

Asosiasi Marka Genetik dengan Pertambahan Bobot Badan Sapi Madura di Pamekasan

Suyadi¹, Isnaini N¹, Rahayu S.² dan Y. Nurpah³

¹ Staff Member of Faculty of Animal Husbandry University of Brawijaya, Malang

² Staff Member of Faculty of Natural and Mathematics Sciences University of Brawijaya, Malang

³ Alumni of Faculty of Animal Husbandry University of Brawijaya, Malang

ABSTRACT

Characteristic of DNA markers may be able to be used as useful and efficient tool to select merit animal from a population. In order to Madura cattle, growth rate is one of important traits should be considered. The aim of this study was to evaluate the association between the characteristic of DNA marker of candidate gene for growth hormone (GH) and growth rate of Madura cattle. A number of 10 female Madura cattle selected from 40 animals in average of about 18 months old were used as sample. The animal was weighed twice using electronic balance at the interval time of two months. At the simultaneous time to the animal weighing the blood sample was collected via vena jugularis 6 ml of each for DNA source. The blood sample was dropped into polypropylene tubes containing EDTA for anti coagulant agent. DNA was isolated from leucocyte cells in the blood using salting out as standard method. PCR technique was used for amplifying the DNA using GH primer (forward: 5'-TAGGGAGGTGGAAAATGGA-3' and reverse: 5'-GACACCTAGACAATGCG-3'). DNA polymorphism of GH gene was detected using RFLP technique by digesting the PCR-product DNA with HaeIII enzyme at position of GG*CC. The results showed that amplified DNA with this primer showed a single band of 450bp. Restriction of DNA with HaeIII enzyme resulted 4 haplotypes of uncut fragment, 2 fragments (2a and 2b), 3 fragments (3a and 3b) and 5 fragments at the position of 125bp, 200bp, 275bp and 450 bp. According to the data analysis, the non significant association was shown between specific genetic polymorphism and growth rate in this cattle.

Key words: DNA marker, GH gene, growth rate, Madura cattle

PENDAHULUAN

Sapi Madura merupakan salah satu ternak lokal Indonesia yang memiliki ciri spesifik yang kemungkinan besar tidak dimiliki oleh ternak eksotik lainnya. Diantara ciri tersebut adalah ketahanan yang tinggi terhadap kondisi lingkungan tropis dengan suhu dan kelembaban harian tinggi, kondisi pakan kualitas rendah serta cekaman terhadap berbagai parasit (Suyadi, 2005).

Keyakinan saat ini adalah bahwa performans produksi sapi Madura selalu menurun dari tahun ke tahun yang disebabkan oleh menurunnya kualitas lingkungan untuk sapi bangsa ini dan kemungkinan terjadinya seleksi negatif yang berlansung di masyarakat sebagai akibat dua faktor utama yaitu (1) tidak adanya program *breeding* yang jelas dan ketat yang dapat diterapkan di masyarakat dan (3) pengetahuan dan kondisi sistem peternakan rakyat yang mengharuskan

kenyataan ini terjadi (Suyadi *et al.*, 2005). Untuk memperbaiki kinerja produksi sapi Madura, maka tidak ada pilihan lain kecuali dengan menerapkan seleksi yang terarah dan dilangsungkan secara kontinyu. Seleksi berdasarkan catatan individu ternak (sistem rekording) melalui pendekatan genetika kuantitatif telah terbukti mampu meningkatkan mutu genetik ternak serta produktivitasnya. Namun, metode ini memerlukan waktu yang sangat lama serta kecermatan dan kekomplekan sistem rekording. Di sisi lain, tidak menjangkau aspek genotip ternak yang mencerminkan potensi keunggulan genetiknya.

Seleksi berdasarkan marka genetik telah dipercaya dapat meningkatkan efisiensi dan percepatan pelaksanaan seleksi sehingga kemajuan genetik dapat ditingkatkan (Ge *et al.*, 2001). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui asosiasi atau hubungan antara marka genetik pada gen pertumbuhan dengan pertambahan bobot badan (PBB) sapi Madura di wilayah Pamekasan.

MATERI DAN METODE

Ternak dan Koleksi Sampel Darah

Selama sekitar 2 bulan, sebanyak 35 ekor sapi Madura berumur sekitar 1 tahun di wilayah Pamekasan ditimbang bobot badannya dan bersamaan dengan waktu tersebut diambil sampel darah sekitar 6 ml per ekor. Darah ditampung dalam tabung propilen 15 ml yang telah mengandung anti koagulan EDTA.

Pemisahan Leukosit dan Isolasi DNA

Sampel darah yang akan diteliti dipipeting sebanyak 3 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung *polipropilen* 15 ml, tambahkan 9 ml RBCs 1X, RBCs berfungsi sebagai pemecah sel darah merah, homogenkan

dengan gerakan bolak-balik, diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit kemudian disentrifugasi pada 1500 rpm selama 10 menit, buang supernatan. Prosedur ini diulangi sebanyak 3 kali sampai pelet (endapan) berwarna putih. Pelet yang didapat merupakan limfosit (Roby dan White, 1987).

Sel limfosit yang telah dipisahkan dari darah ditambah dengan 750 μ l *Cell Lysis Solution* (CLS), CLS berfungsi memecahkan dinding sel darah putih dan dinding intinya, dihomogenkan dengan cara *pipetting* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Tambahkan 500 μ l *Protein Precipitation* homogenkan dengan cara *divortex*, pindahkan ke dalam tabung *appendorf* 1,5 ml, disentrifugasi 10000 rpm, selama 15 menit pada suhu 4°C, pindahkan supernatan pada tabung *appendorf* baru, jangan sampai pelet ikut terambil. Supernatan pada tabung baru ditambah dengan *protein precipitation* sebanyak 500 μ l, *divortek*, dan disentrifugasi (10000 rpm, 15 menit, suhu 4°C). Supernatan dibagi dalam 3 buah *appendorf* baru, lakukan dengan hati-hati agar pellet tidak terambil. Pada setiap *appendorf* ditambahkan 1000 μ l etanol absolut dingin, campuran dihomogenkan dengan dibolak-balik 25 sampai 30 kali sampai terlihat benang DNA berwarna putih, kemudian diinkubasi pada refrigerator 4°C semalam. Keesokan harinya *appendorf* yang berisi cairan tersebut disentrifugasi 10000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, buang supernatan yang terbentuk. Tambahkan 1000 μ l etanol 70 % dingin, kocok sampai terlihat benang DNA 25-30 kali, disentrifugasi (10000 rpm, 15 menit, 4°C), buang supernatan, dikeringkan (oven pada suhu 37°C, selama kurang lebih 30 menit). Apabila masih ada tabung yang basah keringkan dengan cotton bud, tambahkan TE buffer

sebanyak 100 µl, simpan dalam *freezer* bersuhu -20°C sampai akan digunakan.

Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

Untuk mendapatkan fragmen DNA spesifik pertumbuhan dilakukan amplifikasi dengan menggunakan primer spesifik yaitu GHE5F sebagai *forward* dengan urutan basa 5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3' dan GHE5R sebagai *reverse* dengan urutan basa 5'-GACACCTACTCAGACAATGCG-3'. Primer GHE5F dan GHE5R diadopsi dari Ge *et al.* (2003). Campuran reaksi terdiri dari 3,78 µl dH₂O; 0,11 µl primer GHE5F; 0,11 µl primer GHE5R; 5µl PCR mix dan 1µl DNA (volume campuran total 10µl) dimasukkan ke dalam *thin wall* dengan urutan sesuai urutan penyebutan. Setelah campuran siap, *thin wall* dimasukkan ke dalam alat *Thermal cycler biorad*. Proses amplifikasi terdiri dari 31 siklus. Masing-masing siklus terdiri dari denaturasi template DNA pada suhu 94°C selama 60 detik, 58°C selama 45 detik dan 72°C selama 60 detik. Siklus diawali dengan hot start pada suhu 95°C selama 5 menit dan diakhiri dengan inkubasi pada suhu 72°C selama 7 menit, dilanjutkan suhu 37°C selama 5 menit (Ge *et al.*, 2003).

Untuk melihat keberhasilan PCR dilakukan elektroforesis dalam gel agarosa 2%, tegangan 110 Volt, diwarnai dengan *ethidium bromide* dan dievaluasi dengan *UV transiluminator*. Gel agarosa 1% dibuat dengan melarutkan 0,3 gram bubuk agarosa ke dalam 15 ml larutan TBE 1X di dalam Erlenmeyer. Selanjutnya larutan tersebut dipanaskan di dalam *microwave oven* untuk menghomogenkan agarosa, sambil sesekali digoyang sampai bening. Larutan dibiarkan sampai agak dingin kemudian ditambahkan *ethidium bromide* 0,5 µl dan digoyang untuk menghomogenkan.

Selanjutnya larutan dituangkan ke dalam cetakan yang telah dipasangi sisir pencetak. Setelah gel mengeras ditempatkan pada *electroforesis chamber* yang telah diisi buffer TBE 1X. kedalam setiap sumuran dimasukkan sample DNA sebanyak 3 µl yang telah dicampur dengan 2 µl *loading dye*. Alat elektroforesis kemudian dihubungkan dengan sumber listrik 110 volt lalu dihidupkan. Dan dibiarkan selama 30 menit. Selanjutnya gel diamati dengan UV transiluminator dan kemudian difoto dengan kamera polaroid. Keberhasilan amplifikasi dapat dilihat dengan adanya pita DNA pada gel agarosa dan besarnya DNA hasil amplifikasi diukur berdasarkan DNA marker.

Pemotongan DNA oleh Enzim Restriksi Dengan Metode RFLP

Untuk mengetahui adanya polimorfisme pada DNA marker kandidat gen pertumbuhan, dilakukan pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi HaeIII, enzim HaeIII memiliki sisi pemotongan pada basa GG↓CC. Campuran reaksi terdiri dari 0,5 µl *deionized water steril* (dH₂O) dimasukkan ke dalam *thin wall*, ditambah *buffer* enzim sebanyak 1,2 µl, DNA PCR produk sebanyak 3 µl, enzim restriksi HaeIII sebanyak 3,5 µl dikocok pelan, kemudian diinkubasi dalam *waterbath* yang telah diatur pada suhu 37°C selama 3 jam. 37°C merupakan suhu dimana enzim dapat bekerja secara optimal.

Hasil pemotongan dengan teknik RFLP berupa beberapa fragmen DNA kemudian dielektroforesis dengan gel agarosa 2%, diwarnai dengan *ethidium bromide* dan dievaluasi menggunakan *UV transiluminator*, DNA yang terekspresi didokumentasi dengan kamera polaroid.

Data hasil PCR-RFLP kemudian dianalisis secara deskriptif dan

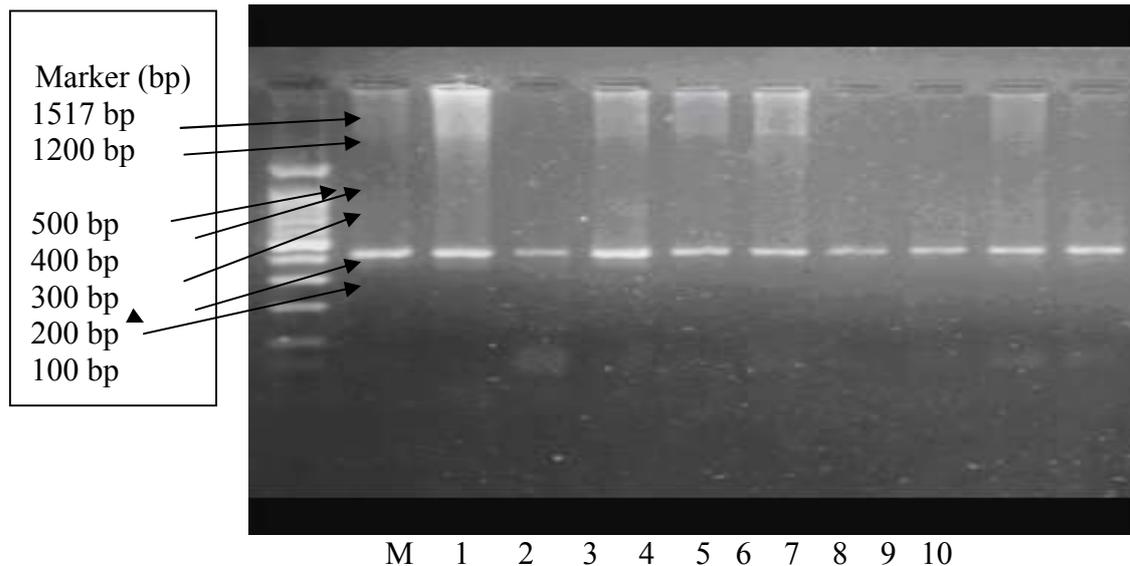
dihubungkan dengan data fenotipik Sapi Madura di Pamekasan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA Hasil Amplifikasi

DNA hasil isolasi diukur kemurnian dan konsentrasinya untuk mengetahui

kelayakan sampel dan selanjutnya diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan primer GHE5F sebagai *forward* (5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3') dan GHE5R sebagai *reverse* (5'-GACACCTACTCAGACAATGCG-3') yang diadopsi dari Ge *et al.* (2003). Hasil amplifikasi ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Sampel DNA Sapi Madura di Pamekasan Menggunakan Primer Ghe5

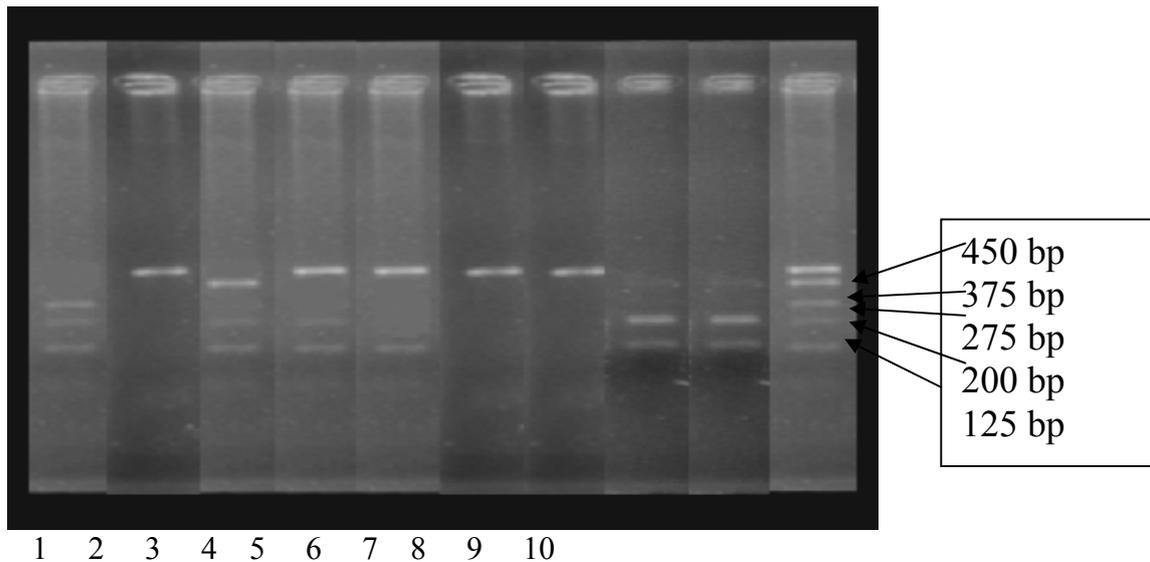
Hasil amplifikasi dengan primer GHE5F dan GHE5R menunjukkan suatu band pada gel agarose 2% setelah dilakukan elektroforesis dengan ukuran fragmen 450bp pada DNA yang teramplifikasi, hal ini berarti bahwa primer GHE5F dan GHE5R yang diadopsi dari Ge *et al.* (2003) memiliki kesesuaian dengan DNA sapi Madura sehingga dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA sapi Madura. Primer GHE5F dan GHE5R dilaporkan oleh (Rahayu *et al.*, 2006) juga memiliki kesesuaian dan dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen *growth hormon* sapi Bali.

DNA hasil PCR (PCR produk) selanjutnya digunakan sebagai materi

untuk mengidentifikasi polimorfisme genetik individu-individu sapi sampel yang dilakukan dengan teknik RFLP, dipotong menggunakan enzim HaeIII.

Penentuan Polimorfisme

Polimorfisme genetik sering digunakan untuk mengkaraktisasi individu-individu ternak yang selanjutnya dapat juga dihubungkan dengan sifat-sifat fenotipik yang dituju. Hasil elektroforesis gel agarosa 2% pada DNA PCR produk yang telah dipotong menggunakan enzim HaeIII dengan teknik RFLP ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Bentuk Pita DNA Marker Kandidat Gen Pertumbuhan Sapi Madura di Pamekasan Hasil Pemotongan Menggunakan Enzim *Haeiii*

PCR produk yang dipotong dengan enzim *HaeIII* menghasilkan 5 fragmen pemotongan DNA dengan pasangan basa 450bp, 375bp, 275bp, 200bp dan 125bp. Sapi sampel memiliki pola pemotongan pada fragmen yang berbeda-beda (Tabel 1).

Hasil pemotongan menggunakan enzim *HaeIII* menghasilkan perbedaan pemotongan pita DNA, Albert *et al.*

(1989) menyatakan bahwa apabila terdapat variasi dalam sekuen DNA yang dapat dideteksi sebagai perbedaan antara individu dalam populasi. Jika perbedaan itu jarang ditemui disebut mutasi, namun jika sering ditemui disebut polimorfisme. Sesuai dengan pernyataan tersebut, pada hasil pemotongan DNA sapi Madura di Pamekasan menggunakan enzim *HaeIII* terdapat polimorfisme genetik.

Tabel 1. Posisi Basa yang Terpotong Dengan Teknik PCR-RFLP Menggunakan Enzim *Haeiii* pada Sapi Madura di Pamekasan

No Sampel	Posisi Pemotongan Fragmen (bp)				
	450	375	275	200	125
1	-	-	x	x	x
2	x	-	-	-	-
3	-	x	-	x	x
4	x	-	-	x	x
5	x	-	-	-	x
6	x	-	-	-	-
7	x	-	-	-	-
8	-	-	-	x	x
9	-	-	-	x	x
10	x	x	x	x	x

Keterangan : x : terjadi pemotongan
- : tidak terjadi pemotongan

Polimorfisme genetik ditunjukkan dengan adanya 4 macam tipe pemotongan atau haplotipe (Tabel 2). Haplotipe I dengan 1 fragmen, haplotipe II dengan 2 fragmen, haplotipe III dengan 3 fragmen dan haplotipe IV dengan 5 fragmen.

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada sapi Madura di Pamekasan terdapat variasi genetik gen pertumbuhan hasil pelacakan menggunakan teknik PCR-RFLP dengan jumlah haplotipe 4. Haplotipe 2 memiliki 2 (2a dan 2b) sub-

haplotipe, haplotipe 3 memiliki 3 (3a, 3b dan 3c) sub-haplotipe. Haplotipe 1, tidak terjadi pemotongan yang ditunjukkan dengan ukuran fragmen 450bp. Haplotipe 2, terjadi pemotongan dengan ukuran fragmen (2a) 125bp dan 450 bp (2b) 125bp dan 200bp. Haplotipe 3 dengan ukuran fragmen (3a) 125bp, 200bp dan 450bp (3b) 125bp, 200bp dan 375bp (3c) 125bp, 200bp dan 275bp. Haplotipe 4 dengan ukuran fragmen 125bp, 200bp, 275bp, 375bp dan 450bp.

Tabel 2. Polimorfisme Genetik Sapi Madura Di Pamekasan Hasil PCR-RFLP

Haplotipe	Sub-haplotipe	Frekuensi (%)	Posisi Fragmen					
			450	375	325	275	200	125
I	-	3/10 (30)	x	-	-	-	-	-
II	2a	1/10 (10)	x	-	-	-	-	x
	2b	2/10 (20)	-	-	-	-	x	x
III	3a	2/10 (20)	x	-	-	-	x	x
	3b	1/10 (10)	-	x	-	-	x	x
	3c	1/10 (10)	-	-	-	x	x	x
IV	-	1/10 (10)	x	x	-	x	x	x

Keterangan : x : terjadi pemotongan
- : tidak terjadi pemotongan

Ekspresi Fenotipik (PBB) Sapi Madura di Pamekasan pada Haplotipe yang Berbeda

Seberapa jauh perbedaan haplotipe terekspresi dalam penambahan bobot badan sapi Madura di Pamekasan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Ekspresi Fenotipik (PBB) Sapi Madura di Pamekasan pada Haplotipe yang Berbeda

Haplotipe	Sub-Haplotipe	Pertambahan Bobot Badan (kg/hari)
I	-	0,048
II	2a	0,112
	2b	
III	3a	0,107
	3b	
	3c	
IV	-	0,036

Tabel 3 menunjukkan bahwa haplotipe II (sub-haplotipe 2a) dan haplotipe III (sub-haplotipe 3b dan 3c) menunjukkan pertambahan bobot badan

yang paling tinggi. Haplotipe IV mengekspresikan pertambahan bobot badan yang paling rendah.

Penelitian yang dilakukan oleh Dybus (2002) dengan jumlah sampel yang mendekati 2000, penggunaan gen hormon pertumbuhan dan enzim restriksi (MspI) menghasilkan pola alel dominan resesif yang mampu membedakan sapi-sapi perah dengan produksi susu yang tinggi dan rendah. Meskipun penampilan fenotip untuk bobot badan pada sapi dipengaruhi oleh banyak faktor, tetapi semua sifat yang tampak (fenotip) dipengaruhi oleh informasi genetik yang dibawa oleh DNA, sehingga variasi DNA berhubungan dengan variasi fenotip (Sutarno, 2005).

KESIMPULAN

Disimpulkan bahwa dengan jumlah sample yang terbatas sudah mulai ditunjukkan adanya kecenderungan marka spesifik untuk sifat pertumbuhan sapi Madura, meskipun hubungan tersebut belum nyata. Dengan meningkatnya jumlah sample serta penggunaan primer dan enzim restriksi yang tepat dimungkinkan akan diperoleh marka genetik yang lebih spesifik sehingga dapat digunakan sebagai dasar pelaksanaan seleksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts dan J. D. Watson. 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing. Inc. New York, USA
- Dybus, A. 2002. Association of growth hormone (gh) and prolactin (prl) genes polymorphisms with milk production traits in polish black-and-white cattle. *J. Anim. Sci.* 20(4):203-212.
- Ge W., Davis ME, Hines HC, Irvin KM dan R.C.M. Simmen. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-i concentration and growth traits in angus cattle. *J. Anim. Sci.* 79: 1757-1762.
- Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM dan R.C.M. Simmen. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth faktor i concentration and growth traits in angus cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 641-648.
- Rahayu, Sri, S.B. Sumitro, T. Susilawati dan Soemarno. 2006. Identifikasi Polimorfisme Gen *Growth Hormone* Sapi Bali dengan Metode PCR-RFLP. Universitas Brawijaya, Malang.
- Robyt, I. M. dan B. J. White. 1987. *Biocemichal Tecniqes: Theory and Practices*. Brooks/Cole Publishing Company, California.
- Sutarno. 2005. Penyulihan Asam Amino Leucin oleh Valin pada Posisi 127 Gen Penyandi Hormon Pertumbuhan dan Pengaruhnya terhadap Pertumbuhan Sapi Benggala. <http://www.Jvetunu.com> diakses 23 Maret 2006.
- Suyadi, N. Isnaini dan S. Rahayu. 2005. Preseleksi kemampuan produksi daging sapi Madura berdasarkan marka gen kandidat untuk sifat pertumbuhan. Laporan RUT XII-1.
- Suyadi, 2005. Bioteknologi Reproduksi dan Peranannya dalam Peningkatan Mutu Genetik dan Produktivitas Ternak. Pidato Pengukuhan Guru Besar. Universitas Brawijaya, Malang.