

DETEKSI POLIMORFISME GEN *GROWTH HORMONE* (GH|MspI) PADA SAPI MADURA YANG DIPELIHARA DI KANDANG KELOMPOK LOKA PENELITIAN SAPI POTONG

Hartati*¹ dan Bayu Dewantoro Putro Soewandi²

¹ Loka Penelitian Sapi Potong, Jawa Timur

² Balai Penelitian Ternak, Ciawi, Jawa Barat

*Korespondensi email: hartatifakhri16@gmail.com

Abstrak. Identifikasi kandidat gen terkait sifat pertumbuhan merupakan langkah awal untuk menghasilkan *marker assisted selection* (MAS) pada sapi Madura. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme gen GH pada populasi sapi Madura menggunakan metode PCR-RFLP dan enzim restriksi *MspI* (C*CGG). Sebanyak 138 sampel DNA sapi Madura yang ada di kandang percobaan Loka Penelitian Sapi Potong digunakan pada penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Gen GH|MspI pada sapi Madura (*Bos indicus*) yang ada di kandang percobaan Loka Penelitian Sapi Potong terdeteksi 2 genotype yaitu *MspI*^{+/-} dan *MspI*^{-/-} dengan masing-masing frekuensi genotype 11,6% dan 88,4%. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa frekuensi genotype gen GH|MspI pada sapi Madura masih dalam keseimbangan Hardy-Weinberg (*Hardy Weinberg Equilibrium*/HWE). Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa nilai H_o dan H_e pada gen GH memiliki nilai yang sama dan cenderung sangat rendah. Nilai PIC gen GH|MspI berada dalam kategori rendah. Disimpulkan bahwa gen GH/MspI bersifat polimorfik namun kurang informatif sebagai penanda genetik dan tidak dapat digunakan dalam analisis asosiasi

Kata kunci: polimorfisme, gen GH, sapi Madura

Abstract. The identification of candidate genes related to growth traits was the first step to produce marker-assisted selection (MAS) in Madura cattle. This study aimed to detect the GH gene polymorphism in Madura cattle populations using the PCR-RFLP method and *MspI* (C*CGG) restriction enzyme. A total of 138 DNA samples of Madura cattle in the Indonesian Beef Cattle Research Station were used in this study. The results showed that the GH | *MspI* genes in Madura cattle (*Bos indicus*) were detected 2 genotypes namely *MspI* +/- and *MspI* - / - with genotype frequencies of 11,6% and 88,4 % respectively. Statistical analysis showed that the frequency of the GH | *MspI* genotype in Madura cattle was still in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The results of the diversity analysis show that the value of H_o and H_e in the GH gene had the same value and tended to be very low. The value of the GH | *MspI* PIC gene was in a low category. It was concluded that the GH / *MspI* gene was polymorphic but was less informative as a genetic marker and cannot be used in association analysis.

Keywords: polymorphism, GH gene, Madura cattle

PENDAHULUAN

Kemajuan teknologi molekuler telah memungkinkan untuk dilakukan seleksi dengan menggunakan penanda DNA guna mendukung dan melengkapi kegiatan pemuliaan konvensional. Berkembangnya teknik biologi molekuler sekarang ini maka eksplorasi polimorfisme gen atau bukan gen disepanjang genom sapi dapat dilakukan. Pemetaan gen telah menghasilkan banyak penemuan daerah-daerah polimorfik (gen atau bukan gen) di sepanjang genom sapi. Apabila suatu daerah

polimorfik diketahui berhubungan dengan sifat-sifat yang bernilai ekonomis, maka daerah polimorfik tersebut dapat dimanfaatkan sebagai penanda genetik dan selanjutnya dapat digunakan sebagai kriteria seleksi untuk perbaikan genetik. Aplikasi penanda genetik dalam seleksi ternak dapat mempercepat perbaikan genetik, terutama pada sapi yang dikenal mempunyai interval generasi panjang.

Sapi Madura merupakan salah satu sapi potong lokal yang memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap pengaruh lingkungan tropis dan merupakan salah satu plasma nutfah lokal yang harus dilestarikan dan dikembangkan potensi genetiknya. Loka Penelitian Sapi Potong telah melakukan perbibitan sapi Madura semenjak tahun 2013 sampai sekarang, namun untuk hasil yang lebih optimal perlu dikaji dan dieksplorasi dengan pendekatan molekuler. *Marker-assisted selection* (MAS) merupakan salah satu pendekatan berbasis molekuler untuk menghasilkan ternak-ternak yang unggul secara genetik melalui pemanfaatan marka DNA yang berkaitan dengan lokus target sebagai alat untuk membantu seleksi fenotipik sifat yang diinginkan. Salah satu sifat fenotipik yang bernilai ekonomis adalah sifat pertumbuhan, dimana sifat pertumbuhan ini sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan faktor genetik. Pengaruh lingkungan tidak diwariskan kepada keturunannya sedangkan faktor genetik sangat dikendalikan oleh gen dan akan diwariskan kepada keturunannya. Pertumbuhan dikendalikan oleh beberapa gen, baik yang pengaruhnya besar/utama (*major gene*) maupun yang pengaruhnya kecil (*minor gene*).

Salah satu gen yang diduga merupakan gen utama dalam mempengaruhi pertumbuhan adalah gen *Growth hormone* (GH) yang merupakan suatu hormone protein yang disintesis dan disekresikan oleh kelenjar hipofisa (Etherton dan Bauman 1998). Gen GH berfungsi sebagai regulator utama untuk pertumbuhan pada mamalia, yaitu pertumbuhan jaringan, metabolisme lemak, pengaturan reproduksi, laktasi dan pertumbuhan tubuh normal (Amiri et al., 2018). Gen penyandi GH pada sapi ditemukan di kromosom 19 pada posisi q26-qtr (Hediger et al., 1990). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi gen GH|*MspI* pada sapi PO (Hartati et al., 2019) dan sapi SO (Anwar et al., 2015) ditemukan dalam kondisi polimorfik. Fenomena peran GH dalam pertumbuhan juga telah membuktikan adanya peningkatan laju pertumbuhan pada ternak. Paputungan et al., (2013) menemukan gen GH sebagai kandidat penanda genetik sifat pertumbuhan pada sapi PO terutama untuk bobot badan, lingkar dada dan panjang badan, namun ada juga yang melaporkan bahwa variasi gen GH pada lokus 2 (GH-L2|*MspI*) pada sapi Madura (Volkandari et al., 2013) dan sapi Aceh (Putra et al., 2013) dalam kondisi monomorfik. Penelitian ini bertujuan untuk

mendeteksi polimorfisme gen GH pada populasi sapi Madura yang ada di kandang percobaan Loka Penelitian Sapi Potong.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada kurun waktu tahun 2019 di kandang percobaan Loka Penelitian Sapi Potong Grati Pasuruan dan Laboratorium Molekuler Balai Penelitian Ternak Ciawi Bogor

Materi

Materi yang digunakan adalah sebanyak 138 sampel darah sapi Madura yang ada dikandang percobaan Loka Penelitian Sapi Potong yang terdiri atas 31 ekor sapi jantan dan 107 ekor sapi Madura betina. Sampel darah sapi Madura di koleksi melalui vena jugularis sebanyak 3 ml menggunakan tabung vacutainer yang mengandung K3 EDTA sebagai antikoagulan. Sample darah diisolasi menggunakan kit ekstraksi DNAQiagen dan DNA yang dihasilkan pada suhu -20°C sebelum digunakan.

Amplifikasi PCR

DNA sapi Madura diamplifikasi menggunakan pasangan primer seperti yang disajikan pada Tabel 1. PCR dilakukan pada volume akhir reaksi campuran 20 μl yang mengandung 3 μl DNA sampel (10-100 ng), 0,4 μl masing-masing primer, 10 μl PCR mix (MyTaq, Biotium) dan 6,2 μl aquabidest. Diinkubasi di mesin PCR Thermocycler (AB System) dengan kondisi tahap denaturasi awal suhu 95°C selama 1 menit, Denaturasi selama 95°C selama 15 detik, Annealing $53,8^{\circ}\text{C}$ selama 15 detik, Extension 72°C selama 10 detik dan final extension 72°C selama 5 menit. Produk PCR divisualisasi pada gel agarose 1,5 %, yang dilarutkan dengan buffer 0,5X *Tris-Boric-EDTA* (0,5X TBE) yang diberi pewarna GelRed®Nucleic Acid Stain (Biotium), Elektroforesis dilakukan pada 120 volt selama 40 menit pada alat elektroforesis (MyGel Mini) dan dilakukan visualisasi pada geldoc (*Infinity VX2*).

Tabel 1. Panjang, lokasi dan primer dari gen GH terkait sifat pertumbuhan

GH MspI	
Posisi <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP)	+837C/T
Region	Intron 3
No akses GenBank	JQ711182.1
Primer Sequences (5' to 3')	F : CCCACGGGCAAGAATGAGGC R : TGAGGAACTGCAGGGGCCCA
Ukuran Amplicon (bp)	329
Suhu Annealing ($^{\circ}\text{C}$)	65,7

Ket : panjang, lokasi dan primer gen GH referensi dari Sutarno et al., (2005)

PCR RFLP Genotyping

Produk PCR gen GH didigesti dengan enzim restriksi MspI (merk *Thermo Scientific*) yang memiliki situs restriksi C*CGG untuk mendeteksi adanya mutasi. RFLP dilakukan dengan volume akhir digesti dengan enzim restriksi 10 µl, yang terdiri dari produk PCR 3 µl, enzim restriksi 0,2 µl, 10x Buffer tango 1 µl dan aquabidest 5,8 µl. Produk RFLP diseparasi dengan gel agarose 2,5 % pada 120 volt selama 50 menit. Gel agarose diberi pewarna gelred dan divisualisasi pada geldoc (*Infinity VX2*). Identifikasi genotype yaitu dilakukan dengan cara membandingkan ukuran fragmen DNA dibandingkan dengan marker DNA 50 bp (merk *Thermo Scientific*).

Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya dilakukan penghitungan frekuensi genotype dan alel serta uji keseimbangan hukum Hardy-Weinberg (HWE) dan dianalisis menggunakan uji Chi-square (Warwick et al., 1990). Indeks genetik populasi termasuk heterozigositas yang diamati (H_o), heterozigositas yang diharapkan (H_e) dihitung berdasarkan Allendorf dan Luiart (2007), dan nilai PIC dihitung berdasarkan Botstein et al., (1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Frekuensi Genotype dan Alel

Frekuensi genotype dan Alel gen GH sapi Madura disajikan pada Tabel 2 berikut ini :

Tabel 2. Frekuensi genotype dan frekuensi Alel gen GH|MspI pada sapi Madura Grati

Gen	Jenis kelamin	n	Frekuensi Genotype (%)			Frekuensi Alel		χ^2_{hit}
			MspI ^{+/+}	MspI ^{+/-}	MspI ^{-/-}	MspI ⁺	MspI ⁻	
GH MspI	Jantan	31	0 (0)	25,8 (8)	74,2(23)	0,129	0,871	0,680
	Betina	107	0 (0)	7,5 (8)	92,5(99)	0,037	0,963	0,161
	Total	138	0 (0)	11,6(16)	88,4(122)	0,058	0,942	0,523

n = jumlah sampel; $\chi^2_{tab} = 3.841$, $\chi^2_{hit} < \chi^2_{tab}$ = frekuensi genotype dalam HWE

Berdasarkan Tabel 2 diatas dapat diketahui bahwa jumlah sapi Madura yang berhasil teramplifikasi sebanyak 138 ekor yang terdiri atas 31 ekor jantan dan 107 ekor betina. Gen GH terdeteksi 2 genotype yaitu MspI^{+/-} dan MspI^{-/-} dengan masing-masing frekuensi genotype 11,6% dan 88,4%. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa frekuensi genotype gen GH|MspI pada sapi Madura masih dalam keseimbangan Hardy-Weinberg (*Hardy Weinberg Equilibrium/HWE*), Falconer dan Mackay (1996) menyatakan bahwa frekuensi genotype dan alel yang dalam HWE akan selalu konstan dari generasi ke generasi, kecuali jika ada peristiwa seleksi, mutasi, migrasi dan *genetic drift*. Hasil perhitungan frekuensi alel pada populasi sapi Madura bersifat polimorfik dengan masing-masing frekuensi 0,129 dan 0,871. Hal tersebut didasarkan pada pendapat Nei (1975) dan Allendorf dan Luikart (2007) yang menyatakan bahwa sebuah lokus dikatakan polimorfik jika

frekuensi alel yang umumnya muncul (*most common allele*) kurang dari 0,99 (99%) sedangkan monomorfik jika diketahui hanya satu alel pada sebuah lokus atau adanya *mostcommon allele* yang memiliki frekuensi tinggi (>99%). Hasil penelitian ini berbeda dengan yang ditemukan Volkandari et al., (2013) bahwa deteksi gen GH pada sapi Madura di Kabupaten Pamekasan bersifat monomorfik.

Heterozigositas

Nilai keragaman genetik dalam suatu *breed* diekspresikan sebagai rata-rata heterozigositas. Keragaman genetik suatu gen dapat dievaluasi dengan melihat indikator keragaman genetik yang lain seperti H_o , H_e , N_e dan PIC. Hasil analisis keragaman gen **GH | *MspI***, disajikan pada Tabel 3 berikut ini:

Tabel 3. Heterozigositas, PIC dan N_e gen GH|*MspI* pada sapi Madura

Gen	Jenis kelamin	n	H_e	H_o	PIC	N_e
GH <i>MspI</i>	Jantan	31	0,225	0,228	0,200	1,290
	Betina	107	0,072	0,072	0,069	1,078
	Total	138	0,109	0,110	0,102	1,123

n = jumlah sampel; H_e = heterozigositas estimasi ; H_o = heterozigositas observasi; PIC = tingkat informasi marker; N_e = jumlah alel efektif

Hasil analisis keragaman memperlihatkan bahwa heterozigositas pengamatan (H_o) dan heterozigositas harapan (H_e) pada gen GH memiliki nilai yang sama, hal ini menunjukkan bahwa kondisi tersebut merupakan indikasi bahwa terjadi perkawinan secara acak dalam populasi. Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa nilai heterozigositas pada penelitian ini sangat rendah. Nei (1975) menyatakan bahwa nilai heterozigositas tergantung pada jumlah sampel, jumlah alel dan frekuensi alel. Nilai heterozigositas yang menurun dapat menyebabkan hilangnya variasi genetik dalam suatu populasi bahkan diperoleh alel yang tetap (*fixed*) (Russel 2010).

Penentuan tingkat informatif suatu marker dapat diketahui dari nilai PIC dengan tiga kategori, yaitu kategori rendah ($\leq 0,25$), moderat ($0,25 < PIC < 0,5$), dan tinggi ($\geq 0,5$). Berdasarkan penggolongan tersebut, maka gen GH|*MspI* berada dalam kategori rendah. Menurut Hildebrand et al., (1992), gen atau marker yang hanya memiliki dua alel saja akan memiliki nilai PIC maksimum 0,375 atau dalam kategori moderate, untuk memperoleh nilai PIC yang lebih tinggi hanya bisa diperoleh dari gen atau marker dengan alel lebih dari dua dan semakin banyak alel perlokus akan semakin tinggi nilai PIC-nya dan akan lebih informatif. Pada penelitian ini, nilai PIC gen GH|*MspI* dalam kategori rendah (0,103 dan 0,136), jauh dibawah 0,25. Nilai PIC yang rendah ini mengindikasikan bahwa marker pada GH|*MspI* tidak informatif sehingga tidak dapat diasosiasikan

dengan sifat tertentu pada populasi sapi Madura Grati. Jumlah alel efektif (N_e) pada gen GH menunjukkan nilai 1,123, hal ini berarti bahwa hanya ada satu alel yang secara efektif muncul dan memiliki frekuensi yang tinggi.

KESIMPULAN

Gen GH|MspI pada sapi Madura (*Bos indicus*) yang ada di kandang percobaan Loka Penelitian Sapi Potong ditemukan bersifat polimorfik namun kurang informatif sebagai penanda genetik. Oleh karena itu, tidak dapat digunakan dalam analisis asosiasi lebih lanjut antara penanda dan sifat fenotipik tertentu termasuk sifat pertumbuhan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, S., A. P. Partogi, W. A. Sulisty, S. Aditya, S. Syahrudin and T. baharuddin. 2015. Deteksi polimorfisme gen growth hormone (GH-MspI) pada sapi Sumba Ongole (SO). Pros. Sem.Nas. Masyarakat Biodiversity Indonesia. 1 (3).
- Allendorf, F.W. and G. Luikart. 2007. Conservation and Genetics of Populations [Internet]. [place unknown]: Blackwell Publishing. Available from: <https://academic.oup.com/jhered/article-lookup/doi/10.1093/jhered/esl039>
- Beauchemin, V.R., M.G. Thomas, D.E. Franke, G.A Silver. 2006. Evaluation of DNA Polymorphisms Involving Growth Hormone Relative To Growth And Carcass Characteristics in Brahman steers. Genet Mol Res. 5: 438–447.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map In Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. Am JHum Genet [Internet]. 32: 314–331. Available from: [papers2://publication/uuid/0BCE67F-8A97-4A0A-9B37-6B8450CE68AA](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6845068/)
- Etherton, T.D. and D.E. Bauman. 1998. Biology of Somatotropin In Growth And Lactation of Domestic animals. Physiol Rev. 78: 745–761.
- Hartati, B.D.P. Soewandi, A.A.R. Hapsari, S. Anwar and D. Pamungkas. 2019. Identification of GH|MspI and GHR|AluI Gene Polymorphism and its Association with Calf Birth Weight of Grati-PO Cattle. JITV Vol. 24 No 2 Th. 2019: 49-55.
- Hediger, R., S.E. Johnson, W. Barendse, R.D. Drinkwater, S.S. Moore, J. Hetzel. 1990. Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in situ hybridization. Genomics. 8: 171–174.
- Hildebrand, C.E., D.C. Torney and R.P. Wagner. 1992. Informativeness of polymorphic DNA markers. Los Alamos Sci. 20:100–102.
- Nei, M. 1975. Molecular population genetics and evolution. North Holl PublCo.
- Paputungan, U., L. Hakim, G. Ciptadi dan H.N.F. Lapian. 2013. Polymorphism of Growth Hormone Msp1 Enzyme-Restriction Associated With Production Performance of Ongole-Crossbred Cattle Mated By Artificial Insemination Technique. J Basic Appl Sci Res 3 (6): 581-589.
- Putra, W.P.B., T. Hartatik and Sumadi. 2013. Growth hormone gene genotyping by MspI restriction enzyme and PCR-RFLP methods in Aceh cattle breed at Indrapuri district of Aceh province. J Indon Trop Anim Agric 38 (4): 207-211.

- Sutarno., A. Junaidi and B. Tappa. 2005. MspI polymorphism of Bovine Growth Hormone Gene On Locus-2 And Its Effect On Daily Gain of Body Weight. Biodiversitas [Internet]. 6:77–81. Available from: <http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D0602/D060201.pdf>
- Volkandari, S.D., T. Hartatik dan Sumadi. 2013. Polimorfisme Gen Growth Hormone (GH) pada sapi Limura. Buletin Peternakan. 37(2): 67-73.
- Warwick, E.J.,J.M. Astuti dan W.Hardjosubroto. 1995. Pemuliaan Ternak. Gajah Madah University Press. Yogyakarta.