

IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN GH (GROWTH HORMONE) SAPI BALI DENGAN METODE PCR-RFLP

Sri Rahayu*, SB Sumitro*, T Susilawati**, dan Soemarno***

* Jurusan Biologi, FMIPA, Unibraw

** Fakultas Peternakan, Unibraw

*** Fakultas Kedokteran, Unibraw

ABSTRACT

This study was conducted to identify polymorphism of growth hormone gene of Bali cattle. A PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) procedure was developed for determining polymorphism of growth hormone gene. The DNA was isolated from blood samples by salting out method. Total DNA were amplified with forward primer, 5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3' and reverse primer, 5'-GACACCTACTCAGACAATGCG-3'. The PCR product was digested by HaeIII restriction enzyme. Result of the amplification was a specific single band with fragment 450 bp. Restriction with HaeIII restriction enzyme resulted four kinds of haplotype. Haplotype I was not cut by HaeIII restriction enzyme. Haplotype II were cut into two, 225 bp and 150 bp. Haplotype III were cut into three size, 400 bp, 225 bp and 150 bp. Haplotype IV were cut into five fragments 450 bp, 400 bp, 275 bp, 225 bp and 150 bp.

Key words: bali cattle, growth hormone gene, PCR, RFLP, HaeIII restriction enzyme

PENGANTAR

Ternak sapi merupakan salah satu jenis ternak yang memberikan kontribusi besar dalam penyediaan daging nasional untuk memenuhi kebutuhan protein hewani masyarakat. Talib *et al.*, (2002) mengemukakan bahwa permintaan daging di Indonesia meningkat 6 sampai 8% setiap tahun. Namun, penambahan populasi ternak tidak seimbang dengan kebutuhan daging nasional (Putu *et al.*, 1997). Sejak terjadinya krisis pada tahun 1997, terjadi pengurangan ternak di beberapa daerah sehingga populasi sapi potong diduga menurun secara signifikan (Diyanto dan Setiadi, 2000). Permasalahan ini menjadi lebih kompleks karena upaya pembibitan sapi lokal masih kurang diperhatikan.

Sapi Bali merupakan salah satu sapi lokal Indonesia yang cukup penting, sehingga upaya pengembangannya perlu diperhatikan untuk menunjang pemenuhan kebutuhan konsumsi di dalam negeri. Hal ini mengingat bahwa sapi bali mempunyai beberapa keunggulan, antara lain dalam hal adaptasi dengan kondisi lingkungan yang minimal, kemampuan reproduksi yang tinggi dan kualitas karkas yang baik (Hardjosubroto, 1994).

Adanya seleksi negatif di tingkat peternak dan upaya pembibitan yang kurang diperhatikan mengakibatkan sapi bali yang tersisa adalah ternak-ternak yang kualitasnya kurang bagus yang kemudian terpaksa menjadi sapi bibit. Apabila hal ini berlangsung terus-menerus dikhawatirkan suatu saat sapi Bali akan mengalami kepunahan dan kita akan mengalami kerugian yang sangat besar karena

kehilangan plasma nutfah (Mahaputra, 2002; Hardjosubroto, 2002). Dari pengamatan lapangan diketahui bahwa saat ini beberapa populasi sapi bali mengalami penurunan berat badan. Pada saat yang sama diperoleh informasi dari peternak di beberapa desa di Provinsi Bali bahwa pada satu desa hanya terdapat beberapa ekor pejantan yang digunakan sebagai pejantan untuk keperluan perkembangbiakan. Penggunaan pejantan yang sama secara terus menerus dapat menyebabkan terjadinya *inbreeding*. Supriyantono dkk. (2005), dari hasil penelitiannya mendapatkan bahwa bobot badan sapi Bali berada di bawah standar yang telah ditentukan secara nasional. Sementara itu Sariubang dkk. (1998) menyatakan bahwa masalah utama yang dihadapi dalam pengembangan ternak sapi bali adalah rendahnya kualitas bibit yang diduga akibat dari faktor *inbreeding* atau tata laksana pemeliharannya.

Inbreeding adalah perkawinan yang terjadi antarindividu yang mempunyai hubungan keluarga yang dekat. Perkawinan semacam ini apabila berlangsung terus menerus akan meningkatkan jumlah individu homozigot di dalam populasi tersebut (Klug dan Cummings, 2002). *Inbreeding* sering menyebabkan menurunnya ukuran tubuh, fertilitas dan daya tahan tubuhnya (Tamarin, 2002). Pada populasi tertutup seperti Pulau Bali, kemungkinan adanya *inbreeding* harus menjadi perhatian, karena ada kemungkinan menyebabkan penurunan *bobot sapih* (Thomas, 1978 dalam Sukmasari dkk., 2002), penurunan kemampuan reproduksi dan peningkatan cacat yang diwariskan (Warwick *et al.*, 1987 dalam Sukmasari, 2002).

Salah satu faktor yang mempunyai peranan di dalam pertumbuhan suatu individu adalah *growth hormone* (GH). Sekresi GH dikontrol oleh dua neuropeptida yang diproduksi oleh hipotalamus, yaitu somatotropin dan somatostatin. Somatotropin merupakan faktor pelepas GH yang menstimulasi sekresi GH, sedangkan somatostatin bekerja menekan sekresi GH (Hadley, 1992). GH pada sapi merupakan suatu peptida tunggal dengan berat molekul 22 kD, tersusun atas 190 atau 191 asam amino, dan pada ujung N nya terdapat Ala atau Phe. Pada mamalia, GH memberikan efek biologis terhadap pertumbuhan individu setelah lahir, kecepatan pertumbuhan, dan produksi susu (Wallis, 1973 dalam Dybus, 2002; Wood *et al.*, 1989 dalam Dybus, 2002; Ge *et al.*, 2003). Chikuni *et al.* (1997) menemukan adanya variasi genetik pada gen GH sapi. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Unanian *et al.* (1994), dengan memanfaatkan pendekatan PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *HaeIII*. Dalam penelitian Unanian *et al.* (1994) menemukan adanya 3 variasi di dalam gen GH sapi dengan munculnya fragmen 268 bp, 102 bp, 71 bp dan 50 bp. Reis *et al.* (2001) menemukan adanya hubungan yang signifikan antara genotip dari GH dengan rata-rata berat badan pada beberapa sapi portugis. Dybus (2002), dengan menggunakan enzim restriksi *AluI* menemukan adanya hubungan antara polimorfisme gen GH dengan produksi susu pada sapi *black-and-white* polandia. Sapi dengan genotip LL mempunyai produksi susu yang lebih tinggi dibandingkan sapi dengan genotip LV. Dengan demikian, gen GH dapat dijadikan kandidat gen yang dapat digunakan sebagai marker genetik untuk pertumbuhan, karkas, dan produksi susu.

Berdasarkan kondisi di atas, untuk menunjang keberhasilan upaya pembibitan sapi bali, maka sangat perlu segera dilakukan identifikasi variasi gen GH pada sapi bali. Tujuan dari penelitian ini untuk melihat adanya variasi gen GH pada sapi Bali. Dalam jangka panjang diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar seleksi sapi bali untuk meningkatkan mutu genetik sapi bali.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel Penelitian

Sampel darah dari 30 ekor sapi bali diambil dari 3 daerah di Provinsi Bali, yaitu Puluhan, Tabanan, dan Karangasem. Darah diambil melalui *vena jugularis* di leher dengan menggunakan *venojack* yang telah diisi dengan EDTA sebanyak 10 ml. DNA diisolasi berdasarkan metode

yang ditulis oleh Sambrook & Russel (2001). Hasil isolasi DNA total disimpan pada suhu -20°C . Untuk mengetahui ukuran DNA total hasil isolasi dilakukan elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 1%. Estimasi konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer.

Amplifikasi DNA

Untuk mendapatkan fragmen DNA dari gen *growth hormone* dilakukan amplifikasi dengan menggunakan primer yang diadopsi dari Ge *et al.* (2003), yaitu *forward primer*: 5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3' dan *reverse primer*: 5'-GACACCTACTCAGACAATGCG-3'. Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sebanyak 31 siklus. Tiap 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).

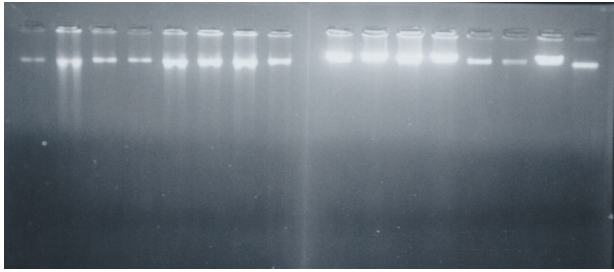
Untuk melihat keberhasilan amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarosa 2%, diwarnai dengan *Ethidium Bromide* dan dievaluasi menggunakan UV transluminator. DNA yang terekspresi didokumentasi dengan kamera Polaroid.

Teknik PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

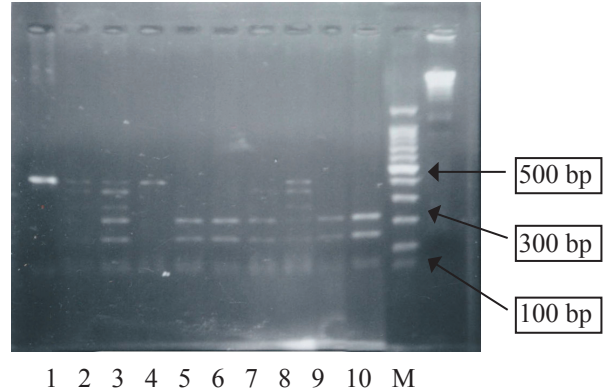
Untuk mengetahui variasi fragmen gen GH, hasil amplifikasi PCR dipotong dengan enzim restriksi. Enzim restriksi yang digunakan adalah *HaeIII* (Unanian *et al.*, 1994) yang memotong pada sisi GG'CC. Tiga mikroliter hasil PCR dicampur dengan 3,5 units enzim restriksi *HaeIII*, 0,5 ul H_2O dan 1,2 ul buffer $10\times$. Campuran kemudian diinkubasi pada *waterbath* suhu 37°C selama 3 jam. Untuk melihat keberhasilan digesti dilakukan elektroforesis dengan agarosa 2%, diwarnai dengan *Ethidium Bromide* dan dievaluasi menggunakan UV transluminator. DNA yang terekspresi didokumentasi dengan kamera Polaroid. Data hasil PCR-RFLP dianalisis berdasarkan *elektrophenogram* kemudian diinterpretasikan.

HASIL PENELITIAN

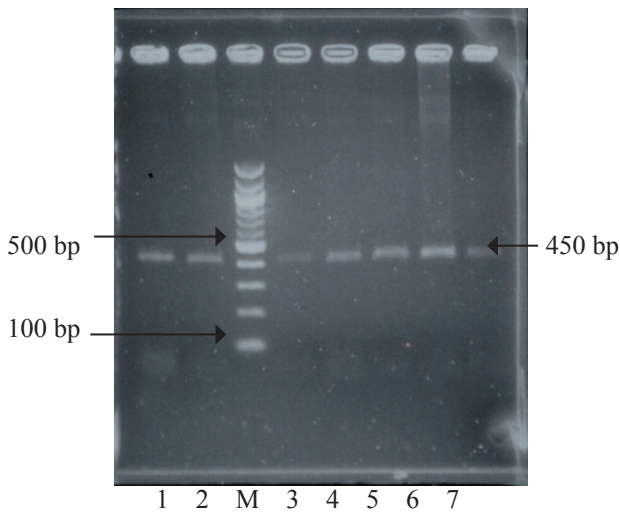
Hasil isolasi DNA dan hasil amplifikasi fragmen gen GH disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2. Ketepatan kondisi reaksi PCR serta ketepatan primer yang digunakan memberikan produk PCR yang sangat spesifik dengan hanya terbentuknya satu pita DNA dengan ukuran 450 bp.



Gambar 1. DNA total sapi bali hasil isolasi yang dielektroforesis pada gel agarosa 1%.



Gambar 3. Fotograf gel agarosa memperlihatkan adanya variasi DNA pada 450 bp fragmen gen GH yang dideteksi dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII*. M: DNA ladder 100 bp, 1: *uncut* (fragmen DNA hasil PCR yang tidak dipotong enzim restriksi), 2-10: *band* yang terpotong oleh enzim restriksi.



Gambar 2. Fotograf gel agarosa yang menunjukkan spesifitas hasil PCR fragmen gen GH sapi bali. M: DNA ladder 100 bp. 1-2 dan 3-7 : Hasil PCR DNA sapi bali

Selanjutnya hasil amplifikasi digunakan untuk reaksi digesti dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII*, yang hasilnya disajikan pada Gambar 3. Gambar 3 menunjukkan adanya polimorfisme pada fragmen gen GH dengan menggunakan enzim *HaeIII*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya 4 macam variasi pola potongan DNA hasil restriksi. Fragmen hasil restriksi dengan enzim restriksi *HaeIII* disajikan dalam Tabel 1. Variasi ukuran fragmen yang dihasilkan dari reaksi digesti disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Jumlah fragmen DNA yang dihasilkan dari reaksi digesti dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII* terhadap 450 bp fragmen gen GH

No.	Jumlah sampel	Jumlah fragmen DNA			
		Tidak terpotong	2 fragmen	3 fragmen	5 fragmen
1	12	√			
2	8		√		
3	3			√	
4	7				√

Tabel 2. Variasi ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari reaksi digesti dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII*

Enzim restriksi	Alel (haplotipe)	Jumlah fragmen DNA	Ukuran fragmen DNA (bp)
<i>HaeIII</i>	I	0	450
	II	2	225 dan 150
	III	3	400, 225 bp, dan 150
	IV	5	425, 400, 275, 225, dan 150

PEMBAHASAN

Analisis variasi pada gen GH pada sapi bali dilakukan dalam tiga tahapan yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi DNA dengan PCR dan pemotongan DNA target dengan enzim restriksi *HaeIII*. Fragmen DNA gen GH yang dihasilkan melalui amplifikasi dengan PCR mempunyai spesifitas yang tinggi dengan terbentuknya satu pita DNA saja sebesar 450 bp. Hasil PCR yang baik dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemurnian DNA hasil ekstraksi, ketepatan pemilihan primer yang digunakan, serta ketepatan kondisi PCR. Primer merupakan bagian yang penting dalam PCR karena primer merupakan inisiator pada sintesis DNA target. Syarat-syarat yang harus dipenuhi di dalam menyusun suatu primer adalah terdiri dari 20 basa, kandungan G/C-nya 50%. Ketepatan kondisi PCR juga sangat memengaruhi hasil dari reaksi PCR. Ketepatan kondisi PCR ditentukan oleh ketepatan campuran reaksi dan ketepatan kondisi suhu pada masing-masing siklus (Turner *et al.*, 1997). Pada penelitian ini primer yang digunakan diadopsi dari Ge *et al.* (2003) yang ternyata primer tersebut sangat sesuai digunakan untuk mengamplifikasi gen GH sapi bali.

Dengan semakin berkembangnya penelitian di bidang molekuler telah banyak membantu analisis variasi genetik pada tingkat DNA. PCR-RFLP merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan dalam mendeteksi adanya variasi genetik di dalam suatu populasi. Connor *et al.* (1999) telah berhasil melakukan mapping pada gen *growth hormone-Releasing Hormone Receptor* (GHRH-R) dengan menggunakan pendekatan PCR-RFLP. Ling Sun *et al.* (2003) menggunakan metode PCR-RFLP untuk mengidentifikasi daging pada *Porcine*, *Caprine*, dan *Bovine*.

Hasil digesti dengan enzim restriksi *HaeIII* didapatkan 4 macam pola digesti. Pola yang paling banyak ditemukan dalam sampel penelitian ini adalah fragmen DNA yang tidak terpotong oleh enzim restriksi *HaeIII* (Tabel 1). Meskipun dalam penelitian ini tidak ada pola yang khusus mengenai fragmen DNA hasil pemotongan, namun sudah dapat diketahui bahwa sapi bali yang ada di Pulau Bali menunjukkan adanya polimorfisme genetik untuk gen GH. Banyak atau sedikitnya variasi gen GH pada sapi bali ini bisa disebabkan karena tinggi rendahnya perkawinan acak, migrasi, dan seleksi di dalam populasi sapi bali tersebut. Gen GH merupakan salah satu gen yang mengatur sifat pertumbuhan. Penampilan fenotipik untuk bobot badan dan penambahan bobot badan pada sapi dipengaruhi oleh banyak faktor, namun dengan diketahui adanya variasi genetik pada gen GH ini sudah dapat digunakan sebagai acuan untuk dilakukan seleksi dalam rangka memperbaiki mutu genetik sapi bali. Unanian *et al.* (1994), menemukan adanya polimorfisme pada gen GH pada posisi 2637. Polimorfisme juga ditemukan oleh Dybus (2002) pada sapi *black-and-white*. Genotip dari sapi *black-and-white* ini sangat berhubungan dengan produksi susu. Sorensen *et al.* (2002), mendapatkan adanya polimorfisme gen GH pada sapi Danish Holstein, Danish Red dan Danish Jersey. Polimorfisme ini berhubungan erat dengan sekresi GH.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sapi bali yang ada di Pulau Bali memiliki variasi genetik untuk gen GH sehingga memungkinkan untuk dilakukan seleksi berdasarkan kriteria ini.

KEPUSTAKAAN

Connor EE, Ashwell MS, Kappes SM, and Dahl GE, 1999. Rapid Communication: Mapping of the Bovine Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor (GHRH-R) Gene to Chromosome 4 by Linkage Analysis Using a Novel PCR-RFLP. *American Society of Animal Sciences*. 77: 793–794.

Chikuni K, Fukumoto Y, Tanabe R, Muroya S, and Ozawa S, 1997. Short Communication: A Simple Method for Genotyping

the Bovine Growth Hormone Gene. *Animal Genetics* 28: 230–232.

Diwyanto K, Setiadi B, 2000. Perplasmanutfahan (Pertanian) di Indonesia. Studium Generale, Komisi Nasional Plasma Nutfah bekerjasama dengan Universitas Diponegoro, Semarang, 11 Oktober 2000.

Dybus A, 2002. Associations between Leu/Val polymorphism of growth hormone gene and milk production traits in Black-and White Cattle. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 45(5): 421–428.

Friedberg EC, Walker GC, and Siede W, 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM. Press, Washington DC.

Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, and Simmen RCM, 2003. Association of Single Nucleotide Polymorphism in the Growth Hormone and Growth Hormone Receptor Genes with Blood serum Insulin-like growth Factor I Concentration and Growth Traits in Angus Cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 641–648.

Hadley ME, 1992. *Endocrinology*, 3rd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 07632.

Hardjosubroto W, 1994. *Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan*. PT. Gramedia Widiasarana Indonesia, Jakarta.

Hardjosubroto W, 2002. Arah dan Sasaran Penelitian dan Pengembangan sapi potong di Indonesia : Tinjauan dari Segi Pemuliaan Ternak. Wokshop Sapi Potong. Malang, 11–12 April 2002.

Klug WS and Cummings MR, 2002. *Essentials of Genetics*. Fourth Edition. Prantice Hall. New Jersey.

Ling Sun Y and Sheng Lin C, 2003. Establishment and Application of a Fluorescent Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Polymorphism (PCR-RFLP) Method for Identifying Porcine, caprine and Bovine Meats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 1771–1776.

Mahaputra L, 2002. Arah dan Sasaran Penelitian Reproduksi sapi Potong di Indonesia. Workshop sapi Potong Di Malang, Jawa Timur, 11–12 April 2002.

Putu IG, Dewyanto P, Sitepu TD, 1997. Ketersediaan dan kebutuhan teknologi Produksi Sapi Potong. Proceeding Seminar nasional Peternakan dan veteriner, Bogor, 7–8. Januari 1997. hal. 50–63.

Reis C, Navas D, Pareira M, and Cravador A, 2001. Growth Hormone Alu Polymorphism Analysis in Eight Portuguese Bovine Breeds. *Arch.Zootech*. 50: 41–48.

Sambrook J and Russel DW, 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Third Ed. Vol 1. Cold Sping Harbor Laboratory Press. New York.

Sariubang M, Pasambe D, dan Chalidjah, 1998. Pengaruh Kawin Silang terhadap Performans Hasil Turunan Pertama (F1) pada sapi bali di Sulawesi Selatan. *Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner*. Bogor, 1–2 Desember 1998.

Sorensen P, Grochowska R, Holm L, Henryon M, and Lovendahl P, 2002. Polymorphism in the Bovine Growth Hormone Genes Affects Endocrine Release in Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* 85: 1887–1893.

- Sukmasari AH, Noor RR, Martojo H, dan Talib C, 2002. Penduganaan Nilai pemuliaan dan Kecenderungan Genetika Bobot Badan Sapi Bali di Proyek Pembibitan dan Pengembangan Sapi bali. *Hayati*. 9(4): 109–113.
- Supriyantono A, Hakim L, Suyadi, dan Ismudiono, 2005. Performans Sapi Bali pada Tiga Daerah di provinsi Bali. Seminar Nasional Biologi dan Pembelajarannya. Universitas Negeri Malang. Malang, 3 Desember 2005.
- Talib C, K Entwistle, A Siregar, S Budiarti-Turner and D Lindsay, 2002. Survey of Population and Production Dynamics of Bali Cattle and Existing Breeding Programs in Indonesia. Working Papers: Bali Cattle Workshop. Bali. 4–7 February 2002.
- Tamarin RH, 2002. *Principles of Genetics*. Seventh Edition. McGraw-Hill. New York.
- Unanian MM, DeNise SK, Zhang HM, and Ax RL, 1994. Rapid Communication: Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Polymorphism in the Bovine Growth Hormone Gene. *J. Anim. Sci.* 72: 2203.

Reviewer: **Dr. Bambang Irawan, MSc.**