

Asosiasi Keragaman Lokus DNA Mikrosatelit DRB3 Gen Bola dengan Berat Badan Induk dan Berat Lahir Pedet pada Sapi Bali

Association of the Polymorphism of DNA Microsatellite Bola-DRB3 Gene with Dam Body Weight and Birth Weight of Calves in Bali Cattle

Ni Nyoman Trinayani¹, I Nengah Wandia², I Ketut Puja^{3*}

1 Program Magister Kedokteran Hewan, Unud, Jl. PB Sudirman, Denpasar, Bali

2 Laboratorium Molekuler PPSP LPPM Unud Kampus Bukit Jimbaran, Badung Bali

3 Bagian Anatomi Veteriner FKH Unud Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali

* *Corresponding author* email: asubali@hotmail.com

ABSTRACT

Genomic selection has a high potency to improve the genetic quality of Bali cattle. In effort to find out a molecular marker or DNA segment which is linked with a certain phenotype, we examined the association between BoLa-DRB3 microsatellite polymorphism and dam body weight and birth weight of calves in Bali cattle. A total of 40 dams from Abuan Village, the District of Susut was investigated. The total DNA was extracted with QIAamp DNA blood mini kit. The locus was amplified using PCR technique with a 54°C annealing temperature.. Alleles were separated through PAGE 6%, and visualized with silver staining. We found 10 alleles which their length varied from 145 bp to 233 bp. Allele 195 had the highest frequency that was 35.0%. The HE, HO, PIC were 0.821, 0.875, and 0.791 consecutively. Statistical analysis showed that the polymorphism of DRB3 microsatellite had a marginally significant association ($p < 0.1$) to the dam body weight. However, it had no significant association to the birth weight of the calves. The results of the research reflect that the DRB3-BoLA gene has a weak potency in controlling the body weight.

Key words: Bali cattle, BoLA gene, DRB3 microsatellite, dam body weight, birth weight of calves

ABSTRAK

Seleksi genomik berpotensi besar untuk memperbaiki kualitas genetik sapi Bali. Dalam rangka penemuan marka molekuler atau segmen DNA yang berkaitan dengan ekspresi tertentu, penelitian ini ditujukan untuk mengkaji asosiasi keragaman lokus mikrosatelit DRB3 gen BoLA (*Bovine Leukocyte Antigen*) dengan berat badan induk dan berat lahir pedet pada sapi Bali. Sebanyak 40 ekor sapi betina yang di sampling dari Desa Abuan, Kecamatan Susut digunakan dalam studi ini. DNA total diekstraksi dengan QIAamp DNA blood mini kit. Amplifikasi lokus mikrosatelit DRB3 menggunakan teknik PCR dengan suhu annealing 54°C. Alel dipisahkan secara elektroforesis pada gel poliakrilamid 6% dan dimunculkan dengan pewarnaan perak. Penelitian menemukan 10 alel dengan panjang berkisar 145-233 bp. Alel 195 mempunyai frekuensi tertinggi, yaitu 35,0%. HE, HO, dan PIC secara berurutan adalah 0,821; 0,875; dan 0,791. Analisis statistik menunjukkan adanya asosiasi nyata secara marginal antara keragaman lokus DNA mikrosatelit DRB3 dengan berat badan induk ($P < 0,1$), tetapi tidak menunjukkan adanya asosiasi dengan berat lahir pedet. Hasil penelitian merefleksikan bahwa lokus DRB3 gen BoLA berpotensi lemah dalam mengontrol berat badan.

Kata kunci : sapi Bali, gen BoLA, mikrosatelit DRB3, berat badan induk, berat lahir pedet.

PENDAHULUAN

Usaha perbaikan mutu genetik sapi Bali untuk mengatasi terjadinya seleksi negatif di tingkat peternak perlu dilakukan. Sapi Bali sudah ditetapkan sebagai plasma nutfah nasional, dengan banyak keunggulan khusus dibandingkan dengan sapi – sapi ras lain, dan oleh karena itu upaya untuk pelestarian dan peningkatan mutu genetik harus dikaji dan diberdayakan secara nasional.

Salah satu upaya perbaikan mutu genetik sapi Bali dengan cara seleksi untuk menghasilkan ternak bibit sapi Bali yang unggul. Teknik seleksi berdasarkan pada segmen DNA (*deoxyribo nucleic acid*) atau gen yang dikenal sebagai *genomic selection* merupakan suatu teknik seleksi berdasarkan pada petanda/penciri spesifik dari gen atau segmen DNA yang mengekspresikan atau terpaut dengan suatu sifat yang dijadikan dasar kriteria seleksi (Suyadi, 2010).

Mikrosatelit DNA merupakan marka genetik yang menyediakan informasi mengenai keragaman alel pada lokus gen. Mikrosatelit telah digunakan secara luas diberbagai bidang, salah satunya adalah pemetaan lokus gen yang berasosiasi dengan sifat produksi pada hewan (Hiendleder *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2003).

Gen BoLA (*bovine leukocyte antigen*) merupakan kompleks gen yang berada pada kromosom 23 sapi dan berperan penting pada penampilan reproduksi, produksi, dan ketahanan penyakit (Nascimento *et al.*, 2006). Struktur gen BoLA sama dengan gen MHC pada manusia (Firouzamandi *et al.*, 2010). Gen BoLA dibedakan menjadi tiga kelas yaitu MHC kelas I, kelas II dan kelas III (Bastos-Silveira *et al.*, 2008). MHC menciri dengan jumlah alel yang banyak pada setiap lokus dan terdapat perbedaan jumlah asam amino yang tinggi pada setiap alelnya (Sommer, 2005).

Hubungan polimorfisme gen BoLA dengan sifat yang berkaitan dengan ketahanan penyakit telah banyak diungkapkan, namun asosiasi gen BoLA dengan sifat produksi belum banyak diungkap. Penelitian ini ditujukan untuk mengkaji asosiasi antara variasi mikrosatelit DRB3 gen BoLa dengan berat induk dan berat lahir pedet pada sapi bali. Penelitian ini merupakan langkah awal dari tindakan *genomic selection* sehubungan dengan penemuan marka molekuler untuk diperbantukan dalam seleksi pada sapi bali. . (Firouzamandi *et al.*, 2010).

MATERI DAN METODE

Koleksi Sampel

Sejumlah 40 sampel darah diambil dari vena jugularis sapi Bali betina produktif menggunakan tabung venoject yang mengandung antikoagulan. Sapi Bali betina produktif yang disampling dipelihara oleh Instansi Populasi Dasar Balai Pembibitan Ternak Unggul Sapi Bali di Denpasar, Bali.

Berat Badan Induk dan Berat Lahir Pedet

Data berat badan induk dan berat lahir pedet didapatkan dari pencatatan ternak di Instalasi Populasi Dasar Balai Pembibitan Ternak Unggul Sapi Bali di Denpasar, Bali.

Ekstraksi DNA dan Amplifikasi DNA

Sampel darah sapi Bali diekstraksi menggunakan QIAamp DNA Mini Kit sesuai dengan protokol pembuatnya. Reaksi PCR dilakukan menurut metode Hillis *et al.* (1996) dengan mengandung 3mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; sepasang primer masing – masing 0,4 µM; Taq DNA Polimerase sebanyak 0,4 U dan 1x *buffer* PCR. Setiap satu reaksi PCR dimasukkan *template* DNA sebanyak 1,5 µl, dan sejumlah air deionase sehingga

volume akhir 12,5 μ l. Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan program Pre PCR: 1) Denaturasi pada 94°C selama 3 menit ; PCR: 1) denaturasi pada 94°C selama 45 detik, 2) annealing pada 54°C selama 35 detik dan 3) ekstensi pada 72°C selama 35 detik; Post PCR : ekstensi 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dipisahkan dengan gel acrylamide 6% dan visualisasi dilakukan dengan pewarnaan perak. DNA typing dilakukan dengan mengukur jarak migrasi masing – masing pita DNA pada gel dibandingkan dengan pita DNA standar 100 pb ladder.

Analisis Data

Polimorfisme genetik sapi Bali diukur dengan rataan heterosigositas (H), jumlah, dan frekuensi alel dengan menggunakan program *Microsatellite Toolkit V.3.1* (Park, 2001). Asosiasi gen BoLA dengan sifat produksi (berat badan dan berat lahir pedet) menggunakan prosedur *General Linear Models*. Analisis dikerjakan pada SPSS V.19 (Hermann *et al.*, 2006).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berat Badan Induk dan Berat Lahir Pedet Sapi Bali

Rata – rata berat badan induk sapi Bali adalah 282,8 kg dengan berat yang paling tinggi 346,5 kg dan terendah 226,5 kg. Rata – rata berat lahir pedet 17,9 kg, dengan berat lahir tertinggi 22,0 kg dan terendah 14,0 kg (Tabel 1).

Keragaman Lokus DNA Mikrosatelit DRB3 Gen BoLA

Hasil analisis lokus DNA mikrosatelit DRB3 gen BoLA menunjukkan bahwa pada sapi Bali terdeteksi sejumlah 10 alel, dengan ukuran alel bervariasi dari 145 bp sampai dengan 233 bp. Frekuensi alel yang tertinggi terdapat pada alel 195 bp (35,0%) dan frekuensi alel terendah terdapat pada alel 145 bp (1,25%, Tabel

2). Hasil ini menunjukkan bahwa lokus mikrosatelit DRB3 sangat polimorfik (10 alel). Jumlah alel pada penelitian ini lebih banyak dibandingkan alel yang ditemukan pada penelitian sapi bali sebelumnya oleh Puja *et al.*(2011), yakni pada sapi bali jantan asal Bali teridentifikasi sebanyak 7 alel dan pada sapi Bali jantan asal Nusa Penida sebanyak 9 alel. Jumlah alel yang ditemukan pada sapi Bali masih lebih sedikit dibandingkan pada bangsa sapi lainnya, seperti yang dilaporkan Acosta-Rodriguez *et al.*,(2005) yang mengidentifikasi 18 alel pada sapi persilangan antara bangsa sapi Eropa, Simmenthal, Holstein dan Zebu. Hasil penelitian Bastos-Silveira *et al.*(2008) mengidentifikasi jumlah alel 28 menggunakan penanda yang sama pada jenis sapi berbeda (bangsa sapi Portugal), sedangkan Martinez *et al.* (2006) mengidentifikasi 20 alel pada sapi persilangan antara Gyr dengan Holstein. Nascimento *et al.*(2006), menemukan 37 alel pada sapi Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). Polimorfisme lokus DRB3 pada sapi bali ini juga sesuai dengan hasil penelitian lainnya. Baxter *et al.* (2008) menyatakan bahwa lokus DRB3 paling polimorfik diantara gen BoLA. Miretti *et al.* (2001) melaporkan bahwa gen BoLA lokus DRB3 bersifat polimorfik.

Heterosigositas lokus DRB3 adalah 0,821 untuk He dan 0,875 untuk Ho. Berdasarkan persamaan Botstein's (Botstein *et al.*, 1980), nilai PIC yang diperoleh cukup tinggi yaitu 0,791 (Tabel 3). Heterozigositas lokus DRB3 lebih tinggi dibandingkan yang dilaporkan oleh Puja *et al.*(2011) yaitu 0,7863 pada sapi Bali jantan asal Bali dan 0,7967 pada sapi Bali jantan asal Nusa Penida. Nilai PIC lokus DRB3 cukup tinggi mengindikasikan lokus DRB3 bersifat informatif untuk analisis genetika populasi (Botstein *et al.*, 1980).

Tabel 1 Data Berat Badan Induk dan Berat Lahir Pedet di KTT.Sari Laba, Dusun Abuan, Desa Sala, Kabupaten Bangli

Produksi	Maksimum (kg)	Minimum (kg)	Rataan (kg) \pm SD
Berat Badan Induk	346,5	226,5	282,8 \pm 26,96
Berat Lahir Pedet	22,0	14,0	17,9 \pm 2,19

Tabel 2 Jumlah Alel dan Frekuensi Alel Lokus DNA Mikrosatelit DRB3 pada Sapi Bali Betina

Lokus	Ukuran Alel (bp)	Jumlah Alel	Frekuensi Alel (%)
DRB3	145	1	1,25
	149	3	3,75
	155	2	2,50
	171	12	15,00
	177	5	6,25
	183	5	6,25
	195	28	35,00
	207	5	6,25
	225	7	8,75
	233	12	15,00

Tabel 3 *Expected Heterozygosity* (He), *Observed Heterozygosity* (Ho) dan *Polimorphic Information Content* (PIC)

Lokus	He	Ho	PIC
DRB3	0,821	0,875	0.791

Tabel 4 Hasil Analisis Ragam Asosiasi Keragaman Lokus DNA Mikrosatelit DRB3 Gen BoLA dengan Berat Badan Induk

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F	P (Nyata)
Alel	9	11125,591	1236,177	1,868	0,071
Galat	70	46315,209	661,646		
Total	79	57440,8			

Tabel 5 Hasil Analisis Ragam Asosiasi Keragaman Lokus DNA Mikrosatelit DRB3 Gen BoLA dengan Berat Lahir Pedet

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F	P (Nyata)
Alel	9	29,193	3,244	0,649	0,752
Galat	70	350,007	5,000		
Total	79	379,200			

Asosiasi Keragaman Mikrosatelit DRB3 gen BoLA dengan Berat Badan Induk dan Berat Lahir Pedet

Hasil analisis ragam menunjukkan adanya asosiasi ringan antara keragaman lokus DNA mikrosatelit DRB3 gen BoLA dengan berat badan induk pada sapi Bali

($p < 0,1$, Tabel 4). Hasil penelitian ini mendukung hasil penelitian sebelumnya oleh Firouzamandi *et al.* (2010) bahwa sifat produksi dan sifat yang berkaitan dengan ketahanan penyakit telah diketahui berhubungan dengan polimorfisme alel gen BoLA dan menurut Nascimento *et al.*

(2006) polimorfisme pada alel gen BoLA berhubungan dengan sifat produksi, prosentase lemak, protein air susu, angka pertumbuhan, penampilan reproduksi, respon imun dan ketahanan penyakit, meskipun asosiasi dengan sifat produksi (berat badan induk) yang diperoleh dari penelitian ini ringan ($p < 0,1$). Akan tetapi, hasil penelitian ini tidak menunjukkan adanya asosiasi keragaman lokus DNA mikrosatelit DRB3 gen BoLA dengan berat lahir pedet (Tabel 5), yang artinya bahwa polimorfisme lokus DRB3 gen BoLA tidak mempengaruhi berat lahir pada pedet sapi Bali.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa lokus DNA mikrosatelit DRB3 sangat polimorfik dengan teridentifikasi sebanyak 10 alel. Terdapat asosiasi ringan antara keragaman lokus DNA mikrosatelit DRB3 gen BoLA dengan berat badan induk, akan tetapi tidak ada asosiasi antara keragaman lokus DRB3 dengan dan berat lahir pedet yang dilahirkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Instansi Populasi Dasar Balai Pembibitan Ternak Unggul Sapi Bali di Denpasar, Bali atas pemberian ijin sampling sapi untuk penelitian. Saya juga menyampaikan penghargaan setinggi-tingginya kepada Kepala Laboratorium Molekuler PPSP LPPM Unud atas segala fasilitas yang diberikan sehingga penelitian dapat diselesaikan sesuai dengan waktu telah yang direncanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Acosta-Rodriguez R, Alonso-Morales R, Balladares S, Flores-Aguilar H, Garcia-Vazquez Z, dan Gorodezky C. 2005. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Vet parasitol.*, 127: 313-21.
- Bastos-Silveira C, Luís C, Ginja C, Gama LT, dan Oom MM. 2008. Genetic variation in BoLA microsatellite loci in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetic* 40: 101-105.
- Baxter R, Hasting N, Law A, dan Glass EJ. 2008. A Rapid and Robust Sequence-based genotyping method for BoLA DRB3 alleles in large numbers of heterozygous cattle. *Animal Genetic* 39: 561-563.
- Botstein D, Raymond, White L, Skolnick M, dan Davis RW. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J. Hum.Genet.*, 32: 314-331.
- Firouzmandi M, Shoja J, Barzegari A, dan Roshani E. 2010. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Iranian Holstein and Sarabi (Iranian native) cattle. *African Journal of Biotechnology*. 9(15) : 2224-2228.
- Hermann G, Manzoor R, Andreas WK, Heinz B. 2006. BoLA-DRB1 Microsatellite Variants are Associated with Ovine Growth and Reproduction Traits. *Genet.Sel.Evol.*38 : 431-444.
- Hiendleder S, Thomsen H, Reinsch N, Bennewitz J, Leihe Horn B, Reinhardt F, Reent R, Averdunk G, Schwerin M, Foster M, Kalm E, Erhardt GJH. 2003. Mapping of QTL for Body Conformation and Behavior in Cattle. www.Wikigenes.Org/e/author/e/1027065.html.
- Hillis DM, Morits C, Mable BK. 1996. *Molecular Systematics*. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Kuhn H, Hu Y, Frank-Kamenetskii MD, dan Demidov VV. 2003. Artificial Site-specific DNA-nicking System based on Common Restriction Enzymes Assisted by PNA Opener. *Biochemistry* 42: 4985-4992.

- Martinez ML, Machado MA, Nascimento CS, Silva MVGB, Teodoro LR, Furlong J, Prata MCA, Campos AL, Guimaraes MFM, Azevedo ALS, Pires MFA, dan Verneque RS. 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genetics and Molecular Research*. 5 (3): 513-524.
- Miretti MM, Ferro JA, Lara MA dan Contel EPB. 2001. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in Exon 2 of the BoLA-DRB3 Gene in South American Cattle. *Biochemical Genetics*, 39 (9-10): 311-324.
- Nascimento CS, Machado MA, Martinez ML . 2006. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). *Genetics and Molecular Biology* 29: 641–7
- Park SDE. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [Ph.D. thesis] University of Dublin.
- Puja IK, Wandia IN, Suastika P, Sulabda IN. 2011. Asosiasi Polimorfisme Genetik Locus DNA Mikrosatelit Gen BoLA dengan Kualitas Semen pada Sapi Bali. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Denpasar-Bali.
- Sommer S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology* 2(1)
- Suyadi. 2010. Model Seleksi Sapi Bali Berdasarkan Marka Gen Pertumbuhan. Dewan Riset Nasional Kementrian Negara Riset dan Teknologi.