

## Identifikasi Keragaman Gen Flavin-Containing Monooxygenases 3 (FMO3|AlwNI) pada Ayam Lokal Indonesia

### Polymorphism Identification of Flavin-Containing Monooxygenases 3 (FMO3|AlwNI) in Indonesian Local Chicken

R. L. Suhita<sup>1)</sup>, A. Gunawan<sup>2)</sup>, S. Darwati<sup>2)</sup>, N. Ulupi<sup>2)</sup>, C. Sumantri<sup>23)</sup>

<sup>1)</sup>Fakultas Peternakan, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

<sup>2)</sup>Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

<sup>3)</sup>Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

Correspondence author: 085781056454/ rindang.suhita@gmail.com

#### ABSTRACT

Local chicken in Indonesia is commonly maintained traditionally for meat consumption so that it has the potential to be developed as an economical livestock commodities. The increasing of meat local chicken demand should be followed by the increasing of its quality. FMO3 gene as a gene that control meat quality especially controlling fish odor in livestock product, can be used as a functional gene in its function as a genetic marker. This research was aimed to identify the FMO3 gene polymorphism in exon 6 in broiler, kampung, sentul, merawang, pelung and nunukan chicken population. Identification of polymorphism was used 129 samples from those populations. AlwNI enzyme was used in PCR-RFLP technique to digest PCR product overnight. Genotyping showed only AA genotype (275/249 bp) in 524 bp product amplification. There was no polymorphism found in every population. It needs further study in the different sequences to find the polymorphism of FMO3 in local chicken.

**Key words :** AlwNI, FMO3, local chicken, PCR-RFLP

#### PENDAHULUAN

Produksi komoditas ternak Indonesia periode 2013-2015 pada sektor unggas meningkat sebesar 67.03%-67.85% (BPS 2015). Hal ini membuktikan bahwa komoditas unggas masih memberikan sumbangan terbesar pada produksi daging nasional. Ayam lokal sebagai salah satu komponen pada sektor unggas hanya menyumbang sebesar 15.12% dari total produksi unggas atau 10.26% dari total produksi ternak nasional. Ayam lokal merupakan hasil domestikasi ayam hutan merah (*Gallus gallus*) oleh penduduk setempat dan memiliki ciri khas dibanding ayam dari negara lain (Sulandari *et al.* 2007). Ayam lokal merupakan ayam yang banyak dibudidayakan di masyarakat dengan keunggulan keragaman fenotip dan genotip, adaptif, tahan panas, serta resisten terhadap penyakit (Nataamijaya 2000; Pagala *et al.* 2013; Tamzil *et al.* 2013; Ulupi *et al.* 2013). Ayam lokal dapat dikelompokkan sebagai tipe pedaging (pelung, nagrak, gaok, dan sedayu), petelur (kedu, nunukan, merawang, dan wareng), dan dwiguna (sentul, kampung, bangkalan, dan olagan) (Nataamijaya 2010). Ayam lokal umumnya dipelihara secara tradisional untuk kebutuhan pangan hewani dalam rumah tangga. Dengan demikian, ayam lokal memiliki potensi untuk dapat ditingkatkan sebagai pemenuhan program ketahanan pangan yang aman, sehat, utuh, dan halal (ASUH). Semakin tingginya konsumsi ayam

lokal berkaitan dengan adanya paradigma di masyarakat bahwa ayam lokal memiliki rasa yang enak dan lebih aman dikonsumsi karena berkhasiat bagi kesehatan.

Rasa yang enak dan aroma khas dari ayam lokal berkaitan dengan kandungan lemak yang ada di daging ayam lokal. Lemak memberikan cita rasa dan aroma spesifik pada makanan yang tidak dapat digantikan oleh komponen makanan lainnya (Sartika 2008). Winarso (2003) menyatakan lemak merupakan komponen daging yang bervariasi, sehingga kualitas fisik daging dapat ditentukan oleh kadar lemak dalam daging. Hal ini mendukung Setiyono (1987) yang menyebutkan kualitas fisik daging ditentukan oleh komposisi kimia daging yang memiliki variasi pada komponen lemak. Komponen dasar lemak adalah asam lemak dan gliserol yang diperoleh dari hasil hidrolisis lemak, minyak maupun senyawa lipid lainnya. Salah satu jenis asam lemak, yaitu asam lemak esensial dibutuhkan oleh tubuh untuk pertumbuhan dan fungsi normal semua jaringan yang tidak dapat disintesis oleh tubuh (Mayes 2003). Kualitas daging lebih banyak dipengaruhi oleh status nutrisi, namun faktor genetik juga memberikan pengaruh pada kualitas daging khususnya kadar lemak daging (Soeparno 2011). Upaya peningkatan produktivitas ayam dapat dilakukan melalui seleksi berbasis marka genetik, khususnya untuk sifat perlemakan yang

berpengaruh terhadap kualitas daging. Salah satu gen yang berperan pada regulasi lemak tubuh adalah FMO grup.

Grup FMO memiliki peran sebagai kontributor mayor metabolisme xenobiotic. Selain itu, grup FMO memetabolis endogen tertentu sebagai bagian dari substrat hasil proses fisiologis diskrit. Gunawan *et al* (2013) menyebutkan adanya mutasi pada gen FMO5 berasosiasi dengan kandungan androstenon yang berpengaruh pada *odour* daging babi. FMO memiliki kekhususan substrat dan sering menghasilkan metabolit yang berbeda yang berpotensi signifikan sebagai toksikologi (Hao *et al.* 2009). Genotipe GG gen FMO5 pada babi mengindikasikan tingginya androstenon sedangkan genotipe AG mengindikasikan tingginya skatol dan indol (Neuhoff *et al.* 2015).

Gen FMO3 (*flavin containing monooxygenase 3*) memiliki peran sebagai kandidat gen major yang mengontrol bau amis akibat akumulasi trimethylamine (TMA) di telur ayam (Honkatukia *et al.* 2005). Honkatukia *et al.* (2005) menunjukkan adanya titik mutasi gen FMO3 pada beberapa populasi ayam yang menyebabkan perubahan basa adenin menjadi timin pada posisi 1034. Mutasi ini menyebabkan perubahan kodon ACT menjadi TCT sehingga merubah asam amino threonine menjadi serine pada sekuen asam amino ke-329. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi keragaman gen FMO3 pada ayam lokal Indonesia sehingga dapat bermanfaat sebagai acuan seleksi ayam lokal dengan kualitas daging yang baik.

## MATERI DAN METODE

### Pengambilan sampel darah ayam

Sampel darah yang digunakan sebanyak 129 sampel yang berasal dari enam populasi yang terdiri atas 7 ayam ras pedaging, 56 ayam kampung, 20 ayam sentul, 20 ayam merawang, 20 ayam pelung, dan 6 ayam nunukan. Pengambilan sampel darah ayam dilakukan pada bagian sayap ayam di sekitar *vena axilaris* menggunakan spoit yang telah dibersihkan sebelumnya dari bulu dan kotoran yang menempel menggunakan alkohol 70%. Darah kemudian dimasukkan ke dalam tabung 1.5 mL yang sudah diisi dengan EDTA. Darah disimpan pada refrigerator dengan suhu 4°C.

### Ekstraksi dan Amplifikasi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan Sambrook *et al.* (1989) yang dimodifikasi. Darah diambil sebanyak 20 µL, lalu ditambahkan 1 000 µL NaCl 0.2% dalam tabung *Eppendorf* 1.5 mL, dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 8 000 rpm selama 5 menit dan supernatan yang terbentuk dibuang. Endapan ditambahkan 40 µL SDS 10%, 10 µL proteinase-K (5 mgmL<sup>-1</sup>) dan 1×STE 400 µL dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 2 jam. Degradasi bahan organik dilakukan dengan menambahkan 400 µL *phenol solution*, 400 µL CIAA, dan 40 µL NaCl 5M selama satu jam pada suhu ruang.

Molekul DNA disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 5 menit. Fase DNA sebanyak 400 µL dipindahkan ke tabung baru untuk ditambahkan 800 µL EtOH *abssolute* 70% dan 40 µL NaCl 5M, kemudian *freezing (overnight)* pada suhu -20 °C. Setelah didiamkan selama semalam, fase DNA kemudian dikeluarkan dari

*freezer*. Molekul DNA disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 5 menit untuk memisahkan EtOH *absolute*. Supernatan yang mengendap dibuang. Endapan didiamkan hingga kering untuk disuspensikan dalam 100 µL TE 80%. Sampel DNA disimpan dalam *freezer*.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer yang dirancang berdasarkan Wang *et al.* (2013) dengan *forward* 5'-CAC CGT GGC CTC GC-3' dan *reverse* 5' 5'-GAA ACA TCA GTC TTG TTT CAA G-3'. *Premix* PCR dibuat dengan campuran primer 0.3 µL, *Green Master Mix* 7.5 µL, dan DW 6.2 µL sesuai dengan perhitungan jumlah sampel yang akan diamplifikasi lalu *premix* dihomogenkan dan disentrifugasi. Sampel dimasukkan pada mesin PCR dengan suhu *annealing* 60°C.

### Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Penentuan genotipe gen IGF2 menggunakan metode RFLP. Sebanyak 5 µL produk PCR gen IGF2 dipotong menggunakan 2 µL *restriction endonuclease mix* yang terdiri atas 1 µL dH<sub>2</sub>O, 0.7 µL buffer, dan 0.3 µL enzim pemotong, kemudian diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37 °C. Enzim pemotong yang digunakan untuk gen FMO3 adalah *AlwMI* yang mengenali situs potong CAGNNN| (Gambar 1)

Produk PCR yang sudah dipotong oleh enzim restriksi kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 2% dengan buffer 0.5 *Tris Borat EDTA* (TBE) yang dialiri arus listrik dengan tegangan 100 V selama 40 menit. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan di bawah UV trans iluminator.

### Analisis Data

Setelah genotipe didapat melalui metode PCR-RFLP, nilai frekuensi alel, frekuensi genotipe, nilai keseimbangan Hardy-Weinberg, heterozigositas pengamatan, dan heterozigositas harapan dihitung berdasarkan rumus berikut:

**Frekuensi alel (Nei dan Kumar 2000).** Perhitungan frekuensi alel didapatkan melalui rumus berikut :

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

Keterangan:

$x_i$  = frekuensi alel ke-i

$n_{ii}$  = jumlah individu bergenotipe ii

$n_{ij}$  = jumlah individu bergenotipe ij

N = total sampel

**Frekuensi genotipe (Nei dan Kumar 2000).** Perhitungan frekuensi genotipe didapatkan melalui rumus berikut :

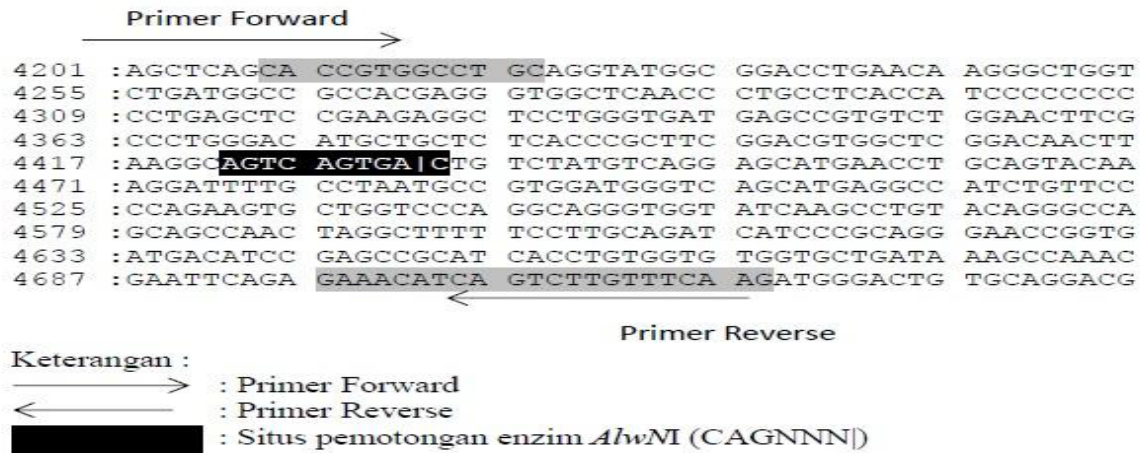
$$x_{ii} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i}{N}$$

Keterangan:

$x_{ii}$  = frekuensi genotipe ii

$n_i$  = jumlah individu bergenotipe ii

N = total sampel



Gambar 1 Visualisasi penempelan primer dan situs pemotongan pada sekuen gen FMO3 ekson 6 sesuai dengan kode akses Ensembl ENSGALG00000003316

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Amplifikasi gen *Flavin-Containing Monooxygenases 3(FMO3|AlwNI)***

Gen FMO3 didapatkan melalui isolasi DNA dengan metode penghancuran sel, pemusnahan protein dan RNA, serta pemurnian DNA dari sampel darah. FMO3 merupakan gen yang terletak pada kromosom 8 ayam dengan panjang mencapai 7 693 pb terdiri atas 9 ekson dan 8 intron (Gambar 2).

*Primerforward* dan *reverse* yang telah disusun akan berkomplemen pada salah satu rantai tunggal komplemennya pada suhu 60 °C (*annealing*) selama 20 detik. Produk PCR yang didapatkan kemudian dielektroforesis dengan menggunakan agarose 1.5%. Visualisasi produk PCR gen FMO3 pada ekson 6 disajikan pada Gambar 3a. Hasil tersebut direaksikan dengan enzim restriksi *AlwNI* selama 16 jam (*overnight*) pada suhu 37 °C. Hasil RFLPgen FMO3 dapat diamati pada Gambar 3b.

Hasil RFLP yang diamati menunjukkan bahwa hanya ditemukan satu genotipe pada seluruh populasi yang diamati yaitu AA. Wang *et al* (2013) sebagai acuan primer menyebutkan adanya titik *missense mutation* pada ekson 6 di posisi 869 dengan perubahan basa adenin (A) menjadi guanin (G). Mutasi ini dapat berpengaruh terhadap kerja enzim FMO3 pada bebek. Honkatukia *et al.* (2005) menyebutkan adanya mutasi adenin (A) menjadi timin

(T) pada ayam di ekson 7 posisi 329 yang menyebabkan perubahan asam amino threonin menjadi serin.

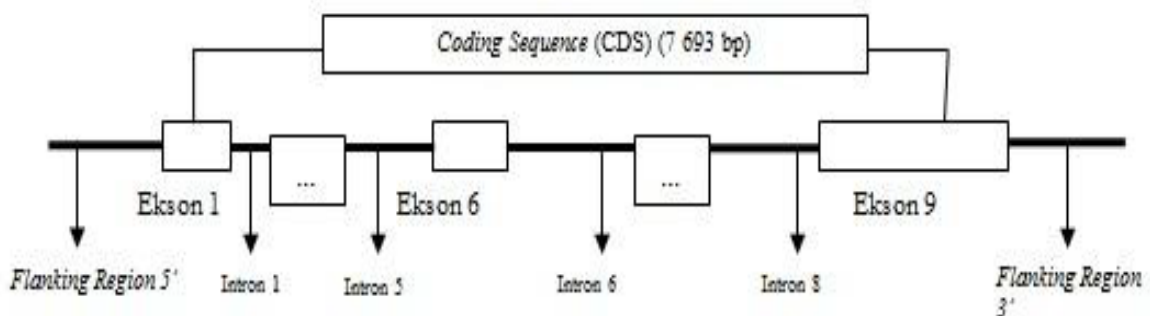
**Frekuensi Genotipe dan Frekuensi Alel FMO3|AlwNI dan Keseimbangan Hardy-Weinberg**

Analisis keragaman gen FMO3 ekson 6 pada ayam kampung, sentul, merawang, pelung, dan nunukan dilakukan menggunakan frekuensi genotipe dan frekuensi alel yang disajikan pada Tabel 1. Seluruh sampel yang dianalisa diketahui hanya memiliki satu genotipe yaitu AA sehingga frekuensi alel A sebesar 1.00. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak ada keragaman genetik sekuen gen FMO3 ekson 6 yang digunakan dan tidak ditemukan alel G pada seluruh populasi ayam yang diteliti.

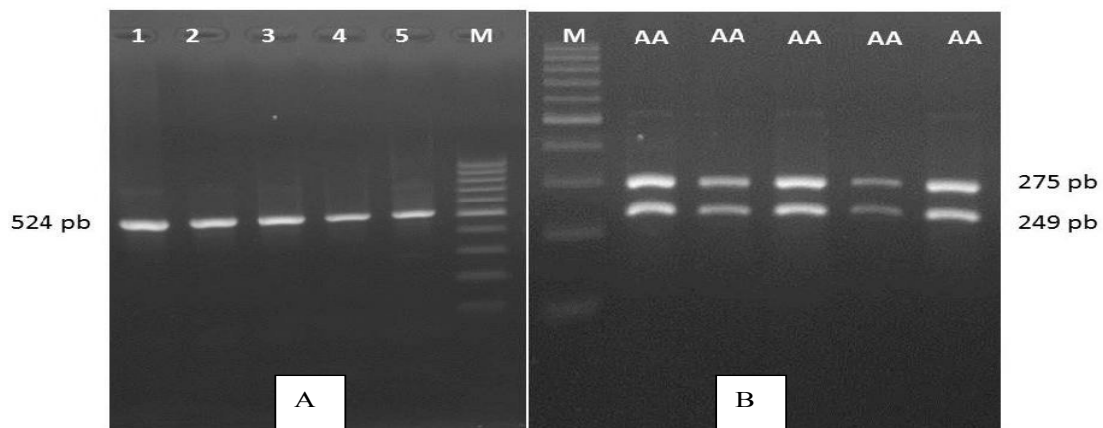
Tabel 1 Frekuensi genotipe dan alel sampel gen FMO3|AlwNI

Sampel	N	Genotipe			Alel	
		AA (n)	AG (n)	GG (n)	A	G
Broiler	7	1,00 (7)	0	0	1	0
Kampung	56	1,00 (56)	0	0	1	0
Sentul	20	1,00(20)	0	0	1	0
Merawang	20	1,00 (20)	0	0	1	0
Pelung	20	1,00 (20)	0	0	1	0
Nunukan	6	1,00 (6)	0	0	1	0

Keterangan: n= jumlah individu



Gambar 2 Visualisasi struktur gen FMO3 berdasarkan sekuen gen FMO3 di Ensemble (nomor akses : ENSGALG00000003316)



Gambar 3 Hasil (a) amplifikasi gen FMO3 pada ayam kampung dengan panjang target 524 pb pada agarose 1.5% (b) RFLP gen FMO3 pada ayam kampung dengan panjang 524 pb pada agarose 2%. M (marker = 100 pb); 1-5 (sampel); AA (genotipe)

Keragaman gen FMO3 telah banyak diteliti dan terbukti berasosiasi dengan bau amis pada beberapa hewan. *Nonsense* mutasi pada sekuen gen FMO3 sapi menunjukkan adanya asosiasi dengan bau amis pada susu sapi Lunden *et al.* (2002). Glenn *et al.* (2007) membuktikan adanya asosiasi bau amis pada daging babi dengan keragaman gen FMO3. Hamid *et al.* (2012) menyatakan terdapat mutasi A→T pada posisi 985 bp sehingga didapatkan tiga genotipe, yaitu AA, AT, dan TT. Honkatukia *et al.* (2005) melakukan sekuensing gen FMO3 pada ayam petelur komersil. Hasil yang didapatkan menunjukkan adanya mutasi nonsinonim (T→S) sehingga menyebabkan peningkatan level TMA yang berpengaruh pada bau amis kuning telur ayam. Hamid *et al.* (2012) melakukan pengamatan keragaman pada 306 ekor ayam dari 6 populasi dengan frekuensi genotipe tertinggi pada TT. Honkatukia *et al.* (2005) menyebutkan bahwa genotipe TT memiliki peningkatan TMA 10 kali dibandingkan genotipe lainnya. Ward *et al.* (2009) melakukan pengamatan pada titik yang sama menunjukkan adanya pengaruh genotipe TT terhadap tingkat trimethylamine (TMA) pada kuning telur ayam petelur komersil. Tingginya konsentrasi TMA berkaitan dengan adanya perubahan asam amino pada mutasi FMO3 yang menyebabkan gen ini menjadi tidak aktif (Honkatukia *et al.* 2005). Teknik sekuensing dan ekspresi RNA dilakukan Wang *et al.* (2013) pada titik yang sama dengan penelitian menunjukkan adanya 27 SNP, salah satunya terjadi *missense mutation* di ekson 6 bebek yang sangat berperan pada aktivitas enzim FMO3 di jaringan hati.

Terdapat kemungkinan mutasi yang dapat muncul pada total panjang gen FMO3 yang terletak di kromosom 8 sebesar 7 693 kb. Allendorf dan Luikart (2007) menyebutkan ratusan mutasi dapat terjadi pada setiap individu baru. Tidak ditemukannya keragaman di sekuen gen FMO3 pada beberapa sampel ayam lokal dapat disebabkan karena teknik PCR-RFLP yang digunakan hanya mampu mengenali satu titik mutasi.

## KESIMPULAN

Gen FMO3|*Alwn* teridentifikasi bersifat monomorfik pada populasi ayam broiler, kampung,

sentul, merawang, pelung, dan nunukan. Perlu dilakukan pengamatan lebih besar dengan titik mutasi yang berbeda untuk dapat digunakan sebagai penciri genetik untuk sifat kualitas daging, khususnya kadar lemak daging.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi melalui program Insentif SINAS 2015 No 12/SEK/INSINAS/PPK/IV/2015 yang telah memberikan dukungan dana pada penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Allendorf FW, G. Luikart. 2007. Conservation and The Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Oxford.
- [BPS] Badan Pusat Statistik (ID). 2015. Produksi Daging Unggas berdasarkan Provinsi dan Jenis Unggas. BPS RI, Jakarta.
- Glenn KL, A.M. Ramos, & M.F. Rothschild. 2007. Analysis of FMO genes and off flavour in pork. *J. Anim. Breed. Genet.* 124:35–38
- Gunawan A, S. Sahadevan, C. Neuhoff, C.G. Brinkhaus, A. Gad, L. Frieden, D. Tesyafe, E. Tholen, C. Looft, M.J. Uddin, K. Schellander, & M.U. Cinar. 2013. RNA deep sequencing reveals novel candidate genes and polymorphisms in boar testis and liver tissues with divergent androstenedione levels. *Plos One.* 8:5
- Hamid MA, X. Wang, & X. Zhao. 2012. Genotyping of flavin-containing mono-oxygenase 3 (FMO3) gene by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and mismatch amplification mutation assay (MAMA-PCR) in chickens. *Afr. J. Biotech.* 11:1823-1828
- Hao DC, S.L. Chen, J. Mu, & P.G. Xiao. 2009. Molecular phylogeny, long-term evolution, and functional divergence of flavin-containing monooxygenases. *Genetica.* 137:173–187
- Honkatukia M, K. Reese, R. Preisinger, M. Tuiskula-Haavisto, & S. Weigend, J. Roito, A. Maki-Tanila, J. Vilkki. 2005. Fishy taint in chicken eggs is associated with a substitution within a conserved motif of the

- FMO3 gene. *Genomics*. 86:225–232.
- Lunden A**, S. Marklund, & V. Gustafsson. 2002. A nonsense mutation in the FMO3 gene underlies fishy off-flavor in cow's milk. *Gen. Res.* 12:1885–1888
- Mayes PA**. 2003. *Biosintesis Asam Lemak*. UI Press, Jakarta.
- Nataamijaya AG**. 2000. The native chicken of Indonesia. *Buletin Plasma Nutfah*. 6:1
- Nataamijaya AG**. 2010. Pengembangan potensi ayam lokal untuk menunjang peningkatan kesejahteraan petani. *J. Litbang Pertanian*. 29: 4.
- Nei M**, S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Pr, Oxford.
- Neuhoff C**, A. Gunawan, M.O. Farooq, M.U. Cinar, C.G. Brinkhaus, S. Sahadeva, L. Frieden, L. Tesfaye, E. Tholen, C. Looft, K. Schellander, & M.J Uddin. 2015. Preliminary study of FMO1, FMO5, CYP21, ESR1, PLIN2 and SULT2A1 as candidate gene for compounds related to boar taint. *Meat Science*. 108: 67-73
- Pagala MA**, Muladno, C. Sumantri, & S. Murtini. 2013. Association of Mx Gene Genotype with Antiviral and Production Traits in Tolaki Chicken. *Inter. J. Poultry. Sci.* 12: 735-739
- Sambrook J**, E.F. Fritsch, & J.F. Medrano. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Pr, New York.
- Sartika RAD**. 2008. Pengaruh Asam Lemak Jenuh, Tidak Jenuh dan Asam Lemak Trans terhadap Kesehatan. UI Press, Jakarta.
- Setiyono**. 1987. Hubungan kualitas fisik dengan komposisi fisik dan kimia karkas daging domba lokal jantan yang diberi pakan dengan level energi dan berat potong berbeda. Tesis. Pascasarjana Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Soeparno**. 2011. *Ilmu Nutrisi dan Gizi Daging*. Gadjah Mada University Pr, Yogyakarta
- Sulandari S**, M. S. A. Zein, S. Paryanti, & T. Sartika. 2007. Taksonomi dan Asal Usul Ayam Domestikasi. Dalam: K. Diwyanto & S. N. Prijono (Eds.). *Keragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia: Manfaat dan Potensi*. Edisi Pertama. LIPI Press, Jakarta. Hal. 7-24
- Tamzil MH**, R.R. Noor, P.S. Hardjosworo, W. Manalu, & C. Sumantri. 2013. Acute heat stress responses of three lines of chickens with different Heat Shock Protein (HSP)-70 genotypes. *Inter. J. Poultry. Sci.* 12: 264-272
- Ulupi N**, Muladno, C. Sumantri, & I.W.T. Wibawan. 2013. Association of TLR4 gene genotype and resistance against *Salmonella enteritidis* natural infection in kampung chicken. *Inter. J. Poultry. Sci.* 12:445-450
- Wang P**, J. Zheng, Qu L, Lian L, Xu G, & Yang N. 2013. Molecular cloning, sequence characterization, SNP detection, and tissue expression analysis of duck FMO3 gene. *Mol. Cell Biochem.* 379:141–151
- Ward AK**, Classen HL, & Buchanan FC. 2009. Fishy-egg tainting is recessively inherited when brown-shelled layers are fed canola meal. *Poult. Sci.* 88:714-721
- Winarso D**. 2003. Perubahan karakteristik fisik akibat perbedaan umur, macam otot, waktu, dan perebusan pada daging ayam kampung. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 28:119-132