

Keragaman Genetik dan Distribusi Haplogrup Ayam Kampung dengan Menggunakan Hipervariabel-I Daerah Kontrol DNA Mitokondria

M. SYAMSUL ARIFIN ZEIN dan S. SULANDARI

*Pusat Penelitian Biologi LIPI
Jl. Raya Jakarta Bogor KM. 46, Cibinong 16911*

(Diterima 13 April 2012; disetujui 19 Juni 2012)

ABSTRACT

M. SYAMSUL ZEIN, A. and SULANDARI. 2012. Genetic diversity and haplogroups distributions of Kampung chickens using hypervariable-I mitochondrial DNA control region. *JITV* 17(2): 120-131.

Until now no studies evaluating the position of Kampung chickens in chicken clade of Asia. Thus studies based on molecular DNA sequence hypervariable-I on Kampung chicken is needed. Molecular studies based on DNA sequences hyper variable-I of Kampung chicken was done to confirm the results of previous evaluations conducted on 15 families of local chickens of Indonesia. An analysis of 210 individuals Kampung chicken (Aceh, North Sumatra, Lampung, Banten, Central Java, Lombok, Sulawesi, Ternate, Morotai and Halmahera) resulted in 51 haplotypes derived from 62 polymorphic sites. Polymorphic sites among the highest seen at 112-397 (93.22%). The highest haplotype frequencies contained in the haplotype H-4 (36.19%), followed by H-1 (18.57%) and H-5 (10, 95%). Kampung chicken phylogeny analysis formed four haplogroups/clade from 7 references of Asian chicken clade. Four haplogroups are clade II = 84.31% (43 haplotypes), clade IIIC = 1.96% (1 haplotype), clade IIID = 3.92% (2 haplotypes), clade IV = 7.84% (4 haplotypes). The results prove of that Indonesian local and indigenous chickens were equally dominated clade II. Analysis of genetic diversity showed haplotype diversity of 0.825 ± 0.021 , nucleotide diversity of 0.00600 on average, the genetic distance between populations ranged from 0.003 to 0.011, and the genetic distance within populations ranged from 0.00395 to 0.01031. Genetic distance between individuals in all populations of Kampung chickens was significantly different ($P < 0.01$). Fu's F_s values was negative, indicating high genetic diversity and population expansion on native chicken in Indonesia. Other important result was shown with the major haplotype spread from western to eastern Indonesia, and had strengthened the position of Indonesia as one of the centers of domestication of the chicken.

Key Words: Kampung Chicken, Hypervariable-I, Control Region, Mitochondrial DNA, Haplotype, Clade

ABSTRAK

M. SYAMSUL ZEIN A. dan SULANDARI. 2012. Keragaman genetik dan distribusi haplogrup ayam kampung dengan menggunakan hipervariabel-I daerah kontrol DNA mitokondria. *JITV* 17(2): 120-131.

Sampai kini belum ada penelitian yang mengevaluasi posisi ayam Kampung di clade ayam Asia. Maka kajian molekuler DNA ayam Kampung berdasarkan sekuen hipervariabel-I adalah penting untuk dilakukan, Kajian molekuler DNA ayam Kampung berdasarkan sekuen hipervariabel-I dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil evaluasi sebelumnya yang dilakukan terhadap 15 rumpun ayam lokal Indonesia. Hasil analisa terhadap 210 individu ayam Kampung (Aceh, Sumatera Utara, Lampung, Banten, Jawa Tengah, Lombok, Sulawesi Tenggara, Ternate, Morotai dan Halmahera) ditemukan 51 haplotipe yang berasal dari 62 situs polimorfik. Polimorfik tertinggi terlihat pada situs antara 112-397 (93,22%). Frekuensi haplotipe tertinggi terdapat pada haplotipe H-4 (36,19%), disusul H-1 (18,57%) dan H-5 (10, 95%). Analisa filogeni ayam Kampung membentuk empat haplogrup/clade dari 7 referensi clade ayam Asia. Empat haplogrup tersebut adalah clade II= 84,31% (43 haplotipe), clade IIIC= 1,96% (1 haplotipe), clade IIID= 3,92% (2 haplotipe), clade IV= 7,84% (4 haplotipe). Hasil penelitian membuktikan bahwa ayam Indonesia baik ayam lokal maupun ayam asli ternyata sama-sama mendominasi dalam clade II. Analisis diversitas genetik menunjukkan diversitas haplotipe $0,825 \pm 0,021$, diversitas nukleotida rata-rata 0,00600, jarak genetik antar populasi berkisar antara 0,003-0,011, dan jarak genetik dalam populasi berkisar 0,00395-0,01031. Jarak genetik diantara individu di semua populasi ayam Kampung adalah berbeda sangat nyata $P < 0,01$. Nilai Fu's F_s yang negatif mengindikasikan tingginya diversitas genetik dan ekspansi populasi pada ayam kampung di Indonesia. Hasil penting lainnya ditunjukkan dengan haplotipe utama yang menyebar dari wilayah barat hingga timur Indonesia, dan telah memperkuat posisi Indonesia sebagai salah satu pusat domestikasi ayam.

Kata Kunci: Ayam Kampung, Hipervariabel-I, Daerah Kontrol, DNA Mitokondria, Haplotipe, Clade

PENDAHULUAN

Domestikasi ayam yang meletakkan dasar peradaban manusia adalah proses perubahan dari ayam

liar menjadi ayam peliharaan. Ayam telah ditenak dengan kegunaan utama sebagai penghasil telur, daging, kegiatan agama, hiburan atau tujuan hiasan. Namun asal ayam domestikasi telah menjadi perdebatan lama antara

ahli arkeologi dan komunitas ahli genetika. Hasil penemuan arkeologi menunjukkan bahwa di dunia pada mulanya terjadi domestikasi ayam di sekitar sungai Kuning, Henan (China) sekitar 8000 tahun yang lalu. Selain itu bukti arkeologi juga ditemukan di lembah Indus, India (WEST dan ZHOU, 1988). Penemuan arkeologi di kedua wilayah ini telah memberikan gambaran bahwa peradaban manusia di kedua daerah tersebut sebagai yang paling awal melakukan domestikasi ayam sehingga diyakini sebagai pusat dari domestikasi ayam di dunia yang kemudian menyebar ke berbagai tempat lain di dunia. Namun demikian, penemuan arkeologi ini belum berhasil mengungkap nenek moyang (*ancestor*) dari ayam domestikasi.

Studi molekuler genetik pertama yang dilakukan FUMIHITO *et al.* (1994) menginformasikan bahwa semua populasi ayam domestikasi berasal dari satu nenek moyang (*monophyletic*) yaitu ayam hutan merah (*Gallus gallus*), yang berasal dari Asia Tenggara. Lebih lanjut FUMIHITO *et al.* (1996) mengemukakan hasil kajian terhadap D-loop DNA mitokondria pada marga *Gallus* dari famili Phasianidae yaitu duplikasi tandem sepanjang 60 pasang basa ditemukan di dalam daerah D-loop dan temuan ini merupakan sifat spesifik pada marga *Gallus*. Hasil kajian yang paling menarik adalah kesamaan jumlah copy duplikasi tandem yang dimiliki antara ayam domestikasi dan *Gallus gallus*. Temuan ini memberi petunjuk bahwa ayam domestikasi adalah keturunan dari *Gallus gallus*. Kajian yang dilakukan SAWAI *et al.* (2010) dengan menganalisa 30 intron pada gen di 24 kromosom dan satu Z-klinked loci pada genom inti menyatakan bahwa ayam domestikasi terkait erat dengan *Gallus gallus*. Evaluasi terhadap sekuen DNA mitokondria pada ayam domestikasi asli China dilakukan oleh NIU *et al.* (2002). Hasil evaluasi telah memberi konfirmasi bahwa ayam domestikasi di China berasal dari Thailand dan anak jenis ayam hutan merah India (*G. gallus murghi*) mempunyai kontribusi langsung terhadap ayam domestikasi.

Hasil analisa terhadap sekuen hypervariable-I daerah kontrol DNA mitokondria oleh NIU *et al.* (2006) menerangkan bahwa domestikasi ayam terjadi di berbagai tempat (*multiple maternal origins*) di Asia Selatan dan Asia Tenggara. Pendapat ini juga didukung hasil penelitian yang dilakukan oleh OKA *et al.* (2007) dengan menggunakan ayam lokal Jepang dan menginformasikan bahwa ayam Jepang berasal dari Asia Tenggara dan China/Korea. Selain itu, haplotipe dari Okinawa juga disebut sebagai group ayam Indonesia. Seperti diketahui, SIBLEY dan MOORE (1990) menyatakan bahwa distribusi ayam hutan merah (*Gallus gallus*) meliputi daerah dataran rendah hingga dataran tinggi (2000 m dpl) dari Himalayah, Pakistan, India, Banglades, Asia Tenggara, Sumatera, Jawa dan Bali, serta introduksi di Sulawesi. Hal ini sesuai dengan wilayah terjadinya domestikasi ayam seperti yang

disampaikan oleh beberapa peneliti dengan pendekatan DNA molekuler.

Atas inisiasi dari ILRI (*International Livestock Research Institute*) yang melakukan kolaborasi dengan beberapa institusi dari Eropa, Afrika dan Asia untuk melakukan penelitian tentang asal dan distribusi keragaman genetik ayam domestikasi pada level DNA mitokondria, khususnya dengan menggunakan sekuen hipervariabel-I (HV-I) daerah kontrol DNA mitokondria sepanjang 397 pasang basa sebagai bahan kajian. Hasil penelitian yang didapatkan telah mendorong untuk menyelenggarakan *Chicken diversity consortium* pada saat diselenggarakan *The 4th all Africa conference on animal agriculture and the 31st annual meeting of the Tanzania Society for Animal Production* di Afrika yang dikordinasi oleh ILRI pada tanggal 20-24 September tahun 2005. Analisa yang dihasilkan yaitu telah terbentuk tujuh *haplogroup/clade*, yaitu *clade* I, II, IIIa, IIIb, IIIc, IIId dan IV (BJORNSTAD *et al.*, 2005 *unpublished in* MOBEGI, 2005; MOBEGI, 2006; ILRI, 2006; YI-PING *et al.*, 2006).

Salah satu topik penting yang dibahas dalam acara "*Chicken diversity consortium*" bahwa adanya indikasi bahwa *clade* II didominasi oleh ayam dari Indonesia. Hasil penting tersebut telah dikonfirmasi oleh SULANDARI *et al.* (2008) dengan melakukan analisis terhadap 434 individu dari 15 rumpun ayam Indonesia (ayam Cemani, Kedu, Kedu Putih, Merawang, Kapas, Kate, Arab Goden, Arab Silver, Sentul, Pelung, Wareng, Gaok, Nunukan, Tolaki dan Kalosi). Pohon filogeni yang terbentuk menunjukkan hubungan yang dekat antara ayam domestikasi dengan 2 anak jenis dari *Gallus gallus* (*G. g. gallus* dan *G. g. spadiceus*). Hasil penelitian SULANDARI *et al.* (2008) dapat mengungkap bahwa ayam Indonesia memiliki karakterisasi molekuler yang berbeda dengan ayam lain di dunia (80,2% masuk dalam *clade* II). Komposisi *clade* ayam di Asia diketahui ada tiga wilayah besar yang mempunyai komposisi *clade* yang sangat khusus atau dominan, yaitu daerah lembah Hindius (India) yang didominasi oleh populasi *clade* IV, sungai Kuning, Henan (China) yang didominasi oleh populasi *clade* IIIc, dan wilayah Indonesia yang didominasi oleh *clade* II maka ILRI (2006) menyimpulkan bahwa pusat domestikasi utama terjadi di Asia, yaitu China Selatan, India dan Indonesia.

Dalam rangka memberi kontribusi lebih luas terhadap sumber daya hayati ayam Indonesia, maka kajian lanjutan mengenai karakterisasi genetika molekuler khusus ayam Kampung Indonesia perlu dilakukan. Seperti diketahui bahwa ayam Kampung merupakan salah satu rumpun ayam asli Indonesia (Permentan No. 36/Permentan/OT.140/8/2006). Penyebaran populasi ayam kampung merata di seluruh pelosok kepulauan Nusantara dengan jumlah populasi sekitar 290.803.000 ekor (DITJENNAK, 2008). Selain itu

SIDADOLOG (2007) juga menyatakan bahwa kehidupan ayam Kampung telah menyatu dengan kehidupan masyarakat pedesaan. Hal ini terlihat dari keberadaan ayam Kampung di setiap pelosok wilayah pedesaan di Indonesia dan setiap anggota masyarakat di pedesaan memelihara ayam kampung. Pemeliharaan masih bersifat tradisional (dilepas di sekitar rumah) dan perkawinan antar individu berlangsung secara alamiah. Keragaman morfologi ayam Kampung masih sangat tinggi serta bervariasi dalam warna bulu, bobot badan, pertumbuhan dan produksi telur.

Informasi genetik tentang ayam Kampung yang sudah dievaluasi sampai saat ini masih terbatas dan bersifat parsial, belum ada data yang mengupas ayam Kampung dari wilayah Indonesia bagian Barat sampai Timur secara komprehensif. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan materi ayam Kampung yang dikoleksi dari berbagai tempat di Aceh, Sumatera Utara, Lampung, Banten, Jawa Tengah, Lombok, Sulawesi Tenggara, Ternate, Morotai dan Halmahera. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi gambaran lebih luas terhadap distribusi keragaman genetik ayam Indonesia, khususnya posisi ayam Kampung dalam *clade* ayam Asia. Sebagai salah satu pusat domestikasi ayam, tentu plasma nutfah ayam merupakan bagian penting dari kekayaan sumber daya hayati Indonesia. Diharapkan informasi dasar tentang distribusi *clade* dan keragaman genetika molekuler ayam Kampung dapat digunakan sebagai pijakan dalam melakukan konservasi, pengembangan, dan pemanfaatan plasma nutfah ayam Indonesia secara berkelanjutan.

MATERI DAN METODE

Koleksi material DNA

Material DNA ayam Kampung berupa darah sebanyak 210 sampel dikoleksi dari beberapa daerah di Indonesia, yaitu Aceh (29 sampel), Sumatera Utara (30 sampel), Lampung (25 sampel), Banten (18 sampel), Jawa Tengah (16 sampel), Lombok (45 sampel), Sulawesi Tenggara (17 sampel), Ternate (10 sampel), Morotai (10 sampel) dan Halmahera (10 sampel), serta ayam hutan merah (*G. gallus gallus*) dari Sulawesi (5 sampel). Material DNA dikoleksi di dalam tabung 2 ml dan diawetkan dengan menggunakan 100% alkohol.

Amplifikasi D-loop DNA mitokondria dan sekuen DNA

Ekstraksi material DNA berupa darah menggunakan metoda fenol/kloroform mengikuti prosedur SAMBROOK *et al.* (1989). Amplifikasi daerah D-loop DNA mitokondria menggunakan primer forward L16750 (5'-aggactacggcttgaaagc-3') dan primer reverse CR1b (5'-

ccatacacgcaaaccgtctc-3'). Reaksi PCR sebanyak 30 µl terdiri dari 2.5 mM dNTPs, 14 pmol masing-masing primer, 1.5 mM MgCl₂, 1×bufer PCR (10 mM Tris-HCl (pH 8.3) dan 50 mM KCl, 1.25 U Taq DNA polymerase, 40ng DNA template dan dH₂O.

Proses PCR menggunakan tabung reaksi 0,2 ml dengan Thermocycler machine Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystem, USA). Kondisi PCR meliputi Predenaturasi pada temperatur 94°C selama 5 menit dan kemudian dilanjutkan 35 siklus pada temperatur of 94°C selama 45 detik, 60°C selama 45 detik dan 72°C selama 90 detik. Setelah itu dilakukan final elongasi pada temperatur 72°C selama 10 menit. Visualisasi produk PCR dilakukan elektroforesis menggunakan 2% gel agarose dengan ethidium bromide dalam 1X bufer TAE pada 100 volts selama 30 minutes.

Purifikasi produk PCR dilakukan dengan menggunakan QIAquick kit purification PCR (Qiagen, GmbH, Germany). Produk PCR yang telah dipurifikasi dilakukan sekuen langsung pada segmen Hipervariabel-1 (HV-I) di daerah kontrol DNA mitokondria dengan menggunakan satu set primer internal sekuen, yaitu CR-forward (5'-tctatattccacatttctc-3') and CR-reverse (5'-ggcagcataaccaaatgg-3'). Sekuen dilakukan menggunakan BigDye* Terminator version 3.1 Circle Sequencing kit (Applied Biosystem, USA) dan kemudian di elektroforesis pada ABI 3730 XL automated capillary DNA sequencer (Applied Biosystems, USA).

Data analysis

Penselarasan hasil sekuen *forward* dan *reverse*, jarak genetik, serta analisa filogenetik dari sekuen hipervariabel-I daerah kontrol DNA mitokondria sepanjang 397 basa menggunakan Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) versi 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011). Ilustrasi diversitas haplotipe menggunakan analisis Network dengan program NETWORK versi 4.1.0.8 (BANDELT *et al.*, 1999). Polimorfisme DNA meliputi diversitas haplotipe, distribusi haplotipe, diversitas nukleotida serta uji Fu dan Li (1993), uji TAJIMA (1989) dilakukan menggunakan DnaSP versi 5.0 (ROZAS *et al.*, 2003).

Analisa filogeni dari 210 sekuen hipervariabel-I daerah kontrol DNA mitokondria dari ayam Kampung dan 5 spesimen *Gallus gallus gallus* yang dikoleksi dari hutan Sulawesi menggunakan referensi sekuen dari GenBank dengan kode akses AB098668 (KOMIYAMA *et al.*, 2003). Sekuen daerah kontrol lain dari GenBank yang digunakan adalah *Gallus gallus spadiceus* (kode akses AB007721) dan tujuh haplotipe referensi *haplogrup/clade* I, II, IIIa, IIIb, IIIc, IIIId dan IV (Tabel 1) berdasarkan rekomendasi *Chicken Diversity Consortium* yang dikoordinasi oleh International

Livestock Research Institute. *Outgroup* digunakan *Gallus varius* (code akses D82912), *Gallus lafayetti* (code akses D66893) dan *Gallus sonneratii* (D66892).

Table 1. Referensi haplogrup/clade dari ayam domestikasi

Nama <i>clade</i>	Kode haplotipe	Tempat sampling spesimen
<i>Clade I</i>	AF128344*	China
<i>Clade II</i>	AB009436*	Lombok, Indonesia
<i>Clade IIIa</i>	FL17	Thailand
<i>Clade IIIb</i>	DW07	China
<i>Clade IIIc</i>	DW02	China
<i>Clade IIId</i>	DC15	China
<i>Clade IV</i>	PKD15	Pakistan

Sumber: BJORNSTAD *et al.* (2005) unpublished in MOBEGI (2005); MOBEGI (2006); ILRI (2006); YI-PING *et al.* (2006).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Polimorfisme Sekuen hipervariabel-I

Hasil analisis sekuen HV-I sepanjang 397 pasang basa dari populasi ayam Kampung terdapat 62 situs polimorfik dan diidentifikasi terdapat 51 haplotipe (Gambar 1). Frekuensi haplotipe tertinggi terdapat pada H-4 (36,19%) kemudian diikuti H-1 (18,57%), H-5 (10,95%) dan haplotipe lainnya dengan frekuensi berkisar antara 0,48 hingga 2,3%. Distribusi situs polimorfik sekuen hipervariabel-I dari daerah kontrol DNA mitokondria, yaitu pada urutan basa antara 0-49 terdapat 4 situs polimorfik (6,45%), 50-99 tidak terdapat situs polimorfik (0%), 100-149 terdapat 3 situs polimorfik (4,84%), 150-199 terdapat 7 situs polimorfik (11,29%), 200-249 terdapat 14 situs polimorfik (22,58%), 250-299 terdapat 17 situs polimorfik (27,42%), 300-349 terdapat 14 situs polimorfik (22,58%) dan 350-397 terdapat 3 situs polimorfik (4,84%) (Gambar 2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa situs polimorfik tertinggi berada antara situs 112-397 pasang basa dari sekuen HV-I, yaitu terdapat 58 situs polimorfik (93,55%). SULANDARI *et al.* (2008) pada 15 rumpun ayam Indonesia melaporkan polimorfik tertinggi antara situs 167-397 pasang basa (94,5%).

Distribusi haplotipe hipervariabel-I

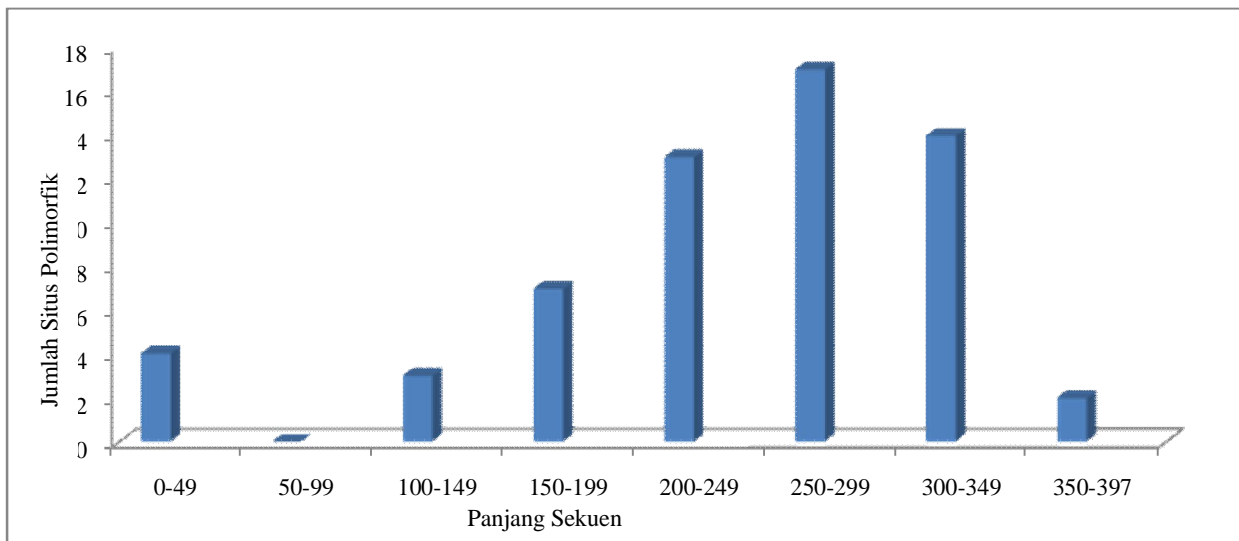
Frekuensi haplotipe tertinggi dari populasi ayam Kampung berturut-turut terdapat pada H-4 (36,19%)

dengan distribusi haplotipe meliputi Aceh, Sumatera Utara, Lampung, Banten, Jawa Tengah, Lombok, Sulawesi Tenggara, Ternate, Morotai dan Halmahera; kemudian diikuti H-1 (18,57%) dengan distribusi haplotipe meliputi Aceh, Lampung, Jawa Tengah, Lombok, Sulawesi Tenggara, Ternate, Morotai dan Halmahera; sedangkan H-5 (10,95%) dengan distribusi haplotipe meliputi Aceh, Sumatera Utara, Lombok, Ternate, Morotai, Moti dan Sulawesi Tenggara. Haplotipe lain dengan frekuensi lebih rendah berkisar antara 0,47% hingga 2,38% distribusinya terbatas di lokasi tertentu. Hasil tersebut menunjukkan tiga haplotipe yaitu H-4, H-1, dan H-5 paling dominan dan distribusinya menyebar luas ke berbagai daerah mulai dari Barat ke Timur wilayah Nusantara. Distribusi haplotipe ayam Kampung secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.

Analisis filogeni

Hasil analisa filogeni dengan referensi sekuen *clade* I, II, IIIa, IIIb, IIIc, IIId dan IV digunakan untuk menunjukkan posisi dari ayam Kampung dan *Gallus gallus* yang dikoleksi dari Sulawesi. Frekuensi *clade* dari ayam Kampung terdiri dari *clade* II= 84,31% (43 haplotipe), *clade* IIIc= 1,96% (1 haplotipe), *clade* IIId= 3,92% (2 haplotipe), *clade* IV= 7,84% (4 haplotipe), dan satu haplotipe berada di luar referensi pembagian *clade* (1,96%). Lima sekuen dari *G. gallus gallus* yang dikoleksi dari Sulawesi semua masuk dalam *clade* II dimana satu sekuen tergabung dalam H-23 dan dua sekuen lainnya tergabung dalam H-4, serta dua sampel berdiri sebagai haplotipe *G. g. gallus* 1 dan *G. g. gallus* 3 (Gambar 3). Hal ini berarti garis keturunan langsung ayam Kampung dari *clade* II berasal dari *Gallus gallus gallus*. Sekuen dari ayam domestikasi yang diambil dari GenBank dengan kode akses AB098668 masuk dalam *clade* IIId (China) dan sekuen dari *Gallus gallus spadiceus* dengan kode akses AB007721 masuk dalam *clade* IV (India).

Hasil analisis ini memberi petunjuk bahwa pada ayam Kampung terdapat empat *clade* (II, IIIc, IIId dan IV), berarti terdapat empat garis keturunan, sedangkan pada 15 rumpun ayam Indonesia (SULANDARI *et al.*, 2008) melaporkan terdapat lima *clade* (I, IIIc, IIId dan IV). Hal ini menunjukkan pada rumpun ayam Indonesia secara keseluruhan tidak terdapat garis keturunan dari *clade* IIIa dan IIIb, tetapi dalam jumlah kecil terdapat haplotipe yang tidak masuk dalam referensi pembagian *clade*, yaitu pada ayam Kampung (1,96%) dan pada 15 rumpun ayam lokal Indonesia lainnya (2,9%) dari jumlah haplotipe yang berhasil diidentifikasi.



Gambar 2. Distribusi situs polimorfik sekuen fragmen HV-I daerah kontrol DNA mitokondria

Pada ayam Kampung didominasi dalam *clade* II meliputi 84,31% dari semua populasi yang dianalisis. Hasil ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil analisis pada 15 ayam lokal Indonesia yang meliputi ayam Pelung, Cemani, Gaok, Kedu, Wareng, Arab Silver, Arab Golden, Merawang, Kapas, Nunukan, Tolaki dan Kalosi didominasi *clade* II sekitar 80,2% dari semua populasi yang dianalisis (SULANDARI *et al.*, 2008). Hasil ini memberi petunjuk bahwa dominasi *clade* II pada ayam Kampung lebih tinggi dari 15 rumpun ayam Indonesia. Hal yang dapat disimpulkan bahwa secara umum semua populasi ayam Indonesia berada di dalam *clade* II dan merupakan frekuensi populasi tertinggi dari populasi ayam di Asia. Frekuensi *clade* II tertinggi lainnya ditemukan pada populasi ayam di Madagaskar, yaitu mencapai 75% (MOBEGI, 2005). Tentu temuan ini menjadi semakin menarik kenapa populasi ayam di Madagaskar juga dominan di *clade* II sehingga perlu dilihat dari sejarah hubungan antara masyarakat di kepulauan Nusantara dan Madagaskar dimasa lalu. Pendapat ini diperkuat dari hasil penelitian COX *et al.* (2012) melaporkan hasil kajian dengan teknik molekuler terhadap suku bangsa di Indonesia dan Madagaskar. Hasil penelitian dilaporkan bahwa penduduk Madagaskar berasal dari kepulauan Nusantara. Selain itu menurut RAZAFINDRAIBE *et al.* (2008) menyatakan bahwa ayam Madagaskar berasal dari Indonesia dengan adanya dokumentasi mengenai migrasi manusia secara langsung dari Indonesia sekitar 1500 tahun yang lalu. MTILENI *et al.* (2011) melaporkan bahwa asal usul Ayam Afrika bagian selatan berasal dari tiga garis keturunan, yaitu China, India dan Asia Tenggara berdasarkan analisis DNA mitokondria. Kenyataan ini telah memperkuat posisi kepulauan nusantara sebagai pusat domestikasi utama dan rumpun

ayam Indonesia terkait erat dengan kehidupan liar ayam hutan merah (*G. gallus gallus*) yang masih hidup lestari sampai saat ini di hutan Sumatera, Jawa, Bali dan Sulawesi.

Analisa network

Analisa *Median-joining Network* dari 210 individu (51 haplotipe) ayam Kampung dilakukan dengan menggunakan program komputer NETWORK 4.1.0.8. (BANDELT *et al.*, 1999) dapat dilihat pada Gambar 4. *Median joining network* membuat diskripsi variasi genetik ayam Kampung yang dikoleksi dari berbagai tempat di Indonesia menunjukkan variasi terdiri dari empat *clade* (*clade* II, IIIc, IIIId IV) dan satu di luar referensi *clade* yang diperlihatkan lima warna yang berbeda dan didominasi oleh warna biru (*clade* II) yang terdiri dari 41 haplotipe yang diperlihatkan oleh lingkaran berwarna biru dan terdapat warna merah yang merupakan *G. gallus gallus* yang tergabung dalam H-4, H-23, dan dua sekuen ayam hutan merah lainnya berdiri sebagai haplotipe sendiri. Namun demikian semua *G. gallus gallus* yang berasal dari Sulawesi masuk dalam *clade* II. Diikuti warna kuning/*clade* IV (India) terdapat empat haplotipe, warna hijau tua/*clade* IIIId (China) terdapat dua haplotipe dan satu haplotipe sekuen referensi GenBank AB098668, warna hijau muda/*clade* IIIc (China) terdapat 1 haplotipe, dan satu haplotipe dari ayam Kampung berasal dari Jawa Tengah (empat sampel) tidak termasuk dalam pembagian referensi *clade* (warna abu-abu). Titik berwarna hitam merupakan median vector (mv) yang merupakan mutasi nukleotida dibandingkan dengan referensi sekuen kode akses GenBank AB098668 (KOMIYAMA *et al.*, 2003).

Tabel 2. Distribusi haplotipe ayam Kampung berdasarkan sekuen hipervariabel-I daerah kontrol dari DNA mitokondria

Haplotipe	Lokasi populasi ayam kampung										Total	Frekuensi (%)
	Aceh	Sumut	Lampung	Banten	Jateng	Lombok	Sulteng	Morotai	Ternate	Halmahera		
H_1	1	-	10	9	8	3	2	2	3	1	39	18,57
H_2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,95
H_3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_4	9	11	6	5	3	27	3	4	3	5	76	36,19
H_5	5	7	-	-	-	3	2	3	2	1	23	10,95
H_6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,95
H_7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_8	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,95
H_9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_10	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2	0,95
H_11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	0,95
H_13	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_14	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	0,95
H_15	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_17	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_18	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2	0,09
H_19	-	-	1	-	4	-	-	-	-	-	4	1,95
H_20	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_22	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	0,95
H_23	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5	2,38
H_24	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_25	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_26	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_27	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_28	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_29	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	0,95
H_30	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_31	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_32	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_33	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_34	-	-	-	-	-	-	3	-	1	-	4	1,90
H_35	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0,47
H_36	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	0,47
H_37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,47
H_38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,47
H_39	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	0,47
H_40	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	4	1,90
H_41	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	0,47
H_42	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	0,47
H_43	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_44	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_45	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_46	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1,43
H_47	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_48	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_49	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_50	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47
H_51	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47

Diversitas genetik

Keragaman genetik dari populasi ayam Kampung berupa diversitas haplotipe dan nukleotida sebagai berikut di Aceh ($0,890 \pm 0,044$) dan ($0,00907$), Sumatera Utara ($0,830 \pm 0,052$) dan ($0,00768$), Lampung ($0,782 \pm 0,053$) dan ($0,00639$), Banten ($0,725 \pm 0,083$) dan ($0,00494$), Jawa Tengah ($0,728 \pm 0,083$) dan ($0,01206$), Lombok ($0,654 \pm 0,080$) dan ($0,00395$), Sulawesi Tenggara ($0,908 \pm 0,039$) dan ($0,00781$), Ternate ($0,873 \pm 0,071$) dan ($0,01031$), Morotai ($0,018 \pm 0,083$) dan ($0,00654$), Halmahera ($0,818 \pm 0,119$) dan ($0,00709$). Populasi ayam Kampung secara keseluruhan mempunyai diversitas haplotipe $0,825 \pm 0,021$ ($0,018 \pm 0,083$ - $0,908 \pm 0,039$) dan diversitas nukleotida $0,00600$ ($0,00395$ - $0,01206$). Dapat dilihat secara lengkap pada Tabel 3.

Jika dilihat berdasarkan kelompok haplotipe populasi ayam Kampung, maka pada haplogrup II yang merupakan populasi mayoritas dari ayam Kampung maka diversitas haplotipe ($1,00 \pm 0,005$) dan diversitas nukleotida ($0,01057$), haplogrup III diversitas genetik ($1,00 \pm 0,272$) dan diversitas nukleotida ($0,00338$), haplogrup IV diversitas haplotipe ($1,00 \pm 0,177$) dan diversitas nukleotida ($0,01266$), sedangkan haplogrup IIIc hanya ada satu haplotipe dengan diversitas nukleotida ($0,01511$), dapat dilihat secara lengkap pada Tabel 4. Diversitas haplotipe pada 15 rumpun ayam lokal Indonesia lainnya berdasarkan laporan SULANDARI *et al.* (2008) berkisar antara $0,45538$ - $0,89832$, sedangkan secara keseluruhan dari rumpun ayam lokal Indonesia $0,880445$, sedangkan diversitas nukleotida $0,00264$ - $0,00828$ dan secara keseluruhan $0,00994$.

Hasil perbandingan dengan hasil penelitian di Afrika seperti yang dilakukan ADEBAMBO *et al.* (2010) melaporkan ayam Kampung Nigeria memiliki diversitas haplotipe ($0,4217 \pm 0,0419$) dan diversitas nukleotida ($0,00157 \pm 0,01376$) dan MTILENI *et al.* (2011),

diversitas haplotipe ayam lokal Afrika selatan terendah $0,54 \pm 0,08$ dan tertinggi $0,88 \pm 0,05$. Secara umum diversitas genetik ayam Afrika lebih rendah dibandingkan ayam Indonesia. Populasi ayam lokal Asia yaitu di Vietnam menurut SALAZAR *et al.* (2010) menunjukkan diversitas haplotipe ($0,75$ - $1,00$) dan diversitas nukleotida ($0,007$ - $0,019$), sedangkan keragaman genetik populasi ayam Jepang diversitas nukleotida berkisar antara $0,001020$ - $0,001623$ (OKA *et al.*, 2007).

Jarak genetik dan uji polimorfisme

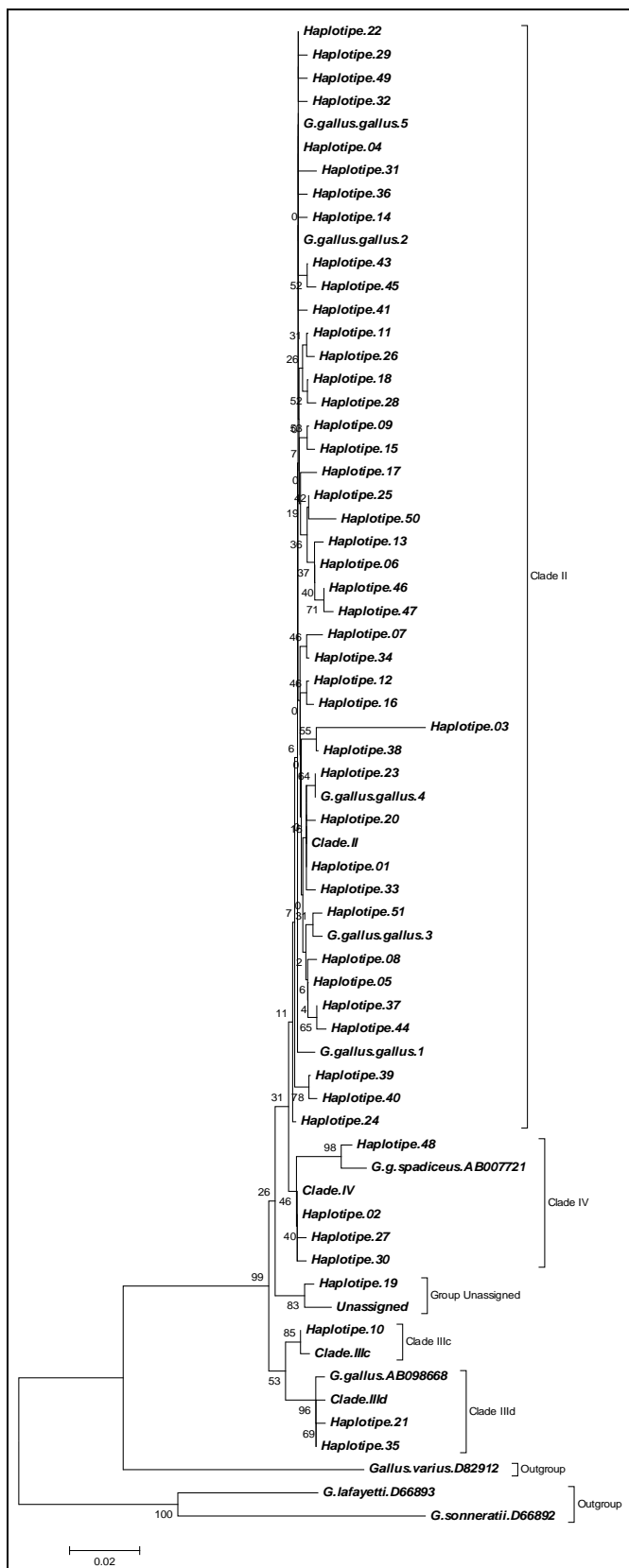
Hasil analisa jarak genetik dalam populasi ayam Kampung dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MEGA versi 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011) dengan hasil sebagai berikut, di Aceh ($0,008$), Sumatera Utara ($0,007$), Lampung ($0,005$), Banten ($0,003$), Jawa Tengah ($0,11$), Lombok ($0,003$), Sulawesi Tenggara ($0,006$), Ternate ($0,007$), Morotai ($0,003$) dan Halmahera ($0,003$). Perhitungan jarak genetik antar populasi berkisar antara $0,003$ - $0,011$, sedangkan hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Uji TAJIMA (1989b) dan uji Fu dan Li (1993) dilakukan untuk menguji hipotesis mutasi netral pada polimorfisme DNA. Perangkat lunak yang digunakan DnaSP versi 5.0 (ROZAS *et al.*, 2003). Hasil uji TAJIMA menunjukkan nilai negatif ($-2,35088$) dan uji Fu dan Li menunjukkan nilai negatif ($-4,83418$) dan berbeda sangat nyata $P < 0,01$ pada jarak genetik diantara individu populasi ayam Kampung. Menurut SIMONSEN *et al.* (1995), dikatakan Uji Fu dan Li sedikit lebih sensitif dibandingkan dengan uji TAJIMA. Nilai Fu's Fs negatif

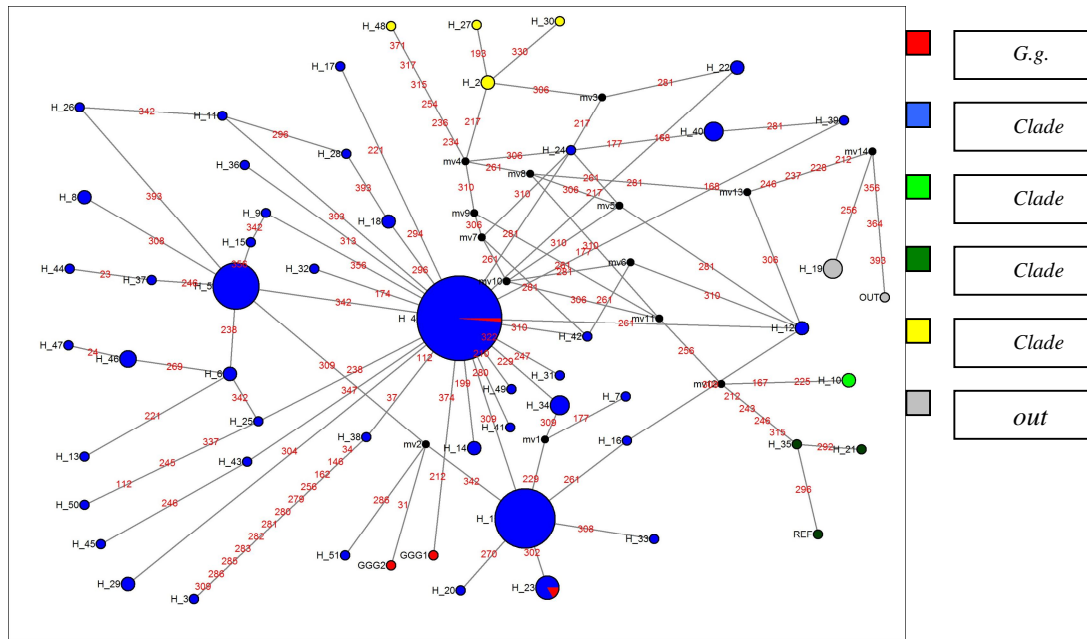
($-57,608$) merupakan indikator tingginya diversitas genetik dan ekspansi populasi pada ayam kampung. Hal ini berarti terjadi aliran gen antar populasi sangat tinggi seperti diperlihatkan dengan haplotipe utama yang menyebar dari wilayah barat hingga wilayah timur Indonesia.

Tabel 3. Diversitas ayam Kampung pada masing-masing populasi

Lokasi	Jumlah sampel	Situs polimorfik	Haplotipe	Diversitas Haplotipe	Diversitas nukleotida
Aceh	29	33	16	$0,890 \pm 0,044$	0,00907
Sumatera Utara	30	27	13	$0,830 \pm 0,052$	0,00768
Lampung	25	15	7	$0,782 \pm 0,053$	0,00639
Banten	18	12	6	$0,725 \pm 0,083$	0,00494
Jawa Tengah	16	15	5	$0,728 \pm 0,083$	0,01206
Lombok	45	22	15	$0,654 \pm 0,080$	0,00395
Sulawesi Tenggara	17	15	9	$0,908 \pm 0,039$	0,00781
Ternate	10	13	6	$0,873 \pm 0,071$	0,01031
Morotai	10	12	5	$0,018 \pm 0,083$	0,00654
Halmahera	10	13	7	$0,818 \pm 0,119$	0,00709
Total				$0,825 \pm 0,021$	0,00600



Gambar 3. Pohon filogeni ayam Kampung berdasar sekuen Hipervariabel-I daerah kontrol DNA mitokondria



Gambar 4. Analisis Median-joining network ayam Kampung berdasar sekuen Hipervariabel-I daerah kontrol DNA mitokondria masing-masing lingkaran merupakan proporsi frekuensi haplotipe

Tabel 4. Jarak genetik antar populasi ayam Kampung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aceh	-									
Banten	0,006									
Jateng	0,0011	0,008								
Lombok	0,006	0,003	0,008	0,005						
Ternate	0,008	0,005	0,009	0,006	0,005					
Morotai	0,005	0,003	0,008	0,004	0,003	0,005				
Halmahera	0,006	0,004	0,008	0,005	0,003	0,005	0,003			
Sulteng	0,007	0,005	0,010	0,006	0,005	0,007	0,005	0,005		
Sumut	0,007	0,006	0,011	0,007	0,005	0,007	0,005	0,005	0,007	-

KESIMPULAN

Hasil penting penelitian ini memberi petunjuk bahwa dominasi *clade* II pada ayam Kampung telah memperkuat hasil penelitian SULANDARI *et al* (2008), yang menyatakan Indonesia sebagai pusat domestikasi utama dan ayam lokal Indonesia terkait erat dengan ayam hutan merah (*G. gallus gallus*). Sebagai pusat domestikasi, populasi ayam Kampung menunjukkan diversitas genetik, ekspansi populasi, serta distribusi haplotipe yang tinggi. Hal ini juga diperlihatkan dengan haplotipe utama yang menyebar dari wilayah barat hingga wilayah timur di kepulauan Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Prof. Dr. Jian Lin Han (ILRI) atas bantuan dana yang diberikan untuk sekuen sampel ayam Kampung; teknisi Laboratorium Genetika, Bidang Zoologi-Puslit Biologi-LIPI serta pada semua pihak yang membantu dalam koleksi material DNA dari Aceh hingga di Propinsi Maluku Utara.

DAFTAR PUSTAKA

- ADEBAMBO, A.O., V.A. MOBEGI, J.M. MWACHARO, B.M. OLADEJO, R.A. ADEWALE, L.O. ILORI, B.O. MAKANJUOLA, O. AFOLAYAN, G. BJORNSTAD, H. JIANLIN and O. HANOTTE. 2010. Lack of phylogeographic structure in Negerian village chickens revealed by mitochondrial DNA D-loop sequence analysis. *Int. J. Poult. Sci.* 9: 503-507.
- BANDELT, H.J., P. FORSTER and A. ROHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-38.
- COX, M.P., M.G. NELSON, M.K. TUMONGGOR, F.X. RICAUT and H. SUDOYO. 2012. A small cohort of Island Southeast Asian women founded Madagascar. *Proc. R. Soc. B*
- DITJENNAK, 2008. Statistik Peternakan. Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian RI. hlm. 300.
- FUMIHITO, A., T. MIYAKE, S. SUMI, M. TAKADA, S. OHNO and N. KONDO. 1994. One subspecies of the Red Jungle Fowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12505-12509.
- FUMIHITO, A., T. MIYAKE, M. TAKADA, R. SHINGU, T. ENDO, T. GOJOBORI, N. KONDO and S. OHNO. 1996. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of indigenous fowls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 6792-6795.
- FU, Y.X. AND LI, W.H. 1993. Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- ILRI. 2006. Safe guarding livestock diversity. The time is now ILRI Annual report 2006. pp. 108.
- KOMIYAMA, T., K. IKEO and T. GOJOBORI. 2003. Where is the origin of the Japanese gamecocks? *Gene* 317: 195-202.
- TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI and S. KUMAR. 2011. MEGA 5.05: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolution distance, and maximum parsimony methode. *Mol. Biol. Evol.* 10: 2731-2739.
- LIU, Y.P., G.S. WU, Y.G. YAO, Y.W. MIAO and G. LUIKART. 2006. Multiple maternal origin of chickens: out of the Asian jungles. *Mol. Phy. Enet. Evol.* 38: 12-19.
- MOBEGI, V.A. 2005. Genetic characterization of African chicken using mitochondrial DNA D-loop sequences *Thesis*. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Nairobi, Nairobi.
- MOBEGI, A.V. and CHICKEN DIVERSITY CONSORTIUM. 2006. Mitochondrial DNA D-loop Sequences Reveal the Genetic Diversity of African Chicken. Tanzania Society for Animal Production, Dar es Salaam; All Africa Society for Animal Production, Nairobi (Kenya). The role of biotechnology in animal agriculture to address poverty in Africa: Opportunities and challenges. Proc. of the 4th all Africa conference on animal agriculture and the 31st annual meeting of the Tanzania Society for Animal Production. Dar es Salaam Tanzania: TSAP. pp. 293-298.
- MTILENI, B.J., F.C. MUCHADEYI, A. MAIWASHE, M. CHIMONYO, E. GROENEVELD, S. WEIGEND and K. DZAMA. 2011. Diversity and origin of South African chickens. *Poult. Sci.* 90: 2189-2194.
- NIU, D., Y. FU, J. LUO, H. RUAN, X.P. YU, G. CHEN and Y.P. ZHANG. 2002. The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. *Biochem. Gen.* 40: 163-174.
- OKA, T., Y. INO, K. NOMURA, S. KAWASHIMA, T. KUWAYAMA, H. HANADA, T. AMANO, M. TAKADA, N. TAKAHAKA, Y. HAYASHI and F. AKISHINONOMIYA. 2007. Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Int. Societ. Anim. Gen.* 38: 287-293
- RAZAFINDRAIBE, H., V.A. MOBEGI, S.C. OMMEH, RAKOTONDRAVAO, G. BJORNSTAD, O. HANOTTE and H. JIANLIN. 2008. Mitochondrial DNA origin of indigenous Malagasy chicken, implication for a functional polymorphism at the Mx gene. *Anima Biodiversity and emerging diseases. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149: 77-79.
- ROZAS, J., J. C SÁNCHEZ-DELBARRIO, X. MESSEGYER and R. ROZAS. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- SALAZAR, C.B., X. ROGNON, T.N. VAN, M. GELY, C.V. CHI, M.T. BOICHARD, B.B. HOM, N. BRUNEAU, E. VERRIER, J.C. MAILLARD and J.R. MICHAUX. 2010. Vietnamese chickens: A gate towards Asian genetic diversity. *BMC. Genetics* 11: 1-11.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH and T. MANIAS. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Vol. 1-3. Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- SAWAI, H., H.L. KIM, K. KUNO, S. SUZUKI, H. GOTOH, M. TAKADA, N. TAKAHATA, Y. SATTÀ and F. AKISHINONOMIYA. 2010. The origin and genetic variation of domestic chickens with special reference to junglefowls *G. gallus gallus* and *G. varius*. May 2010. www.plosone.org
- SIBLEY, C.G. and B.L. MONROE. 1990. Distribution and Taxonomy of Birds of the World. Yale University Press. New Haven and London. P1111.
- SIDADOLOG, J.H.P. 2007. Pemanfaatan dan kegunaan ayam lokal Indonesia. *Dalam: Keanekaragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia Manfaat dan Potensinya*. DIWYANTO K. dan S.N. PRIJONO (Eds.). Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor, Indonesia. pp. 27-42.
- SULANDARI, S., M.S.A. ZEIN and T. SARTIKA. 2008. Molecular characterization of Indonesian indigenous chicken based on mitochondrial DNA displacement (D)-loop sequences. *Hayati J. Biossci.* 15: 145-154.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

- WEST B. and B.X. ZHOU. 1988. Did chickens go north? New evidence for domestication. *J. Archaeol. Sci.* 15: 515-533.
- YI-PING, L., W. GUI-SHENG, Y. YONG-GANG, M. YONG-WANG, G. LUIKART, M. BAIG, A. BEJA-PEREIRA, D. ZHAO-LI, M.G. PALANICHAMY and Z. YA-PING. 2006. Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungle. *Mol. Phylogen. Evol.* 38: 12-19.