

## KERAGAMAN GENETIK AYAM KAMPUNG BERDASARKAN ANALISIS PENANDA DAERAH D-LOOP MITOKONDRIA DNA

TIKE SARTIKA<sup>1</sup>, D. DURYADI<sup>2</sup>, S.S. MANSJOER<sup>2</sup>, DAN B. GUNAWAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Balai Penelitian Ternak P.O. Box 221, Bogor 16002, Indonesia

<sup>2</sup> Institut Pertanian Bogor

### ABSTRACT

SARTIKA, T., D. DURYADI, S. S. MANSJOER, and B. GUNAWAN. 2000. Genetic diversity of native chicken based on analysis of D-Loop mtDNA marker. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5(2): 100-106.

Genetic diversity of base selection population of native chicken (*Gallus gallus domesticus*) at Research Institute for Animal Production was carried out using control region/D-loop mtDNA marker. The base population of native chicken was selected from subpopulation at Cianjur, Jatiwangi, Depok, Bogor 1, and Bogor 2. Samples from each population was 10 heads and 2 samples Green Jungle Fowl (*Gallus varius*) from East Java as out Group samples. Two primers binding conserved tRNA Phenylalanine gene and tRNA Glutamine gene were DNA Heavy stranded HI255 (5'-CATCTTGGCATCTTCAGTGCC-3') and DNA Light stranded LI6750 (5'-AGGACTACGGCTTGAAAAGC-3') was used to amplify D-loop mtDNA chicken. PCR-RFLP methods with 6 restriction enzymes 4 cutter such as, *AluI* (AG↓CT), *HpaII* (C↓CGG), *MboI* (↓GATC), *RsaI* (GT↓AC), *NlaIII* (CATG↓) and *HaeIII* (GG↓CC) were used to detect polymorphism within and between subpopulation. Result of experiment show that mtDNA which was amplified by PCR was 1320 bp, consist of 1227 bp control region/D-loop, 45 bp tRNA Glutamine gene and 48 bp tRNA Phenylalanine gene. PCR product which were digested from 6 endonucleases enzyme show that native chicken within and between population was monomorphic and if its compare with Green Jungle Fowl was polymorphic.

**Key words:** Native chicken, genetic diversity, mtDNA

### ABSTRAK

SARTIKA, T., D. DURYADI, S. S. MANSJOER, dan B. GUNAWAN. 2000. Keragaman genetik ayam Kampung berdasarkan analisis penanda daerah D-Loop mitokondria DNA. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5(2): 100-106.

Keragaman genetik ayam Kampung (*Gallus gallus domesticus*) pada populasi dasar seleksi di Balai Penelitian Ternak, telah dipelajari dengan menggunakan penanda daerah *control region/D-loop* mitokondria DNA. Ayam-ayam Kampung tersebut berasal dari subpopulasi Cianjur, Jatiwangi, Depok, Bogor 1, dan Bogor 2. Sampel yang digunakan pada masing-masing subpopulasi tersebut sebanyak 10 sampel. Sebagai outgroup digunakan pula 2 sampel ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) yang berasal dari Jawa Timur. Primer yang menempel pada daerah *conserved* gen tRNA Phenilalanin dan tRNA Glutamin yaitu primer dari DNA utas berat HI255 (5'-CATCTTGGCATCTTCAGTGCC-3') dan primer dari DNA Utas ringan LI6750 (5'-AGGACT-ACGGCTTGAAAAGC-3') digunakan untuk mengamplifikasi daerah yang mengandung D-loop mitokondria DNA (D-loop mtDNA). Metode PCR-RFLP dengan 6 macam enzim restriksi 4 basa antara lain: *AluI* (AG↓CT), *HpaII* (C↓CGG), *MhoI* (↓GATC), *RsaI* (GT↓AC), *NlaIII* (CATG↓) dan *HaeIII* (GG↓CC) digunakan untuk mengetahui ada-tidaknya polimorfisme baik didalam maupun diantara subpopulasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fragmen DNA ayam Kampung maupun ayam Hutan Hijau yang teramplifikasi sebesar 1320pb yang terdiri dari 1227 pb daerah *control region/D-loop* mtDNA, 45 pb gen tRNA Glutamin dan 48pb gen tRNA Phenilalanin. Hasil pemotongan dengan 6 macam enzim restriksi menunjukkan bahwa ayam Kampung baik didalam maupun diantara subpopulasi tersebut adalah monomorfik, tidak menunjukkan adanya keragaman genetik yang berbeda, sedangkan bila dibandingkan dengan ayam Hutan Hijau menunjukkan adanya polimorfik.

Kata kunci : Ayam Kampung, keragaman genetik, DNA mitokondria

### PENDAHULUAN

DNA mitokondria merupakan DNA sitoplasmik yang pada umumnya berbentuk sirkuler, terdiri dari DNA utas berat (*Heavy strand*) dan DNA utas ringan (*Light strand*). Ukuran dan sekuen DNA dari genom mitokondria ayam telah dipetakan (DESJARDINS dan MORAIS, 1990) dan terdapat sebanyak 16 775 pasang

basa (Pb). Komposisi DNA mitokondria terdiri dari daerah yang tidak mengkode protein (*Control region* atau *displacement-loop/D-loop*) dan daerah yang mengkode 13 protein, 2 gen rRNA dan 22 gen tRNA, terbagi atas DNA utas berat (*H-strand*) mengkode 12 protein (*open reading frame*), 12 S dan 16 S rRNA dan 14 gen tRNA. DNA utas ringan (*L-strand*) mengkode 1 protein (ND6) dan 8 gen tRNA. Ke-13 protein

mitokondria tersebut adalah NADH dehidrogenase 1,2,3,4,4L, 5 dan 6 (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, dan ND6), sitokrom oksidase I, II dan III (CO I, COII dan COIII), sitokrom b (cyt b), ATPase 6 dan ATPase 8. Dari bagian-bagian fragmen mtDNA tersebut daerah *control region* atau dikenal dengan D-loop merupakan daerah yang paling hipervariabel, mempunyai laju kecepatan mutasi 10 kali lebih cepat dibandingkan dengan daerah mtDNA lainnya (ISHIDA *et al.*, 1994). Sebagai contoh perbedaan panjang fragmen *control region* antara unggas dan mamalia cukup tinggi sebesar 348 pb, yaitu pada ayam sebesar 1227 pb dan pada mencit sebesar 879 pb, sedangkan daerah yang mengkode protein cukup konservatif seperti pada fragmen DNA gen ND5 perbedaan maksimum antara unggas dan mamalia hanya sebesar 18 pb yaitu pada angsa sebesar 645 pb dan pada tikus sebesar 663 pb, begitu pula pada gen rRNA perbedaan maksimum antara unggas dan mamalia hanya sebesar 43 pb yaitu pada angsa sebesar 508 pb dan pada sapi sebesar 465 pb (QUINN dan WILSON, 1993). Tetapi bila dibandingkan dengan DNA inti, mtDNA yang mengkode protein pun lebih bervariasi (QUINN dan WILSON, 1993). DNA mitokondria mempunyai laju kecepatan mutasi 5 sampai 10 kali lebih cepat dibandingkan dengan DNA inti (BROWN *et al.*, 1982). Hal ini dapat diketahui dari terjadinya mutasi basa transversi antara ayam dan itik pada DNA inti gen  $\alpha$ -globin hanya sebesar 6,2% dan pada gen Histon H5 sebesar 12,1% (DOENECKE dan TONJES, 1984), sedangkan pada DNA mitokondria mutasi basa transversi yang terjadi antara ayam dan angsa pada gen ND5 sebesar 28,2% dan tertinggi pada gen sitokrom b sebesar 40% (QUINN dan WILSON, 1993). Oleh karena itu akhir-akhir ini studi keragaman genetik menggunakan mtDNA sangat berkembang, karena mtDNA mempunyai jumlah turunan yang tinggi (*high copy number*), ukurannya kecil sehingga dapat dipelajari secara utuh dan pada daerah *control region/displacement-loop* (D-loop) mtDNA mempunyai variasi basa yang cukup tinggi/berevolusi dengan cepat. Oleh karena itu daerah *control region/D-loop* sering digunakan untuk analisis filogenetik baik didalam spesies maupun antar spesies (BROWN *et al.*, 1982; FUMIHITO *et al.*, 1994; QUINN dan WILSON, 1993).

Studi keragaman genetik melalui analisis mitokondria DNA khususnya pada fragmen *control region* mtDNA telah banyak dilakukan baik terhadap manusia maupun hewan. Pada hewan antara lain khususnya unggas yaitu pada ayam daerah *control region* telah dapat diamplifikasi sebesar 1227 pb (DESJARDINS dan MORAIS, 1990; FUMIHITO *et al.*, 1994); pada puyuh sebesar 1153 pb (DESJARDINS dan MORAIS, 1991) dan pada angsa sebesar 1057 pb (QUINN dan WILSON, 1993). Dikemukakan pula bahwa pada daerah *control region* terdapat pula bagian fragmen DNA konservatif yang homolog dengan

manusia seperti bagian struktur primer dari F, D, C box dan struktur sekunder yang berimpit dengan daerah CSB I (*Conserve Sequence Block*) dan yang paling hipervariabel yaitu pada daerah sekuen berulang (*repeat tandem*) terletak pada 400 pb pertama (FUMIHITO *et al.*, 1994).

Dengan memanfaatkan kelebihan-kelebihan yang terdapat pada daerah *control region/D-loop* mtDNA untuk pengujian keragaman genetik, maka dalam penelitian ini akan dicoba untuk mengetahui keragaman genetik ayam Kampung (intra spesies) pada populasi dasar seleksi yang berasal dari beberapa lokasi di Jawa Barat antara lain: subpopulasi Cianjur, Jatiwangi, Depok, Bogor 1 dan Bogor 2 dengan metode PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) yaitu dengan mempelajari panjang fragmen DNA terpotong dengan beberapa macam enzim endonuklease. Perbedaan panjang fragmen terpotong yang dapat dilihat dari hasil elektroforesis dapat menjelaskan ada tidaknya keragaman genetik ayam Kampung pada populasi dasar seleksi di Balai Penelitian Ternak. Selanjutnya apabila terdapat fragmen DNA spesifik pada ayam Kampung yang berhubungan dengan sifat produksi, diharapkan dapat dibuat marker genetik yang dapat membantu mempercepat seleksi MAS (*Marker Assisted Selection*).

## MATERI DAN METODE

Sebanyak 50 sampel darah (*whole blood*) ayam Kampung (*Gallus-gallus-domesticus*) yang diambil dari beberapa lokasi di Jawa Barat antara lain berasal dari subpopulasi Cianjur, Jatiwangi, Depok, Bogor 1 (daerah Cigudeg) dan Bogor 2 (daerah Ciawi) masing-masing 10 sampel dan 2 sampel ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) dari Jawa Timur sebagai out-grup. Pengambilan sampel darah dilakukan pada bagian vena sayap sebanyak  $\pm$  500  $\mu$ l dan ditempatkan pada tabung effendorf yang berisi EDTA sebagai anti koagulan. Penelitian dilakukan di Lab. Zoologi FMIPA, IPB, di Biotrop, Bogor. Ekstraksi dan purifikasi genom DNA total dilakukan dengan standar Phenol, Chloroform Isoamilalkohol (24: 1) dan presipitasi dengan etanol absolut menurut prosedur MANIATIS *et al.* (1982) dengan modifikasi metode DURYADI (1997).

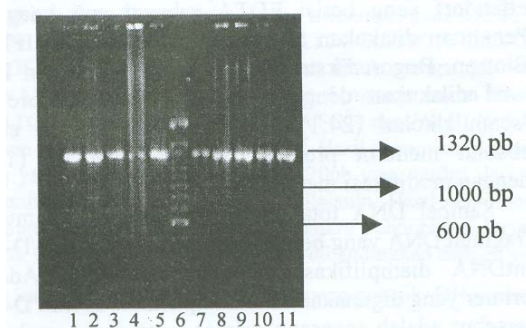
Sampel DNA total diencerkan 20 kali, kemudian fragmen DNA yang berisi sekuen *control region/D-loop* mtDNA diamplifikasi menggunakan PCR. Adapun primer yang digunakan untuk amplifikasi daerah D-loop tersebut adalah sepasang primer yang menempel pada daerah *conserve* gen tRNA phenilalanin dan tRNA glutamin yaitu primer HI255 (5'-CATCTTGGCATCTTCAGTGCC-3') dan primer LI6750 (5'-AGGACTACGGCTTGAAAAGC-3'). Larutan yang digunakan untuk amplifikasi D-loop mtDNA tersebut menurut KOCHER *et al.* (1989); FUMIHITO *et al.* (1994) dan DURYADI (1997) terdiri atas

larutan Tris (pH 8,8), MgCl<sub>2</sub>, dNTP, Taq Polimerase ditambah mineral oil. Kondisi PCR diprogram dua menit pada awal denaturasi (94°C), 30 detik denaturasi pada 94°C, 30 detik *annealing* pada 60°C dan satu menit ekstensi pada 72°C diulang sebanyak 35 siklus dan akhir ekstensi diperpanjang selama tujuh menit. Hasil PCR disimpan pada 4°C.

Untuk mengetahui ada tidaknya polimorfisme/keragaman genetik pada sampel ayam Kampung yang berasal dari beberapa lokasi tersebut dilakukan pemotongan dengan enzim endonuklease, yaitu dengan menggunakan enzim restriksi 4 basa antara lain: *AluI* (AG↓CT), *HpaII* (C↓CGG), *MhoI* (↓GATC), *RsaI* (GT↓AC), *NlaIII* (CATG↓), dan *HaeIII* (GG↓CC). Perbedaan panjang fragmen DNA terpotong oleh masing-masing enzim restriksi tersebut dapat diketahui dari hasil elektroforesis gel agarose 1,2% maupun gel akrilamid 6% dengan pewarnaan perak nitrat. Analisis data dengan menghomologikan hasil sequencing mtDNA ayam White Leghorn (DESJARDINS dan MORAIS, 1990).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Besar fragmen mtDNA teramplifikasi dengan primer H1255 dan L16750 adalah sebesar 1320 pb, baik pada ayam Kampung maupun ayam Hutan Hijau (Gambar 1). Fragmen DNA teramplifikasi tersebut bila dihomologikan dengan hasil sequencing mtDNA ayam (DESJARDINS dan MORAIS, 1990) yang diasumsikan bahwa daerah gen tRNA Glutamin dan tRNA Phenilalanin besarnya tidak berubah karena merupakan daerah *conserve*, maka besarnya daerah control region /D-loop mtDNA ayam Kampung maupun ayam Hutan Hijau teramplifikasi pada penelitian ini sebesar 1227 pb, gen tRNA Glutamin 45 pb dan gen tRNA phenilalanin 48 pb.

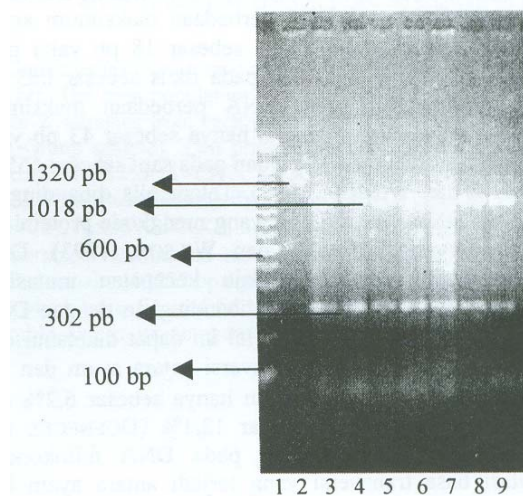


Keterangan : 1-5,7-9 = Fragmen yang berisi control region/ D-loop mtDNA ayam Kampung  
6 = DNA Ladder  
10-11 = Fragmen yang berisi control region/ D-loop mtDNA ayam Hutan hijau

Gambar 1. Fragmen berisi D-Loop mtDNA ayam

Hasil ini sesuai dengan hasil DESJARDINS dan MORAIS (1990) pada ayam White Leghorn (WL) dan FUMIHITO *et al.*, (1994) memperoleh daerah *control region/D-loop* mtDNA pada ayam Hutan dan ayam lokal Indonesia sebesar 1227 pb. Dikemukakan pula bahwa pada daerah *control region* terdapat daerah *repeat tandem* yang spesifik pada jenis gallus sebesar 60pb.

Walaupun hasil amplifikasi produk PCR tersebut sama, tetapi bila terdapat ragam genetik yang berbeda menghasilkan situs pemotongan yang berbeda pula. Hal ini dapat dilihat dari hasil pemotongan dengan beberapa enzim restriksi seperti tertera pada Gambar 2-8.



Keterangan : 1 = DNA Ladder  
2 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA ayam Hutan Hijau (tidak terpotong)  
3-9 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA ayam Kampung dari 5 lokasi (terpotong menjadi 2 fragmen)

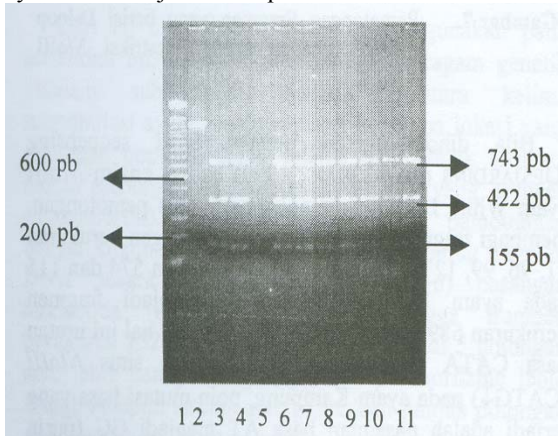
Gambar 2. Pemotongan Fragmen yang berisi D-Loop mtDNA dengan enzim restriksi *AluI*

Dari hasil pemotongan fragmen teramplifikasi dengan enzim restriksi *AluI* (AG↓CT), ternyata didalam dan diantara ke-5 subpopulasi ayam Kampung tersebut tidak terdapat ragam genetik yang berbeda (monomorfik) artinya pemotongan dengan enzim restriksi *AluI*, pada kelima subpopulasi tersebut mempunyai satu situs pemotongan yang sama dan membagi fragmen DNA teramplifikasi tersebut menjadi 2 bagian, berukuran 1018 dan 302 pb (Gambar 2). Bila dibandingkan antara ayam Kampung dengan ayam Hutan Hijau ternyata pada ayam Hutan Hijau tidak mempunyai situs pemotongan *AluI*. Dengan kata lain, berdasarkan pemotongan dengan enzim restriksi *AluI* antara ayam Kampung dengan ayam Hutan Hijau mempunyai keragaman genetik yang berbeda

(polimorfik). Bila dihomologikan dengan hasil sekuensing DESJARDINS dan MORAIS (1990) pada ayam White Leghorn (WL) ternyata pada ayam WL terdapat satu situs pemotongan *AluI* tetapi telah bergeser pada daerah tRNA Phenilalanin dan memotong fragmen DNA menjadi fragmen berukuran 1282 dan 38pb. Perbedaan potongan pada ketiga jenis ayam tersebut dapat diterangkan, bahwa pada ayam Kampung terdapat mutasi basa dari urutan basa AGCC pada ayam WL dan ayam Hutan Hijau menjadi situs *AluI* (AG↓CT) pada ayam Kampung. Dalam hal ini terjadi poin mutasi transisi (Wood dan Phua, 1996) dari pasangan basa CG menjadi TA (pirimidin menjadi pirimidin) sehingga fragmen D-loop ayam Kampung tersebut terpotong menjadi 2 bagian, sedangkan pada ayam Hutan Hijau tidak terpotong.

Pemotongan dengan enzim restriksi *HpaII* (C↓CGG), baik didalam sub populasi maupun diantara kelima subpopulasi ayam Kampung maupun ayam Hutan Hijau menunjukkan hasil pemotongan yang sama (monomorfik). Jumlah situs pemotongannya sebanyak 2 situs dan memotong fragmen DNA menjadi 3 bagian berukuran 155, 422 dan 743 pb (Gambar 3). Situs pemotongan tersebut juga sama dengan ayam white Leghorn (WL).

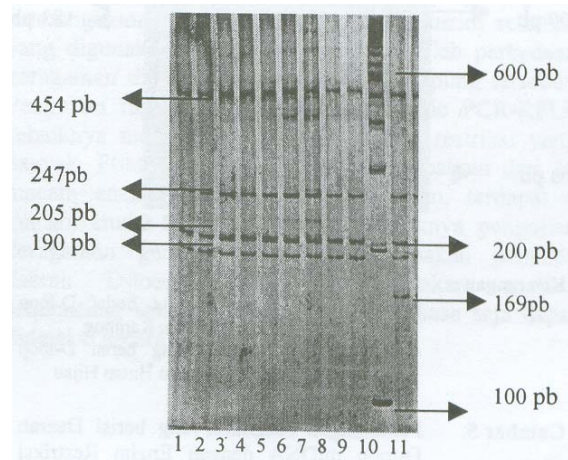
Pemotongan dengan enzim restriksi *MboI* (GA↓TC) juga diperoleh bahwa keragaman genetik ayam Kampung baik yang berasal dari subpopulasi yang sama maupun dari kelima subpopulasi adalah monomorfik, sedangkan bila dibandingkan dengan ayam Hutan Hijau adalah polimorfik.



Keterangan : 1 = DNA Ladder  
 2 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA Ayam Hutan Hijau (hasil pemotongan)  
 3-4 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA Ayam Hutan Hijau (hasil pemotongan)  
 5-11 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA Ayam Kampung dari 5 lokasi (hasil pemotongan)

Gambar 3. Pemotongan Fragmen yang berisi D-Loop mtDNA dengan Enzim Restriksi *HpaII* (C↓CGG)

Pada ayam Kampung, hasil pemotongan dengan enzim restriksi *MboI* (↓GATC) terdapat 5 situs pemotongan dan membagi fragmen DNA menjadi 6 bagian berukuran 19, 190, 205, 205, 247, 454 pb, dan 6 situs pemotongan pada ayam Hutan Hijau membagi fragmen DNA menjadi 7 bagian berukuran 19,36, 169, 190,205,247,454 pb (Gambar 4). Bila dihomologikan dengan hasil sequensing DESJARDINS dan MORAIS (1990) diperoleh bahwa pemotongan dengan enzim *MboI* pada ayam WL menghasilkan 5 situs pemotongan dan membagi fragmen DNA menjadi 6 bagian berukuran 19, 190, 205, 205, 247, dan 454 yang sama dengan ayam Kampung pada penelitian ini. Pada ayam Hutan Hijau fragmen berukuran 36 dan 169 bermutasi menjadi fragmen berukuran 205 pada ayam Kampung dan ayam WL.

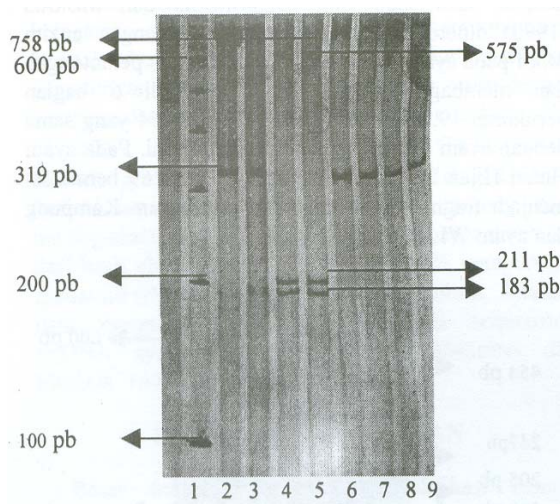


Keterangan: 1-9 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA Ayam Kampung dari 5 subpopulasi  
 10 = DNA Ladder  
 11 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA Ayam Hutan Hijau

Gambar 4. Pemotongan Fragmen yang berisi Daerah D-Loop mtDNA dengan Enzim *MboI* (↓GATC)

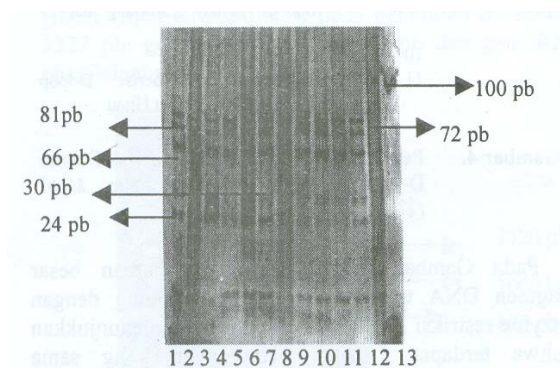
Pada Gambar 5 dan 6 memperlihatkan besar fragmen DNA teramplifikasi yang dipotong dengan enzyme restriksi *RsaI*. Hasil pemotongan menunjukkan bahwa terdapat 5 situs pemotongan yang sama (monomorfik) pada ayam Kampung baik didalam subpopulasi maupun diantara kelima subpopulasi dan membagi fragmen DNA menjadi 6 bagian berukuran 24, 66, 72, 81, 319, dan 758 pb, sedangkan pada ayam Hutan Hijau terdapat 8 situs pemotongan dan membagi fragmen DNA menjadi 9 bagian berukuran 24, 30, 66, 72, 78, 81, 183, 211, dan 575 pb. Bila dihomologikan dengan ayam White Leghorn (DESJARDINS dan MORAIS, 1990) bahwa pada ayam White Leghorn terdapat 6 fragmen DNA terpotong yang sama dengan

ayam Kampung pada penelitian ini. Fragmen berukuran 78, 30 dan 211 pb pada ayam Hutan Hijau bermutasi menjadi fragmen berukuran 319 pb pada ayam Kampung dan WL, juga fragmen berukuran 183 dan 575 pada ayam Hutan Hijau bermutasi baik secara transversi maupun transisi menjadi fragmen berukuran 758 pada ayam Kampung dan WL.



Keterangan : 1 = DNA Ladder  
2-3,6-9 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA Ayam Kampung  
4-5 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA Ayam Hutan Hijau

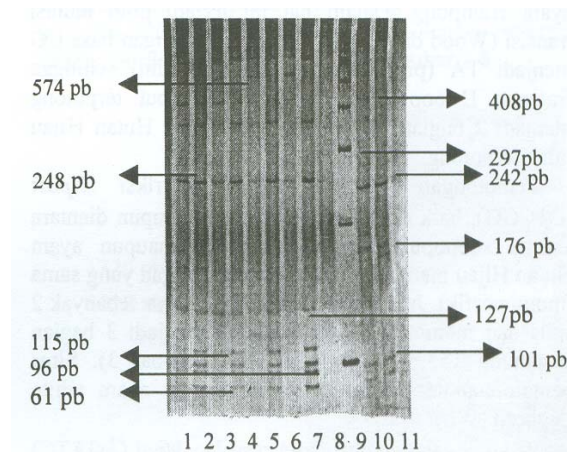
Gambar 5. Pemotongan Fragmen yang berisi Daerah D-loop mtDNA dengan Enzim Restriksi" *RsaI* (GT↓AC)



Keterangan: 13 = DNA Ladder  
2,4,8-11 = Fragmen yang berisi D-loop mt DNA ayam Kampung  
1,3,5-6 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA ayam Hutan Hijau

Gambar 6. Pemotongan Frgamen yang berisi D-loop mtDNA dengan Enzim Restriksi *RsaI* (GT↓AC) dibawah 100 pb

Seperti halnya dengan enzim restriksi lainnya, pemotongan dengan enzim *NlaIII* pun didalam dan diantara kelima subpopulasi ayam Kampung tidak terdapat ragam genetik yang berbeda (monomorfik), sedangkan dengan ayam Hutan Hijau berbeda. Pemotongan dengan enzim *NlaIII* menghasilkan 7 fragmen DNA terpotong berukuran 61, 96, 99, 115, 127, 248, dan 574, sedangkan pada ayam Hutan Hijau menghasilkan 6 fragmen DNA terpotong berukuran 96, 101, 176, 242, 279, dan 408pb (Gambar 7).



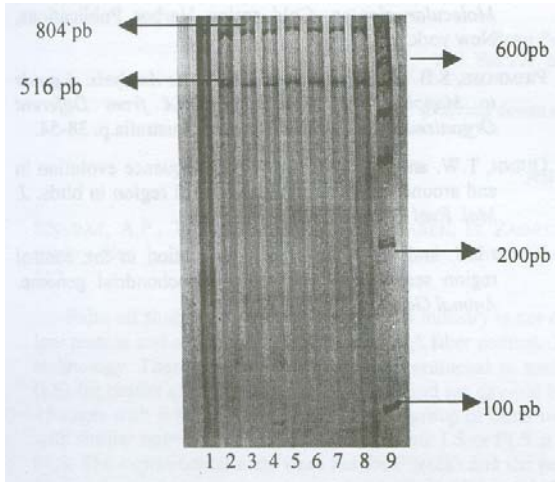
Keterangan : 1-8 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA Ayam Kampung  
9 = DNA Ladder  
10-11 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA Ayam Hutan Hijau

Gambar 7. Pemotongan Fragmen yang berisi D-loop mtDNA dengan Enzim Restriksi *NlaIII* (CATG↓)

Bila dihomologikan dengan hasil sequencing (DESJARDINS dan MORAIS, 1990) bahwa enzim *NlaIII* ayam White Leghorn mempunyai 5 situs pemotongan, membagi fragmen DNA menjadi 6 potongan berukuran 61, 96, 99, 127, 248, dan 689 pb. Fragmen 574 dan 115 pada ayam Kampung bermutasi menjadi fragmen berukuran 689 pb pada ayam WL. Dalam hal ini urutan basa CATA pada ayam WL menjadi situs *NlaIII* (CATG↓) pada ayam Kampung, poin mutasi basa yang terjadi adalah pasangan basa AT menjadi GC (purin menjadi purin), mutasi transisi. Situs 101, 176 dan 297pb pada ayam Hutan Hijau bermutasi menjadi fragmen 574 pada ayam Kampung. Kemudian fragmen berukuran 408 pada ayam Hutan Hijau bermutasi menjadi fragmen 248, 99 dan 61 pada ayam Kampung dan WL.

Pemotongan dengan enzim restriksi *HaeIII* menghasilkan 2 fragmen DNA berukuran 516 dan 804 pb, baik diantara ayam Kampung intra dan antar kelima subpopulasi maupun dengan ayam Hutan Hijau

menghasilkan jumlah dan ukuran fragmen yang sarna (Gambar 8) Bila dihomologikan dengan hasil sequensing ayam WL (DESJARDINS dan MORAIS, 1990) juga menghasilkan 2 potongan fragmen DNA yang sarna dengan penelitian ini (monomorfik).



Keterangan : 1-2 = Fragmen yang berisi D-loop mtDNA ayam Hutan Hijau  
3-8 = Fragman yang berisi D-loop mtDNA ayam Kampung  
9 = DNA Ladder

Gambar.8. Pemotongan Fragmen yang berisi D-loop mtDNA dengan Enzim Restriksi *HaeIII* (GG↓CC)

Dari ke 6 enzim restriksi yang digunakan pada penelitian ini, ternyata pada pengujian ragam genetik didalam subpopulasi maupun diantara kelima subpopulasi ayam Kampung dari beberapa lokasi yang dijadikan populasi dasar seleksi di Balitnak ternyata belum menunjukkan keragaman genetik yang berbeda (monomorfik). Padahal diasumsikan pemotongan dengan enzim restriksi 4 basa dapat memotong fragmen DNA secara random setiap  $4^4$  (256) pasangan nukleotida (PRIMROSE, 1995), sehingga fragmen berukuran 1320pb dapat terpotong menjadi 5 potongan atau lebih dan peluang terjadinya polimorfisme lebih tinggi. Adapun terdapatnya perbedaan jumlah potongan dari beberapa macam enzim restriksi 4 basa yang digunakan disebabkan bahwa distribusi dari susunan nukleotida tidaklah random dan kebanyakan organisme tidak mempunyai jumlah situs 4 basa yang sama (PRIMROSE, 1995). Pada dasarnya pengujian ragam genetik intra spesies dengan penanda daerah control region/D-loop merupakan pilihan yang tepat. Karena daerah ini mempunyai laju evolusi yang cepat seperti dikemukakan BROWN *et al.* (1982), laju evolusi genom mitokondria adalah 5-10 kali DNA inti dan ISHIDA *et al.*, (1994) mengemukakan bahwa laju

substitusi nukleotida pada fragmen D-loop 10 kali lebih besar dibandingkan dengan genom mtDNA lainnya. Namun demikian pada penelitian ini tidak ditemukannya ragam genetik yang berbeda pada ayam Kampung dari beberapa subpopulasi di Jawa Barat yang dijadikan populasi dasar seleksi, kemungkinan terjadinya mobilisasi (*flowgenic*) pada ayam Kampung tersebut begitu cepat, ayam Kampung dapat dengan mudah dibawa kemana saja dan banyaknya perkawinan yang tidak terkontrol, menyebabkan secara genetik ayam Kampung dari lima lokasi tersebut tidak beragam (aliran gennya sangat intensif). Dengan kata lain walaupun performans/ fenotip ayam Kampung sangat beragam, tetapi secara genetik tidak berbeda banyak. Namun bila dibandingkan dengan jenis yang lain yaitu ayam Hutan Hijau maupun ayam ras petelur White Leghorn masih dapat dibedakan dengan jelas. Kemungkinan lain terbatasnya jumlah enzim restriksi yang digunakan, sehingga belum diperoleh perbedaan keragaman didalam populasi ayam Kampung tersebut. Pengujian ragam genetik dengan metode PCR-RFLP sebaiknya menggunakan jumlah enzim restriksi yang banyak. FUMIHITO *et al.* (1994) mendapatkan dari 36 macam enzim restriksi yang digunakan, terdapat 4 macam enzim yang polimorfik. Sebaiknya pengujian keragaman genetik dengan menggunakan penanda daerah D-Loop mtDNA menggunakan analisis sequensing, sehingga mutasi beberapa basa saja dapat dideteksi secara akurat.

## KESIMPULAN

Keragaman genetik ayam Kampung (intra spesies) dari beberapa lokasi yang dijadikan populasi dasar seleksi di Balai Penelitian Ternak, berdasarkan analisis penanda daerah D-loop mtDNA mendapatkan ragam genetik yang tidak berbeda diantara ayam Kampung (monomorfik), sedangkan terhadap ayam Hutan Hijau mendapatkan ragam genetik yang berbeda (polimorfik).

## DAFTAR PUSTAKA

- BROWN, W.M., E.M. PRAGER, A WANG, and A.C. WILSON 1982. Mitochondrial DNA Sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution. *J. Mol. Evol.* (18): 225-239.
- DESJARDINS, P. and R. MORAIS. 1990. Sequence and Gene Organization of the Chicken Mitochondrial Genome. A Novel Gene Order in Higher Vertebrates. *J. Mol. Biol.* (212): 599-634.
- DESJARDINS, P. and R. MORAIS. 1991. Nucleotide sequence and evolution of coding and non coding regions of a quail mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* (32): 153-161.
- DOENECKE, D. and R. TONJES. 1984. Conserve dyad symmetry structures at the 3' end of H5 histone genes. Analysis of the duck H5 gene. *1. Mol. Biol* (178): 121-135.

- DURYADI, D. 1997. Isolasi dan Purifikasi DNA Mitokondrion (mt DNA). Laboratorium Molekuler Biotrop, Bogor. Tidak diterbitkan.
- FUMIHITO, A, T. MIYAKE, S. SUMI, M. TAKADA, S. OHNO, and N. KONDO. 1994. One subspecies of the Red Jungle Fowl (*Galus galus galus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (91): 12505-12509.
- ISHIDA, N., T. HASEGAWA, K. TAKEDA, M. SAKAGAMI, A.ONISHI, S. INUMARU, M. KOMATSU, and H. MUKOYAMA.1994. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA *Animal Genetics* 25: 215
- KOCHER, T.D., W.K. THOMAS, A MEYER, S.V. EDWARDS, S. PAABO, F.X. VILLABLANCA, and A.C. WILSON. 1989. Dynamic of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (86): 6196-6200.
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH, and J. SAMBROOK. 1982. *Molecular cloning*. Cold spring Harbor Publications, New york.
- PRIMROSE, S.B. 1995. *Principles o/Genome Analysis. A guide to Mapping and Sequencing DNA from Different Organisms*. Blackwell ScienceLtd, Australia.p. 38-54.
- QUINN, T.W. and AC. WILSON. 1993. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *J Mol. Evol* (37): 417-425.
- WOOD N.J. and S.H. PHUA. 1996. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Animal Genetics* 27: 25-33.