

# Identifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* pada Gen Mono Amine Oxidase A sebagai Penanda Genetik untuk Sifat Agresif pada Domba

EKO HANDIWIRAWAN<sup>1</sup>, RONNY R. NOOR<sup>2</sup>, C. SUMANTRI<sup>2</sup>, SUBANDRIYO<sup>3</sup> dan I. INOUNU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Jl. Raya Pajajaran Kav. E-59, Bogor 16151

E-mail: eh\_wirawan@yahoo.com

<sup>2</sup>Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agathis Kampus IPB Darmaga

<sup>3</sup>Balai Penelitian Ternak, PO Box 221 Bogor 16002

(Diterima 3 September 2012; disetujui 17 Desember 2012)

## ABSTRACT

HANDIWIRAWAN E., R.R. NOOR, C. SUMANTRI, SUBANDRIYO, and I.INOUNU. 2012. Identification of Single Nucleotide Polymorphism in Mono Amine Oxide A Gene as a Genetic Marker for Aggressiveness in Sheep. *JITV* 17(4): 258-275.

In population, there is aggressive sheep in a small number which requires special management such as specific animal housing and routine management. The purpose of this study was to identify the variation of marker of SNP (single nucleotide polymorphism) DNA as genetic marker for aggressive trait in several sheep breed. Identification of point mutation in exon 8 of MAO-A gene associated with aggressive behavior in sheep may further be used to become DNA marker for aggressive trait in sheep. Five sheep breeds were used, i.e.: Barbados Black belly Cross (BC), Composite Garut (KG), Local Garut (LG), Composite Sumatra (KS) and St. Cross Croix (SC). Length of ten behavior trait performances, blood serotonin concentrations and DNA sequence of exon 8 of MAO-A gene from the aggressive and nonaggressive sheep were observed. PROC GLM of SAS Ver. 9.0 program was used to analyze behavior variable and blood serotonin concentrations. DNA polymorphism in exon 8 of MAO-A gene was analyzed using the MEGA software Ver. 4.0. Results show that the percentage of the aggressive rams of each breed was less than 10 percent; except for the KS sheep was higher (23%). Based on length of behavior, aggressive sheep group was not significantly different to non aggressive sheep group, except duration of care giving and drinking behavior. It was known that concentration of blood serotonin in aggressive and non aggressive rams was not significantly different. The aggressive trait in sheep has a mechanism of a different cause from that occurs in mice and humans. In this study, aggressive behavior in sheep was not associated with a mutation in exon 8 of MAO-A gene.

**Key Words:** Sheep, Aggressive, Exon 8 Of MAO-A Gene, Single Nucleotide Polymorphism

## ABSTRAK

HANDIWIRAWAN, E., R.R. NOOR, C. SUMANTRI, SUBANDRIYO dan I. INOUNU. 2012. Identifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* pada gen Mono Amine Oxidase A sebagai penanda genetik untuk sifat agresif pada domba. *JITV* 17(4): 258-275.

Dalam jumlah kecil terdapat domba berkarakter agresif yang memerlukan penanganan khusus untuk bentuk kandang dan manajemen rutin. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi keragaman penanda DNA SNP (*single nucleotide polymorphism*) sebagai penanda genetik untuk sifat agresif pada berbagai rumpun domba. Identifikasi mutasi titik di ekson 8 gen MAO-A yang berhubungan dengan sifat agresif pada domba ini selanjutnya dapat bermanfaat menjadi penanda DNA untuk melakukan seleksi sifat agresif pada domba. Lima rumpun domba yang terdiri dari domba Barbados Blackbelly Cross (BC), Komposit Garut (KG), Lokal Garut (LG), Komposit Sumatera (KS) dan St. Croix Cross (SC) digunakan dalam penelitian ini. Sepuluh peubah durasi tingkah laku, konsentrasi serotonin darah dan runutan DNA ekson 8 gen MAO-A dari kelompok domba jantan agresif dan tidak agresif diamati. PROC GLM dari Program SAS Ver. 9,0 digunakan untuk analisa ragam peubah tingkah laku dan konsentrasi serotonin darah. Polimorfisme runutan DNA ekson 8 gen MAO-A dianalisa dengan *software* MEGA Ver. 4,0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase domba jantan yang berkarakter agresif pada setiap rumpun tidak lebih dari 10% kecuali pada rumpun domba KS relatif agak tinggi yaitu sekitar 23%. Berdasarkan durasi tingkah laku, domba berkarakter agresif tidak berbeda dengan domba berkarakter tidak agresif kecuali dalam durasi tingkah laku merawat diri (CARE) dan minum (DRINK). Konsentrasi serotonin darah domba berkarakter agresif dan tidak agresif tidak berbeda. Sifat agresif pada domba mempunyai mekanisme atau sebab yang berbeda dengan yang terjadi pada tikus dan manusia. Sifat agresif pada domba tidak berkaitan dengan adanya mutasi pada ekson 8 gen MAO-A.

**Kata Kunci:** Domba, Agresif, Ekson 8 Gen MAO-A, *Single Nucleotide Polymorphism*

## PENDAHULUAN

Dalam suatu populasi domba jantan dewasa terkadang dalam jumlah sedikit terdapat domba yang bertingkah laku agresif, sifat yang berbeda dengan tingkah laku domba jantan dewasa pada umumnya. Tingkah laku agresif dapat ditunjukkan dalam beberapa bentuk tingkah laku. Domba agresif biasanya menunjukkan tingkah laku sering menanduk dinding kandang sehingga dinding kandang menjadi mudah rusak. Domba agresif lebih dominan di dalam kelompok dan sering menyerang domba yang lain di dalam kelompok. Tingkah laku agresif yang lain adalah menyerang petugas kandang ketika membersihkan kandang atau melakukan aktivitas rutin di kandang sehingga dapat menimbulkan cedera bagi petugas.

Domba dengan sifat agresif memerlukan penanganan khusus, diantaranya beberapa penyesuaian tipe kandang atau tambahan tindakan dalam manajemen rutin yang perlu dilakukan oleh petugas kandang. Pada umumnya kandang individu dibuat dalam ukuran yang tidak cukup luas bagi domba jantan yang sering menanduk dinding kandang seperti umumnya diterapkan pada domba Garut tangkas. Domba jantan yang sering menyerang petugas biasanya diikat ketika petugas melakukan aktivitas rutin di kandang.

Penelitian mengenai adanya sifat agresif pada manusia dan tikus telah dilakukan dan dilaporkan oleh BRUNNER *et al.* (1993) dan CASES *et al.* (1995) yang berkaitan dengan mutasi delesi dan mutasi titik di ekson 8 gen MAO-A (Mono Amine Oxidase A). Mutasi pada gen MAO-A menyebabkan tubuh kekurangan produksi enzim Mono Amine Oxidase A yang sangat penting dalam mendegradasi *serotonin*, *norepinephrine* (*noradrenaline*), *epinephrine* (*adrenaline*) dan *dopamine* serta beberapa amina eksogenous (ANDRÉS *et al.*, 2004). Beberapa senyawa *neurotransmitter* tersebut harus didegradasi oleh enzim MAO-A karena konsentrasinya yang meningkat abnormal akan menyebabkan individu bereaksi secara berlebihan dan kadangkala melakukan kekerasan (MORELL, 1993). MAO-A adalah enzim mitokondria yang dikode oleh gen inti yang berlokasi pada lengan panjang dari kromosom X (Xp 11.4-p11.3) (LEVY *et al.*, 1989; GRIMSBY *et al.*, 1991).

Pada domba, sifat agresif dan gen yang mengontrolnya belum pernah dilaporkan. Berdasarkan laporan penelitian sifat agresif oleh peneliti terdahulu pada manusia dan tikus yang disebabkan mutasi pada gen MAO-A, sifat agresif yang terdapat pada domba dicoba untuk diteliti. Apabila mutasi yang terjadi pada domba serupa dengan yang terjadi pada manusia atau

tikus maka hasil penelitian ini dapat dipergunakan sebagai penanda untuk sifat agresif pada domba. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi keragaman penanda DNA SNP (*single nucleotide polymorphism*) sebagai penanda genetik untuk sifat agresif pada berbagai rumpun domba. Identifikasi mutasi titik di ekson 8 gen MAO-A yang berhubungan dengan sifat agresif pada domba ini selanjutnya dapat bermanfaat menjadi penanda DNA untuk melakukan seleksi sifat agresif pada domba.

## MATERI DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat atau laboratorium, yaitu:

1. Penelitian tingkah laku rumpun domba Barbados Blackbelly Cross (BC), Komposit Garut (KG), Lokal Garut (LG), Komposit Sumatera (KS) dan St. Croix Cross (SC), dilakukan di Kandang Percobaan Domba Balai Penelitian Ternak (Kandang Percobaan Jl. Raya Pajajaran, Bogor dan Kandang Percobaan Cilebut) dan untuk menambah sampel domba Garut dilakukan pengamatan domba Garut di Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Balai Pengembangan Perbibitan Ternak Domba (BPPTD) Margawati, Garut, Jawa Barat.
2. Analisa kandungan serotonin darah dilakukan di Laboratorium Endokrinologi, Departemen Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.
3. Isolasi DNA dan amplifikasi runutan DNA target sampel dilakukan di Laboratorium Pemuliaan Ternak, Balai Penelitian Ternak, Jl. Raya Pajajaran, Bogor. Produk PCR (ekson 8 gen MAO-A domba) disekuen oleh sebuah perusahaan swasta yang mempunyai jasa pelayanan sekuensing DNA di Singapura.

Pelaksanaan penelitian tingkah laku, kandungan serotonin darah dan analisa DNA dilakukan selama 8 bulan sejak bulan Maret hingga Oktober 2011.

### Materi penelitian

Jumlah dan jenis materi penelitian yang digunakan berbeda-beda sesuai dengan jenis data yang ingin dikumpulkan. Jumlah dan jenis materi penelitian setiap rumpun domba dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Jenis dan jumlah sampel yang digunakan untuk setiap rumpun domba

Jenis pengamatan	Jenis sampel	Kelompok domba	Rumpun domba					Jumlah
			BC	KG	LG	KS	SC	
Tingkah laku	Domba jantan	Agresif	0	0	3	6	1	12
	dewasa (>2 tahun)	Tidak agresif	5	5	5	5	5	23
		Jumlah	5	5	8	11	6	35
Kandungan serotonin	Serum darah	Agresif	1	0	11	5	1	18
		Tidak agresif	5	6	0	6	5	22
		Jumlah	6	6	11	11	6	40
Analisa DNA	Darah	Agresif	1	0	10	4	1	16
		Tidak agresif	5(4)	5(4)	0	4(3)	5(3)	19(14)
		Jumlah	6(5)	5(4)	10	8(7)	6(4)	35(30)

BC = Barbados Black Belly Cross (50% Lokal Sumatera 50% Barbados Blackbelly), KG = Komposit Garut (50% Lokal Garut 25% St. Croix 25% Moulton Charolais), LG = Lokal Garut, KS = Komposit Sumatera (50% Lokal Sumatera 25% St. Croix 25% Barbados Black Belly), SC = St. Croix Cross (50% Lokal Sumatera 50% St. Croix)  
 Angka dalam kurung adalah jumlah sampel yang runutan DNA-nya layak dianalisa lebih lanjut, sampel sisanya tidak bisa dianalisa karena runutan ekson 8 gen MAO-A tidak berhasil diperoleh secara lengkap

**Metode penelitian**

**Pengumpulan data awal karakter domba jantan dewasa**

Terlebih dahulu dikumpulkan data awal karakter seluruh domba jantan dewasa berumur >2 tahun yang ada di Kandang Percobaan Domba Balai Penelitian Ternak sebagai dasar penetapan kategori karakter domba. Penentuan kategori domba agresif atau tidak agresif dilakukan dengan pengamatan langsung berdasarkan minimal satu dari dua indikator yang telah ditetapkan sebagai berikut:

1. Memiliki riwayat menyerang/menyeruduk petugas kandang yang diperoleh dari wawancara dengan petugas kandang.
2. Merangsang domba dengan memukulkan tangan ke kepala domba dan melihat respon yang diberikan domba. Domba agresif akan memberikan respon melawan atau menanduk/menyeruduk untuk melawan.

Berdasarkan data awal yang diperoleh dari penentuan kategori karakter domba jantan dewasa (berumur >2 tahun) kemudian ditentukan sampel yang mewakili kategori domba agresif dan tidak agresif setiap rumpun. Sampel yang telah ditetapkan kemudian diamati tingkah laku, kandungan serotonin darah dan runutan DNA ekson 8 gen MAO-A.

**Prosedur penelitian tingkah laku**

Dua kandang kelompok yang bersebelahan dengan ukuran sama yaitu 11 m<sup>2</sup> diisi masing-masing 5 ekor domba jantan dari rumpun yang sama. Khusus untuk domba LG yang sampelnya diambil di Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Balai Pengembangan Perbibitan Ternak Domba (BPPTD) Margawati, Garut, Jawa Barat setiap kandang hanya diisi oleh satu ekor. Pencampuran beberapa ekor domba jantan dalam satu kandang kelompok di UPTD BPPTD Margawati, Garut tidak memungkinkan karena dikhawatirkan terjadi perkelahian antar domba jantan yang dapat mengakibatkan luka.

Sampel dan perekaman tingkah laku domba jantan dewasa agresif Lokal Garut diambil di UPTD BPPTD Margawati, Garut karena di Kandang Percobaan Domba Balai Penelitian Ternak tidak diperoleh sampel domba jantan yang berkarakter agresif dengan jumlah yang cukup (hanya diperoleh 1 ekor).

Pengamatan tingkah laku domba dilakukan dengan menggunakan seperangkat peralatan CCTV (*Close Circuit Televisi*). Segala aktivitas tingkah laku domba selama 24 jam terekam oleh 2 kamera yang dipasang di masing-masing kandang kelompok. Keempat kamera yang merekam dua kandang kelompok tersebut terhubung dengan kabel ke peralatan 4CH STANDALONE DVR (*Digital Video Recorder*)

sebagai alat perekam dan televisi sebagai alat monitor yang diletakkan di ruangan khusus pengamatan.

Sifat tingkah laku domba yang diamati seperti yang dikemukakan oleh HAFEZ *et al.* (1969) dan EWING *et al.* (1999), dengan sedikit modifikasi meliputi 10 tingkah laku yaitu:

1. Makan (*ingestif*): lama tingkah laku domba yang memakan konsentrat, rumput atau mineral blok (menit).
2. Bermain (*playing*): lama tingkah laku domba yang berlari dan meloncat senang, biasanya diikuti domba yang lain dalam kelompok tersebut (menit).
3. Berkelahi/agresif (*agonistic*): lama tingkah laku domba yang aktif menyerang (menanduk domba lain) atau melawan dengan menanduk juga (bertubrukan kepala dengan kepala) serta tingkah laku yang menggesekkan atau menandukkan tanduk ke dinding atau tiang kandang (menit).
4. Membuang kotoran (*eliminatif*): lama tingkah laku domba membuang feses (defekasi) atau urine (urinasi) (menit).
5. Merawat diri (*care giving*): lama tingkah laku domba merawat diri bagian tubuh yang gatal diantaranya dengan cara menggigit bagian tubuh sendiri seperti bagian kaki depan atau belakang, badan bagian samping, paha dan sebagainya, atau menggarukan kaki belakang ke bagian tubuh seperti leher, kepala, kaki depan, dan sebagainya, atau menggesek-gesekkan pantat, badan bagian samping dan pundak ke dinding kandang (menit).
6. Melangkah/berjalan (*locomotion*): lama tingkah laku domba melangkah atau berjalan (menit).
7. Berdiri (*standing*): lama tingkah laku domba berdiri (tidak melangkah), biasanya diiringi dengan aktivitas regurgitasi, remastikasi dan redeglutasi atau melihat/mengamati sesuatu (menit).
8. Istirahat tidur (*sleeping*): lama tingkah laku domba berbaring dengan posisi kepala rebah atau bersandar dan mata tertutup (menit).
9. Istirahat berbaring (*resting*): lama tingkah laku domba berbaring dengan posisi kepala tegak dan mata terbuka, biasanya diringi dengan aktivitas regurgitasi, remastikasi dan redeglutasi (menit).
10. Minum (*drinking*): lama tingkah laku domba meminum air di tempat/bak air minum (menit).

*File* data rekaman dianalisa dengan *software* VVF *Player* dan kemudian hasil rekaman diterjemahkan dalam bentuk data kuantitatif berupa durasi (menit) suatu sifat tingkah laku dilakukan. Analisa video rekaman memerlukan waktu yang lama sehingga data rekaman tingkah laku hanya dapat diamati selama durasi 5 jam, yang dipilih pada waktu-waktu yang dianggap dapat mewakili aktivitas domba dari data rekaman 24 jam. Periode waktu yang diamati adalah pada pukul 07.00-08.00, 10.00-11.00, 13.00-14.00, 19.00-20.00 dan 01.00-02.00 WIB.

### Prosedur analisa kandungan serotonin darah

Sampel darah diambil melalui *vena jugularis* di leher domba dengan menggunakan tabung *venojack* 6 ml tanpa EDTA. Selama sekitar 1-2 jam sampel darah dibiarkan dalam suhu ruang sampai serum darah terpisah. Jika diperlukan, untuk memisahkan serum dan padatan yang lain maka dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Serum yang terkumpul di bagian atas tabung diambil menggunakan pipet dan dipindahkan ke dalam *cryo tube* 4 ml dan kemudian disimpan di dalam *freezer* (-20°C) sebelum dianalisa lebih lanjut.

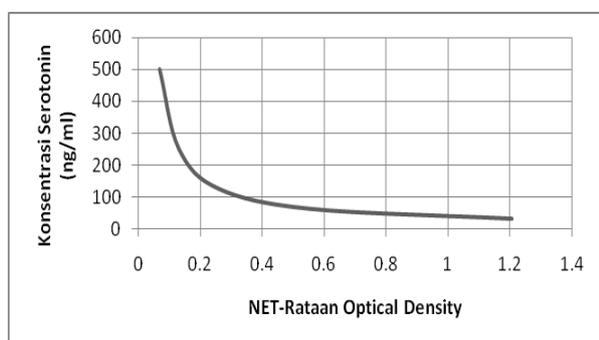
Analisa konsentrasi serotonin darah domba dilakukan dengan teknik *Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay* (CIEI) menggunakan *Sheep Serotonin ELISA Kit*, sebuah produk Kit buatan sebuah perusahaan komersial di China. Prosedur analisa dilakukan dengan urutan sebagai berikut:

Semua reagen dan sampel serum yang disimpan pada suhu 2-8°C, dibawa ke suhu kamar setidaknya selama 30 menit sebelum digunakan. Sebanyak 50 µl Larutan Standar (S1-S5) atau sampel serum dimasukkan ke dalam setiap sumur *plate*. Uji dilakukan dalam rangkap dua (*duplo*) sesuai standar petunjuk Kit. Sebanyak 50 µl *Conjugate* ditambahkan ke dalam setiap sumur (tetapi tidak ke sumur kosong), dicampur/diaduk rata dan kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setiap sumur diisi dengan *Wash Buffer* (sekitar 200 µl), didiamkan selama 10 detik dan kemudian *dispin*, selanjutnya cairan dibuang. Proses pencucian diulang tiga kali pencucian. Setelah pencucian terakhir (yang ketiga), *Wash Buffer* yang tersisa dibuang dengan cara aspirasi atau dituang. Di atas *plate* ditutup dengan kertas tissue bersih dan kemudian *plate* dibalik.

Sebanyak 50 µl HRP (*Horseradish Peroxidase*) Avidin ditambahkan ke dalam setiap sumur, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya larutan dibuang (dituang) dan pencucian sebagaimana pada langkah ke-5 diulang sebanyak lima kali. Sebanyak 50 µl Substrat A dan B ditambahkan ke dalam setiap sumur kemudian dicampur/diaduk rata, selanjutnya diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. *Plate* dijaga dari angin dan fluktuasi suhu dalam suasana gelap. Sebanyak 50 µl *Stop Solution* ditambahkan ke dalam setiap sumur ketika empat sumur pertama yang berisi konsentrasi Larutan Standar tertinggi berubah menjadi berwarna biru jelas. Jika perubahan warna tidak muncul seragam, tekan dengan lembut *plate* untuk memastikan pencampuran menyeluruh. *Optical density* dari setiap sumur ditentukan dalam waktu 10 menit dengan menggunakan pembaca *mikroplate* yang diatur pada panjang gelombang 450nm.

### Perhitungan hasil konsentrasi serotonin darah

Nilai NET-rataan *optical density* diperoleh dari nilai rata-rata pembacaan duplikat *optical density* untuk setiap standar, blanko, dan sampel dikurangi dengan nilai *optical density* blanko/*Non Specific Binding* (NSB). Kurva larutan standar dibuat berdasarkan nilai NET-rataan *optical density* pada sumbu X dan konsentrasi serotonin (ng/ml) pada sumbu Y (Gambar 1).



**Gambar 1.** Kurva larutan standar hubungan antara nilai NET-rataan *optical density* dengan konsentrasi serotonin (ng/ml) berdasarkan persamaan matematis non linier terbaik

Persamaan matematis untuk membuat kurva larutan standar dihitung dengan bantuan *software online* di *Xuru's Website* (<http://www.xuru.org/>). Persamaan matematis non linier terbaik yang diperoleh dari perhitungan *software online* tersebut, yang ditunjukkan dengan nilai kesalahan terkecil dari nilai *plot* pada kurva adalah:

$$Y = (-34,23931176 X) + 33,79832094 + (38,45672092/X) + (36,12746554 \ln(X)).$$

Persamaan matematis tersebut kemudian digunakan untuk menghitung nilai Y (konsentrasi serotonin sampel) berdasarkan nilai X (NET-rataan *optical density* sampel).

### Prosedur isolasi, ekstraksi dan purifikasi DNA

Isolasi, ekstraksi dan purifikasi sampel DNA dilakukan dengan menggunakan reagen *Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)*, Kit produk buatan sebuah perusahaan komersial di Taiwan. Proses isolasi, ekstraksi dan purifikasi DNA dari sampel darah domba dilakukan dalam 5 langkah sesuai protokol *Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)*, dengan urutan sebagai berikut:

### Langkah 1: Lysis sel darah merah

Sampel darah diambil melalui vena jugularis di leher domba dengan menggunakan tabung *venojack* 6 ml yang mengandung EDTA. Sebanyak 300 µl darah segar yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung mikro sentrifuse 1,5 ml. Ke dalam tabung tersebut kemudian ditambahkan 3 x volume sampel *RBC Lysis Buffer* dan dicampur dengan cara dibolakbalik (tidak divorteks). Setelah tabung diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian tabung disentrifuse selama 5 menit pada kecepatan 3.000 x G dan kemudian supernatan dibuang. Selanjutnya sebanyak 100 µl *RBC Lysis Buffer* ditambahkan untuk *resuspend* (melarutkan kembali) pelet sel.

### Langkah 2: Lysis sel

Sebanyak 200 µl *GB Buffer* ditambahkan ke dalam tabung mikro sentrifuse 1,5 ml dan dicampur dengan cara *shaking*. Selanjutnya tabung diinkubasi pada suhu 65-70°C selama 10 menit atau sampai lisat sampel terlihat jelas dan selama inkubasi, tabung dibalik setiap 3 menit. Pada saat ini, *Elution Buffer* yang diperlukan (200 µl per sampel) dipanaskan dalam *water bath* 70°C (untuk dipergunakan pada Langkah 5 Elusi DNA). Untuk mendegradasi RNA maka diambahkan 5 µl RNase A (10 mg/ml) ke lisat sampel dan dicampur dengan cara divorteks, kemudian tabung diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit.

### Langkah 3: DNA Binding

Sebanyak 200 µl Etanol Absolut ditambahkan ke lisat sampel dan dicampur segera dengan cara *shaking* selama sekitar 10 detik, jika endapan muncul maka dirusak/dihancurkan dengan pipet. Selanjutnya *GD Column* ditempatkan dalam *Collection Tube* 2 ml. Semua campuran (termasuk endapan) dipindahkan ke *GD Column*, selanjutnya disentrifuse pada kecepatan 14.000-16.000 x G selama 5 menit. *Collection Tube* 2 ml yang berisi *flow-through* dibuang dan kemudian *GD Column* ditempatkan di *Collection Tube* 2 ml yang baru.

### Langkah 4: Pencucian (Wash)

Sebanyak 400 µl *WI Buffer* ditambahkan ke *GD Column*, kemudian disentrifuse pada kecepatan 14.000-16.000 xG selama 30 detik. *Flow-through* dibuang dan selanjutnya *GD Column* ditempatkan kembali ke dalam

*Collection Tube* 2 ml. Sebanyak 600 µl *Wash Buffer* (yang telah ditambahkan Etanol) kemudian ditambahkan ke dalam *GD Column*, selanjutnya disentrifuse pada kecepatan 14.000-16.000 x G selama 30 detik. *Flow-through* dibuang dan *GD Column* selanjutnya ditempatkan kembali ke dalam *Collection Tube* 2 ml dan kemudian disentrifuse lagi selama 3 menit pada kecepatan 14.000-16.000 x G untuk mengeringkan matriks kolom.

#### Langkah 5: Elusi DNA

*GD Column* kering dipindahkan ke 1,5 ml tabung mikro sentrifuse bersih, kemudian sebanyak 100 µl *Elution Buffer* yang telah dipanaskan atau TE ditambahkan ke tengah matriks kolom. Tabung didiamkan selama 3-5 menit atau sampai *Elution Buffer* atau TE diabsorpsi (diserap) oleh matriks dan kemudian disentrifuse pada kecepatan 14.000-16.000 xG selama 30 detik untuk elusi DNA yang dipurifikasi.

#### Prosedur mendesain primer

Desain primer dilakukan berdasarkan runutan mRNA gen MAO-A *Bos taurus* (no akses NCBI NM\_181014) oleh karena runutan gen MAO-A untuk domba (*Ovis aries*) belum tersedia di database *gene bank National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Sebelumnya letak ekson 8 ditentukan dengan melakukan pensejajaran (*alignment*) dengan runutan acuan ekson 8 dari runutan gen MAO-A *Bos taurus* dengan no akses EF672353 NCBI karena runutan gen MAO-A *Bos taurus* lengkap (no akses NCBI NM\_181014) tidak memberikan informasi letak daerah ekson 8. Pensejajaran dilakukan dengan bantuan *software* MEGA Ver. 4,0 (TAMURA *et al.* 2007).

Primer untuk ekson 8 gen MAO-A *Bos taurus* didesain dengan bantuan *software* Primer3Plus secara

*online* di situs <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. Runutan primer terbaik yang diperoleh dari hasil tersebut dipergunakan untuk mengamplifikasi ekson 8 gen MAO-A domba. Runutan primer yang telah dipilih diperiksa kembali untuk melihat peluang kesalahan penempelannya dengan semua database runutan DNA yang terdapat pada NCBI dengan menu BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Proses desain primer berdasarkan ekson 8 gen MAO-A *Bos taurus* menghasilkan primer *forward* yang terletak pada ekson 7 dan primer *reverse* yang terletak pada ekson 9, masing-masing primer berukuran 20 basa. Runutan primer yang dipergunakan dari hasil desain dengan menggunakan *software online* Primer3Plus adalah:

Primer *Forward* GTAGAGACCCTGAATCGTGA,  
(MAO-A81\_F) =

Primer *Reverse* AATTGGAGCTTCCTCATCTT.  
(MAO-A81\_R) =

#### Prosedur amplifikasi runutan DNA target

Reaksi PCR dibuat sebanyak 50 µl per reaksi yang terdiri dari 25 µl KAPA Taq *Ready Mix DNA Polymerase* (mengandung 0,05 U/µl KapaTaq DNA Polymerase, *Buffer* Reaksi dengan Mg<sup>2+</sup>, 0,4mM dNTP), 2 µl Primer *Forward* (10 µM), 2 µl Primer *Reverse* (10 µM), sebanyak kurang lebih 50 ng *Template* DNA dan *Deionized Water* ditambahkan sampai volume reaksi menjadi 50 µl. *Mikrotube* PCR yang berisi campuran seperti tersebut di atas kemudian ditempatkan pada mesin PCR. Kondisi optimal siklus mesin PCR yang telah diperoleh dari ujicoba sebelumnya diprogram dengan keadaan seperti tercantum pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Banyaknya siklus, suhu dan lama proses amplifikasi yang diprogramkan pada PCR

Siklus	Tahapan	Suhu (°C)	Lama (menit)	Ulangan
1	Denaturasi awal	94	5	1
2	Denaturasi	94	1	35
	<i>Annealing</i>	53	1	
	Ekstensi	72	1	
3	Ekstensi akhir	72	4	1
4	<i>Soak</i>	4	-	-

## Prosedur elektroforesis

Penentuan produk hasil PCR dan deteksi alel yang dihasilkan dilakukan dengan cara separasi (elektroforesis) DNA pada gel *agarose* 2% dengan pewarnaan *ethidium bromide*. Produk PCR sampel dengan *band* yang jelas yang menunjukkan bahwa runutan target DNA teramplifikasi selanjutnya dikirim dan disekuen di sebuah perusahaan komersial di Singapura.

## Analisa data

Durasi setiap sifat tingkah laku selama 5 jam pengamatan dan kandungan serotonin darah diuji signifikansinya menurut kategori karakter domba (agresif dan tidak agresif), rumpun domba dan interaksi antara kategori karakter dan rumpun domba. PROC GLM dari *software* SAS Ver. 9,0 digunakan untuk menganalisa data tingkah laku dan kandungan hormon (SAS, 2002). Model persamaan linier yang dipergunakan adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + K_i + B_j + (KB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan:

- $Y_{ijk}$  = Durasi setiap sifat tingkah laku atau kandungan hormon karena pengaruh karakter ke-*i* rumpun ke-*j* interaksi antara karakter dan rumpun ke-*ij* dan ulangan ke-*k*
- $\mu$  = Rataan umum
- $K_i$  = Pengaruh karakter domba (agresif dan tidak agresif) ke-*i*, (*i*=1, 2)
- $B_j$  = Pengaruh rumpun ke-*j*, (*j* = 1, 2, 3, 4, 5)
- $(KB)_{ij}$  = Pengaruh interaksi karakter dan rumpun domba ke-*ij*
- $\varepsilon_{ijk}$  = Pengaruh acak karena pengaruh karakter ke-*i* rumpun ke-*j* interaksi antara karakter dan rumpun ke-*ij* dan ulangan ke-*k*

Sehubungan dengan ketidakmampuan dalam memberikan kondisi penelitian yang sama antara domba Lokal Garut dari UPTD BPPTD Margawati, Garut dengan domba yang berasal dari Kandang Percobaan Balai Penelitian Ternak maka data tingkah laku dan konsentrasi hormon untuk rumpun domba Lokal Garut yang berasal dari UPTD BPPTD Margawati, Garut, tidak dimasukkan dalam analisa ragam bersamaan dengan rumpun domba yang berasal dari Kandang Percobaan Balai Penelitian Ternak. Data tingkah laku dan konsentrasi hormon untuk domba Garut yang

sampelnya berasal dari UPTD BPPTD Margawati, Garut hanya ditampilkan informasi dalam bentuk rataan dan standar deviasi dari setiap variabel yang diukur secara terpisah.

Analisa runutan DNA gen MAO-A dilakukan dengan *software* MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) Ver. 4,0 (TAMURA *et al.* 2007) yang diperoleh dari situs <http://www.megasoftware.net/index.php>. Letak ekson 8 gen MAO-A domba didapatkan dengan cara pensejajaran (*alignment*) antara runutan DNA sampel domba dengan runutan DNA ekson 8 gen MAO-A *Bos taurus* (no akses EF672353 NCBI). *Software* MEGA Ver. 4,0 juga digunakan untuk mendeteksi adanya SNP pada runutan ekson 8 gen MAO-A sampel. Translasi dari kodon ke asam amino dilakukan untuk menganalisa dan mengetahui terjadinya perubahan asam amino akibat terjadinya mutasi pada ekson 8 gen MAO-A.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Tingkah laku

Tabel 3 menampilkan jumlah domba jantan di Kandang Percobaan Balai Penelitian Ternak dari berbagai rumpun domba yang berkarakter agresif dan tidak agresif. Persentase domba jantan agresif dari keseluruhan domba jantan dewasa yang diteliti adalah kecil (< 10%) (Tabel 3). Pada semua rumpun hanya ditemukan jantan agresif dengan persentase relatif kecil (dibawah 10%) kecuali pada rumpun domba Komposit Sumatera (KS) didapati persentase domba jantan agresif lebih tinggi yaitu sekitar 23%. Sementara itu, untuk domba jantan Komposit Garut berkarakter agresif tidak ditemukan di antara domba jantan dewasa Komposit Garut yang dipelihara di Kandang Percobaan Balai Penelitian Ternak Bogor. Hanya ditemukan masing-masing satu ekor untuk ketiga rumpun domba yang lain (BC, LG dan SC).

Domba jantan agresif Lokal Garut yang direkam tingkah lakunya adalah domba Garut jantan yang berada di Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Balai Pengembangan Perbibitan Ternak Domba (BPPTD) Margawati, Garut, Jawa Barat. Jumlah domba jantan agresif ditemukan dalam jumlah sedikit kemungkinan karena umumnya domba agresif sering *diculling* dari populasi untuk mengurangi bahaya kecelakaan atau luka bagi petugas kandang akibat serangan/serudukan. Disamping itu, dari sisi manajemen, domba agresif memerlukan penanganan yang lebih intensif dibandingkan dengan domba normal. Sifat agresif telah ditemukan dan dilaporkan terjadi di banyak spesies, MAXZON dan CANASTAR (2006) dalam *review*nya mengemukakan bahwa sifat agresif juga ditemukan pada spesies lalat buah, lebah madu, ikan *sticklebacks*,

**Tabel 3.** Jumlah domba jantan berkarakter agresif dan tidak agresif pada berbagai rumpun domba yang dipelihara di kandang percobaan domba Balai Penelitian Ternak

Kelompok	Rumpun domba					Jumlah
	BC	LG	KG	KS	SC	
Agresif	1 (8,3)	1 (4,6)	0 (0)	6 (23,1)	1 (4,3)	9 (9,6)
Tidak agresif	11 (91,7)	21 (95,4)	11 (100)	20 (76,9)	22 (95,7)	85 (90,4)

BC = Barbados Balck Belly Cross, LG = Lokal Garut, KG = Komposit Garut, KS = Komposit Sumatera, SC = St. Croix Cross  
Angka dalam kurung menunjukkan persentase

*zebra fish*, unggas, tikus, kuda, sapi, babi, domba, anjing, kucing dan primata.

Durasi delapan dari sepuluh tingkah laku domba jantan berkarakter agresif dan tidak agresif yang diamati tidak berbeda nyata (Tabel 4), sedangkan tingkah laku merawat diri (CARE) dan minum (DRINK) durasinya berbeda nyata. Durasi tingkah laku agresif yang menjadi titik perhatian pada penelitian ini juga tidak berbeda antara kelompok domba berkarakter agresif maupun tidak agresif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sifat tingkah laku agresif pada domba berkarakter agresif tidak nampak/muncul dalam tingkah laku sosial kelompok. Pengelompokan domba jantan dalam penelitian ini semestinya berpeluang akan menimbulkan sifat agresif seperti dilaporkan oleh FERNANDEZ *et al.* (2007) yang melaporkan adanya peningkatan keagresifan dan penurunan produksi susu pada kambing laktasi setelah dikelompokkan kembali pada kandang yang lain (*regrouping*). Ada kemungkinan domba-domba jantan yang digunakan dalam penelitian sudah saling mengenal karena sudah pernah bertemu atau pernah dikelompokkan dalam satu kandang kelompok sehingga sistem sosial yang terbentuk sudah stabil. Hal tersebut sesuai dengan pendapat MCGLONE (1986) bahwa tingkah laku *agonistic* yaitu tingkah laku dari mulai mengancam hingga menyerang sampai penaklukan umumnya diperlihatkan ketika domba-domba yang tidak saling kenal dicampur dalam satu kandang sampai periode stabilitas sosial tercapai. Pada sistem sosial yang stabil, ancaman dari seekor domba akan mengakibatkan dengan segera tanda menghindar atau takluk dari domba yang diancam. Pada kelompok yang baru terbentuk atau kelompok sosial yang tidak stabil sebuah ancaman dapat menyebabkan penerima ancaman untuk mengancam kembali atau bisa menjadi awal tingkah laku agresif (menyerang) (MCGLONE, 1986).

Sifat tingkah laku agresif pada domba yang berkarakter agresif dapat muncul sebagai respon dari stimulasi lingkungan. Tingkah laku domba menyerang atau menyeruduk petugas kandang pada domba agresif muncul kemungkinan sebagai tingkah laku mempertahankan wilayah (*defense of territory*) akibat

adanya petugas kandang yang dianggap sebagai pengacau/pengganggu. Tingkah laku mempertahankan wilayah merupakan salahsatu tingkah laku agresif, disamping *maternal defense* dan *predation*, dimana MCGLONE (1986) mengelompokkan sifat tingkah laku tersebut dalam kategori *interspecific aggression*.

Adanya pengaruh rumpun domba terhadap seluruh tingkah laku terlihat dari hasil uji statistik. Uji statistik interaksi antara variabel karakter dan rumpun domba menunjukkan bahwa untuk semua sifat tingkah laku nyata berbeda, kecuali tingkah laku bermain (PLAY) dan minum (DRINK) (Tabel 4). Khusus A x BC, AxSC (hanya diperoleh 1 ekor sampel) dan A x KG (tidak diperoleh sampel) karena jumlah sampel yang diperoleh tidak cukup atau tidak tersedia maka tidak tercantum di dalam Tabel 4.

Durasi tingkah laku menyerang atau agresif (AGON) berkisar antara 0,44-2,90 menit, dan durasi tingkah laku agresif lebih lama ditunjukkan oleh rumpun domba tidak agresif KG dan domba agresif KS dibandingkan domba yang lain yaitu berturut-turut 2,90 dan 2,88 menit (Tabel 4). Khusus rumpun domba KS yang mempunyai sampel agresif dan tidak agresif terlihat bahwa durasi tingkah laku agresif berbeda nyata antar dua kelompok tersebut. Durasi tingkah laku agresif yang lebih lama ditunjukkan oleh rumpun domba jantan KG yang berkarakter agresif dibandingkan rumpun domba yang lain diduga karena kepadatan kandang yang menjadi lebih sempit akibat bobot badan rumpun domba KG lebih besar atau akibat pengelompokkan individu (*regrouping*) yang tidak saling kenal dalam pengamatan sehingga terjadi ketidakstabilan kelompok sosial untuk penentuan dominasi di dalam kelompok pengamatan.

Domba agresif LG tidak menampakkan keagresifannya kemungkinan karena dalam penelitian ini dikandangan secara individu (satu ekor setiap kandang). Pencampuran secara berkelompok beberapa ekor domba jantan dalam satu kandang tidak memungkinkan dilakukan dalam penelitian ini karena setelah berkonsultasi dengan petugas kandang dan pegawai di UPTD BPPTD Margawati, Garut,

perkelahian hebat dapat terjadi yang dapat mengakibatkan luka pada domba sampel.

Domba SC memiliki durasi makan (INGEST) yang paling singkat dibandingkan dengan rumpun domba yang lain, dan hal itu nampaknya juga berkaitan dengan menurunnya aktifitas tingkah laku lain yang memerlukan energi lebih tinggi misalnya berjalan (LOCO) dan berdiri (STAND), diiringi dengan bertambahnya durasi tingkah laku istirahat (REST dan SLEEP). Namun demikian, rumpun domba dengan durasi tingkah laku makan (INGEST) paling lama (domba KS tidak agresif) tidak serta merta mempunyai aktivitas yang juga lebih tinggi dalam tingkah laku berjalan (LOCO) dan berdiri (STAND) atau agresif (AGON). Durasi tingkah laku istirahat (REST dan SLEEP) domba KS tidak agresif tersebut bahkan tidak berbeda dengan domba KS tidak agresif.

Domba tidak agresif bervariasi dalam menampilkan sifat tingkah laku tergantung rumpun domba. Domba tidak agresif KG lebih aktif (sama dengan domba tidak agresif BC), dimana durasi LOCO dan STAND paling lama dibandingkan domba yang lain sementara aktivitas istirahat (SLEEP dan REST) paling singkat. Kebalikan dengan tingkah laku domba tidak agresif KG (tidak berbeda secara statistik dengan domba tidak agresif KS dan LG), domba tidak agresif SC terlihat paling tidak aktif (durasi aktivitas LOCO dan STAND paling singkat) sementara itu durasi aktivitas istirahat (SLEEP dan REST) paling lama.

Sifat tingkah laku eliminatif (ELIM), merawat diri (CARE) dan minum (DRINK) adalah sifat tingkah laku dengan durasi relatif lebih singkat. Durasi ELIM nampaknya tidak konsisten berhubungan dengan durasi INGEST. Beberapa faktor yang kemungkinan berpengaruh adalah faktor cara makan yang menentukan banyaknya jumlah makanan yang diperoleh dan ditelan, serta faktor rumpun yang menentukan proses fisiologi pencernaan pakan. Domba tidak agresif SC paling lama melakukan aktivitas CARE, tidak berbeda dengan domba tidak agresif BC dan LG. Durasi DRINK untuk seluruh rumpun domba tidak berbeda. Khusus untuk domba agresif LG dalam manajemennya tidak disediakan air minum sehingga dalam penelitian ini tidak diperoleh data durasi tingkah laku minum.

### Kandungan serotonin darah

Hasil penelitian menunjukkan bahwa keragaman konsentrasi serotonin darah domba jantan antar rumpun domba tidak berbeda nyata (Tabel 5). Meskipun tidak berbeda, terdapat variasi konsentrasi serotonin antar rumpun yang disebabkan adanya variasi komposisi genetik dari setiap rumpun domba. Besarnya konsentrasi serotonin darah domba yang diperoleh bervariasi antara 70,34 hingga 73,05 ng/ml. Rumpun

domba Komposit Sumatera mempunyai rataan konsentrasi serotonin darah paling rendah sedangkan yang tertinggi adalah pada rumpun domba Komposit Garut. Domba LG mempunyai kandungan serotonin darah agak lebih tinggi yaitu sebesar 78,90 ng/ml. Masih belum diketahui dari penelitian ini, tingginya kandungan serotonin darah itu karena pengaruh rumpun (genetik) atau lebih dikarenakan pengaruh sistem perkandangan individu.

Konsentrasi serotonin darah kelompok domba agresif tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok domba yang tidak agresif (Tabel 5) yaitu 72,39 vs 70,51 ng/ml. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian terdahulu yang dilaporkan oleh BRUNNER *et al.* (1993) yang melaporkan bahwa kandungan serotonin darah pada setiap laki-laki yang mempunyai sifat agresif dari sebuah keluarga besar Belanda ditemukan lebih tinggi daripada yang tidak memiliki sifat agresif. Temuan selanjutnya adalah bahwa tingginya kandungan serotonin darah ini disebabkan adanya mutasi titik pada gen MAO sehingga produksi enzim Mono Amine Oxidase A yang dihasilkan gen tersebut, tidak mampu mengontrol konsentrasi serotonin tetap dalam keadaan normal. Enzim Mono Amine Oxidase A berfungsi dalam mendegradasi beberapa *neurotransmitter* seperti serotonin, norepinephrine dan dopamine. Penelitian pada tikus transgenik yang mengalami delesi pada gen MAO-A mengakibatkan konsentrasi tiga jenis *neurotransmitter* di otak (serotonin, norepinephrine dan dopamine) meningkat secara nyata. Tikus jantan yang mengalami mutasi delesi pada gen MAO-A ini juga terlihat lebih agresif dibandingkan dengan tikus jantan yang normal (CASES *et al.*, 1995). Gagalnya gen MAO-A berfungsi dengan baik untuk memproduksi enzim Mono Amine Oxidase A mengakibatkan kandungan serotonin (dan *neurotransmitter* yang lain) menjadi meningkat dan terakumulasi. *neurotransmitter* tersebut memainkan peran penting untuk mengatur respon tubuh terhadap ancaman atau stress sehingga individu tersebut dapat mempunyai respon secara berlebihan (MORELL, 1993).

Disamping tingkah laku agresif, tingkah laku domain yang dipengaruhi oleh serotonin bermacam-macam, termasuk pergerakan, tingkah laku seksual, tidur, nafsu makan, dan suasana hati (MANUCK *et al.*, 2006; HALBACH dan DERMIETZEL 2006). Pada manusia walaupun pada wanita tidak ditemukan adanya hubungan, pada laki-laki yang dihukum oleh satu atau lebih pidana kekerasan dan dilaporkan menyerang secara fisik atau mengancam orang lain pada berbagai kasus mempunyai tingkat serotonin darah yang lebih tinggi dibandingkan dengan laki-laki yang dihukum karena pidana yang tidak terkait dengan tingkah laku kasar (MANUCK *et al.* 2006).

**Tabel 4.** Rataan durasi beberapa sifat tingkah laku berdasarkan pengelompokan domba berkarakter agresif dan tidak agresif serta interaksi antara karakter dan rumpun domba (menit)

Variabel	Tingkah laku									
	INGEST	PLAY	AGON	ELIM	CARE	LOCO	STAND	SLEEP	REST	DRINK
Karakter	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	*
- A	73,31±14,50	0,00±0,00	1,84±1,00	3,25±1,02	10,27±2,06	26,00±10,19	89,08±18,42	16,44±6,71	78,25±20,39	1,55±0,20
- NA	64,52±5,37	0,00±0,00	1,45±0,37	4,18±0,38	3,90±0,76	32,13±3,78	103,41±6,82	11,99±2,48	78,01±7,55	0,40±0,07
Karakter x Rumpun	*	NS	*	*	*	*	*	*	*	NS
- AxKS	61,65 <sup>b</sup> ± 10,96	0,00 ± 0,00	2,88 <sup>b</sup> ± 0,76	4,19 <sup>b</sup> ± 0,77	1,90 <sup>a</sup> ± 1,55	31,29 <sup>abc</sup> ± 7,71	105,30 <sup>ab</sup> ± 13,93	6,69 <sup>ab</sup> ± 5,07	85,84 <sup>bc</sup> ± 15,41	0,27 ± 0,15
- NAxBC	54,39 <sup>b</sup> ± 12,00	0,00 ± 0,00	2,11 <sup>a</sup> ± 0,83	4,69 <sup>b</sup> ± 0,84	4,17 <sup>ab</sup> ± 1,70	43,73 <sup>bc</sup> ± 8,44	136,67 <sup>b</sup> ± 15,26	4,26 <sup>ab</sup> ± 5,55	49,71 <sup>ab</sup> ± 16,88	0,27 ± 0,17
- NAxLG	60,18 <sup>b</sup> ± 12,00	0,00 ± 0,00	0,95 <sup>a</sup> ± 0,83	5,95 <sup>b</sup> ± 0,84	5,25 <sup>ab</sup> ± 1,70	33,35 <sup>abc</sup> ± 8,44	95,69 <sup>ab</sup> ± 15,26	9,24 <sup>ab</sup> ± 5,55	88,78 <sup>bc</sup> ± 16,88	0,61 ± 0,17
- NAxKG	73,13 <sup>b</sup> ± 12,00	0,00 ± 0,00	2,90 <sup>b</sup> ± 0,83	3,33 <sup>a</sup> ± 0,84	0,37 <sup>a</sup> ± 1,70	50,61 <sup>c</sup> ± 8,44	149,93 <sup>b</sup> ± 15,26	0,00 <sup>a</sup> ± 5,55	19,26 <sup>a</sup> ± 16,88	0,48 ± 0,17
- NAxKS	86,32 <sup>b</sup> ± 12,00	0,00 ± 0,00	0,87 <sup>a</sup> ± 0,83	3,16 <sup>a</sup> ± 0,84	1,70 <sup>a</sup> ± 1,70	20,81 <sup>ab</sup> ± 8,44	65,76 <sup>a</sup> ± 15,26	18,82 <sup>bc</sup> ± 5,55	102,18 <sup>c</sup> ± 16,88	0,38 ± 0,17
- NAxSC	48,59 <sup>a</sup> ± 12,00	0,00 ± 0,00	0,44 <sup>a</sup> ± 0,83	3,76 <sup>b</sup> ± 0,84	8,03 <sup>b</sup> ± 1,70	12,15 <sup>a</sup> ± 8,44	68,97 <sup>a</sup> ± 15,26	27,66 <sup>c</sup> ± 5,55	130,12 <sup>c</sup> ± 16,88	0,27 ± 0,17
- AxLG	95,42 ± 32,08	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,37	3,17 ± 0,69	0,88 ± 1,37	22,37 ± 11,21	129,88 ± 12,13	9,05 ± 15,68	38,98 ± 23,57	0,00 ± 0,00

NS = Tidak berbeda nyata, \* = Berbeda nyata (P < 0,05), Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P < 0,05)

A = Agresif, NA = Tidak agresif, BC = Barbados Blackbelly cross, LG = Lokal Garut, KG = Komposit Garut, KS = Komposit Sumatera, SC = St. Croix cross

INGEST = Makan (*ingestif*), PLAY = Bermain (*playing*), AGON = Berkelahi/agresif (*agonistic*), ELIM = Buang kotoran (*eliminatif*), CARE = Merawat diri (*care giving*),

LOCO = Melangkah/berjalan (*locomotion*), STAND = Berdiri (*standing*), SLEEP = Istirahat tidur (*sleeping*), REST = Istirahat berbaring (*resting*), DRINK = Minum (*drinking*)

**Tabel 5.** Konsentrasi serotonin darah menurut rumpun dan karakter domba dan interaksi karakter dan rumpun domba

Variabel	Konsentrasi serotonin darah (ng/ml)
Rumpun	TN
BC	70,52 ± 5,66
KG	73,05 ± 9,32
KS	70,34 ± 8,74
SC	70,45 ± 7,24
LG	78,90 ± 8,05
Karakter	TN
A	72,39 ± 9,24
NA	70,51 ± 6,94
Karakter x Rumpun	TN
AxKS	74,44 ± 10,96
NAxBC	70,00 ± 6,17
NAxKG	73,05 ± 9,32
NAxKS	66,92 ± 5,08
NAxSC	72,26 ± 6,40
AxLG	78,90 ± 2,39

TN = Tidak nyata ( $P > 0,05$ ), \* = Nyata ( $P < 0,05$ )

A = Agresif, NA = Tidak agresif

BC = Barbados Blackbelly cross, LG = Lokal Garut, KG =

Komposit Garut, KS = Komposit Sumatera, SC = St. Croix cross

CLARK dan GRUNSTEIN (2000) mengemukakan bahwa perilaku tikus jantan agresif berkorelasi terbalik dengan tingkat serotonin dalam otak, dimana strain tikus yang paling agresif memiliki tingkat serotonin di otak terendah, sedangkan strain kurang agresif memiliki kadar serotonin yang lebih tinggi. Meskipun demikian harus dipahami bahwa perilaku agresif dipengaruhi tidak hanya satu senyawa akan tetapi beberapa senyawa dalam sistem kerja yang kompleks. Peneliti-peneliti terdahulu (BRUNNER *et al.*, 1993; MORELL, 1993) telah melaporkan bahwa perilaku agresif dipengaruhi oleh beberapa *neurotransmitter* dan hormon. Meningkatnya konsentrasi dopamine dan norepinephrine diketahui berkorelasi dengan meningkatnya perilaku agresif. *Neurotransmitter* lain yang diketahui berhubungan dengan sifat agresif adalah *nitric oxide*.

Hormon lain yang telah dilaporkan mendorong individu untuk bersifat agresif adalah testosteron dan *growth hormone* (GH). CLARK dan GRUNSTEIN (2000) melaporkan bahwa hormon testosteron terutama mendorong agresi antar hewan jantan, bersaing untuk posisi sosial dan preferensi kawin dan pada tingkat

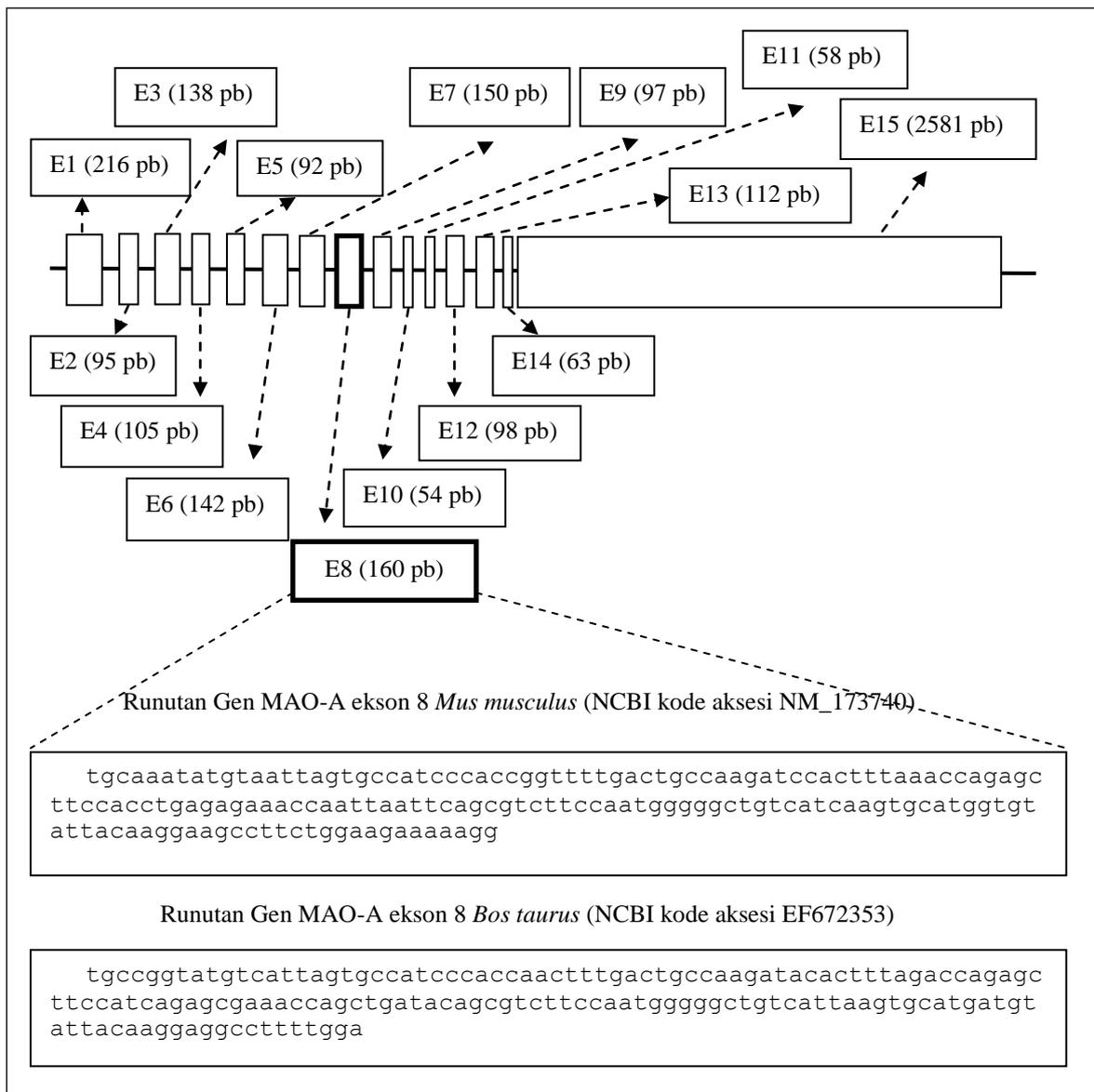
lebih rendah dalam perilaku interspesifik agresif seperti membunuh binatang untuk makanan. Korelasi yang tinggi antara konsentrasi *growth hormone* (GH) darah dan temperamen agresif pada *Bos frontalis* juga telah dilaporkan oleh MONDAL *et al.* (2006). Perlakuan *growth hormone* (GH) pada domba muda telah dilaporkan meningkatkan secara cepat pertumbuhannya melalui peningkatan pertumbuhan otot (ROSEMBERG *et al.*, 1989). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa domba yang agresif diduga memiliki karakteristik seperti tingkat konsentrasi hormon testosteron dan *growth hormone* (GH) yang lebih tinggi dan cenderung akan mempunyai ukuran tubuh lebih besar.

### Runutan DNA Ekson 8 Gen MAO-A

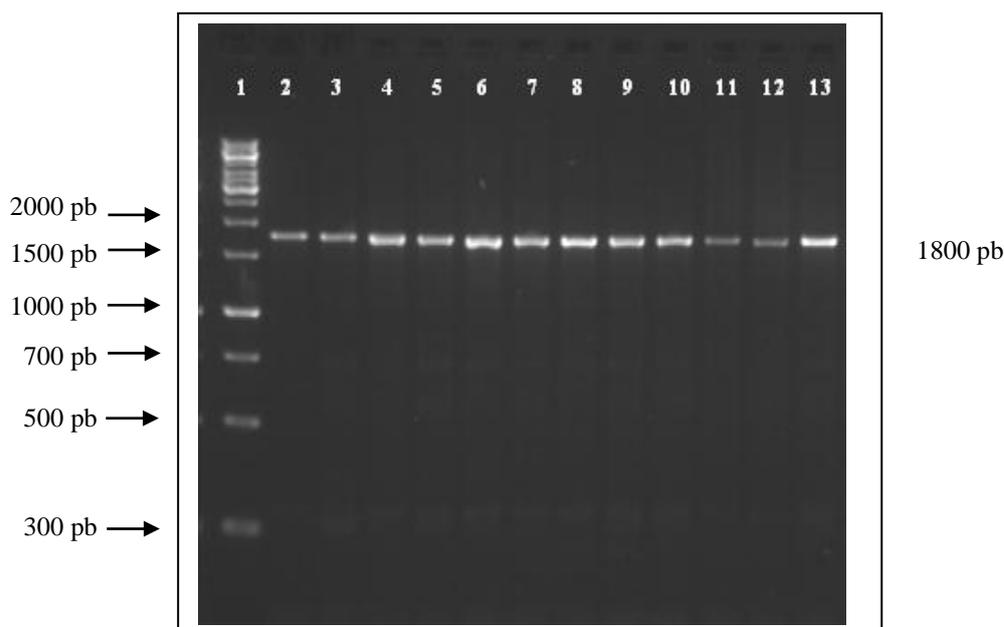
Secara lengkap runutan mRNA gen MAO-A dapat diperoleh di website NCBI (The National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Hasil pencarian di situs NCBI pada bulan Pebruari 2012 didapat 20 runutan lengkap mRNA gen MAO-A dari 11 spesies hewan. Dari hasil pencarian tersebut, hanya 2 runutan dari 2 spesies yang mempunyai informasi lengkap tentang struktur bagian-bagian ekson dari mRNA gen MAO-A yaitu untuk spesies tikus rumah (*Mus musculus*) dan manusia (*Homo sapiens*) dengan panjang runutan berturut-turut adalah 4161 dan 4090 pb. Gen MAO-A mempunyai 15 ekson yang jika digambarkan berdasarkan ukuran ekson-eksonnya adalah seperti terlihat pada Gambar 2.

Dalam penelitian ini, primer yang dibuat berdasarkan runutan gen MAO-A sapi dapat menempel pada DNA sampel domba dan dapat mengamplifikasi runutan DNA target (ekson 8 gen MAO-A). Hasil amplifikasi primer tersebut diperoleh produk dengan ukuran sekitar 1800 pb (Gambar 3). Produk sepanjang 1800 pb tidak hanya berisi runutan ekson 8 gen MAO-A saja tetapi merupakan runutan sebagian ekson 7 (tempat primer *forward* didesain), intron 7, ekson 8, intron 8 dan sebagian runutan ekson 9 (tempat primer *reverse* didesain).

Hasil pensejajaran runutan ekson 8 gen MAO-A sapi (*Bos taurus*) dengan kode akses EF672353 sebagai acuan terhadap hasil sekuensing runutan DNA domba sampel diperoleh ekson 8 gen MAO-A dengan ukuran 151 pb. Hasil analisa runutan DNA antar karakter domba agresif dan tidak agresif pada ekson 8 gen MAO-A ternyata tidak terdapat adanya polimorfisme atau semua runutan DNA dua kelompok domba tersebut sama pada berbagai rumpun, dengan demikian pada domba tidak terdapat hubungan karakter agresif dengan



**Gambar 2.** Diagram mRNA gen MAO-A *Mus musculus* yang digambarkan berdasarkan runutan yang dipublikasikan oleh NCBI dengan kode aksesinya NM\_173740 dan runutan ekson 8 gen tersebut pada *Mus musculus* dan *Bos taurus* (kode aksesinya EF672353)



Keterangan : Kolom 1 = 1 kb DNA ladder, kolom 2-13 sampel domba

**Gambar 3.** Produk yang diperoleh dari hasil amplifikasi primer yang didesain khusus pada ekson 7 (*forward*) dan ekson 9 (*reverse*) dengan ukuran sekitar 1800 pb

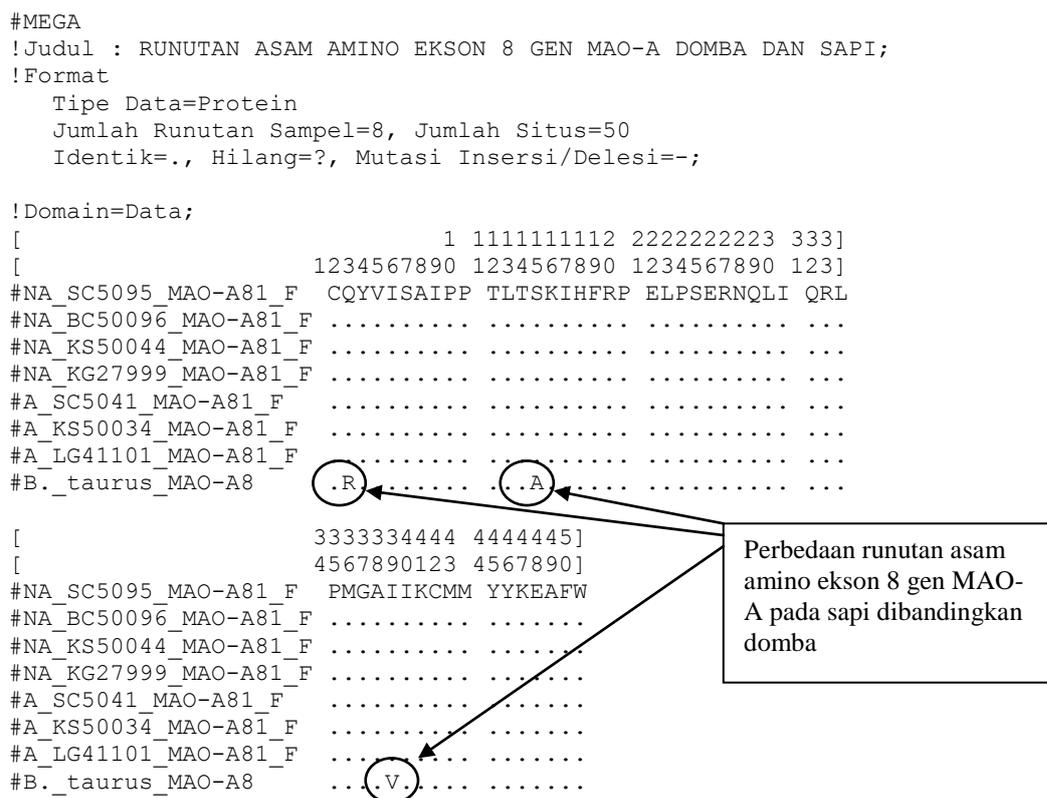
mutasi pada ekson 8 gen MAO-A. Contoh runutan ekson 8 gen MAO-A pada kelompok domba agresif dan tidak agresif pada berbagai rumpun domba seperti terlihat pada Gambar 4.

Mutasi delesi dan mutasi titik di ekson 8 gen MAO-A yang dilaporkan oleh BRUNNER *et al.* (1993) dan CASES *et al.* (1995) sebagai penyebab timbulnya sifat agresif pada manusia dan tikus ternyata tidak terjadi pada ekson 8 gen MAO-A pada semua sampel domba yang berkarakter agresif. MAXSON (2009) mengemukakan bahwa di seluruh spesies, individu yang tidak mempunyai atau rendah aktivitas MAO-A lebih mudah untuk berperilaku agresif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sifat agresif pada domba mempunyai mekanisme atau sebab yang berbeda dengan yang terjadi pada tikus dan manusia. Mutasi yang dapat menyebabkan gangguan produksi enzim kemungkinan terbesar terjadi di bagian ekson (ekson 1-7 dan 9-15) atau di bagian promotor gen MAO-A.

Ekson 8 gen MAO-A sapi bernomor aksesori EF672353 (di Bank Gen) dipergunakan sebagai acuan

dalam penentuan lokasi ekson 8 runutan DNA domba sampel penelitian. Runutan ekson 8 gen MAO-A sapi tersebut ternyata mempunyai perbedaan beberapa basa bila dibandingkan dengan runutan ekson 8 gen MAO-A domba sampel penelitian. Hasil pensejajaran antara runutan ekson 8 gen MAO-A domba dan sapi diperoleh lima basa di runutan sapi yang berbeda dengan runutan domba yaitu pada basa ke-5 (mutasi A→G), 6 (A→G), 18 (C→T), 40 (T→G) dan 112 (A→G). Hasil translasi kodon runutan ekson 8 gen MAO-A domba dan sapi terlihat bahwa walaupun mutasi terjadi di empat kodon dengan penggantian lima basa tetapi perubahan hanya terjadi di tiga asam amino, masing-masing di runutan asam amino ke-2 (Q(Gln)/Glutamin→R(Arg)/Arginin), 14 (S(Ser)/Serin→A(Ala)/Alanin) dan 38 (I(Ile)/Isoleusin→V(Val)/Valin). Mutasi yang terjadi di basa ke-18 tidak mengakibatkan perubahan asam amino (mutasi sinonim). Translasi kodon runutan DNA ekson 8 gen MAO-A domba dan sapi menghasilkan 50 asam amino seperti terlihat pada Gambar 5.





**Gambar 5.** Runutan asam amino ekson 8 gen MAO-A pada beberapa rumpun domba berkarakter agresif dan tidak agresif serta runutan asam amino ekson 8 gen MAO-A *Bos Taurus*

**SNP pada Ekson 8 Gen MAO-A Domba SC**

Dari 30 sampel runutan DNA ekson 8 gen MAO-A yang dianalisa ternyata ditemukan seekor domba jantan SC yang mengalami mutasi inseri. Ukuran ekson 8 gen MAO-A domba SC tersebut lebih panjang satu basa sehingga menjadi 152 pb. Domba bernomor SC 5099 tersebut mengalami mutasi inseri atau penambahan basa C pada basa ke-102 dari ekson 8 gen MAO-A. Perbandingan runutan DNA ekson 8 gen MAO-A antara domba normal (SC5018 dan BC70097) dan domba yang mengalami mutasi (SC5099) adalah sebagaimana terlihat pada Gambar 6.

Mutasi inseri pada domba SC5099 tersebut menyebabkan perubahan kodon ke-34 akan tetapi tidak

merubah jenis asam amino pada saat translasi. Asam amino yang dihasilkan pada runutan ke-34 ekson 8 gen MAO-A adalah tetap P(Pro)/Prolin (Tabel 6). Meskipun mutasi inseri tidak merubah asam amino, inseri basa C pada runutan basa ke-102 pada ekson 8 gen MAO-A tersebut mengakibatkan runutan asam amino selanjutnya (asam amino ke-35 hingga 50) menjadi berubah dan berbeda dibandingkan runutan asam amino domba normal. Terlebih lagi pada runutan asam amino ke-40 terkode kodon STOP (UAA atau TAA untuk kode kodon DNA) sehingga runutan asam amino yang terbentuk pada ekson 8 gen MAO-A untuk domba SC5099 pada saat proses translasi akan lebih pendek yaitu hanya 39 asam amino dibandingkan 50 asam amino yang akan terbentuk pada domba normal.



Domba SC5099 yang ternyata mengalami mutasi insersi pada runutan DNA ekson 8 gen MAO-A adalah domba yang masuk kriteria dalam kelompok domba tidak agresif dan dari data hasil analisa hormon serotonin darah diketahui domba ini mempunyai kandungan serotonin darah tergolong rendah yaitu hanya 66,9 ng/ml dibandingkan dengan rata-rata kandungan serotonin darah dalam kelompok domba tidak agresif (71,5ng/ml).

### KESIMPULAN

Durasi tingkah laku kelompok domba yang berkarakter agresif dan tidak agresif berbeda hanya pada dua tingkah laku yaitu merawat diri (CARE) dan minum (DRINK) dimana domba berkarakter agresif melakukan tingkah laku tersebut dalam durasi yang lebih lama.

Konsentrasi serotonin darah antara kelompok domba berkarakter agresif dan tidak agresif serta antar rumpun domba tidak berbeda nyata.

Sifat agresif pada domba mempunyai mekanisme atau sebab yang berbeda dengan yang terjadi pada tikus dan manusia sehingga keragaman ekson 8 dari gen MAO-A tidak dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk sifat agresif pada domba. Hasil analisa sepanjang 151 pb ekson 8 gen MAO-A menunjukkan tidak ditemukan adanya mutasi pada kelompok domba jantan berkarakter agresif. Hasil pensejajaran runutan ekson 8 gen MAO-A kelompok domba jantan berkarakter agresif dan tidak agresif ternyata identik sehingga tidak ditemukan adanya hubungan antara mutasi pada ekson 8 gen MAO-A pada domba dengan sifat agresif.

Ditemukan mutasi insersi pada basa ke-102 ekson 8 gen MAO-A pada seekor domba jantan rumpun SC akan tetapi mutasi tersebut tidak berhubungan dengan karakter agresif.

Perlu dilakukan penelitian untuk melihat keragaman runutan DNA di ekson 1-7 dan 9-15 dan bagian promotor gen MAO-A untuk melihat hubungannya dengan sifat agresif pada domba.

### DAFTAR PUSTAKA

- ANDRÉS, A.M., M.M. SOLDEVILA, A. NAVARRO, K.K. KIDD, B. OLIVA and J. BERTRANPETIT. 2004. Positive selection in MAO-A gene is human exclusive: Determination of the putative amino acid change selected in the human lineage. *Hum. Genet.* 115: 377-386.
- BRUNNER, H.G., M. NELEN, X.O. BREAKEFIELD, H.H. ROPERS and B.A. VAN OOST. 1993. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262(5133): 578-580.
- CASES, O., I. SEIF, J. GRIMSBY, P. GASPAS, K. CHEN, S. POURNIN, U. MULLER, M. AGUET, C. BABINET, J.C. SHIH and E. DEMAËYER. 1995. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAO-A. *Science* 268: 1763-1766.
- CLARCK, W.R. and M. GRUNSTEIN. 2000. Are we hardwired?: The role of genes in human behavior. Oxford University Press, Inc. New York.
- EWING, S.A., D.C. LAY JR. and E.V. BORELL. 1999. Farm Animal Well-Being: Stress Physiology, Animal Behavior, and Environmental Design. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
- FERNANDEZ, M.A., L. ALVAREZ and L. ZARCO. 2007. Regrouping in lactating goats increases aggression and decreases milk production. *Small Rum. Res.* 70: 228-232.
- GRIMSBY, J., K. CHEN, L.J. WANG, N.C. LAND and J.C. SHIH. 1991. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3637-3641.
- HAFEZ, E.S.E., J.P. SCOTT, R.B. CAIRNS, C.V. HULET, V.H. DENENBERG and E.M. BANKS. 1969. The Behaviour of Sheep and Goats. Tindal & Casell, London.
- HALBACH, O.B. and R. DERMIETZEL. 2006. Neurotransmitters and neuromodulators: Handbook of receptors and biological effects. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany.
- LEVY, E.R., J.F. POWELL, V.J. BUCKLE, Y.P.P. HSU, X.O. BREAKEFIELD and I.W. CRAIG. 1989. Localization of human monoamine oxidase-A gene to Xpl 1.23-11.4 by in situ hybridization: Implications for Norrie disease. *Genomics* 5: 368-370.
- MANUCK, S.B., J.R. KAPLAN and F.E. LOTRICH. 2006. Brain serotonin and aggressive disposition in humans and nonhuman primates. *In: Biology of Aggression.* R. J. Nelson (Editor). Oxford University Press Inc. New York. pp. 65-113.
- MAXSON, S.C. 2009. The genetics of offensive aggression in mice. *In: Handbook of Behavior Genetics.* Y. K. Kim YK (Editor). Springer Science+Business Media, LLC. New York. pp. 301-316.
- MAXSON, S.C. and A. CANASTAR. 2006. Genetic aspects of aggressions in nonhuman animals. *In: Biology of Aggression.* R.J. Nelson (Editor). Oxford University Press Inc. New York. pp. 3-19.
- MCGLONE, J.J. 1986. Agonistic behavior in food animals: Review of research and techniques. *J. Anim. Sci.* 62: 1130-1139.
- MONDAL, M., C. RAJKHOWA and B.S. PRAKASH. 2006. Relationship between plasma growth hormone concentrations and temperament in mithuns (*Bos frontalis*). *Hormones Behav.* 49: 190-196.

- MORELL, V. 1993. Evidence found for a possible 'aggression gene'. *Science* 260: 1722-1723.
- ROSEMBERG, E., M.L. THONNEY and W.R. BUTLER. 1989. The effects of bovine growth hormone and thyroxine on growth rate and carcass measurements in lambs. *J. Anim. Sci.* 67: 3300-3312.
- SAS. 2002. *SAS/STAT User's Guide Release 9.0 Edition*. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI and S. KUMAR. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.