

Keragaman Gen *Myxovirus* (Mx) pada Ayam Kampung Terseleksi

Polymorphisms of Myxovirus Gene in Selected Kampung Chicken

P.Permatasari¹, C.Sumantri², S.Darwati², N.Ulupi²

¹Fakultas Peternakan, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Jl.

Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

Correspondence author: permatasari@ipb.ac.id

ABSTRACT

The Mx gene is well known as marker genetic for chicken resistance of virus infection. The aim of this study was to analyze the mx gene polymorphisms in selected kampung chicken. A total of 25 heads of kampung chicken, which had been selected for ND virus resistant, were identified by PCR-RFLP method. The Mx gene used Hpy8I restriction enzyme where digested at GTN|NAC nucleotides. There were two alleles, A and G with three genotypes AA, AG dan GG. The result showed that 69.2% of kampung chicken were resistant toward the virus infection. This population was in Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 < \chi^2_{0.05}$).

Keywords: polymorphisms, Mx gene, selected kampung chicken

PENDAHULUAN

Ayam kampung merupakan ayam asli Indonesia yang memiliki dua tujuan produksi, yaitu sebagai ayam pedaging dan ayam petelur. Beberapa tahun ke belakang, ayam kampung memiliki nilai ekonomis yang tinggi dan dipandang sebagai makanan yang mewah. Permintaan akan ayam kampung meningkat, khususnya untuk masyarakat kalangan menengah ke atas. Seiring dengan peningkatan permintaan, ternyata laju populasi ayam kampung tiap tahunnya tidak selalu meningkat. Tahun 2012 hingga 2014 terjadi penurunan laju populasi sebesar 10% (BPS 2014). Hal ini utamanya disebabkan oleh tingginya angka kematian pada ayam kampung.

Penyebab kematian terbesar pada ayam kampung adalah virus *Newcastle Disease* (ND). Secara genetik, ketahanan terhadap virus, termasuk virus ND salah satunya dikontrol oleh gen Mx. Berdasarkan data dari *Gen Bank* dengan nomor akses DQ788615, berada di kromosom 1 dan bekerja mentranskripsi protein Mx yang berfungsi sebagai promotor ketahanan terhadap infeksi virus. Gen Mx dilaporkan dapat digunakan sebagai penciri genetik untuk sifat ketahanan tubuh ayam terhadap infeksi virus, seperti virus *Avian Influenza* (AI) dan *Newcastle Disease* (ND). Maeda (2005) melakukan penelitian gen Mx pada ayam lokal Indonesia dan melaporkan bahwa sebesar 63% ayam lokal Indonesia tahan terhadap infeksi virus AI sedangkan 37% yang berada pada kategori tidak tahan. Pagala *et al.* (2013) melakukan penelitian pada ayam Tolaki dan melaporkan bahwa gen Mx|Hpy8I dapat digunakan sebagai penciri genetik untuk sifat ketahanan tubuh ayam terhadap infeksi virus *Newcastle Disease* (ND). Selain itu, dilaporkan pula adanya asosiasi keragaman genotipe

gen Mx|Hpy8I terhadap sifat antiviral pada ayam Tolaki. Genotipe gen Mx yang ditemukan pada ayam Tolaki adalah genotipe AA, AG, dan GG, genotipe yang memiliki alel A menampilkan ketahanan terhadap penyakit viral yang lebih baik dibandingkan dengan genotipe yang memiliki alel G.

Ayam kampung yang digunakan pada penelitian ini adalah ayam kampung yang telah diseleksi ketahanannya terhadap infeksi virus ND secara fenotipik. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi genotipe gen Mx pada ayam kampung yang telah diseleksi tersebut.

METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli sampai bulan Oktober 2014. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Genetika Molekuler Ternak, Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

Total Sampel

Sampel ayam kampung yang digunakan sebanyak 25 ekor. Ayam kampung yang digunakan merupakan ayam kampung yang telah diseleksi ketahanannya terhadap paparan virus ND.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dimulai dengan pengambilan sampel darah. Darah diambil dari bagian *vena axillaris*, kemudian dimasukkan ke dalam tabung ependorf yang telah diisi EDTA. Selanjutnya sebanyak 50 μ L sampel darah dimasukkan ke dalam tabung ependorf (1.5 mL) dan ditambahkan dengan 1 000 μ L NaCl 0.2%, kemudian didiamkan selama 5 menit

dan disentrifugasi pada kecepatan 8 000 rpm selama 5 menit, kemudian bagian supernatan dibuang.

Setelah bagian supernatan dibuang, larutan ditambahkan dengan 20 μL proteinase K 5 mg mL^{-1} , 40 μL sodium dodesil fosfat (SDS) 10% dan 30 μL 1 x STE (sodium tris EDTA). Selanjutnya campuran larutan tersebut dikocok pelan di dalam inkubator selama 2 jam pada suhu 55 $^{\circ}\text{C}$. Setelah dikocok, campuran larutan tersebut ditambah 400 μL phenol, 400 μL CIAA dan 40 μL 5 M NaCl sambil digoyang pelan selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah itu, campuran disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 5 menit.

Sebanyak 400 μL bagian yang berwarna bening (DNA) dipindahkan menggunakan pipet ke tabung baru (1.5 mL). Tabung yang sudah berisi DNA ini kemudian ditambahkan dengan 800 μL etanol absolut dan 40 μL 5 M NaCl lalu disimpan di dalam *freezer* selama semalam. Setelah itu, larutan disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12 000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi, bagian supernatan dibuang dan didiamkan dalam keadaan terbuka pada suhu ruang sampai etanol hilang. Selanjutnya ditambahkan 100 μL TE 80%. DNA yang diperoleh kemudian disimpan di *freezer* sampai siap untuk digunakan.

Amplifikasi PCR

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen Mx berdasarkan Sironi *et al.* (2010) adalah primer *forward* (5'-GCA CTG TCA CCT CTT AAT AGA-3') dan primer *reverse* (5'GTA TTG GTA GGC TTT GTT GA-3'). Primer tersebut mampu mengamplifikasi gen Mx sepanjang 299 pb yaitu dari basa ke 20 670-20 968 (exon 13).

Amplifikasi DNA dilakukan pada total volume 15 μL yang terdiri dari 1 μL DNA, 10.75 μL DW, 0.2 μL primer *forward*, 0.2 μL primer *reverse*, 0.05 *Taq polymerase*, 1.5 μL buffer, 0.3 μL dNTPs dan 1 μL MgCl_2 . Metode amplifikasi dilakukan melalui tiga tahap. Tahap pertama meliputi proses denaturasi awal pada 95 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit yang dilakukan 1 siklus. Tahap kedua meliputi proses denaturasi pada suhu 95 $^{\circ}\text{C}$ selama 10 detik, proses annealing suhu 60 $^{\circ}\text{C}$ selama 20 detik, dan proses ekstensi suhu 72 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik. Tahap kedua dilakukan 35 siklus. Tahap ketiga meliputi proses ekstensi akhir pada suhu 72 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit. Produk hasil PCR kemudian diinkubasi pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$ untuk kemudian digunakan pada proses RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Penentuan genotipe gen Mx menggunakan metode PCR-RFLP. Sebanyak 5 μL produk PCR gen Mx dipotong menggunakan 2 μL *restriction endonuclease mix* yang terdiri dari 1 μL dH_2O , 0.7 μL buffer, dan 0.3 μL enzim pemotong, kemudian diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$. Enzim pemotong yang digunakan adalah *Hpy8I* yang mengenali situs potong GTN|NAC.

Produk PCR yang sudah dipotong oleh enzim restriksi kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 2% dengan buffer 0.5 TBE (Tris Borat EDTA) yang dialiri arus listrik dengan tegangan 100 V selama 40 menit.

Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan di bawah UV transiluminator.

Analisis Data

Genotipe yang didapat melalui metode PCR-RFLP digunakan untuk analisis data. Data yang dianalisis diantaranya frekuensi alel, genotipe, nilai keseimbangan Hardy-Weinberg, heterozigositas pengamatan, heterozigositas harapan, dan nilai *Polymorphic Informative Content* (PIC).

Frekuensi genotipe merupakan rasio jumlah suatu genotipe terhadap jumlah populasi. Frekuensi genotipe dapat diketahui dengan menghitung perbandingan jumlah genotipe tertentu pada setiap populasi, dengan rumus sebagai berikut (Neidan Kumar 2000):

Keterangan:

$$x_{ii} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i}{N}$$

x_{ii} = frekuensi genotipe ii

n_i = jumlah individu bergenotipe ii

N = total sampel

Frekuensi alel merupakan rasio suatu alel terhadap keseluruhan alel pada lokus suatu dalam populasi. Frekuensi alel dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Neidan Kumar 2000):

$$x_i = \frac{(2n_{ii} + \sum_{j \neq i} n_{ij})}{(2N)}$$

Keterangan:

x_i = frekuensi alel ke-i

n_{ii} = jumlah individu bergenotipe ii

n_{ij} = jumlah individu bergenotipe ij

N = total sampel

Keragaman genetik dapat diketahui melalui estimasi frekuensi heterozigositas pengamatan (H_o) dan heterozigositas harapan (H_e) yang diperoleh dengan menggunakan rumus Nei (1987) sebagai berikut:

$$H_o = \sum_{i \neq j} \frac{N_{ij}}{N} \quad H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Keterangan:

H_o = heterozigositas pengamatan

N_{ij} = jumlah individu heterozigot pada lokus ke-1

N = jumlah individu yang diamati

H_e = heterozigositas harapan

p_i = frekuensi alel ke-i pada lokus ke-1

Pengujian nilai genotipe antara hasil pengamatan dan nilai harapan diukur dengan menggunakan *chi-square* dengan rumus sebagai berikut (Hartl dan Clark 1997):

Keterangan:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

- x^2 = frekuensi genotipe ii
- O = jumlah pengamatan genotipe ke-i
- E = jumlah harapan genotipe ke-i

Tingkat informatif suatu alel dihitung dengan menggunakan pendekatan nilai *Polymorphic Informative Content* (PIC) yang dihitung berdasarkan rumus Bostein *et al.*(1980) sebagai berikut:

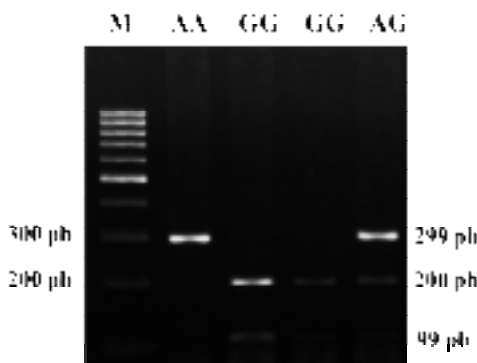
$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{k=j+1}^n 2 p_j p_k$$

- Keterangan:
 PIC = *Polymorphic Informative Content*
 pi = frekuensi alel ke-i
 pj = frekuensi alel ke-j
 n = jumlah alel per penciri

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman Gen Mx dengan Metode PCR RFLP

Produk PCR yang didapat pada penelitian ini sepanjang 299 bp. Hasil visualisasi produk PCR disajikan pada Gambar 1. Visualisasi produk PCR-RFLP dengan menggunakan enzim *Hpy8I* menunjukkan adanya titik potong pada basa ke 99. Hal ini mengindikasikan adanya mutasi pada titik tersebut. Mutasi diketahui merupakan perubahan basa dari



Gambar 1 Visualisasi hasil PCR-RFLP gen Mx. M (marker); 1-4 (DNA ayam kampung) adenin menjadi guanin (A → G) (Elfidasari *et al.* 2013). Perubahan basa tersebut menyebabkan perubahan asam amino Asparagin (AAT) menjadi Serin (AGT). Keberadaan asam amino asparagin mengindikasikan ayam tersebut resisten terhadap infeksi virus (Ko *et al.* 2002).

Hasil amplifikasi kemudian diidentifikasi genotipenya berdasarkan pada perubahan basa. Genotipe yang ditemukan pada penelitian ini adalah tiga macam genotipe, yaitu genotipe AA, AG dan GG. Genotipe AA diidentifikasi jika tidak ada pemotongan oleh enzim *Hpy8I* sehingga

muncul pita hasil produk PCR dengan panjang 299 bp. Genotipe GG diidentifikasi dengan munculnya basa pada pita ke 200 bp dan ke 99 bp. Genotipe AG ditandai dengan munculnya pita pada basa ke 299, basa ke 200, dan basa ke 99.

Frekuensi Genotipe, Frekuensi Alel dan Keseimbangan Hardy-Weinberg Gen Mx

Nilai frekuensi genotipe dan alel serta keseimbangan Hardy-Weinberg gen Mx pada ayam kampung terseleksi ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gen Mx pada ayam kampung terseleksi bersifat polimorfik. Nei (1987) menjelaskan bahwa jika sebuah gen memiliki frekuensi alel kurang dari atau sama dengan 0.99 maka gen tersebut bersifat polimorfik.

Frekuensi genotipe tertinggi adalah genotipe AA (0,462) dan AG (0,462), sedangkan frekuensi alel tertinggi adalah alel A (0,692). Hal ini berarti berarti frekuensi ayam yang memiliki sifat ketahanan terhadap infeksi virus adalah tinggi. Frekuensi ayam kampung yang membawa alel tahan terhadap infeksi virus pada penelitian ini lebih tinggidaripada yang dilaporkan oleh Maeda (2005) pada ayam lokal Indonesia yang menyebutkan bahwa sebesar 63% ayam lokal Indonesia tahan terhadap infeksi virus AI sedangkan 37% yang berada pada kategori tidak tahan. Hasil penelitian Pagala *et al.* (2013) melaporkan bahwa sebesar 72% ayam Tollaki tahan terhadap infeksi virus ND, sedangkan 28% ayam Tollaki tidak tahan. Hal ini menunjukkan bahwa ayam Tollaki lebih tahan terhadap infeksi virus dibandingkan ayam kampung. Hasil penelitian Sulandari *et al.* (2007) melaporkan bahwa frekuensi ayam lokal Indonesia yang tahan terhadap infeksi virus AI berkisar antara 35– 89 persen.

Nilai keseimbangan Hardy-Weinberg pada penelitian ini menunjukkan nilai chi-kuadrat hitung lebih rendah daripada chi-kuadrat tabel. Hal ini berarti bahwa frekuensi gen Mx pada penelitian ini berada dalam keadaan seimbang. Keseimbangan tersebut menunjukkan bahwa tidak terjadinya seleksi secara sengaja terutama seleksi yang dilakukan terhadap gen Mx. Menurut Noor (2010), populasi yang besar tidak akan berubah dari satu generasi ke generasi lainnya jika tidak ada seleksi, migrasi, mutasi, dan *genetic drift*.

Nilai Heterozigositas dan PIC Gen Mx pada Ayam Kampung Terseleksi

Nilai heterozigositas pengamatan (H_o) pada penelitian ini ditemukan di bawah 0.5 (50%). Javanmard *et al.* (2005) menjelaskan bahwa jika ditemukan nilai heterozigositas pada sebuah populasi di bawah 0.5 (50%) dapat diindikasikan bahwa nilai keragaman pada populasi

Tabel 1 Frekuensi genotipe dan alel serta keseimbangan HW gen Mx pada ayam kampung terseleksi

Frekuensi Genotipe			Frekuensi Alel		Keseimbangan Hardy-Weinberg	
AA	AG	GG	A	G	x^2 hitung	x^2 tabel
0.462(n=12)	0.462 (n=12)	0.077 (n=2)	0.692	0.308	0.181	5.99

Tabel 2 Nilai Heterozigositas pengamatan (Ho), heterozigositas harapan (He), dan PIC gen Mx pada ayam kampung terseleksi

Ho	He	PIC
0.462	0.426	0.335

Tersebut rendah. Hal tersebut juga tidak jauh berbeda dengan nilai yang ditemukan pada nilai heterozigositas harapan (He). Nilai heterozigositas harapan (He) yang ditemukan pada penelitian ini juga di bawah 0.5.

Menurut Hildebrand *et al.* (1992) nilai *Polymorphic Informative Content* (PIC) berkisar antara 0 sampai 1. Nilai PIC sama dengan 0 apabila hanya ditemukan satu alel dan PIC sama dengan 1 apabila terdapat jumlah alel yang tak terhingga. Apabila ditemukan dua alel, Hildebrand *et al.* (1992) menjelaskan bahwa nilai PIC maksimum yang ditemukan adalah sebesar 0.375. Nilai PIC gen Mx yang ditemukan pada populasi ayam kampung terseleksi adalah sebesar 0.335. Hal ini berarti nilai PIC gen Mx pada ayam kampung terseleksi rendah. Nilai PIC yang rendah menyebabkan primer tersebut tidak informatif. Menurut Hildebrand (1992), nilai heterozigositas akan selalu lebih tinggi dibandingkan dengan nilai PIC, karena nilai PIC merupakan nilai heterozigositas yang dikoreksi.

SIMPULAN

Gen Mx pada ayam kampung terseleksi bersifat polimorfik. Frekuensi genotipe tertinggi adalah genotipe GG dan AG, yaitu masing sebesar 46.2%. Sebanyak 69.2% ayam kampung terseleksi membawa alel tahan terhadap infeksi virus dan 30.8% membawa sifat tidak tahan. Frekuensi gen Mx pada ayam kampung terseleksi berada dalam keseimbangan *Hardy-Weinberg*.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik.** 2014. Statistik Indonesia. Jakarta (ID): Badan Pusat Statistik Indonesia.
- Bostein D, White RL, Skolnick M, Davis RW.** 1980. Construction of genetic linkage map in human using restriction fragmen lenght polymorphisms. *Amer. J Hum Genet.* 32:314-331.
- Elfidasari D, Solihin DD, Soejoedono, Murtini S.** 2013. Identification of gene resistance to avian influenza virus (Mx gene) among wild waterbirds. *Makara J Sci.* 17(1):6-10.
- Hartl DL, Clark AG.** 1997. *Principle of Population Genetic.* Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hildebrand CE, Torney DC, Wagner RP.** 1992. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Sci.* 20:100-102.
- Javanmard A, Asadzadeh N, Banabazi MH, Tavakolian J.** 2005. The allele and genotype frequencies of bovine pituitary-specific transcription factor and leptin genes in Iranian cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. *Iran J Biotechnol.* 3(2):104-108.
- Ko JH, Jin HK, Asano A, Takada A, Ninomiya A, Kida H, Hokiyama, Ohara M, Tsuzuki, Nishibori, Mizutani, Watanabe T.** 2002. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Gen Res.* 12 (4):595-601.
- Maeda.** 2005. Polymorphism of Mx Gene in Asian Indigenous chicken population. *Seminar Nasional tentang Unggas Lokal III:* 25 Agustus 2005. Universitas Diponegoro, Semarang (ID).
- Nei M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.* New York (US): Columbia University Pr.
- Nei M, Kumar S.** 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* New York (US): Oxford Univ Pr.
- Noor RR.** 2010. *Genetika Ternak.* Jakarta (ID): Penebar Swadaya.
- Pagala MA, Muladno, Sumantri C, Murtini S.** 2013. Association of Mx gene genotype with antiviral and production traits in Tolaki chicken. *J Poult Sci.* 12 (12):735-739.
- Sironi L, Ramelli P, Williams JL, Mariani P.** 2010. PCR-RFLP Genotyping protocol for chicken Mx gene G/A polymorphism associated with the S631N mutation. *Gen and Mol Res.* 9(2):1104-1108.
- Sulandari S, Zein MSA, Paryanti S, Sartika T, Astuti M, Widjastuti T, Sujana E, Syafril D, Setiawan I, Garnida D.** 2007. Sumberdaya genetik ayam lokal Indonesia. *Keanekaragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia : Manfaat dan Potensi.* Pusat Penelitian Biologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Bogor (ID). Hlm 45-104.