

POLA DAN LEVEL EKSPRESI GEN –GEN SIFAT MENERAM AYAM KAMPUNG (*Gallus gallus domesticus*) YANG DIBERI ANTIPROLAKTIN

Joice J Bana, Ermelinda D Meye

Program Studi Biologi FST Undana

ABSTRAK

Ayam kampung merupakan salah satu ternak unggas yang tidak asing lagi bagi masyarakat Indonesia dan dunia. Permintaan akan produk ayam khususnya ayam kampung baik daging maupun telur semakin meningkat dari tahun ke tahun, namun sampai saat ini belum bisa memenuhi permintaan. Hal ini disebabkan karena produktivitas ayam kampung yang relatif rendah. Kendala utama dalam meningkatkan produktivitas ayam kampung adalah sifat mengeram dan mengasuh anak yang lama. Sifat mengeram tersebut dipengaruhi oleh hormon dan gen. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa pola dan level ekspresi gen-gen sifat mengeram yaitu : Gen Prolaktin regulatory elemen binding protein (PREB), pituitary specific transcriptional factor (Pit-1), prolactin (PRL), Vasoactive intestinal peptide (VIP) dan GAPDH sebagai House keeping gen. Ayam berumur 6-7 bulan diberi senyawa anti prolaktin (2-Bromo-A-Ergocryptine Methanesulfonate salt) dengan dosis 0,12 mg/kg bb, 0,23 mg/kg bb dan 0,35 mg/kg bb secara oral, pada saat ayam menunjukkan tanda-tanda akan mengeram. Pengukuran profil dan pola keempat gen menggunakan metode PCR. Hipofisa ayam kampung diisolasi untuk mengukur pola serta level ekspresi gen-gen sifat mengeram. Analisis pola dan level ekspresi keempat gen dengan menggunakan ImageJ. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis antiprolaktin yang diberikan memberikan pengaruh terhadap pola dan level ekspresi yang berbeda untuk keempat gen tersebut.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: Dosis antiprolaktin yang diberikan memberikan efek inhibitor bagi gen PREB dan Pit-1 namun memberikan efek stimulator bagi gen PRL dan VIP.

Kata kunci: ayam kampung, anti prolaktin, Gen PREB, Pit-1, PRL dan VIP.

Ayam kampung (*Gallus gallus domesticus*), dikenal sebagai ayam yang telah mengalami domestikasi dan merupakan subspecies dari ayam hutan (*Gallus gallus*). Ayam merupakan hewan domestikasi yang umum dan penyebarannya luas dengan populasi lebih dari 19 trilyun pada tahun 2011 (UN's Food and Agriculture Organisation). Ayam kampung memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan ayam ras (negeri), diantaranya adalah : mudah dalam pemeliharaan, tahan terhadap penyakit, daging dan telurnya memiliki nilai jual yang lebih tinggi, namun juga memiliki kekurangan yaitu produktivitasnya yang rendah.

Produktivitas yang rendah ini berpengaruh terhadap jumlah telur yang dihasilkan yaitu rata-rata 45 butir/tahun. Produktivitas yang rendah ini disebabkan karena ayam kampung memiliki sifat mengeram. Sifat ini diekspresikan lewat tingkah laku mengerami telur dan mengasuh anak yang membutuhkan waktu yang lama, kurang lebih 3 bulan. Hartono (2014) menyatakan bahwa kendala utama dalam peningkatan produktivitas ayam kampung adalah periode mengeram yang sangat lama yaitu 21 hari mengerami telur dan 60 hari mengasuh anak diikuti waktu istirahat 9-10 hari, sehingga total menjadi lebih dari 3 bulan untuk satu periode anakan.

Untuk itu perlu upaya untuk meningkatkan produktivitas ayam kampung. Upaya ini diarahkan pada mengurangi atau menghilangkan sifat mengeram ayam kampung. Dengan mengurangi atau menghilangkan sifat mengeram maka jumlah periode bertelur

selama kurun waktu reproduksi (2-3 tahun) akan meningkat. Sejauh ini upaya-upaya untuk mengurangi atau menghilangkan sifat mengeram ayam kampung yang telah dilakukan adalah dengan memandikan, penyapihan anak secara dini dan seleksi (Sartika *dkk.*, 1988 dalam Hartono, 2003). Upaya lain yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan zat anti prolaktin.

Hormon prolaktin adalah hormone steroid yang dihasilkan dari hipofisa bagian anterior, dan bertanggung jawab terhadap berbagai proses fisiologi pada vertebrata, termasuk reproduksi, osmoregulasi, pertumbuhan dan perkembangan, metabolisme, regulasi kekebalan tubuh, keseimbangan energy dan tingkah laku (Ben-Jinathan, *dkk.*, 2008 dalam Bu, *dkk.*, 2013). Pada mamalia hormone prolaktin bertanggung jawab dalam sekresi air susu, sedangkan pada ayam hormone ini secara alami disekresi pada akhir periode bertelur dan bertanggung jawab dalam menginduksi kebiasaan mengeram. (Goldberg and Tim Jewell, 2016).

Salah satu zat anti prolaktin yang dapat digunakan untuk memanipulasi hormone prolaktin adalah Bromochryptin. Bromochryptin telah terbukti dapat mengatasi masalah hyperprolaktemia pada manusia (Martindale, 2009). Bromochryptin bersifat dopamin agonis yang diduga akan berkompetisi dengan reseptor prolaktin sehingga produksi prolaktin akan menurun yang berdampak pada pengurangan periode mengeram ayam kampung dan mempercepat siklus bertelur ayam kampung. Anwar dan Safitri, (2005) melaporkan bahwa penggunaan anti prolaktin pada ayam petelur dapat menghambat proses moulting dan mempercepat proses produksi telur.

Hormon prolaktin (PRL) yang dikode oleh gen prolaktin bukan merupakan satu-satunya faktor penentu sifat mengeram. Gen-gen dan atau kandidat gen yang telah diketahui berhubungan dengan sifat mengeram hasil beberapa peneliti telah dirangkum oleh Romanov (2001) yaitu : gen estrogen reseptor (ESR), gen progesteron reseptor (PGR), gen prolaktin (PRL), gen prolaktin reseptor (PRLR), gen vasoactive intestinal peptide (VIP), gen vasoactive intestinal peptide receptor (VIPR), luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR), luteinizing hormone-releasing hormone 1 (LHRH1), gen dopamin D1D receptor (D1LR), gen growth hormon (GH1), gene growth hormone receptor (GHR) dan gonadotrophin releasing hormone 1 (GNRH). Gen-gen lain yang juga telah ditemukan dan diduga berhubungan dengan sifat mengeram adalah gen promotor prolaktin, gen Pit-1, gen GARLN1, gen prolactin regulatory element binding protein dan gen dopamin D2 receptor (DRD2), (Sartika, dkk, 2004; Elzholt, dkk, 1991; Shen, dkk, 2012; Hiyama, dkk, 2015, 2016; Rahman, 2014).

Gen-gen yang berhubungan dengan sifat mengeram diduga berhubungan juga dengan regulasi sekresi hormon prolaktin. Untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk mengkaji hubungan gen-gen tersebut dengan sekresi hormon prolaktin dan mekanisme pengaturan sekresi hormon prolaktin oleh gen-gen yang berhubungan dengan sifat mengeram. Analisis pola serta level gen-gen sifat mengeram merupakan langkah awal untuk memperoleh data bagi

penelitian lanjutan dalam upaya peningkatan produktivitas ayam kampung dari aspek molekuler. Dalam penelitian ini digunakan empat gen yaitu gen PRL, gen Pit-1, gen PREB dan gen VIP. Pemberian antiprolaktin dalam berbagai dosis dipakai untuk melihat pola dan level ekspresi dari keempat gen tersebut.

MATERI DAN METODE

Persiapan Kandang dan Hewan Uji

Kandang yang digunakan adalah kandang ren (kandang yang dibangun sebagian merupakan tempat tertutup untuk tempat bertelur dan berteduh, sebagian tempat terbuka yang dibatasi pagar) Untuk bagian yang tertutup tempat bertelur dibuat dengan ukuran 40x40 cm/ekor yang dilengkapi dengan tempat makan dan minum. Sebelum digunakan, kandang ini terlebih dahulu disemprot dengan desinfektan untuk mencegah berkembangbiakan bibit penyakit. Setiap minggu kandang ini dibersihkan.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayam betina berumur 6-7 bulan (umur reproduktif) dengan berat berkisar antara 1100 kg – 1285 kg. Hewan ini dibiakkan sendiri dari 4 ekor induk dan 2 pejantan. Telur-telur yang dihasilkan dari perkawinan ayam jantan dan betina ditetaskan dengan mesin tetas, anak-anak ayam betina yang dihasilkan diseleksi hingga diperoleh ayam yang memiliki berat dan umur yang relatif seragam. Hewan uji diberi makan dan minum secara ad libitum. Pakan hewan uji berupa ransum komersil (BR II) dan jagung giling.

Pemberian Anti Prolaktin.

Hewan uji dibagi dalam 4 kelompok perlakuan yaitu : kelompok kontrol (K) : diberi air tanpa 2-Bromo-a-methanesulfonate ergocryptine salt, perlakuan 1 (P1) : diberi 2-Bromo-A-Ergocryptine Methanesulfonate salt dengan dosis 0,12 mg/kg bb, perlakuan 2 (P2) : : diberi 2-Bromo-A-Ergocryptine Methanesulfonate salt dengan dosis 0,23 mg/kg bb dan perlakuan 3 (P3) : : diberi 2-Bromo-A-Ergocryptine Methanesulfonate salt dengan dosis 0.35 mg/kg bb secara oral (Martindale, 2009), dengan menggunakan tabel konversi perhitungan dosis antar hewan (Laurence dan Bacharach, 1964).

Pemberian senyawa 2-Bromo-A-Ergocryptine Methanesulfonate salt diberikan pada saat ayam menunjukkan tanda-tanda akan mengeram.

Pengukuran Pola dan Level Ekspresi Gen VIP, PRL, Pit-1, PREB dan GAPDH.

Pada akhir penelitian hewan uji dikorbankan dengan cara dislokasi cervical kemudian diisolasi hipofisanya untuk digunakan melihat dan mengukur pola dan level ekspresi gen VIP, PRL, Pit-1, PREB dan GAPDH sebagai housekeeping gen. Design primer yang digunakan untuk amplifikasi gen-gen tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Design Primer Gen VIP, Pit-1, PRL, PREB dan GAPDH

NO	GEN		Sekuensing	Panjang (bp)
1	Pit-1	Forward	CCTCTCTGCCTCTGATAATGC	21
		Reverse	AGATGCGACTCTGGGAG	17
2	VIP	Forward	ATTGATAGCTCCCAGGACAG	20
		Reverse	CTCGAAGTTTGGCTGGATTT	20
3	PRL	Forward	ACTACATACTACTCTCTTCAG	24
		Reverse	CAGCACTCCCCTACTAAATTC	22
4	PREB	Forward	CCCGACAATAAGGTGGTGA	19
		Reverse	CACTTGGTCAGGTAGCAGG	19
5	GAPDH	Forward	GTG ATG GGT GTC AAC CAT GA	30
		Reverse	ACG GAA AGC CAT TCC AGT AA	30

Amplifikasi Gen Pit-1, VIP, PRL, PREB dan GAPDH.

Amplifikasi Gen Pit-1, VIP, PRL, PREB dan GAPDH menggunakan Bio Rad T100 Thermal Cyler dan Kit Tag Polymerase PCR Mix Kappa 2G Fast RM KKS dengan kondisi seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Amplifikasi Gen Pit-1, VIP, PRL, PREB dan GAPDH.

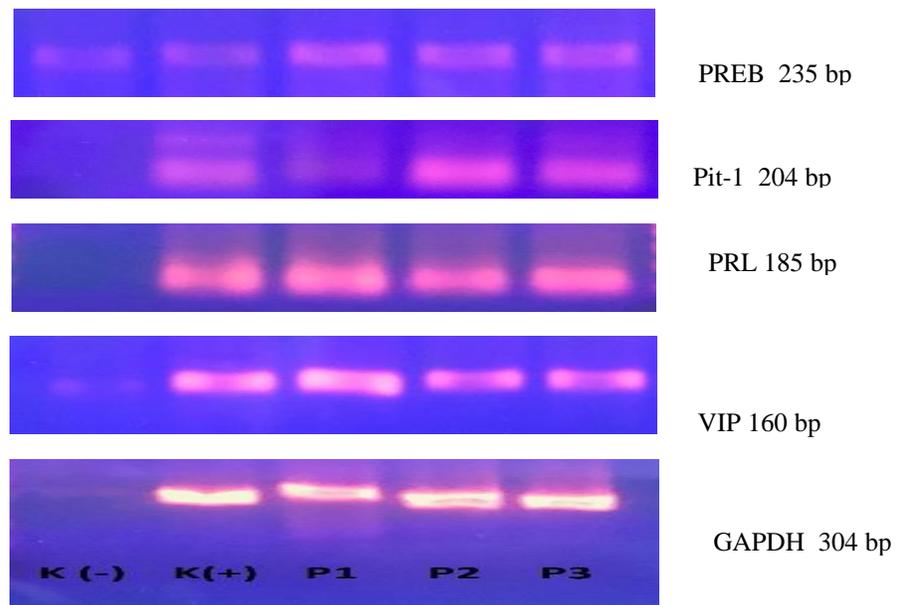
Gen	cDNA	Konsentrasi Primer	Siklus	Suhu
VIP	1 µg	0.25 µl	30 x , Dengan setting PCR : Initial denaturation 95° C : 3 min, denaturation 95° C : 30 s, Annealing (55 °C) : 30 s, Extension 72 °C : 60 s, Final Extension 72 °C ; 5 min, Hold : 4°C : ∞	55
PREB	1 µg	0.1 µl	30 x , Dengan setting PCR : Initial denaturation 95° C : 3 min, denaturation 95° C : 30 s, Annealing (55 °C) : 30 s, Extension 72 °C : 60 s, Final Extension 72 °C ; 5 min, Hold : 4°C : ∞	55
PRL	1 µg	0.5 µl	35 x , Dengan setting PCR : Initial denaturation 95° C : 3 min, denaturation 95° C : 15 s, Annealing (52-62 °C) : 15 s, Extension 72 °C : 15 s, Final Extension 72 °C ; 1 min, Hold : 4°C : ∞	55
PIT-1	1 µg	0.5 µl	35 x , Dengan setting PCR : Initial denaturation 95° C : 3 min, denaturation 95° C : 15 s, Annealing (52-62 °C) : 15 s, Extension 72 °C : 15 s, Final Extension 72 °C ; 1 min, Hold : 4°C : ∞	55
GAPDH	1 µg	0.5 µl	35 x , Dengan setting PCR : Initial denaturation 95° C : 3 min, denaturation 95° C : 15 s, Annealing (52-62 °C) : 15 s, Extension 72 °C : 15 s, Final Extension 72 °C ; 1 min, Hold : 4°C : ∞	55

Setelah dielektroforesis hasil PCR dilanjutkan dengan mengukur dan menganalisis Intensitas signal dari setiap produk PCR dengan menggunakan software umum ImageJ.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Gen VIP, PRL, Pit-1 dan PREB Setelah diberi Antiprolaktin

Target gen yang diisolasi dalam penelitian ini adalah gen PREB, Pit-1, PRL dan VIP . Amplifikasi gen-gen tersebut dilakukan dengan teknik PCR yang menghasilkan produk 253 bp, 204, 185 dan 160 untuk ke empat gen diatas secara berturut-turut dan sebagai house keeping gen digunakan GAPDH dengan ukuran 304 bp. Hasil elektroforesis terhadap transkripsi balik menjadi cDNA dari ke empat gen yang diisolasi dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Pola pita cDNA PREB, Pit-1, PRL dan VIP dari hipofisa ayam penelitian

Berdasarkan visualisasi hasil elektroforesis pada gambar 1 di atas, menunjukkan bahwa gen PREB, Pit-1, PRL dan VIP terekspresi pada semua perlakuan kecuali kontrol negative tapi dengan ketebalan pita yang berbeda. Terekspresinya gen-gen tersebut membuktikan bahwa gen-gen tersebut berperan dalam ekspresi sifat mengeram pada ayam. Gen VIP adalah gen yang mengkode Vasoactive Intestinal Peptide (VIP). VIP adalah faktor pelepas dari PRL pada unggas dan konsentrasi yang tinggi dari VIP pada hipotalamus berkorelasi dengan plasma PRL (Kansaku, dkk., 2001).

Lebih lanjut Ottinger, dkk (1995) menyatakan bahwa Vasoactive intestinal peptide (VIP) penting dalam meregulasi sekresi prolactin yang merupakan hormone yang berhubungan dengan tingkah laku mengeram. Sementara itu Hiyama (2015) mendapatkan level mRNA PRL dan PREB yang tinggi dari ayam Silkie pada fase mengeram.

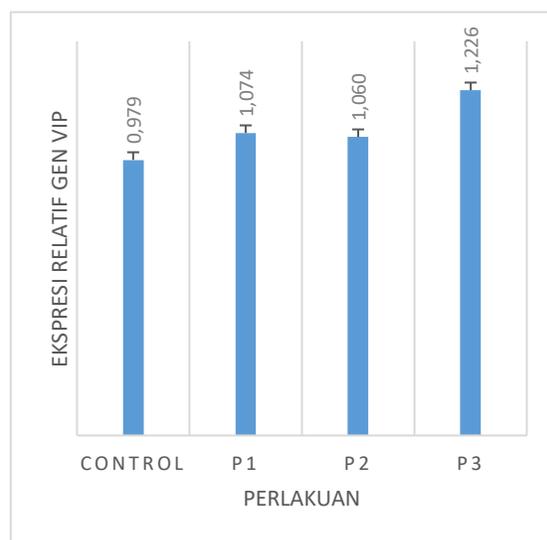
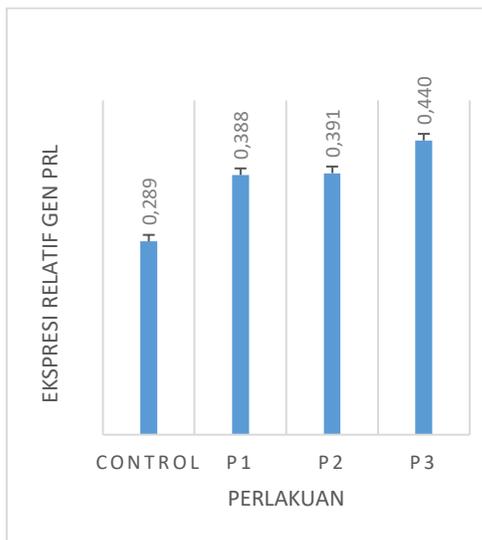
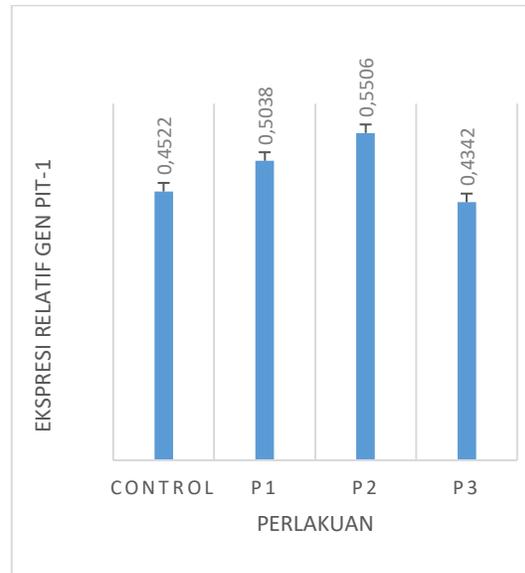
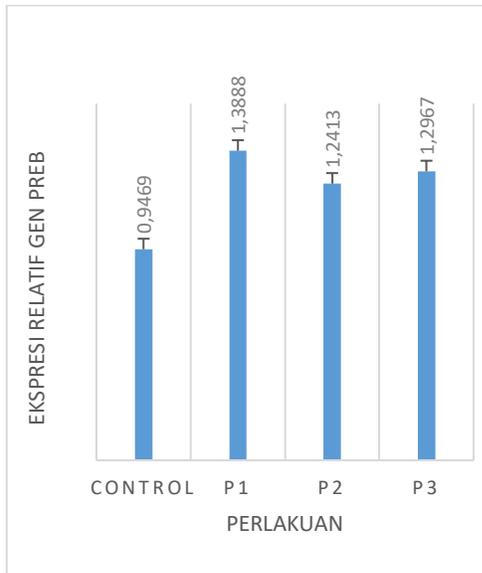
Untuk menguji hasil kualitatif pola pita hasil PCR dilakukan kuantifikasi terhadap mRNA dari gen PREB, Pit-1, PRL dan VIP hasil PCR dengan menggunakan ImageJ. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Ekspresi Relatif Gen PREB, Pit-1, PRL dan VIP

Perlakuan	Gen			
	PREB	Pit-1	PRL	VIP
K	0.947 ± 0.047	0.452 ± 0.014	0.289 ± 0.010	0.979 ± 0.027
P1	1.389 ± 0.033	0.504 ± 0.015	0.388 ± 0.032	1.074 ± 0.627
P2	1.241 ± 0.023	0.551 ± 0.026	0.391 ± 0.014	1.060 ± 0.120
P3	1.297 ± 0.047	0.434 ± 0.021	0.440 ± 0.018	1.226 ± 0.109

Sumber : Data primer.

Berdasarkan data hasil analisis dengan menggunakan Image J, dapat dibuat grafik untuk masing-masing gen seperti gambar di bawah ini.



Hasil Penelitian

Dari gambar di atas, menunjukkan bahwa ekspresi gen PRL dan VIP cenderung meningkat dengan meningkatnya konsentrasi antiprolaktin yang diberikan sedangkan gen Pit-1 dan PREB cenderung menurun. Kecenderungan terjadinya peningkatan ekspresi gen VIP seiring dengan meningkatnya ekspresi gen PRL diduga karena VIP merupakan faktor pelepas hormone prolaktin. Hiyama (2015) menyatakan bahwa pelepasan hormone prolactin dari kelenjar pituitaria anterior diawali oleh suatu factor pelepas yang disebut vasoactive intestinal peptide (VIP) yang dikode oleh gen VIP. Lebih lanjut Talbot, dkk (1991) menyatakan bahwa injeksi VIP menghasilkan peningkatan konsentrasi prolactin dalam plasma, sementara imunisasi pasif anti VIP menurunkan konsentrasi prolactin dalam plasma ayam yang sedang mengeram. Faktor lain yang dapat menjadi pemicu peningkatan ekspresi gen PRL dan VIP adalah dosis antiprolaktin yang dipakai masih berada pada dosis yang relatif rendah sehingga tidak mampu berperan sebagai penghambat (inhibitor) tapi justru berperan sebagai stimulator

Kecenderungan menurunnya ekspresi gen PREB dan Pit-1 seiring dengan bertambahnya dosis antiprolaktin menunjukkan bahwa kedua gen ini berperan pada fase mengeram dan berkorelasi langsung dengan dosis anti prolaktin yang diberikan. Hiyama, dkk (2015) menyatakan bahwa PREB adalah faktor transkripsi yang secara spesifik terikat pada Pit-1 pada promotor Prolaktin untuk meregulasi ekspresi gen prolaktin pada mamalia.

Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian Hiyama, dkk (2016) yang mendapatkan adanya peningkatan level faktor transkripsi PREB dan Pit-1 akibat peningkatan level mRNA PRL. Bila merujuk pada pendapat di atas maka seharusnya penurunan ekspresi gen PREB dan Pit-1 diikuti juga dengan penurunan ekspresi gen PRL, namun dalam penelitian ini tidak seperti itu. Hal ini menimbulkan pertanyaan besar yang perlu dikaji dalam suatu penelitian lanjutan.

Pada penelitian ini efek antiprolaktin yang diberikan terhadap perilaku mengeram dan performa reproduksi ayam belum tampak karena hanya dilakukan pada satu periode bertelur. Untuk itu perlu dilakukan untuk beberapa periode bertelur agar efek anti prolactin terhadap perilaku mengeram dan performa reproduksi ayam dapat diketahui untuk menjadi bahan pertimbangan penggunaan antiprolaktin sebagai agen anti mengeram dalam upaya untuk meningkatkan produktivitas ayam kampung.

PENUTUP

Simpulan

1. Gen PREB, Pit-1, PRL dan VIP berperan pada fase mengeram ayam kampung.
2. Peningkatan dosis antiprolaktin memberikan efek inhibitor bagi gen PREB dan Pit-1 namun memberikan efek stimulator bagi gen PRL dan VIP.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, H dan Safitri, E. (2005): Anti-prolaktin sebagai penghambat proses moulting, *Hayati* : **11**, 25-29.

- Bu, G., Wang, C. Y., Guoqing Cai, G., Leung F. C., Xu, M., Wang, H., Huang, G., Li, J. dan Wang, Y. (2013): Molecular characterization of prolactin receptor (cPRLR) gene in chickens : Gene structure, tissue expression, promoter analysis, and its interaction with chicken prolactin (cPRL) and prolactin-like protein (cPRL-L), *Molecular and Cellular Endocrinology*, **370**, 149-162.
- Crowther, J. R. (2001): *The ELISA guidebook. Humana Press, New Jersey.*
- El Halawani, M. E., Burke, W. H. and Dennison, P. T. (1998) : Effect of nest-deprivation on serum prolactin level in nesting female turkey. *Biology of Reproduction*, **23** : 118-123.
- Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., dan Nagy, G. (2000): Prolactin : Structure, Function & Regulation Of Secretion, *Physiol. Rev*, **80** (4).
- Goldberg, J. dan Tim Jewell. (2016): *Prolactin Level Test : Purpose, Procedure and Results*, www.healthline.com. Visited on Nov 6th, 2017.
- Hartono. (2003): *Upaya Meningkatkan Produktifitas Ayam Buras*. Puslitbang Peternakan. Bogor 29-30 Sept.2003.
- Hiyama, G., Kansaku, N., Tanaka, T., Wakui, S. dan Zadworny, D. (2015): Characterization of Chicken Prolactin Regulatory Element Binding Protein and its Expression in the Anterior Pituitary Gland During Embryogenesis and Different Reproductive Stages. *J. Poul. Sci.*, **52** : 42-51.
- Hiyama, G., Kansaku, N., Tanaka, T., Wakui, S., McQuaid, R dan Zadworny, D. (2016) : Characterization and Expression of Turkey Prolactin Regulatory Element Binding in the Anterior Pituitary Gland and Pancreas During Embryogenesis. *J. Poul. Sci.*, **53**: 67-75.
- Jiang, R. S., Xu, G. Y., Zhang, X.Q. dan Yang, N. (2005) : Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens, *Poultry Science*, **84**, 839-845.
- Kahtane, A. A., Chaiseha, Y. dan Halawani, E. M. (2003): Dopaminergic Regulation of Avian Prolactin Gene Transcription, *Molecular Endocrinology. J*, **31**, 185-196.
- Kaprawi, H. (2015): Mengenal Hormon LH, www.hendrik.id/2015/04/luitenizing hormon. Dikunjungi pada tanggal 10-10-2017.
- Laurence, D.R & Bacharach, A. L. (1964): *Evaluation Of Drug Activities Pharmacometrics*.
- Martindale. (2009): *The Complete Drug Reference*, 36th. Ed.
- Muryanto., W. ubiharta., D. M. Yuwono., D. Pramono dan B. Budiharto. (1998) : Pengkajian teknologi Pada Sistem Usaha Ayam Buras. *Laporan Hasil Pengkajian. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Ungaran*.
- Nanbaldov, A. V. (1990): *Fisiologi Reproduksi Pada Mamalia dan Unggas*, Ed. Ke-3. Penerbit UI, Jakarta. (Diterjemahkan oleh Sunaryo Keman).

- Noor, R. (2000): *Genetika Ternak*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Saputro, Th. (2014): Pengaturan Siklus Bertelur Ayam Kampung, www.ilmu ternak.com. Dikunjungi pada tanggal 10-10-2017.
- Siahaan, N. B., Supriyatno, E dan Mahfuds, L.D. (2013): Pengaruh Penambahan Tepung Jahe Merah (*Zingiber officinale ver. Rubrum*) Dalam Ransum Terhadap Laju Bobot Badan dan Produksi Telur Ayam Kampung Periode Layer. *Animal Agriculture Jurnal*, 2 (1) : 478-488.
- Talbot R.T., Hanks M. C., Sterling e. J., Sang H. M., dan Sharp P. J. (1991) : Pitutary prolactyin messenger ribonucleic acid level in incubation and laying hens : Effect of manipulating plasma level of vasoactive intestinal polypeptide. *Endocrinology*, 129 : 496-502.
- Wihandoyo., S. Sudaryanti dan T. Yuwanta. (1981): Pertumbuhan ayam kampung jantan dan betina yang hidup berkeliaran serta hubungan antara bobot badan dengan umurnya, *Bulletin Fakultas Peternakan*, 4 (V), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.