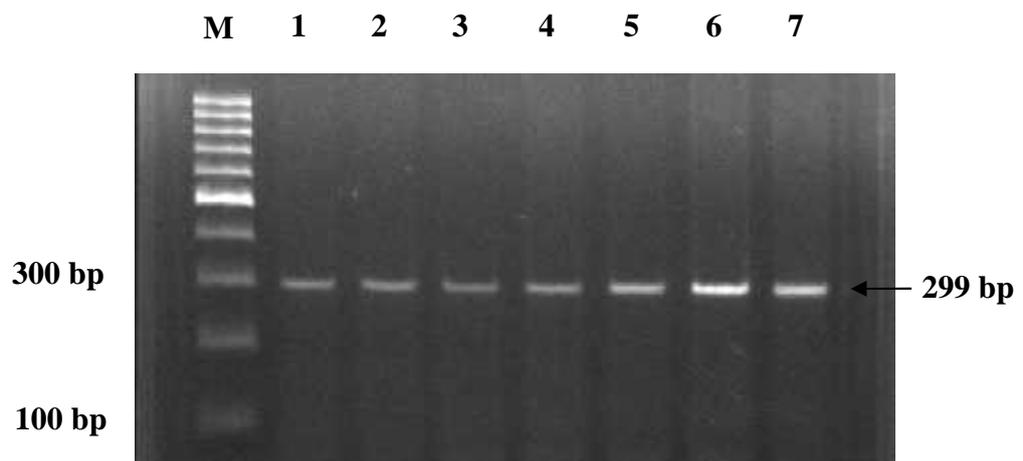


IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Amplifikasi Gen Mx

Amplifikasi gen Mx telah berhasil dilakukan. Hasil amplifikasi gen Mx divisualisasikan pada gel *agarose* seperti terlihat pada Gambar 4.1. Ukuran pita yang berhasil diamplifikasi adalah 299 pb. Hal ini sesuai dengan Sironi *et al.*, (2008) bahwa ukuran pita gen Mx adalah 299 pb.

Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin *thermocycler* dengan suhu *annealing* 60°C selama 20 detik. Kondisi ini berbeda dengan suhu yang disarankan oleh Sironi *et al.*, (2008) yaitu 55°C selama 30 detik. Menurut Muladno (2002) suhu penempelan (*annealing*) berkisar antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa digunakan yaitu 50°C sampai 60°C. Suhu 60°C pada *annealing* merupakan suhu optimum untuk penempelan primer gen Mx selama proses amplifikasi.



Gambar 4.1. Pita DNA Hasil Amplifikasi Gen Mx pada Ayam Kampung Menggunakan Metode PCR pada Gel Agarose 1,5% (M : Marker, No (1-7) Nomor Sampel Ayam Kampung)

Keberhasilan amplifikasi fragmen DNA dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu, DNA cetakan (*template*), primer, buffer PCR, MgCl₂, enzim DNA polimerase, suhu, waktu denaturasi, *annealing* dan jumlah siklus (Sambrook & Russel, 2001). Selain itu, keberhasilan pada proses amplifikasi juga dipengaruhi oleh interaksi komponen campuran PCR (Palumbi, 1986). Kualitas dan kuantitas cetakan DNA (*template*) akan berpengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi fragmen DNA dengan metode PCR (Palumbi, 1996). Kualitas DNA yang baik memiliki rasio absorbansi 260/280 nm sebesar 1,8 sampai 2,0 ($1,8 < A_{260}/A_{280} < 2,0$) (Muladno, 2002).

Keberhasilan amplifikasi sangat tergantung dari primer yang digunakan. Dalam proses amplifikasi, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Konsentrasi primer merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap spesifisitas produk PCR. Konsentrasi primer yang digunakan dalam reaksi PCR sebaiknya berkisar antara 0,1 sampai 0,5 μ M (Loffert *et al.*, 1997). Konsentrasi primer yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penempelan primer pada sekuen DNA cetakan tidak spesifik, sedangkan konsentrasi primer yang terlalu rendah akan menghasilkan sedikit produk PCR (Muladno 2002). Konsentrasi primer yang digunakan pada penelitian adalah 0,3 μ M sehingga menghasilkan produk amplifikasi yang spesifik.

Amplifikasi hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses amplifikasi diperlukan buffer PCR. Fungsi buffer adalah untuk menjamin pH medium yaitu 8,5 (Darmo dan Ari, 2000). Komponen PCR lainnya yaitu MgCl₂. Konsentrasi MgCl₂ berpengaruh besar terhadap

spesifisitas dan kualitas hasil PCR. $MgCl_2$ akan meningkatkan interaksi primer dengan DNA *template* dan meningkatkan kelarutan dengan dNTP. Pada umumnya jika ion Mg^{2+} kurang, maka hal ini akan menurunkan kualitas produk PCR, sedangkan jika ion Mg^{2+} berlebih akan menurunkan spesifisitas dan menghasilkan produk non spesifik (Newton dan Graham, 1997). Konsentrasi $MgCl_2$ yang digunakan dalam proses amplifikasi adalah sebanyak 1 mM.

Enzim taq polimerase adalah enzim yang digunakan dalam penelitian ini karena stabil dalam pemanasan walaupun amplifikasi berjalan pada suhu mendekati titik didih air. Taq *polymerase* diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (Taq) yang dikembangkan pada tahun 1988. Aktivitas Taq polimerase maksimal pada temperatur 92-95°C. Penggunaan enzim ini harus memperhatikan proses penyimpanan (selalu di *freezer* pada suhu -20°C) (Fatchiyah dkk., 2011). Enzim polimerase DNA berfungsi sebagai katalisator untuk reaksi polimerisasi DNA. Penggunaan jenis polimerase DNA berkaitan erat dengan buffer PCR yang dipakai. Semakin panjang fragmen DNA yang diamplifikasi maka diperlukan polimerase DNA dengan aktivitas yang kuat dan juga buffer PCR dengan pH dan kapasitas tinggi (Darmo dan Ari, 2000).

Suhu *annealing* adalah suhu dimana primer akan menempel pada cetakan DNA. Pencarian kondisi optimal dari suhu *annealing* sangat penting, karena berkaitan dengan spesifisitas dan sensitifitas produk PCR. Suhu *annealing* primer juga harus disesuaikan dengan jenis primer yang digunakan dan ukuran fragmen yang akan diamplifikasi. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat mengakibatkan timbulnya pita elektroforesis yang tidak spesifik. Pada penelitian ini berdasarkan hasil coba-coba digunakan suhu 60°C selama 30 detik dan

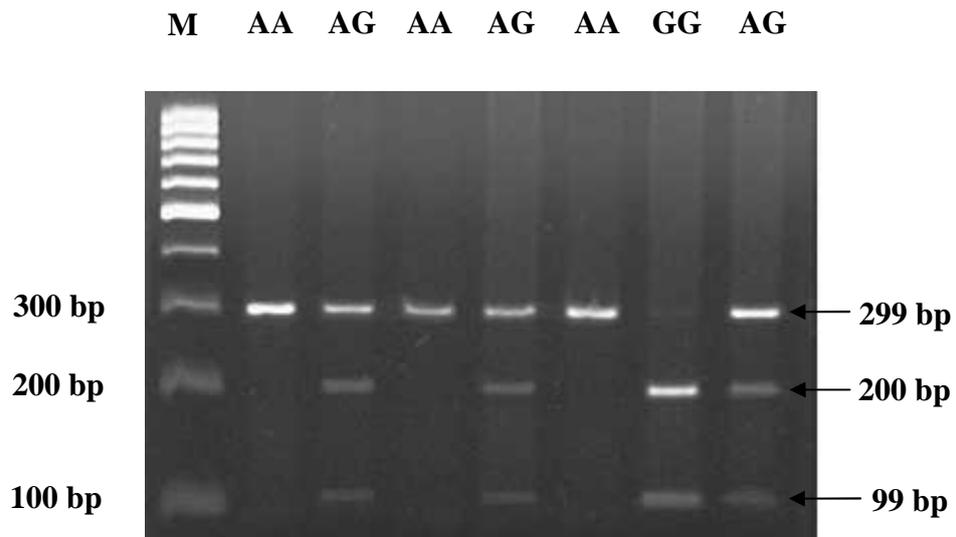
ternyata suhu tersebut cocok untuk berlangsungnya proses amplifikasi. Selain suhu *annealing*, jumlah siklus juga akan mempengaruhi kualitas hasil PCR. Siklus yang terlalu banyak akan meningkatkan konsentrasi produk yang tidak spesifik, sedangkan siklus yang terlalu sedikit akan mengurangi kuantitas produk yang diharapkan. Jumlah siklus proses amplifikasi penelitian ini adalah 35 siklus. Jumlah siklus ini masih berada pada kisaran jumlah siklus optimal untuk siklus PCR yaitu 25-45 siklus (Fairbanks dan Andersen, 1999).

Konsentrasi optimal dNTPs ditentukan oleh panjang target DNA yang diamplifikasi. Untuk panjang target DNA kurang dari satu kilobasa biasanya digunakan konsentrasi dNTPs sebanyak 100 μ M, sedangkan untuk panjang target DNA lebih besar dari satu kilobasa diperlukan konsentrasi dNTPs sebanyak 200 μ M (Fatchiyah dkk., 2011). Konsentrasi dNTP yang digunakan pada penelitian ini adalah 200 mM.

4.2. Penentuan Genotipe Genetik Gen Mx dengan RFLP

Berdasarkan metode PCR-RFLP menggunakan enzim *Hpy8I* didapat tiga macam genotipe ayam kampung terkait dengan sifat ketahanan terhadap virus flu burung yaitu AA, AG dan GG (Gambar 4.2).

Ayam kampung dikatakan memiliki genotipe AA atau Mx^{++} apabila terdapat satu fragmen (pita) DNA dengan panjang 299 pb. Genotipe AG atau Mx^{+-} ditunjukkan dengan tiga fragmen DNA yaitu 299, 200 dan 99 pb. Genotipe GG atau Mx^{--} ditunjukkan dengan terdapatnya dua fragmen DNA yaitu 200 dan 99 pb (Sironi *et al.*, 2010) (Gambar 4.3).



Gambar 4.2. Pola Pita Gen Mx pada Ayam Kampung dalam Gel Agarose 2% dengan Enzim Restriksi *Hpy8I* (M : Marker 100 bp. AA, AG, dan GG adalah Genotipe Gen Mx/*Hpy8I*)

Berdasarkan sekuen DNA yang diamplifikasi pada ruas gen Mx terdapat satu titik pemotongan *Hpy8I* yang menghasilkan fragmen dengan panjang 200 dan 99 pb. Penelitian Sironi *et al.*, (2010) pada ayam broiler (*White Leghorn*) menyatakan bahwa keragaman gen Mx disebabkan karena terjadinya mutasi daerah ekson 13 posisi basa ke 631 (SNP/*Hpy8I*) (nomor akses GenBank DQ788615). Mutasi yang terjadi pada fragmen gen Mx *Hpy8I* adalah mutasi sub tipe basa transisi (*single mutation*), yaitu pasangan basa GC menjadi AT (purin menjadi purin) sehingga menyebabkan perubahan asam amino serin (AGT) menjadi asparagin (AAT). Adanya asam amino asparagin pada nukleotida nomor 631 exon 13 menandakan ayam tahan terhadap flu burung, ditandai dengan gen Mx⁺. Apabila yang terjadi adalah mutasi basa menjadi asam amino serin maka ayam rentan terhadap flu burung, ditandai dengan gen Mx⁻ (Sartika *et al.*, 2010).

Ternak ayam kampung yang mempunyai genotipe homozigot (AA atau GG) berarti kedua tetua masing-masing menyumbangkan gen (alel) yang sama. Ternak

ayam kampung dengan genotipe heterozigot (AG) menunjukkan bahwa ternak tersebut memiliki kombinasi gen yang berbeda dari kedua tetuanya. Keragaman gen Mx|Hpy8I pada ayam kampung di Kabupaten Kampar ditunjukkan dengan jumlah genotipe yang muncul dari masing-masing lokasi (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Hasil Identifikasi Genotipe Gen Mx pada Ayam Kampung di Kabupaten Kampar

| Lokasi | Jumlah Sampel | Genotipe (n) | | |
|--------------|---------------|--------------|----|----|
| | | AA | AG | GG |
| Alam Panjang | 10 | 8 | 2 | - |
| Salo | 10 | 7 | 3 | - |
| Simpang Kubu | 10 | 3 | 6 | 1 |
| Total | 30 | 18 | 11 | 1 |

Keterangan : n = jumlah genotipe yang muncul

Pada Tabel 4.1 dapat dilihat total masing-masing genotipe ayam kampung di Kabupaten Kampar. Genotipe AA atau Mx^{++} ditemukan paling banyak yaitu 18 sampel dan genotipe GG atau Mx^{-} ditemukan sebanyak 1 sampel. Genotipe AA (Mx^{++}) dan AG (Mx^{+-}) merupakan genotipe yang membawa sifat resisten terhadap flu burung, sedangkan genotipe GG (Mx^{-}) membawa sifat rentan terhadap flu burung.

Penelitian Sironi *et al.*, (2008) menunjukkan bahwa amplifikasi PCR-RFLP gen Mx|Hpy8I pada ayam *White Leghorn* dan *New Himpshire* menghasilkan genotipe AA, AG dan GG. Penelitian Sartika *et al.*, (2010) juga menunjukkan amplifikasi PCR-RFLP gen Mx|RsaI pada ayam sentul menghasilkan tiga genotipe, yaitu AA, AG dan GG.

4.3. Keragaman Genetik Gen Mx pada Ayam Kampung

Hasil analisis frekuensi genotipe AA, AG dan GG dan frekuensi alel A dan G fragmen gen Mx|Hpy8I pada ayam kampung di Kabupaten Kampar disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Nilai Frekuensi Genotipe dan Frekuensi Alel gen Mx|Hpy8I pada Ayam Kampung di Kabupaten Kampar

| Lokasi | N | Frekuensi Genotipe | | | Frekuensi Alel | |
|--------------|----|--------------------|------|------|----------------|-------|
| | | AA | AG | GG | A | G |
| Alam Panjang | 10 | 0,8 | 0,2 | 0,0 | 0,9 | 0,1 |
| Salo | 10 | 0,7 | 0,3 | 0,0 | 0,85 | 0,15 |
| Simfang Kubu | 10 | 0,3 | 0,6 | 0,1 | 0,6 | 0,4 |
| Total | 30 | 0,6 | 0,37 | 0,03 | 0,783 | 0,217 |

Keterangan : N = Jumlah individu

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa pada setiap populasi di masing-masing lokasi ditemukan frekuensi genotipe AA lebih tinggi dibandingkan dengan frekuensi genotipe GG. Hal ini berarti ayam kampung di Kabupaten Kampar memiliki frekuensi gen Mx⁺⁺ yang lebih tinggi. Genotipe GG ditemukan sedikit, hal ini mungkin disebabkan oleh adanya seleksi atau adanya perkawinan yang tidak acak (Bourdon, 2000).

Frekuensi alel adalah frekuensi relatif dari suatu alel dalam populasi atau jumlah total alel yang terdapat dalam suatu populasi (Nei dan Kumar, 2000). Frekuensi alel A lebih tinggi ditemukan pada setiap lokasi, dan sebaliknya frekuensi alel G lebih rendah ditemukan pada semua lokasi. Menurut Li dan Graur (2000) keragaman genetik antara sub populasi dapat diketahui dengan melihat persamaan dan perbedaan frekuensi alel dan genotipe di antara sub populasi

Tingginya frekuensi alel A pada setiap populasi di masing-masing lokasi diduga diakibatkan karena terjadinya pencampuran populasi dan perkawinan

silang yang acak yang dilakukan oleh peternak. Pencampuran populasi yang dilakukan oleh peternak dikarenakan pada umumnya peternak di masing-masing lokasi menerapkan manajemen pemeliharaan dengan sistem ekstensif, yaitu ayam kampung dibiarkan bebas berkeliaran. Menurut Noor (2010), faktor-faktor yang mempengaruhi frekuensi gen adalah seleksi, mutasi, pencampuran populasi, silang dalam, silang luar dan *genetic drift*. Hasil penelitian pada ternak ayam Indonesia oleh Sulandari *et al.*, (2007) menggunakan 15 rumpun ternak ayam Indonesia yang dianalisa runutan DNA mitokondrianya dan kemudian disandingkan dengan runutan DNA mitokondria ternak ayam dari berbagai belahan dunia, hasilnya menyatakan bahwa ternyata ayam Indonesia merupakan salah satu dari tiga nenek moyang ayam yang ada di dunia. Pada penelitian yang menggunakan penciri gen Mx pada beberapa ayam yang berasal dari Asia, hasil penelitian Maeda (2005) menunjukkan bahwa pada ayam asia terdapat gen pembawa sifat resisten dan sifat rentan terhadap flu burung dan di Indonesia ditemukan sebanyak 63% populasi ayamnya tahan terhadap flu burung sedangkan 37% sisanya rentan terhadap flu burung. Dalam penelitian tersebut, jumlah sampel yang dianalisa adalah 330.

Keragaman gen Mx|Hpy8I pada ternak ayam kampung di Kabupaten Kampar bersifat polimorfik dengan ditemukannya frekuensi alel kurang dari 0,99. Menurut Nei (1987) suatu alel dikatakan polimorfik jika memiliki frekuensi alel yang sama dengan atau kurang dari 0,99 atau lebih dari 1% (Nei dan Kumar, 2000).

4.4. Keseimbangan dalam Populasi

Hasil uji Chi-Square (X^2) terhadap genotipe fragmen gen Mx|Hpy8I (Tabel 4.3) menunjukkan bahwa frekuensi gen berada dalam keadaan seimbang pada semua populasi di masing-masing lokasi.

Tabel 4.3. Hasil Uji X^2 Keseimbangan Hardy-Weinberg ($p^2+2pq+q^2$) Fragmen Gen Mx Ayam Kampung di Kabupaten Kampar

| Lokasi | Pengamatan | N | Genotipe | | | Frekuensi Alel | | Uji X^2 |
|--------------|------------|----|----------|------|-------|----------------|------|---------------------|
| | | | AA | AG | GG | A | G | |
| Alam Panjang | O | 10 | 8 | 2 | 0 | 0,9 | 0,1 | 0,123 ^{tn} |
| | E | | 8,1 | 1,8 | 0,1 | | | |
| Salo | O | 10 | 7 | 3 | 0 | 0,85 | 0,15 | 0,311 ^{tn} |
| | E | | 7,225 | 2,55 | 0,225 | | | |
| Simpang Kubu | O | 10 | 3 | 6 | 1 | 0,6 | 0,4 | 0,625 ^{tn} |
| | E | | 3,6 | 4,8 | 1,6 | | | |

Keterangan : O = jumlah pengamatan; E = jumlah harapan; X^2 tabel, db (n-1), 5% = 5,99; tn: tidak nyata

Keseimbangan frekuensi genotipe di lokasi Alam Panjang, Salo dan Simpang Kubu menunjukkan bahwa pada populasi di lokasi tersebut tidak terjadi seleksi terutama seleksi yang dilakukan terhadap gen Mx. Hukum Hardy-Weinberg menggambarkan keseimbangan dalam suatu lokus dalam populasi diploid yang mengalami perkawinan secara acak bersifat bebas dari faktor yang berpengaruh terhadap terjadinya proses evolusi seperti, mutasi, migrasi dan pergeseran genetik (Gillepie, 1998). Suatu populasi dinyatakan berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg, jika frekuensi genotipe (p^2 , $2pq$ dan q^2) dan frekuensi alel (p , q) konstan dari generasi ke generasi akibat penggabungan gamet yang terjadi secara acak. Populasi yang cukup besar tidak akan berubah dari satu

generasi ke generasi lainnya jika tidak ada seleksi, migrasi, mutasi dan pergeseran genetik (Noor, 2010).

4.5. Pendugaan Nilai Heterozigositas

Pendugaan nilai heterozigositas pengamatan (H_o) dan nilai heterozigositas harapan (H_e) gen $Mx|Hpy8I$ pada ayam kampung di Kabupaten Kampar disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4. Nilai Heterozigositas Pengamatan (H_o) dan Heterozigositas Harapan (H_e) Gen $Mx|Hpy8I$ pada Ayam Kampung di Kabupaten Kampar

| Lokasi | N | Heterozigositas | |
|--------------|----|-----------------|-------|
| | | H_o | H_e |
| Alam Panjang | 10 | 0,2 | 0,189 |
| Salo | 10 | 0,3 | 0,268 |
| Simpang Kubu | 10 | 0,6 | 0,505 |

Pada Tabel 4.4 diketahui bahwa nilai heterozigositas yang paling tinggi ditemukan pada populasi ayam kampung di lokasi Simpang Kubu (0,6), dan nilai heterozigositas terendah ditemukan pada populasi ayam kampung di lokasi Alam Panjang (0,2). Tingginya nilai heterozigositas pada populasi ayam kampung di lokasi Simpang Kubu disebabkan oleh perkawinan acak dengan peluang *inbreeding* yang rendah. Sistem perkawinan acak banyak terjadi pada sistem pemeliharaan ekstensif. Heterozigositas menggambarkan adanya variasi genetik pada suatu populasi. Semakin tinggi nilai heterozigositas pada suatu populasi maka akan tinggi pula variasi genetik pada suatu populasi tersebut (Fergusson, 1980). Menurut Marson *et al.*, (2005) pendugaan nilai heterozigositas dapat digunakan untuk mendapatkan gambaran variabilitas genetik pada suatu populasi. Keragaman genetik dapat diukur secara akurat dengan nilai heterozigositas () (Nei, 1987).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ayam kampung yang berada di lokasi Alam Panjang, Salo dan Simpang Kubu memiliki nilai heterozigositas pengamatan (H_o) masing-masing 0,2, 0,3 dan 0,6 lebih tinggi daripada nilai heterozigositas harapan (H_e) yaitu 0,189, 0,268 dan 0,505. 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 heterozigositas pengamatan (H_o) dan nilai heterozigositas harapan (H_e) dapat digunakan sebagai salah satu cara untuk menduga nilai koefisien biak dalam (*inbreeding*) pada suatu kelompok ternak. Nilai heterozigositas pengamatan (H_o) lebih rendah dari heterozigositas harapan (H_e) dapat dijadikan indikasi adanya derajat endogami (perkawinan dalam kelompok) sebagai akibat dari proses seleksi yang intensif (Machado *et al.*, 2003). Menurut Moioli *et al.*, (2004) nilai heterozigositas harapan (H_e) merupakan indikator yang baik sebagai penciri genetik yang dapat menunjukkan keragaman genetik pada suatu populasi ternak domestik.