PANEL 16 LOKUS MIKROSATELIT UNTUK DETEKSI POLIMORFISME DAN HUBUNGAN FILOGENETIK PADA GENOM SAPI

Winaya, A.[1], Muladno[2] & B. Tappa[3]

[1]*Fakultas Peternakan - Univ. Muhammadiyah Malang*
[2]*Fakultas Peternakan - Institut Pertanian Bogor*
[3]*Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi - LIPI*

ABSTRACT

The most linkage and population genetic study that based on microsatellite marker assume that the polymorphism at these loci are highly and more complex, so dispersed abundantly in the genome and easy to amplified by PCR. The aims of this study were to get the DNA fingerprinting based on microsatellite marker and to construct the phylogenetic tree to know the genetic relationship among cattle population, that were Bali, Madura, Ongole cross breed and Brangus cattle's. The PCR technique was used to amplified DNA samples which extracted from whole blood cells with the primer pairs that flanking 16 microsatellite loci (BM 2113, CSSM 66, ETH 3, ETH 10, ETH 152, ETH 185, ETH 225, HEL 1, HEL 5, HEL 9, ILSTS, INRA 023, INRA 032, INRA 035, INRA 037 and HAUT 24) to get genetic variation in samples population. Vertical 6 % polyacrylamide gel electrophoresis was used to separate PCR products, while allele detection at each locus using silver staining technique. Polymorphism stated by allele variation at each locus. The research showed that from 16 microsatellites panel was get average allele number in all population 2.17, while the highest allele number was 5 founded in Madura cattle population. From phylogenetic relationship showed that Madura and Brangus cattles in the same cluster and separated with Ongole breed cattle, while Bali cattle separated from others.

Key words : microsatellite, silver staining, PCR, polymorphism, phylogenetic tree, cattle genome.

PENDAHULUAN

Studi populasi dan pautan genetik menggunakan penanda mikrosatelit banyak dilakukan dengan asumsi bahwa polimorfisme tiap lokus tinggi dan lebih kompleks, disamping itu dalam genom eukariot terdistribusi secara luas dengan polimorfisme makin tinggi apabila unit ulangannya tergandakan lebih dari 10 kali lipat (Weber, 1990). Perbedaan panjang alel mikrosatelit pada lokus biasanya dikarenakan variasi pada jumlah ulangannya dan ketidaksepadanan pasangan nukleotida saat kejadian replikasi dipertimbangkan sebagai mekanisme utama yang menyebabkan panjangnya variasi alel tersebut, bahkan munculnya alel-alel baru (Travis *et al;* 1996). Variasi pada lokus-lokus mikrosatelit dapat diuji dengan amplifikasi PCR menggunakan primer-primer yang komplemen dengan sekuen unik pengapit rangkaian nukleotida berulang, serta diikuti dengan elektroforesis produk PCR (Tauzt, 1993).

Penggunaan mikrosatelit dalam studi populasi genetik telah berkembang cepat terutama pada studi populasi manusia (Edwards *et al;* 1991), sedangkan aplikasi teknik ini untuk karakterisasi bangsa ternak domestikasi masih merupakan isu yang relatif baru. Sehingga, hal ini merupakan potensi utama untuk digunakan sebagai teknik dalam analisis genom berdasarkan polimorfisme yang dihasilkan (Ciampolini *et al;* 1995).

Data frekuensi alel pada mikrosatelit dapat digunakan untuk studi hubungan genetik pada spesies maupun antar populasi yang relatif dekat kekerabatannya (Takezaki & Nei, 1996). Dalam hal ini, penggunaannya untuk memperkirakan jarak genetik pada konstruksi pohon filogenetik (Ciampolini *et al;* 1995). Nei *et al;* (1983) dengan menggunakan simulasi komputer telah menguji efisiensi relatif pada pengukuran jarak genetik untuk memperoleh topologi yang tepat pada pohon filogenetik dengan asumsi bahwa alel mutan baru akan selalu berbeda dari alel yang telah ada sebelumnya pada suatu populasi (*infinite-allele model* atau *IAM*).

Pada penelitian ini digunakan 16 buah pasang primer unik pengapit mikrosatelit untuk mendapatkan sidik jari DNA dari 4 bangsa sapi potong, yakni sapi Bali, Madura, Peranakan Ongole (P.O) dan Brangus, dengan metode penentuan polimorfisme genetik secara "klasik" (Astolfi *et al;* 1983). Prosedur statistik digunakan untuk analisis data yang dihasilkan dari variasi frekuensi alel antar populasi sapi, juga berdasarkan asumsi-asumsi dasar yang terkait dengan penentuan struktur genetik dalam analisis populasi terutama untuk konstruksi pohon filogenetik.

MATERI DAN METODE

Materi utama dalam penelitian ini adalah DNA genom sapi yang diperoleh dari sel darah sapi Bali, Madura, P.O dan Brangus, masing-masing sebanyak 25 ekor. Sampel darah yang digunakan sebanyak 10 mL disimpan dalam tabung yang mengandung EDTA (konsentrasi 4 mM). Sedangkan prosedur ekstraksi DNA didasarkan pada metode standart *fenol-kloroform* (Sambrook *et al;* 1989). Adapun primer yang digunakan sebanyak 16 buah, yaitu : BM 2113, CSSM 66, ETH 3, ETH 10, ETH 152, ETH 185, ETH 225, HEL 1, HEL 5, HEL 9, ILSTS, INRA 023, INRA 032, INRA 035, INRA 037 dan HAUT 24, yang merupakan sekuen spesifik pengapit lokus mikrosatelit.

Reaksi PCR dilakukan dengan volume total 25 µl dari 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 0.01% gelatin pH 8.3 serta 0.42 mM dari setiap dNTP's (Pharmacia). Konsentrasi $MgCl_2$ dan temperatur *annealing* dioptimasi pada setiap mikrosatelit yang digunakan. Reaksi mengandung 400 ng setiap pasangan primer (*Forward* 200 ng dan *Reverse* 200 ng) dengan DNA genom kurang lebih 50-100 ng dan penambahan enzim *Taq* polimerase sebanyak 2.5 unit (*Perkin Elmer Cetus*). Suhu denaturasi 95°C selama 3 menit dan siklus temperatur diatur sebanyak 36 kali, dengan masing-masing siklus terdiri 30 detik 94°C, 30 detik untuk suhu *annealing* dan 55 detik dengan suhu 72°C untuk sintesis. Deteksi alel mikrosatelit produk PCR dilakukan dengan vertikal poliakrilamid gel elektroforesis (PAGE) 6%, yang dilanjutkan dengan pewarnaan perak *(silver staining)* (Tegelström, 1986) untuk penentuan ukuran dan jumlah alel. Polimorfisme fragmen ditentukan dari pola pita yang berbeda hasil elektroforesis, sedangkan penentuan posisi pita DNA dilakukan secara manual (Pena *et al.*, 1993).

Konstruksi pohon filogenetik atau dedogram untuk membedakan antar individu maupun populasi diperoleh dari profil DNA setiap individu berdasarkan perhitungan frekuensi alel menggunakan rumus Nei (1987). Kemudian, digunakan untuk menghitung nilai heterosigositas (H) sebagai nilai keragaman genetik. Nilai H ini kemudian digunakan untuk mengkonstruksi pohon genetik guna mengetahui perbedaan genetik dari ke 4 populasi sapi. Dengan asumsi *infinite allele model*, nilai baku Nei (Ds) dihitung untuk memperoleh matrik jarak.

Hasil perhitungan matrik jarak kemudian digunakan untuk konstruksi pohon genetik dengan metode UPGMA dengan *software* PHYLIP ver. 3.5c (Felsenstein, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Polimorfisme Mikrosatelit Genom Sapi

Polimorfisme mikrosatelit dari ke empat genom sapi (Bali, Madura, P.O dan Brangus) ditetapkan dari hasil amplifikasi DNA dengan primer pengapit mikrosatelit yang diseparasi dengan elektroforesis gel poliakrilamid dan dilanjutkan dengan teknik pewarnaan perak *(silver staining)*. Elektroforesis gel poliakrilamid mampu memisahkan DNA lebih sempurna dan jumlah sampel yang dibutuhkan lebih sedikit, sedangkan metode pewarnaan perak lebih sensitif karena mampu mendeteksi DNA dengan kandungan lebih kecil dari 10 ng/µL (Allen *et al;* 1984). Adapun untuk menentukan ukuran maupun jumlah alel dilakukan sesuai petunjuk Leung *et al;* (1993) dengan asumsi bahwa semua pita DNA dengan laju migrasi yang sama, diasumsikan sebagai lokus yang homolog. Kemudian, data profil DNA ini diterjemahkan ke dalam data matrik jarak berdasarkan nilai heterosigositas dari populasi yang dibandingkan. Pada studi ini, dilakukan genotipe terhadap empat populasi sapi (Bali, Madura, P.O dan Brangus) berdasarkan 16 lokus mikrosatelit.

Jumlah alel tertinggi ditemukan pada mikrosatelit ETH 225 (5 buah) dari populasi sapi Madura dengan jumlah rata-rata alel pada ke empat populasi adalah 2,17 dan secara keseluruhan jumlah alel masih cukup rendah (1 hingga 5 buah). Sedangkan nilai heterosigositas ke empat populasi antara 31% hingga 46%. Hasil ini sebenarnya tidak jauh berbeda jika dibandingkan dengan studi sebelumnya oleh Moore *et al;* (1992) yang menggunakan 4 individu *Bos indicus* dan 15 individu persilangan *Bos indicus x Bos taurus*, dimana didapatkan jumlah alel antara 2 hingga 14 dengan tingkat heterosigositas antara 15,8% hingga 100%. Fenomena rata-rata jumlah alel yang rendah diduga antara lain karena variasi genetik sapi Bali dan Madura masih seragam (dalam kasus ini sampel kedua sapi tersebut berasal dari habitat aslinya) atau kemungkinan lain adalah pada teknik pengambilan sampel yang belum berasal dari habitat atau letak geografis yang sangat berjauhan sehingga memungkinkan terjadinya keragaman genetik akibat proses seleksi.

Tabel 1. Jumlah dan Frekuensi Alel Setiap Lokus Mikrosatelit Pada 4 Populasi Sapi (Bali, Madura, P.O dan Brangus)

Lokus	Sapi Bali			Sapi Madura			Sapi P.O			Sapi Brangus		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
BM 2113	23 (46)	3	A 0,04 B 0,50 C 0,46	15 (30)	2	A 0,73 B 0,27	16 (32)	4	A 0,0 6 B 0,47 C 0,25 D 0,22	15 (30)	1	A 1,00
ETH 3	21 (42)	2	A 0,50 B 0,50	20 (40)	1	A 1,00	22 (44)	4	A 0,11 B 0,36 C 0,43 D 0,01	10 (20)	1	A 1,00
INRA 032	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50	19 (38)	2	A 0,32 B 0,68	16 (32)	4	A 0,16 B 0,56 C 0,25 D 0,03	8 (16)	2	A 0,50 B 0,50
ETH 152	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50	20 (40)	3	A 0,38 B 0,47 C 0,15	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50
INRA 035	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50	23 (46)	3	A 0,72 B 0,24 C 0,04	12 (24)	3	A 0,25 B 0,58 C 0,07	17 (34)	1	A 1,00
HEL 1	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50	23 (46)	2	A 0,72 B 0,28	14 (28)	2	A 0,75 B 0,25	18 (36)	1	A 1,00
HEL 5	14 (28)	1	A 1,00	23 (46)	2	A 0,87 B 0,13	10 (20)	2	A 0,60 B 0,40	9 (18)	3	A 0,17 B 0,50 C 0,33
ILSTS 005	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50	23 (46)	3	A 0,17 B 0,65 C 0,17	15 (30)	2	A 0,17 B 0,83	7 (14)	3	A 0,21 B 0,57 C 0,21
ETH 225	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50	23 (46)	5	A 0,22 B 0,43 C 0,11 D 0,09 E 0,15	23 (46)	3	A 0,20 B 0,63 C 0,17	15 (30)	2	A 0,50 B 0,50
CSSM 66	23 (46)	1	A 1,00	23 (46)	1	A 1,00	23 (46)	2	A 0,93 B 0,07	23 (46)	1	A 1,00
ETH 10	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50	23 (46)	2	A 0,50 B 0,50	13 (26)	2	A 0,54 B 0,46	23 (46)	2	A 0,56 B 0,44
INRA 023	23 (46)	4	A 0,46 B 0,04 C 0,46 D 0,44	23 (46)	1	A 1,00	16 (32)	3	A 0,09 B 0,69 C 0,22	13 (26)	2	A 0,31 B 0,69
HEL 9	23 (46)	1	A 1,00	16 (32)	4	A 0,19 B 0,41 C 0,31 D 0,09	13 (26)	2	A 0,62 B 0,38	21 (42)	2	A 0,76 B 0,24
INRA 037	23 (46)	1	A 1,00	19 (38)	2	A 0,50 B 0,50	23 (46)	1	A 1,00	15 (30)	2	A 0,27 B 0,73
ETH 185	12 (24)	2	A 0,75 B 0,25	14 (28)	2	A 0,50 B 0,50	20 (40)	2	A 0,35 B 0,65	9 (18)	3	A 0,17 B 0,50 C 0,33
HAUT 24	15 (30)	2	A 0,67 B 0,33	13 (26)	1	A 1,00	10 (20)	3	A 0,2 0 B 0,70 C 0,10	6 (12)	3	A 0,42 B 0,50 C 0,08

Keterangan : 1) jumlah sampel yang diuji; 2) jumlah alel; 3) jenis dan frekuensi alel.

Pada Tabel 1 ditampilkan secara rinci genotipe dari ke empat populasi sapi berdasarkan frekuensi alel pada 16 lokus mikrosatelit. Adanya kecenderung-an mikrosatelit ETH 225 pada sapi Madura yang lebih polimorfik dibandingkan dengan mikrosatelit lain-nya, maka sebenarnya mikrosatelit ini dapat dijadikan kandidat marker. Namun, untuk menjamin akurasi dan ketepatan serta kestabilan alel yang dihasilkan, maka penggunaan marker mikrosatelit ETH 225 tersebut sebaiknya perlu dilakukan uji lebih lanjut atau berulang kali, misal dengan uji keturunan *(pedigree)* dan segregasi Mendel dengan mengguna-kan jumlah individu lebih banyak serta cakupan geografis yang luas sehingga dapat digunakan untuk estimasi evaluasi genetik maupun filogenetik bagi ternak-ternak domestik di Indonesia ataupun yang terkait dapat ditetapkan berdasarkan penanda ini.

Namikawa *et al;* (1982), menyatakan bahwa studi hubungan genetik sapi-sapi di Indonesia sangat menarik dikarenakan variasi genetiknya yang cukup luas. Dalam kaitan ini, terdapat kecenderungan perbedaan yang meningkat dari beberapa tipe bangsa sapi pada beberapa lokasi di Indonesia. Misal, sapi Bali yang merupakan bangsa sapi unik Indonesia, merupakan sapi domestikasi dari sapi liar Banteng, juga di sisi lain, bangsa sapi zebu Ongole yang masih dipelihara di pulau Sumba, demikian pula bangsa sapi lokal lain seperti sapi Aceh di Sumatra dan sapi Madura. Oleh karena itu, dengan memanfaatkan penanda mikrosatelit ini dapat dijadikan sarana untuk klarifikasi tentang perbedaan genetik diantara ternak-ternak sapi endemik Indonesia.

Sebagai tempat konsentrasi terbesar sapi Bali, maka diasumsikan bahwa pulau Bali atau pulau yang berdekatan merupakan pusat domestikasi sapi Bali (Payne & Rollinson, 1973). Dukungan kuat akan hal ini adalah ditunjukkan dari hasil penelitian Namikawa (1981) yang melaporkan bahwa komponen Hbb-X haemoglobin darah umumnya ditemukan pada darah sapi-sapi yang ada di Asia Tenggara, dan insiden tinggi dari Hbb-X diduga merupakan hasil aliran gen dari sapi Bali. Sebagaimana diketahui pula bahwa distribusi lokus alel Hbb ini secara geografis menunjukkan hubungan filogeni untuk sapi-sapi di Asia Tenggara dan Asia Timur, dimana polimorfisme alel tersebut bersumber dari *Bos taurus, Bos indicus* dan *Bibos banteng.*

Analisis sederhana untuk mengetahui heterosigositas genetik relatif dari populasi ke empat sapi dapat dilakukan dengan menghitung heterosigositas pada ke 16 lokus sekaligus yang kemudian didapatkan pula nilai tengah atau rata-rata heterosigositas ke empat populasi sapi tersebut. Pada Tabel 2 berikut secara ringkas ditampilkan rata-rata tingkat heterosigositas dari ke empat populasi bangsa sapi pada 16 lokus mikrosatelit.

Tabel 2. Rata-rata Heterosigositas (H) Pada 4 Populasi Sapi Berdasarkan 16 Lokus Mikrosatelit

Sapi	H $\pm$ SD
Bali	0,33 ± 0,012
Madura	0,31 ± 0,017
P.O	0,46 ± 0,022
Brangus	0,40 ± 0,001

Sebagai perbandingan, tampak bahwa populasi sapi P.O memiliki tingkat heterosigositas tertinggi (46%), diikuti sapi Brangus (40%), Bali (33%) dan terendah sapi Madura (31%). Hasil yang menunjuk-kan bahwa heterosigositas sapi Madura dan Bali lebih rendah dapat dibuat suatu pendekatan bahwa salah satu efek yang dapat dimunculkan dari heterosigositas adalah dihasilkannya heterosis positif atau *over dominance* dalam suatu bangsa (Baker & Manwell, 1991), walaupun kemungkinan tersebut memerlukan proses seleksi yang ketat dan panjang. Gambaran heterosigositas yang lebih rendah pada sapi Madura dan Bali tersebut dapat sebagai indikasi bahwa sapi Madura dan Bali masih cukup terjaga variasi genetiknya. Hal ini dimungkinkan karena selama ini peternak cukup protektif terhadap perkawinan silang sehingga sumbangan keragaman genetik dari luar cukup rendah.

Sebagaimana studi genetik sejenis sebelumnya pada sapi-sapi potong endemik Indonesia yang dimulai sejak tahun 1974 (Namikawa *et al;* 1980), keragaman genetiknya telah ditunjukkan berdasarkan perbedaan golongan darah dan protein darah (Namikawa *et al;* 1980 dan Martojo *et al;* 1988). Studi menunjukkan bahwa dari golongan darah, sapi Bali memiliki frekuensi alel lebih tinggi untuk alel faktor antigen dibandingkan sapi Madura dan Peranakan Ongole (P.O), dan bahwa berdasarkan protein haemoglobin darah, sapi Bali memiliki alel yang diduga spesifik (Hb^x). Sehingga, penggunaan marker tersebut saat itu dirasakan cukup efektif untuk studi filogenetik atau evaluasi bangsa sapi potong untuk endemik Indonesia. Oleh karena itu, pada studi ini penggunaan DNA mikrosatelit yang dimanfaatkan sebagai penanda dirasakan menjadi penting karena penggunaan marker DNA lebih diskriminatif. Dibandingkan penggunaan marker protein ataupun marker-marker yang lain, penggunaan marker mikrosatelit dapat memberikan tingkat keyakinan *(confidence)* lebih tinggi.

Oleh karena marker mikrosatelit mampu memberikan perbedaan nilai basa hingga satu pasang, maka penggunaan mikrosatelit akan sangat membantu dalam analisis genom yang akurat, terutama untuk studi keterpautan antar individu yang dibedakan hanya satu pasang basa. Sebagaimana hasil studi Cooper & Krawczak (1993) yang menunjukkan adanya korelasi tinggi antara sekuen DNA berulang dengan beberapa penyakit mutasi pada manusia dimana alternatif perubahan konformasi sekuen DNA berulang dapat memberikan efek mutagen.

Hubungan Filogenetik dari Penanda Mikrosatelit

Berdasarkan tingkat heterosigositas pada ke empat populasi bangsa sapi (Tabel 2), maka dapat disusun matrik jarak genetik baku Nei yang kemudian digunakan untuk menyusun pohon filogenetik dengan metode *unweighted pair-group method with arithmatic average (UPGMA)* (Nei, 1987). Program komputer yang digunakan adalah PHYLIP 3.5c yang dikembangkan oleh Felsenstein (1995). Pohon genetik dikonstruksi menggunakan program NEIGHBOR juga dari paket PHYLIP.

Pohon filogenetik merupakan penampilan secara grafis terdiri atas titik-titik sebagai perwakilan unit taksonomi dan cabang-cabang (merupakan jalur penghubung titik-titik tersebut) yang menggambarkan secara ringkas hubungan evolusi maupun topologi diantara organisme atau populasi (Avise, 1994). Sehingga dalam hal ini, gambaran heterosigositas populasi sapi dapat pula merupakan gambaran topologi populasi. Penetapan topologi berdasarkan heterosigositas populasi dari polimorfisme mikrosatelit dilakukan dengan pertimbangan bahwa alel pada lokus-lokus mikrosatelit yang dianalisis bersifat kodominan pada tataran genotipe individunya dan bukan bersifat multialel.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa analisis genom dengan menggunakan penanda mikrosatelit cukup representatif untuk mengetahui adanya heterosigositas yang ditetapkan berdasarkan polimorfisme mikrosatelit, yang kemudian digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik. Untuk itu, heterosigositas masing-masing populasi dihitung jarak genetiknya berdasarkan jarak genetik baku Nei (1987). Pada Tabel 3 berikut ditampilkan jarak genetik antar 4 populasi sapi.

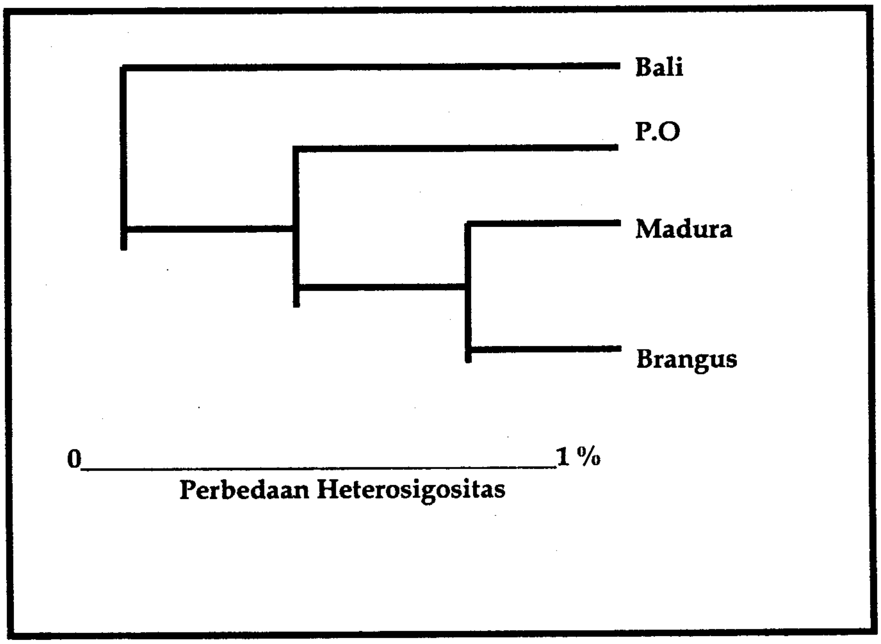
Tabel 3. Jarak Genetik Antar 4 Populasi Sapi (Bali, Madura, P.O dan Brangus)

Sapi	Bali	Madura	P.O	Brangus
Bali	-	0,25	0,21	0,32
Madura	0,02	-	0,38	0,29
P.O	0,13	0,15	-	0,35
Brangus	0,07	0,09	0,06	-

Keterangan : di atas diagonal adalah perbedaan heterosigositas
di bawah diagonal adalah jarak genetik baku

Pada Gambar 1 ditunjukkan pohon filognetik berdasarkan jarak genetik baku Nei (1987) dari tingkat heterosigositas ke 4 populasi sapi. Dari gambar pohon filogenetik tersebut menunjukkan bahwa sapi Madura dan sapi Brangus membentuk klaster, dimana klaster ini merupakan percabangan dari sapi P.O. Hasil ini dapat diasumsikan bahwa berdasarkan 16 lokus mikrosatelit yang dianalisa, maka sapi Madura dan sapi Brangus berdekatan jarak genetiknya dan kedua bangsa ini berada dalam satu klaster genetik dengan sapi P.O dibandingkan sapi Bali. Fenomena demikian memang masih harus dibuktikan lagi lebih jauh, misalnya dari sekuen nukleotidanya.

Hasil klaster tersebut sebenarnya relevan dengan hasil studi Namikawa *et al;* (1981); bahwa proporsi sumbangan gen sapi Madura asal *Bos indicus* (Zebu cattle) adalah 32,8% dan *Bos taurus* sebesar 45,6%, dimana nilai ini lebih besar dibandingkan proporsi gen sapi Bali yang hanya 29,2% berasal dari *Bos indicus* dan 8,4% berasal dari *Bos taurus*. Sedangkan sapi Bali proporsi gen asal justru terbesar dari Banteng *(Bos banteng)*, yaitu 79,1% dibandingkan sapi Madura (21,7%).



Gambar 1. Pohon Filogenetik Berdasarkan Heterosigositas 4 Populasi Sapi (Bali, Madura, P.O dan Brangus) yang Ditetapkan dengan metode *UPGMA* (Nei, 1987).

Sebagaimana diketahui bahwa sapi Brangus merupakan persilangan Brahman *(Bos indicus)* yang berasal dari India dan Angus *(Bos taurus)* dari Inggris, sedangkan sapi Bali dan Madura yang ditetapkan sebagai bangsa sapi asli Indonesia umumnya berasal dari keturunan Banteng. Hasil studi ini dapat memberikan gambaran awal bahwa kemungkinan sapi Madura secara genetik lebih berdekatan dengan *Bos indicus* sedangkan sapi Bali sebagaimana hasil studi awal oleh

Namikawa (1981) telah diketahui lebih dekat secara genetis dengan *Bos banteng*. Memang, implikasi hasil ini belum dapat sepenuhnya diterima, akan tetapi gambaran awal studi ini dapat dimanfaatkan bagi pengembangan metode dalam pemuliaan ternak maupun untuk tujuan konservasi plasma nuftah. Pada Tabel 4 berikut selengkapnya ditampilkan estimasi proporsi sumber gen-gen dari *Bos taurus, Bos indicus* dan *Bos banteng* oleh Namikawa (1981

Tabel 4. Estimasi Proporsi Sumber Gen-gen dari *Bos taurus, Bos indicus* dan *Bos banteng*

Bangsa Sapi	Lokasi	Proporsi sumber gen berasal dari :		
		Bos taurus (benua utara atau sapi Eropa)	*Bos indicus* (sapi Zebu)	*Bibos banteng* (sapi Bali)
Holstein (untuk pembanding)	2	1,000	0,000	0.000
Thai	Thailand Utara	0,123	0,823	0,054
Thai	Thailand Selatan	0,539	0,346	0,115
Kedah-Kelantan	Malaysia Barat	0,604	0,285	0,111
Filipina (asli)	Luzon	0,107	0,723	0,170
Filipina (asli)	Palawan; Mindoro	0,109	0,641	0,250
Sumatra	Padang; Sumatra	0,236	0,569	0,194
Madura	Madura	0,456	0,328	0,217
Jawa	Jawa Timur	0,374	0,395	0,231
Bali	Bali	0,084	0,292	0,791

Sumber : Namikawa (1981)

KESIMPULAN DAN SARAN

Pendekatan penggunaan mikrosatelit dalam analisis variasi genetik pada 4 bangsa sapi, yaitu sapi Bali, Madura, Peranakan Ongole (P.O) dan Brangus yang merupakan ternak sapi yang dipelihara di Indonesia telah mampu dilakukan meskipun polimorfiknya masih rendah (rata-rata alel 2.17). Namun, mikrosatelit ETH 225 memiliki alel tertinggi sebanyak 5 buah pada sapi Madura sehingga masih memberikan indikasi awal bahwa penanda mikrosatelit cukup polimorfik. Sehingga masih diperlukan uji lebih lanjut alel ini pada beberapa generasi untuk kandidat penanda spesifik maupun stabilitasnya.

Konstruksi pohon filogenetik yang diperoleh dari perhitungan nilai baku Nei yang menggambarkan hubungan genetik, maka dari topologi pohon filogenetik sapi Madura membentuk klaster dengan sapi Brangus dan kedua bangsa sapi ini berada dalam klaster sapi Peranakan Ongole (P.O) yang merupakan turunan *Bos indicus* dan berbeda klaster dengan sapi Bali yang merupakan turunan *Bos banteng*. Hasil ini sesuai jika dibandingkan hasil penelitian Namikawa (1981) sebelumnya yang mengindikasikan bahwa proporsi gen terbesar sapi Madura berasal dari *Bos indicus* sedangkan sapi Bali proporsi terbesar dari *Bos banteng*.

Penggunaan genotipe dengan multilokus berdasarkan sejumlah lokus mikrosatelit pada studi ini telah membuktikan bahwa teknik ini cukup relevan untuk digunakan dalam studi kesamaan genetik *(genetic similarity)* , baik dalam populasi maupun antar populasi beberapa populasi ternak sapi yang dipelihara di Indonesia yaitu sapi Bali, Madura, Peranakan Ongole (P.O) dan Brangus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Tim Manajemen Program Doktor (TMPD) Dirjen Dikti, Departemen Pendidikan Nasional melalui Beasiswa Program Pascasarjana dan Dewan Riset Nasional melalui Riset Unggulan Terpadu (RUT) VI/2 atas nama Dr. Muladno, MSA dalam penyediaan dana penelitian. Demikian pula kepada Pemerintah Kota Denpasar - Bali; Pemerintah Kabupaten Bangkalan - Madura; Pemerintah Kabupaten Bogor dan P.T. Rejosari Bumi, Tapos - Bogor; dalam penyediaan sampel darah. Juga kepada Ir. Ahmad Farajallah, MSi., atas bantuan teknik dan sumbangan ide-nya, terutama dalam teknik PAGE dan *silver stain.* Kepada Dr. Bambang Suryobroto, Kepala Laboratorium Zoologi, F-MIPA IPB; Drs. Eddy Jusuf, Kepala Laboratorium Rekayasa Mikroba dan Genetika dan Ir. Endang Tri Margawati, MAgr., Kepala Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Hewan, Puslitbang Bioteknologi LIPI atas bantuan dan dukungan laboratoriumnnya.

DAFTAR PUSTAKA

Allen, R.C., C.A. Saravis & H.R. Maurer. 1984. *Gel electrophoresis and isoelectric focusing of protein. Walter de Gruyter*. New York.

Astolfi, P., G. Pagnacco, & C.R. Guglielmino-Matessi. 1983. *Phylogenetic analysis of native Italian Cattle breed. Z. Tierz. Zuechtungsbiol.* 100 : 87.

Avise, J.C. 1994. Molecular Natural History & Evolution. *Chapman and Hall. Inc.* London. pp. 93-138.

Baker, C.M.A. & C. Manwell. 1991. Population genetics, molecular marker and gene conservation of bovine. In : *Cattle genetic resosurces,* edited by C.G. Hickman. Elsevier Science Publisher B.V. The Netherland. pp.221-289.

Ciampolini, R; K. Moazami-Goudarzi; D. Vaiman; C. Dillman; E. Mazzanti; J.L. Fouley; H. Leveziel & D. Cianci. 1995. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisme to permit the analysis of genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *J. Anim. Sci.* 73 : 3259-3268.

Cooper, D.N. & Krawczak, M. 1993. *Human Gen Mutation.* Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.

Edwards, A., A. Civitello, H.A. Hammond, & C.T. Caskey. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimetric and tetrametric tandem repeat. *Am. J. Hum. Gen.* 49 : 746-756.

Felsenstein, J. 1995. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c.* University of Washington.

Leung, H., Nelson R.J., & Leach, J.E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv. Plant Pathol.* 10 : 157 - 205.

Martojo, H. 1988. Produktivitas Sapi Bali dan Silangannya. *Prosiding Seminar Ekspor Ternak Potong.* Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian. Jakarta.

Moore, S.S., Barendse, W., Berger, K.T., Armitage, S.M. & Hetzeel, D.J.S. 1992. Bovine and ovine DNA microsatellite from the EMBL and GENEBANK databases. *Animal Genetics* 23(5) : 463-467.

Namikawa, T; Y. Matsuda; K. Kondo; B. Pangestu & H. Martojo. 1980. Blood group and blood protein polimorphisms of different types of the cattle in Indonesia. *The Origin and Phylogeny of Indonesia Native Livestock (Report by Grant-in-Aid for Overseas Scientific Surveys),* No. 404315) : 35-45.

Namikawa, T. 1981. Geographic distribution of bovine haemoglobin-beta (Hbb) alleles and the phylogenetic analysis of cattle in Eastern Asia. *Z. Tierz. Zücht.Biol.* 98 : 151-159.

Namikawa, T; T. Amano; B. Pangestu & S. Natasasmita. 1982. Electrophoretic variation of blood protein and enzyme in Indonesia cattle and bantengs. *The Origin and Phylogeny of Indonesia Native Livestock (Report by Grant-in-Aid for Overseas Scientific Surveys,* No. 57043041). pp. 35-42.

Nei, M., F. Tajima, & Y. Tateno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19 : 153-170.

Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics.* Columbia University Press, New York.

Nei, M. & N. Takezaki. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetic* 144 : 389-399.

Payne, W.J.A. & Rollinson, D.H.L. 1973. *Bali cattle. World Anim. Rev.* 7 : 13-21.

Pena, S.D.J.; P.C. Santos; M.C.B.N. Campos & A.M. Macedo. 1993. Paternity test with the F10 multilocus DNA fingerprinting probe. *In : DNA fingerprinting : State of the science,* by Pena, S.D.J.; R. Chakraborty; J.T. Epplen & A.J. Jeffreys (editors). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzrland.

Sambrook, J. E.F. Fritsch & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning : a laboratory manual. 2nd Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Tautz, D. 1993. *Notes on definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences.* In *DNA Fingerprinting : State of the Science* edited by S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys. Birkhauser Verlag, P.O. Box 133, CH4010 Basel, Switzerland. pp. 1-20.

Tegelström, H. 1986. Mitochondrial DNA in natural population : An improved routine for thescreening of genetic variation based on sensitive silver stain. *Electrophoresis* 7 : 226 229.

Travis, C.G., W. Stephan, H.C. Dessauer, and M.J. Braun. 1996. Allelic diversity in Alligatormicrosatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Mol. Biol. Evol.* 13(8) : 1151-1154.

Weber, J.L. 1990. Informativeness of human $(dC\text{-}dA)_n.(dG\text{-}dT)_n$ polymorphisms. *Genomics.* 7 : 524-530.