasi-subpopulasi. Sumber keragaman ini adalah *Single Nucleotide Polimorphisme* (SNP), adanya pengulangan urutan

sekuen, insersi, delesi, dan rekombinasi (Nei dan Kumar, 2000). Menurut Kirby (1990) keragaman genetik atau polimorfisme genetik adalah terdapatnya lebih dari satu bentuk atau macam genotipe di dalam populasi. Keragaman genetik bisa dilihat dari sifat-sifat eksternal sampai urutan asam amino dan protein lainnya.

Identifikasi keragaman genetik dalam suatu populasi digunakan untuk mengetahui dan melestarikan bangsa-bangsa dalam populasi terkait dengan penciri suatu sifat khusus (Notter, 1999). Populasi alami biasanya memiliki keragaman genetik yang tinggi. Informasi keragaman genetik suatu bangsa akan sangat bermanfaat bagi keamanan, dan ketersediaan bahan pangan yang berkesinambungan (Blott *et al.*, 2003). Nei dan Kumar (2000) menyatakan bahwa populasi dinilai beragam jika memiliki dua atau lebih alel dalam satu lokus dengan frekuensi yang cukup (biasanya lebih dari 1%). Tingkat keragaman dalam populasi dapat digambarkan dari frekuensi alel. Frekuensi alel merupakan rasio relatif suatu alel terhadap keseluruhan alel yang ditemukan dalam satu populasi (Nei dan Kumar 2000). Ukuran tinggi rendahnya keragaman genetik dalam suatu kelompok atau populasi dapat dilihat berdasarkan nilai heterozigositas (Notter, 1999).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik untuk menggandakan jumlah molekul DNA secara *in vitro*. Proses ini berjalan dengan bantuan enzim *polymerase* dan primer. Primer merupakan oligonukleotida spesifik pada DNA *template*. Enzim *polymerase* merupakan enzim yang dapat mencetak urutan DNA baru. Hasil PCR dapat langsung divisualisasikan dengan elektroforesis atau dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut (Williams, 2005).

Reaksi yang terjadi dalam mesin PCR secara umum dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahap denaturasi DNA cetakan, tahap *annealing* atau penempelan primer dan tahap *extension*, yaitu pemanjangan primer atau polimerasi. Reaksi ini umumnya terjadi dalam 25-30 siklus. Pada tahap denaturasi, DNA dipanaskan hingga 94°C sehingga untai ganda DNA berpisah menjadi DNA untai tunggal. Tahapan yang paling menentukan dalam proses PCR adalah tahap penempelan primer, karena tiap pasangan primer memiliki suhu penempelan primer yang spesifik. Tahap pemanjangan primer terjadi pada suhu 72°C. Pada tahapan ini enzim *taq polymerase*, *buffer* PCR, dNTP, dan Mg^{2+} memulai aktifitasnya memperpanjang primer (Viljoen *et al.*, 2005)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) merupakan salah satu teknik penciri genetik (*genetic marker*) yang dikembangkan oleh Botstein *et al.*, (1980) yang digunakan untuk mengetahui adanya keragaman sekuens DNA. Mullis *et al.*, (1986) menyatakan bahwa penggunaan teknik RFLP menjadi lebih intensif setelah teknik RFLP dikombinasikan dengan teknologi PCR yang digunakan hingga saat ini. PCR-RFLP merupakan metode analisis lanjutan dari produk PCR. Metode PCR-RFLP memanfaatkan perbedaan pola pemotongan enzim pemotong yang berbeda pada tiap-tiap mikroorganisme. Analisis RFLP sering digunakan untuk mendeteksi lokasi genetik dalam kromosom (Orita *et al.*, 1989).

Beberapa penelitian menggunakan metode PCR-RFLP dilakukan untuk melihat pengaruh keragaman gen Mx terhadap sifat resisten flu burung pada unggas. Sironi *et al.*, (2010) melakukan penelitian untuk mengetahui hubungan keragaman gen Mx dengan sifat resisten flu burung pada ayam buras (White

Leghorn dan *New Hampshire*). Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode PCR-RFLP. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa perubahan asam amino pada posisi asam amino 631 berpengaruh terhadap daya tahan tubuh ayam terhadap flu burung.

Jae *et al.*, (2002) juga melakukan penelitian menggunakan metode PCR-RFLP untuk melihat pola keragaman gen Mx dan hubungannya dengan sifat resisten terhadap flu burung. Penelitian dilakukan pada ayam *White Leghorn* Jerman dan dibandingkan dengan ayam lokal yang ada di Jerman. Kesimpulan yang didapatkan pada penelitian ini adalah keragaman gen Mx berpengaruh terhadap tingkat resisten ayam terhadap flu burung. Pengaruh yang nyata hanya dilihat pada ayam lokal Jerman, sedangkan pada ayam *White Leghorn* tidak ditemukan hubungan yang nyata antara keragaman gen Mx dengan sifat resistensi flu burung. Penelitian yang sejalan juga dilakukan oleh Banfield *et al.*, (2008), Li *et al.*, (2006), Balkisson *et al.*, (2007), Yin *et al.*, (2010) pada ayam *White Leghorn*, dan Sironi *et al.*, (2008) pada embrio ayam. Penelitian serupa yang dilakukan Sartika *et al.*, (2010) menemukan bahwa pada beberapa jenis ayam di Indonesia, yaitu ayam sentul dan ayam merawang diketahui adanya mutasi pada asam amino 631, yang menyebabkan adanya keragaman gen Mx pada ayam sentul dan merawang dan keragaman ini juga diduga berasosiasi kuat dengan sifat resisten flu burung

2.4. Hukum Keseimbangan Hardy-Weinberg dan Heterozigositas

Hukum keseimbangan Hardy-Weinberg menyatakan bahwa frekuensi alel dan frekuensi genotipe dalam suatu populasi yang cukup besar akan tetap konstan dari satu generasi ke generasi jika dalam populasi tersebut terjadi perkawinan

secara acak (*random mating*), tidak ada seleksi, mutasi, migrasi dan genetic drift. Proporsi Hardy-Weinberg dihitung berdasarkan perbedaan frekuensi genotipe pengamatan dengan frekuensi genotipe harapan. Syarat berlakunya hukum Hardy-Weinberg : 1) setiap gen mempunyai viabilitas dan fertilitas yang sama, 2) perkawinan terjadi secara acak, 3) tidak terjadi mutasi gen atau frekuensi terjadinya mutasi sama besar, 4) tidak terjadinya migrasi, dan 5) jumlah individu dari suatu populasi selalu besar. Jika syarat-syarat tersebut terpenuhi, maka frekuensi alel dan frekuensi genotipe dalam suatu populasi akan konstan (Blott *et al.*, 1998; Noor, 2010).

Keragaman genetik adalah penyimpangan sifat atau karakter dari individu yang terjadi karena perkawinan alami yang tidak terkontrol. Keragaman genetik dapat dilihat dari karakter alel dari lokus tertentu yang merupakan ekspresi dari gen tertentu. Nilai heterozigositas merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengukur tingkat keragaman genetik dalam suatu populasi (Tanabe *et al.*, 1999). Heterozigositas diperoleh dari hasil perhitungan frekuensi gen pada masing-masing lokus (Maeda *et al.*, 1999).