

Pengaruh Polimorfisme Gen Heat Shock Protein 70 (HSP70) SacII terhadap Toleransi Panas Itik Lokal Sumatera Barat

(The effect of heat shock protein 70 (HSP70) SacII gene polymorphism on heat tolerance of West Sumatera local duck)

Kusnadidi Subekti¹, Dedi Duryadi Solihin², Rudi Afnan³, Asep Gunawan³, dan Cece Sumantri³

¹Bagian Teknologi dan Produksi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas.

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University

³Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, IPB University

ABSTRAK Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi pengaruh polimorfisme gen *heat shock protein 70* (HSP70) terhadap sifat toleransi panas. Genotiping dilakukan pada 110 itik lokal dari 4 populasi itik Sumatera Barat (pitalah, bayang, kamang, dan payakumbuh). Enzim restriksi yang digunakan adalah *SacII*. Cekaman panas dilakukan selama 1 jam dengan sampel itik lokal sebanyak 24 ekor untuk menganalisa status hematologi. PCR-RFLP dan *Sanger sequencing assay* digunakan untuk mengidentifikasi polimorfisme. Analisis polimorfisme dilakukan dengan menggunakan *Software* MEGA 7 dan pengaruhnya dianalisis dengan ANOVA menggunakan *software* SAS 9.4. Produk amplifikasi yang dihasilkan yaitu 466 pasang basa. Lokus HSP70/SacII mengenali satu situs SNP (*Single*

nucleotide Polymorphism) g.1702T>C, menghasilkan dua alel (T dan C) dan tiga genotype (TT, TC, CC). Gen HSP70/SacII bersifat polimorfik pada semua populasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa alel T memiliki frekuensi yang lebih tinggi daripada alel C pada semua populasi. Analisis chi-kuadrat (χ^2) menunjukkan bahwa semua populasi itik lokal memenuhi kaidah kesetimbangan Hardy-Weinberg. Pengaruh genotype gen HSP70 terhadap status hematologi menunjukkan perbedaan ($P<0,05$) terhadap nilai heterofil dan nilai H/L dengan genotype CT menunjukkan toleransi panas yang lebih baik dibanding genotype lainnya. Gen HSP70/SacII dapat dijadikan marka molekuler sifat toleransi panas pada itik lokal berdasarkan keragaman dan pengaruhnya terhadap status hematologi.

Kata kunci: Gen HSP70, itik lokal, PCR-RFLP, polimorfisme

ABSTRACT The objective of this study was to identify the effect of HSP70/SacII gene polymorphism associated with the thermotolerance trait. Genotyping was performed on 110 local duck from the West Sumatera ducks population (pitalah, bayang, kamang, and payakumbuh). The restriction enzyme used was *SacII*. Heat stress was done for 1 hour with samples used as much as 24 birds to analyze hematological status. PCR-RFLP and *Sanger sequencing assays* were used to identify polymorphism. Analysis of polymorphism was conduct by MEGA 7 software and its effect is analyzed with ANOVA using Statistical SAS 9.4 software. The product of amplification was 466 bp. HSP70/SacII

recognized one SNP g.1702T>C, producing two alleles (T and C) and three genotypes (TT,TC,CC). The HSP70/SacII locus were polymorphic in all population. T allele had a higher frequency than C allele in all populations. The analysis of chi-square (χ^2) showed that all local ducks population were fit with Hardy-Weinberg equilibrium. The effect of HSP70/SacII gene on hematological status showed differences ($P<0,05$) of heterophil and H/L ratio with CT genotype show better heat tolerance than other genotypes. HSP70/SacII gene can be used as a marker of heat tolerance in local ducks based on polymorphism and its effect on hematological status.

Keywords: HSP 70 gene, local ducks, PCR-RFLP, polymorphism

2019 Jurnal Agripet: Vol (19). No. 2: 122-128

PENDAHULUAN

Peternakan itik lokal di Sumatera Barat saat ini didominasi oleh peternak dengan sistem pemeliharaan intensif yang sepenuhnya terkurung. Sistem intensif ini membuat itik yang merupakan unggas air tidak ada lagi

akses ke kolam air sebagai bagian dari tingkah lakunya yang berhubungan dengan minum dan perilaku berenang yang menyenangkan (O'Driscoll dan Broom 2011), padahal hal tersebut diyakini sebagai bagian dari usaha itik mengurangi stres akibat cekaman panas. Suhu lingkungan Sumatera Barat yang berkisar antara 23°C-32°C melebihi suhu nyaman itik yang berkisar antara 18,3°C-25,5°C, serta

Corresponding author: kusnadidi13subekti@aol.com
DOI: <https://doi.org/10.17969/agripet.v19i2.14876>

kondisi pemeliharaan intensif menyebabkan itik mengalami cekaman. Itik sebagai unggas air memiliki fisiologi yang berbeda dengan unggas lainnya sehingga itik lebih rentan terhadap cekaman panas (Ali *et al.*, 2008).

Tubuh unggas yang terganggu karena cekaman panas akan berusaha untuk mengembalikan homeostasis ke kondisi seperti sebelum terjadi cekaman. Jika cekaman berlangsung secara terus menerus dan tubuh gagal mengatasinya, jalur genetik akan digunakan dengan memproduksi protein yang sangat dikenal sebagai pelindung yaitu *heat shock protein* (HSP), dan protein ini hampir bisa ditemukan di semua organisme (Ristossa 1962; Lindquist dan Craig 1988). Diantara semua family HSP, HSP70 adalah yang paling banyak dipelajari. HSP70 pada makhluk hidup lebih sensitif terhadap perubahan suhu (Gong dan Golic 2006).

Studi tentang polimorfisme pada gen HSP70 menunjukkan variasi sekuen dikaitkan dengan tingkat ekspresi mRNA (Xia *et al.*, 2013). Mazzi *et al.* (2003) menganalisis daerah promotor dan awal *coding region* gen HSP70 pada ayam dengan berbagai kemampuan toleransi panas dan menemukan dua *single nucleotide polimorfisme* (SNP): A + 258G dan C + 276G, keduanya bersifat *silent mutation*. Zhen *et al.* (2006) melaporkan berbagai genotipe pada polimorfisme situs C + 276G dan A + 258G dikaitkan dengan tingkat ekspresi mRNA HSP70 di hati dan otot paha, dengan genotipe heterozigot lebih tinggi tingkat ekspresinya dibanding monozigot. Penelitian polimorfisme gen HSP70 pada ayam di Indonesia dengan menggunakan metode PCR-SSCP berhasil mengidentifikasi tujuh genotipe pada ayam kampung (AA, AB, AC, CC, AD, DD, dan BC), enam genotipe pada ayam arab (AA, AB, AC, CC, AD, dan BC) dan hanya satu genotipe pada ayam ras petelur (DD) (Tamzil *et al.*, 2013). Gen HSP70 pada itik (*white shansui*) telah teridentifikasi dengan panjang 2543 pb, terdapat 15 SNP dimana 12 bersifat transisi dan 3 transvers, frekuensi polimorfisme satu SNP per 127 pb dan semua SNP *silent mutation* karena tidak merubah asam amino yang dihasilkan. SNP yang diidentifikasi bersifat polimorfik dan dapat

digunakan sebagai penciri kemampuan toleransi panas pada itik (Xia *et al.*, 2013).

Sejak gen HSP 70 ditemukan, para ilmuwan telah aktif melakukan penelitian, tetapi sebagian besar penelitian berfokus pada mamalia dan ayam. Penelitian gen HSP70 sebagai penanda toleransi panas pada itik masih belum banyak dilakukan, bahkan belum pernah dilaporkan diteliti pada itik lokal Indonesia. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman gen HSP70 dan pengaruhnya terhadap toleransi panas pada itik lokal Indonesia.

MATERI DAN METODE

Hewan Percobaan, Sampel Darah dan Isolasi DNA

Penelitian ini menggunakan 110 ekor itik Sumatera Barat (pitalah 29 ekor, bayang 24 ekor, kamang 29 ekor, dan payakumbuh 31 ekor). Semua itik dipelihara pada kandang percobaan Laboratorium Lapangan Fakultas Peternakan Universitas Andalas. Semua itik dipelihara sesuai dengan prinsip-prinsip kesejahteraan hewan dan dalam kondisi yang sama dalam proses manajemennya. Sebanyak 1 ml darah dari setiap sampel itik diambil melalui *vena brachialis*, kemudian dimasukkan kedalam *vacuum tube* yang telah mengandung EDTA berukuran 3 ml.

Isolasi DNA dilakukan berdasarkan prosedur yang telah dimodifikasi menurut Sambrook dan Russel (2001) yaitu sebanyak 20 µl sampel darah itik dimasukkan ke dalam tabung ependorf (1,5 ml), ditambahkan dengan 1000 µl NaCl 0,2% dan didiamkan selama 5 menit. Langkah berikutnya disentrifugase pada kecepatan 8000 rpm selama 5 menit, kemudian dibuang bagian supernatan dan larutan ditambah 10 µl proteinase K 5 mg/ml, 40 µl sodium dodesil sulfat (SDS) 10% dan 350 µl 1 x STE (sodium tris EDTA). Campuran larutan dikocok pelan di dalam inkubator pada suhu 55°C, selama 2 jam. Selanjutnya campuran larutan ini ditambah 400 µl phenol, 400 µl CIAA (Chloform : Iso Amil Alkohol = 24 : 1), dan 40 µl 5 M NaCl, sambil digoyang pelan selama 1 jam pada suhu ruang. Campuran ini kemudian disentrifugase pada

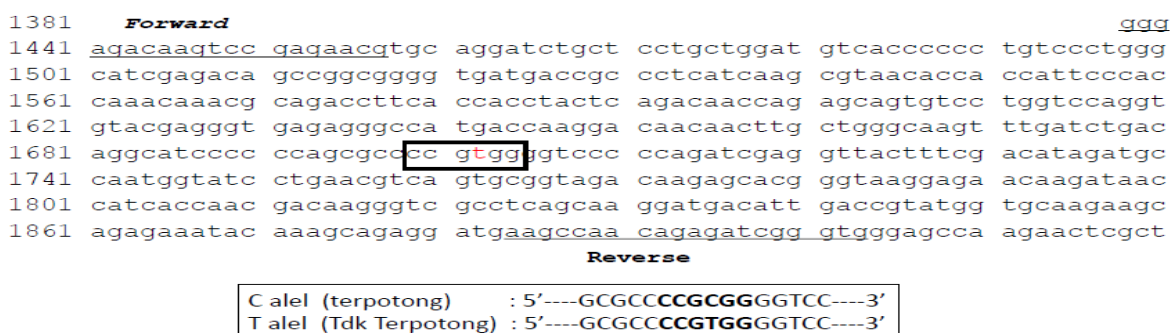
kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Bagian bening (DNA) sebanyak 400 µl dipindahkan menggunakan pipet ke tabung baru (1.5 ml). Tabung yang sudah berisi DNA (bagian bening), ditambah 800 µl etanol absolut dan 40 µl 5 M NaCl, kemudian disimpan dalam freezer selama semalam. Setelah disimpan satu malam, larutan disentrifugase pada kecepatan 12000 rpm selama 5 menit, lalu bagian supernatan dibuang dan didiamkan dalam keadaan terbuka pada suhu ruang sampai etanol hilang. Ke dalam tabung ini selanjutnya ditambah 100 µl TE 80%. DNA yang diperoleh kemudian disimpan dalam freezer sampai siap dipergunakan.

Amplifikasi dan Genotiping Gen HSP70

Sepasang primer (F: CAGCAACATCAAGTGGGCAG dan R: TGGTTCACACCCATCACGAA) didesain untuk mengetahui keragaman lokus SNP g1702T>C gen HSP70, lokus ini sebelumnya telah dilaporkan oleh Xia *et al.* (2013) dengan kode akses gen bank EU678246.2. Primer didesain menggunakan *primer designing tool* (NCBI 2018), primer menghasilkan produk amplifikasi sepanjang 466 pasang basa

(Gambar 1). Reaksi PCR dikondisikan pada volume 15 µL (0,5 µL DNA, 8 µL *green master mix*, 0,2 µL primer HSP 70 F dan 0,2 µL primer HSP 70 R, dan 6,1 µL *destilatian water*), Amplifikasi dilakukan menggunakan GeneAmp® PCR 9700 System (Applied Biosystems, USA). Reaksi PCR dimulai dengan denaturasi awal pada 95°C selama lima menit, selanjutnya dilakukan amplifikasi selama 35 siklus, masing-masing pada 95°C selama 10 detik, 60°C selama 20 detik, dan 72°C selama 30 detik, kemudian diakhiri elongasi akhir pada 72°C selama lima menit. Hasil amplifikasi DNA tersebut divisualisasi dengan elektroforesis gel agarose 1,5%.

PCR-RFLP teknik digunakan untuk mengetahui SNP gen HSP70, enzim restriksi SacII digunakan untuk mengenali lokus g1702T>C. Produk PCR-RFLP divisualisasi dengan elektroforesis gel agarose 2% menggunakan Transilluminator UV (Alpha Imager, Alpha Innotech, Santa Clara, USA). 12 hasil produk PCR disekuensing menggunakan jasa perusahaan PT Genetika Science Indonesia untuk memverifikasi mutasi.



Gambar 1. Posisi penempelan primer forward dan reverse (bergaris bawah), di dalam kotak dengan huruf berwarna merah adalah posisi SNP, dan yang dicetak tebal adalah situs potong enzim SacII (gen bank EU678246.2)

Perlakuan Cekaman Panas

Cekaman panas dilakukan pada suhu 35°C selama 1 jam. Itik lokal ditempatkan pada *environmental chamber* sederhana yang dimodifikasi dengan dinding pembatas terbuat dari mika dan bagian depan diberi kaca dengan ukuran panjang × lebar × tinggi yaitu 35 × 35 × 70 cm. Chamber sederhana ini dilengkapi

dengan *heater*, *blower*, termometer digital, dan termostat. Setelah perlakuan cekaman panas, sampel darah diambil melalui *vena brachialis* menggunakan spuit 1 ml dimasukkan ke tabung EDTA 5 ml, untuk analisis status hematologi.

Analisis Data

Nilai frekuensi alel, frekuensi genotipe, dan keseimbangan Hardy-Weinberg dihitung berdasarkan Nei dan Kumar (2000), sedangkan nilai heterozigositas pengamatan (H_o) dan heterozigositas harapan (H_e) berdasarkan Weir (1996). Penentuan SNP dan hasil sekuensing dianalisis menggunakan MEGA 7. Pengaruh genotipe gen HSP70 terhadap status hematologi itik lokal dianalisis dengan ANOVA menggunakan *software* SAS 9.4. Model matematika berdasarkan Steel dan Torrie (1993).

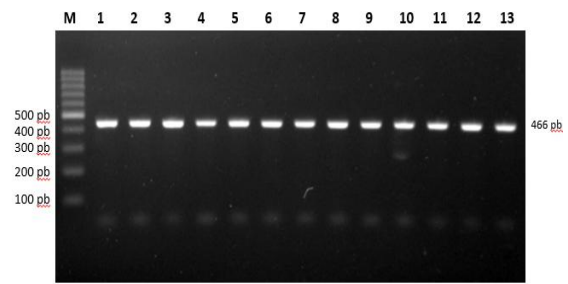
HASIL DAN PEMBAHASAN

Polimorfisme Gen HSP70

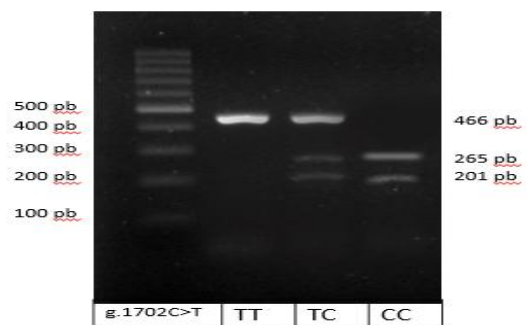
Berdasarkan hasil PCR Gen HSP 70 dari 110 sampel yang dielektroforesis pada gel agarose 1,5% dengan marker 100 pasang basa didapatkan pita DNA hasil amplifikasi sepanjang 466 pasang basa (Gambar 2). Penentuan SNP dengan metode PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi SacII (CCGC|GG), didapatkan hasil satu SNP dengan lokasi g1702T>C. Pada lokus ini didapatkan alel (T dan C) dengan 3 genotipe (TT,TC,CC). adapun panjang dari tiap-tiap genotipe yaitu genotipe TT (466 pasang basa), TC (466, 265, 201 pasang basa) dan CC (265, 201 pasang basa) (Gambar 3). Hasil ini sama dengan yang dilaporkan Xia *et al.* (2013) yaitu SNP g1702T>C didapatkan menggunakan metode PCR-RFLP dengan enzim restriksi SacII.

Alel T gen HSP70/SacII, dikeempat rumpun itik lokal Sumatera Barat mendominasi frekuensi alel. Nilai frekuensi alel T pada keempat rumpun itik berkisar antara 0,83-0,88, sedangkan nilai frekuensi alel C berkisar antara 0,13-0,17. Hal ini menunjukkan bahwa gen HSP70 pada lokus SacII bersifat polimorfik (beragam). Nei dan Kumar (2000) menyatakan bahwa jika terdapat dua alel atau lebih dengan nilai frekuensi relatif dalam populasi lebih dari 1%, maka disebut polimorfik. Genotipe TT mendominasi frekuensi genotipe gen HSP70/SacII, dengan nilai frekuensi genotipe TT pada keempat rumpun itik lokal berkisar antara 0,65-0,76 diikuti frekuensi genotipe CT

berada pada kisaran yang lebih rendah yaitu sebesar 0,21-0,35 serta frekuensi genotipe terendah adalah CC yaitu 0,03 (Tabel 1). Frekuensi alel dan genotipe SNP pada penelitian ini lebih tinggi polimorfismenya bila dibandingkan dengan hasil yang didapatkan Xia *et al.* (2013). Pada penelitian ini, genotipe CC tidak didapatkan pada rumpun itik bayang, kamang, dan payakumbuh. Tingginya keragaman gen HSP 70/SacII pada rumpun itik lokal Sumatera Barat merupakan peluang dilakukannya seleksi untuk mendapatkan genetik itik lokal yang lebih toleran terhadap cekaman panas, karena ternak yang memiliki keragaman gen tinggi lebih adaptif terhadap perubahan kondisi lingkungan pemeliharaan (Noor dan Seminar 2009).



Gambar 2. Hasil Amplifikasi gen HSP70 pada Gel Agarose 1,5 % Baris 1 – 13 : Sampel ; M : Pita DNA



Gambar 3. Polimorfisme Gen HSP 70/SacII lokus C1416T dengan teknik PCR-RFLP TT,TC, CC : Genotipe.

Nilai heterozigositas pengamatan H_o pada gen HSP 70/SacII pada masing-masing rumpun itik lokal yang dianalisis berkisar antara 0,21-0,35, sedangkan nilai heterozigositas harapan berkisar antara 0,22-

0,29. Locus SacII pada itik pitalah nilai H_o lebih kecil dibandingkan H_e , ini menunjukkan kemungkinan telah terjadi inbreeding yang cukup intensif itik pitalah dikalangan peternak di Sumatera Barat dengan tujuan untuk seleksi. Tambasco *et al.* (2003) menyatakan bahwa jika nilai heterozigositas pengamatan (H_o) lebih kecil dari pada nilai heterozigositas pengamatan (H_e), maka dalam populasi tersebut telah terjadi indogami/inbreeding yang intensif yang ditujukan untuk keperluan seleksi. Hasil pengujian nilai chi-kuadrat (χ^2) pada keempat rumpun itik lokal untuk gen HSP70/SacII menunjukkan bahwa frekuensi genotipe dan frekuensi alel berada dalam

kesetimbangan Hardy-Weinberg (Tabel 2). Vasconcellos *et al.* (2003) menyatakan bahwa suatu populasi dalam keseimbangan Hardy-Weinberg apabila frekuensi genotipe dan alel konstan dari generasi ke generasi. Ketidakseimbangan frekuensi genotipe atau alel dalam suatu populasi disebabkan karena terjadinya akumulasi genotipe, populasi yang terbagi, mutasi, seleksi, migrasi dan perkawinan dalam kelompok. Sebaliknya jika tidak ada seleksi, mutasi, migrasi dan *genetic drift* maka kesetimbangan genotipe atau alel dalam suatu populasi dapat tercapai (Noor 2010).

Tabel 1. Frekuensi alel dan genotipe lokus g.1702T>C gen HSP70/SacII itik lokal

Populasi Itik	N	Frekuensi Alel		Frekuensi Genotipe		
		T	C	TT	CT	CC
Bayang	24	0,88	0,13	0,75 (19)	0,25 (5)	-
Payakumbuh	31	0,84	0,16	0,68 (20)	0,32 (11)	-
Kamang	26	0,83	0,17	0,65 (17)	0,35 (9)	-
Pitalah	29	0,86	0,14	0,76 (22)	0,21 (6)	0,03 (1)

Tabel 2. Nilai heterozigositas (H_o dan H_e) dan uji chi-kuadrat (χ^2) gen HSP70/SacII itik lokal

Rumpun Itik	H_o	H_e	χ^2
Pitalah	0,25	0,22	0,49 ^{ns}
Bayang	0,32	0,27	1,15 ^{ns}
Kamang	0,35	0,29	1,14 ^{ns}
Payakumbuh	0,21	0,24	0,49 ^{ns}

Ket : ns = tidak berbeda nyata, $\chi^2_{(0,05, 1)} = 3,84$

Pengaruh Genotipe SNP Gen HSP70/SacII Terhadap Status Hematologi

Perbedaan genotipe lokus g1702T>C pada itik lokal berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap nilai heterofil dan nilai rasio H/L dalam kondisi cekaman panas 1 jam. Genotipe CT memiliki nilai heterofil dan rasio H/L lebih rendah dibanding genotipe TT dan CC (Tabel 3). Peningkatan jumlah nilai heterofil menunjukkan adanya cekaman. Peningkatan heterofil terjadi akibat adanya peningkatan sekresi glukokortikoid pada jalur pembentukannya dan juga pengeluaran heterofil cadangan dari sumsum tulang. Glukokortikoid adalah hormon yang diproduksi dalam kondisi cekaman (Blecha 2000).

Menurut Emadi *et al.* (2007) nilai konstan heterofil/limfosit adalah berada

dikisaran 0,2-0,8 dengan nilai normal 0,5. Peningkatan nilai H/L disebabkan oleh peningkatan hormon stres yang disekresikan oleh kelenjar adrenal (Gudev *et al.*, 2011), maka nilai H/L yang meningkat merupakan indikasi stres yang meningkat pula (Cetin *et al.*, 2011). Peningkatan nilai H/L darah menunjukkan pula peningkatan pada hormon glukokortikoid dalam kondisi cekaman panas (Davis *et al.*, 2008). Campo *et al.* (2000) menyatakan optimalnya perbandingan antara heterofil dan limfosit pada ternak akan memberikan kenyamanan (*welfare*), sehingga dapat mengatasi stres. Genotipe CT memiliki nilai heterofil dan rasio H/L yang lebih rendah dibandingkan genotipe TT dan CC, hal ini menunjukkan genotipe CT lebih toleran terhadap cekaman panas dibanding genotipe lainnya.

Tabel 3. Pengaruh genotipe SNP g1702T>C gen HSP70 terhadap status hematologi, waktu panting dan frekuensi panting itik lokal

Parameter	G1702T>C		
	Cekaman Panas 1 jam		
	TT	CT	CC
Eritrosit ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	2,49 \pm 0,33	2,56 \pm 0,02	2,38
Hematokrit (%)	27,33 \pm 3,55	28,85 \pm 0,77	34,30
Hemoglobin (gr %)	9,52 \pm 0,69	10,04 \pm 0,26	9,46
Leukosit ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	18,46 \pm 1,51	18,70 \pm 0,42	18,20
Heterofil (%)	37,00 \pm 0,86 ^a	36,00 \pm 0,00 ^a	39,00 ^b
Limfosit (%)	49,44 \pm 1,33	52,00 \pm 0,00	50,00
Monosit (%)	7,33 \pm 1,22	6,50 \pm 0,70	7,00
H/L Rasio	0,75 \pm 0,02 ^a	0,69 \pm 0,00 ^b	0,78 ^a
Waktu mulai panting (menit)	9,51 \pm 5,87	14,78 \pm 6,16	5,42
Frekuensi panting (kali/menit)	395,88 \pm 9,72	403,50 \pm 0,70	405,00

^{a, b} superskrip huruf kecil yang berbeda menunjukkan pengaruh nyata ($P < 0,05$)

KESIMPULAN

Didapatkan satu SNP gen HSP70/SacII, lokus ini polimorfik dan berada dalam kesetimbangan Hardy-Weinberg. Genotipe CT memiliki toleransi panas yang lebih baik dibanding genotipe lainnya. Berdasarkan keragaman genotipenya, gen Hsp70/SacII dapat digunakan sebagai penanda molekuler toleransi panas pada itik lokal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah membiayai melalui skim Penelitian Disertasi Doktor dengan kontrak Nomor: 050/SP2H/LT/DRPM/2018 Tahun Anggaran 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M.S., Yang, H.S., Jeong, J.Y., Moon, S.H., Hwang, Y.H., Park, G.B., Joo, S.T., 2008. Effect of chilling temperature of carcass on breast meat quality of duck. *Poult. Sci.* 87: 1860-1867.
- Blecha, F., 2000. Immune system response to stress. In: Moberg, GP, Mench JA (eds). *The Biology of Animal Stress: Basic Principle and Implications for Animal Welfare*. London (UK): CABI Publishing. pp: 111-146.
- Campo, J.L., Gil M.G., Munoz, I., Alonso, M., 2000. Relationship between bilateral asymmetry and tonic immobility reaction or heterofil to limfosit ratio in five breeds of chickens. *Poult. Sci.* 79: 453-459.
- Cetin, E., Guclu B.K., Cetin, N., 2011. Effect of dietary humate and organic acid supplementation on social stress induced by high stocking density in laying hens. *J. Animal and Vet. Adv.* 10(18): 2402-2407.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Func. Ecol.* 22:760-772.
- Emadi, M., Kermanshahi, H., Maraoufyan, E., 2007. Effect of turmeric rhizome powder on the activity of some blood enzyme in broiler chicken. *Int. J. Poult. Sci.* 6(1): 48-51.
- Gong, W.J., Golic, K.G., 2006. Loss of HSP70 in drosophila is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neuro degeneration. *Genetics*: 172: 275-286.
- Gudev, D., Popova-Ralcheva, S., Ianchev, I., Moneva, P., 2011. Effect of betaine and air ammonia concentration on broiler

- performance, plasma corticosterone level, lymphoid organ weights and some haematological indices. *Biotech. in Animal Husb.* 27(3): 687-70.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics.* 22: 631-677.
- Mazzi, C.M., Ferro, J.A., Ferro, M.I.T., Savino, V.J.M., Coelho, A.A.D., Macari, M., 2003. Polymorphism analysis of the HSP70 stress gene in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) of different breeds. *Genetics and Molecular Biology.* 26: 275-281.
- NCBI, 2018. Primer designing tools. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. [14 Januari 2018].
- Nei, M., and Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford Univ Pr. New York.
- Noor, R.R., 2010. *Genetika Ternak.* Penebar Swadaya. Jakarta.
- Noor, R.R., dan Seminar K.B., 2009. *Rahasia dan Hikmah Pewarisan Sifat (Ilmu Genetika dalam Al-Qur'an).* Bogor. Penerbit IPB Press. Hal:109.
- O'Driscoll, K.K.M., Broom, D.M., 2011. Does access to open water affect the behavior of Peking Ducks (*Anas platyrhynchos*). *Poult. Sci.* 90: 229-307.
- Ristossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *drosophila*. *Experientia.* 18: 571-573.
- Sambrook, J., and Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Steel, R.G.D., dan Torrie, J.H., 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika. Suatu Pendekatan Biometrik.* Edisi kedua. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Tambasco, D.D., Pas, C.C.P., Tambasco, S.M., Pereira, A.P., Alencar, M.M., Freitas, A.R., Coutinho, L.L., Packer, I.U., Regitano, L.C.A., 2003. Candidate genes for growth traits in beef cattle cross *Bos Taurus* × *Bos Indicus*. *J. An. Breed. Genet.* 120: 51-56.
- Tamzil, M.H., Noor, R.R., Hardjosworo, P.S., Manalu, W., Sumantri, C., 2013. Keragaman gen *heat shock* protein 70 ayam Kampung, ayam Arab dan ayam Ras. *J. Vet.* 14:317-326.
- Vasconcellos, L.P.M.K., Talhari, D.T., Pereira, A.P., Coutinho, L.L., Regitano, L.C.A., 2003. Genetic characterization of aberdeen angus cattle using molecular markers. *Genetic. Mol. Biol.* 26: 133-137.
- Weir, B.S., 1996. *Genetic Data Analysis II : Method for Discrete Population Genetic Data.* 2nd Ed. Sinauer Associates. Sunderland.
- Xia, M., Gan, J., Luo, Q., Zhang, X., Yang, G., 2013. Identification of duck HSP70 gene, polymorphism analysis and tissue expression under control and heat stress conditions. *British Poult. Sci.* 54(5): 562-566.
- Zhen, F.S., Du, H.L., Xu, H.P., Luo, Q.B., Zhang, X.Q., 2006. Tissue and allelic-specific expression of HSP70 gene in chickens: basal and heat-stress-induced mRNA level quantified with real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *British Poult. Sci.* 47: 449-455.