

KERAGAMAN SNP c.400G>A GEN MYOSTATIN (MSTN|*Alu-I*) PADA SAPI BALI MENGGUNAKAN METODE PCR-RFLP

SHAFIRA NUR SADRINA



DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2022

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Keragaman SNP c.400G>A Gen Myostatin (Mstn|Alu-I) Pada Sapi Bali Menggunakan Metode PCR-RFLP” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, September 2022

Shafira Nur Sadrina
D14180098



RINGKASAN

SHAFIRA NUR SADRINA. Keragaman SNP c.400G>A Gen Myostatin (MSTN|*Alu-I*) Pada Sapi Bali Menggunakan Metode PCR-RFLP. Dibimbing oleh JAKARIA dan CECE SUMANTRI.

Gen myostatin merupakan gen yang mengatur pertumbuhan otot rangka pada ternak dan mutasi yang terjadi pada gen tersebut dapat menyebabkan otot ganda (*double muscle*). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi dan menganalisis keragaman SNP c.400G>A gen myostatin pada sapi bali menggunakan metode PCR-RFLP. Sampel yang digunakan merupakan sampel DNA 100 ekor sapi bali dari BPTU-HPT Denpasar dan BPT-HMT Serading serta 20 ekor sapi limosin. Keragaman SNP c.400G>A gen MSTN dilakukan menggunakan metode PCR-RFLP dengan enzim restriksi *Alu-I*. Analisis data yang dilakukan adalah frekuensi genotipe, frekuensi alel, heterozigositas pengamatan dan harapan, *chi-square* (x^2) dan kesetimbangan *Hardy-Weinberg*. Hasil analisis menunjukkan bahwa ditemukan tiga genotipe yaitu genotipe GG, GA, dan AA dan alel G dan A. Hasil analisis menunjukkan bahwa SNP c.400G>A gen MSTN bersifat polimorfik dan berada dalam keadaan kesetimbangan *Hardy-Weinberg* pada sapi bali, sedangkan pada sapi limosin monomorfik.

Kata kunci: myostatin, keragaman, PCR-RFLP, SNP

SUMMARY

SHAFIRA NUR SADRINA. Polymorphism of Myostatin Gene SNP c.400G>A (MSTN|*Alu-I*) on Bali Cattle Conducted by PCR-RFLP. Supervised by JAKARIA dan CECE SUMANTRI.

The myostatin gene (MSTN) is a gene that regulates skeletal muscle growth that can improve the quality and quantity of meat. This study aims to identify and analyze the polymorphism of the SNP c.400G>A myostatin gene in bali cattle using the PCR-RFLP method. The samples used were DNA samples of 100 bali cattle from BPTU-HPT Denpasar and BPT-HMT Serading and 20 limousine cattle. The study was conducted using the PCR-RFLP method with the restriction enzyme *Alu-I*. Data analysis conducted included genotype frequency, allele frequency, observational heterozygosity and expectation, *chi-square* (x^2) and *Hardy-Weinberg* equilibrium. The DNA band analyzed along 608 bp has three cut points, namely 608 bp, 583 bp, and 384 bp. The resulting genotypes are GG, GA, and AA and produce alleles G and A. Analysis results show that the MSTN SNP c.400G>A gene is polymorphic but has a low level of diversity and is in a state of *Hardy-Weinberg* equilibrium. The results of the analysis showed that three genotypes were found, namely the genotypes GG, GA, and AA and alleles G and A. Analysis results showed that the SNP c.400G>A of the MSTN gene was polymorphic and was in a state of *Hardy-Weinberg* equilibrium in Bali cattle, while in limousine cattle is monomorphic.

Keywords: myostatin, PCR-RFLP, polymorphism, SNP



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak mengizinkan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.





@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2022
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

KERAGAMAN SNP c.400G>A GEN MYOSTATIN (MSTN|*Alu-I*) PADA SAPI BALI MENGGUNAKAN METODE PCR-RFLP

SHAFIRA NUR SADRINA

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana pada
Program Studi Teknologi Produksi Ternak

**DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2022**

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Tim Penguji pada Ujian Skripsi:

- 1 Dr. Yuni Cahya Endrawati, S.Pt., M.Si
- 2 Dr. Bramada Winiar Putra, S.Pt., M.Si

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Judul Skripsi : Keragaman SNP c.400G>A Gen Myostatin (MSTN|*Alu-I*) pada Sapi Bali Menggunakan Metode PCR-RFLP

Nama : Shafira Nur Sadrina
NIM : D14180098

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Jakaria, S.Pt, M.Si.



Pembimbing 2:
Prof. Dr. Ir. Cece Sumantri, M. Agr.Sc.



Diketahui oleh

Ketua Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi
Pernakan:
Dr. Ir. Tuti Suryati S.Pt., M.Si.
NIP 19720516 199702 2 001



Tanggal Ujian: 9 Agustus 2022

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Oktober 2021 sampai bulan November 2021 ini ialah genetika molekuler, dengan judul “Keragaman SNP c.400G>A Gen Myostatin (MSTN|*Alu-I*) pada Sapi bali Menggunakan Metode PCR-RFLP”

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Jakaria, S.Pt., MSi. dan Prof. Dr. Ir. Cece Sumantri, M. Agr.Sc yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih kepada Kak Dairoh, S.Pt, M.Si. dan penghargaan penulis sampaikan kepada kawan – kawan ABGSci yang telah membantu selama pengumpulan data. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayah, ibu, serta seluruh keluarga telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya. Terima kasih juga saya ucapkan kepada orang – orang yang telah berjasa dalam memberikan *moral support* yaitu Karina Rachma Suryani dan Delima Nur Mu'nisah, serta kawan – kawan saya yang telah memberikan *moral support* sehingga saya dapat termotivasi kembali.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, September 2022

Shafira Nur Sadrina

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL

DAFTAR GAMBAR

PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
I METODE	3
2.1 Waktu dan Tempat Penelitian	3
2.2 Alat dan Bahan	3
2.3 Prosedur Kerja	3
2.3.1 Sampel yang digunakan	3
2.3.2 Primer yang digunakan	3
2.3.3 Amplifikasi DNA	4
2.3.4 Elektroforesis	4
2.3.5 Analisis PCR-RFLP gen myostatin	5
2.4 Analisis data	5
III HASIL DAN PEMBAHASAN	7
2.5 Amplifikasi Gen <i>Myostatin</i> (MSTN <i>Alu-I</i>)	7
2.6 Penentuan Genotipe Gen MSTN	7
2.7 Keragaman Gen MSTN	9
2.8 Nilai Heterozigositas dan Keseimbangan <i>Hardy-Weinberg</i>	10
III SIMPULAN DAN SARAN	11
3.1 Simpulan	11
3.2 Saran	11
DAFTAR PUSTAKA	12



DAFTAR TABEL

1	Rincian sampel DNA yang digunakan dalam penelitian	3
2	Frekuensi genotipe dan alel gen MSTN SNP c.400G>A	9
3	Nilai heterozigotas pengamatan dan nilai heterosigositas harapan gen MSTN SNP c.400G>A	10

DAFTAR GAMBAR

1	Posisi penempelan primer dan situs pemotong enzim <i>Afu-I</i> pada ekson 1 gen MSTN	4
2	Hasil amplifikasi gen myostatin menggunakan gel agarose 1,5%. M adalah marker 100 pb. 1-6 adalah sampel yang dianalisis	7
3	Visualisasi hasil inkubasi gen myostatin sapi Bali BPTU Denpasar menggunakan gel agarose 2%. M adalah marker 100 pb 1-5 adalah sampel yang dianalisis	8
4	Rekonstruksi kemungkinan genotype gen MSTN ekson 1 (AY94986.1)	8
5	Visualisasi pemotongan pita DNA serta titik pemotongan SNP c.400 G>A	9

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak mengizinkan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak mengizinkan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sapi bali (*Bos javanicus*) merupakan sapi asli Indonesia dengan populasi yang tersebar luas di seluruh Indonesia. Sapi bali juga merupakan kelompok asli ternak sapi Indonesia yang memiliki karakteristik bentuk fisik dan komposisi genetik serta kemampuan beradaptasi dengan berbagai lingkungan di Indonesia (BSN 2017) sehingga berkontribusi terhadap ketersediaan daging nasional. Meskipun begitu, kualitas dan kuantitas produksi sapi bali masih rendah apabila dibandingkan dengan sapi impor. Secara umum kebutuhan daging sapi sekitar 30% - 40% masih disuplai oleh impor daging maupun impor sapi bakalan (Pusdatin 2020). Kebutuhan konsumsi daging sapi di Indonesia pada tahun 2019 mencapai 2,56 kg/kapita/tahun atau total sebesar 686,27 ribu ton sedangkan produksi daging sapi pada tahun 2019 sebesar 504,80 ribu ton (BPS 2019). Adanya selisih sebesar 181,47 ribu ton ini menunjukkan bahwa Indonesia masih belum berhasil dalam swasembada daging pada tahun 2019.

Perbaikan kualitas daging sapi lokal, khususnya pada sapi bali, dilakukan dengan cara perbaikan kualitas produksi dan pemuliaan seleksi (Salim *et al.* 2012). Seleksi sebagai salah satu metode pemuliaan pada ternak dapat meningkatkan produktivitas ternak secara signifikan, yaitu produksi ternak yang lebih cepat, lebih murah, lebih sehat dan lebih efisien, serta dapat mengurangi dampak buruk pada lingkungan (Tait-Burkard *et al.* 2018). Meski begitu, metode seleksi dibatasi oleh keragaman genetik pada bangsa atau populasi ternak yang diinginkan serta adanya variasi genetik akibat mutasi. Dengan adanya teknologi molekuler, pendekatan metode seleksi terutama metode seleksi pada genetik mungkin untuk dilakukan. Seleksi secara molekuler dapat dilakukan dengan mengevaluasi profil sekuen nukleotida (*Single Nucleotide Polymorphism*; SNP) dari gen yang mempengaruhi produktivitas ternak (Putra dan Indriastuti 2018). Seleksi dengan menggunakan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) telah banyak dilakukan sebagai upaya meningkatkan produksi ternak. Keterkaitan SNP gen potensial terhadap produktivitas banyak dilaporkan Dairoh *et al.* (2021) dan Saputra *et al.* (2020).

Gen Myostatin (MSTN) dikenal dengan gen utama yang mengatur pertumbuhan otot rangka (Beyer *et al.* 2013). Ternak yang mengalami defisiensi gen MSTN ditunjukkan dengan meningkatnya massa dan ukuran otot atau yang biasa disebut otot ganda (*double muscle*). Defisiensi gen MSTN ini disebabkan karena adanya mutasi gen yang terjadi sehingga ternak dapat kekurangan atau kehilangan gen MSTN. Namun, gen ini diminati para peternak karena pertumbuhannya yang cepat dan sifat karkas yang disukai masyarakat, sehingga dapat meningkatkan kualitas dan kuantitas daging (Mirhoseini dan Zare 2012). Selain itu, ternak ini tidak hanya menghasilkan lebih banyak namun juga dagingnya lebih tidak berlemak dan lebih empuk (Kobolák dan Góczya 2002). Sapi *Belgian blue* (BB) merupakan salah satu contoh sapi yang mengalami *double muscle* dan menjadi salah satu sapi yang diunggulkan untuk *breeding* di Indonesia.

Khasanah *et al.* (2016) melaporkan terkait variasi gen MSTN pada sapi bali dan menemukan asosiasi yang signifikan dari dua SNP (g.7799T>C dan g.7941C>T) dengan sifat pertumbuhan dan karkas. Selain itu, penelitian Aliyya *et al.* (2020) menyatakan bahwa gen myostatin ditemukan polimorfisme di ekson 1



yaitu SNP c.400G>A menggunakan metode *direct sequencing* dan polimorfik pada sapi bali. SNP c.400G>A gen MSTN sangat potensial karena polimorfik pada sapi bali oleh karena itu perlu dilakukan studi lanjut yaitu dengan metode PCR-RFLP sebagai salah metode yang sederhana dan mudah dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi sesuai target SNP (Hashim dan Al-Shuhaib 2019).

1.2 Rumusan Masalah

Penelitian lebih lanjut mengenai polimorfisme gen myostatin pada ekson 1 belum diteliti lebih lanjut khususnya teknik PCR-RFLP karena murah dan mudah dilakukan.

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi dan menganalisis keragaman SNP c.400G>A di ekson-1 gen myostatin menggunakan teknik PCR-RFLP pada sapi bali dan sapi limosin sebagai pembanding.

1.4 Manfaat

Penelitian ini dapat dijadikan sebagai informasi dasar dalam mendapatkan keragaman genetik gen myostatin menggunakan teknik PCR-RFLP yang diharapkan dapat bermanfaat dalam mengidentifikasi keragaman genetik pada sapi bali di Balai Pembibitan Ternak khususnya program pemuliaan baik di Provinsi Bali dan Pulau Sumbawa.

@Hani_cipamitik IPB University



II METODE

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler Ternak, pada Bagian Pemuliaan dan Genetika, Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi DNA dan PCR adalah tabung mikrosentrifus 1.5 mL, tabung PCR 0,2 mL, dan 0,5 mL, GS column, 1 set mikro pipet, tip pipet, vortex, rotary mixer, kulkas, mesin PCR AB System, inkubator, dan centrifuge. Alat - alat yang digunakan untuk elektroforesis adalah gelas ukur, timbangan, 1 set rak elektroforesis, microwave, magnetic stirrer, alat elektroforesis, komputer dan UV Transiluminator.

Sampel DNA, primer forward sekuen MSTN ekson 1 yaitu 5'- CAA GTT GTC TCT CAG ACT GG - 3' dan primer reverse yaitu 5'- GAG GAG GAA TGT ATG TTG GG-3'. GSB buffer, Proteinase K, W1 buffer, wash buffer, TE buffer, absolut etanol dan elution buffer. Bahan yang digunakan untuk PCR adalah sampel DNA hasil ekstraksi, primer forward, primer reverse, Nuclease Free Water (NFW), dan MyTaq HS Red Mix. Bahan-bahan yang digunakan untuk elektroforesis adalah produk hasil PCR (amplikon), serbuk agarose 0,3 mL dan Tris-Borat EDTA (TBE) 20 mL, pewarna DNA, dan marker 100 pb. Bahan-bahan yang digunakan pada Teknik RFLP adalah amplikon, enzim restriksi Alu-I, buffer enzim, dan NFW.

2.3 Prosedur Kerja

2.3.1 Sampel yang digunakan

Jumlah dari keseluruhan sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 120 sampel DNA koleksi Laboratorium Genetika Molekuler Ternak Divisi Pemuliaan dan Genetika, Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, IPB University (Tabel 1).

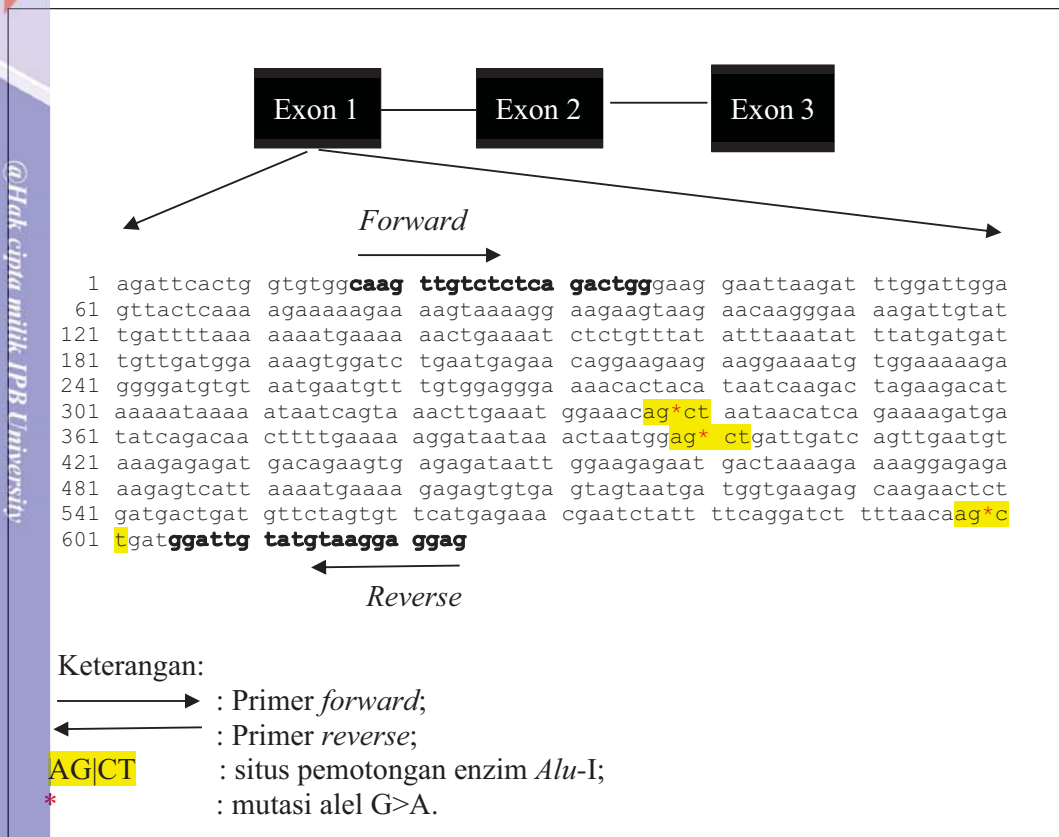
Tabel 1 Rincian sampel DNA yang digunakan dalam penelitian

No	Bangsa	Asal	Tahun koleksi	Jumlah
1.	Bali	BPTU-HPT Denpasar, Bali	2019	50
2.	Bali	BPT-HMT Serading, NTB	2013	50
3.	Limosin	BPTU Padang Mangatas	2019	20

2.3.2 Primer yang digunakan

Primer yang digunakan untuk menentukan enzim dan titik potong yaitu enzim Alu-I primer forward 5'- CAA GTT GTC TCT CAG ACT GG-3' dan primer reverse 5'- GAG GAG GAA TGT ATG TTG GG-3' (Aliyya et al. 2020). Produk PCR berjumlah 608 pb (Gambar 1).

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak mengizinkan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 1 Posisi penempelan primer dan situs pemotong enzim *Alu-I* pada ekson 1 gen *MSTN*

2.3.3 Amplifikasi DNA

Sebelum dilakukan amplifikasi DNA dilakukan optimasi terlebih dahulu agar mengetahui suhu yang cocok digunakan untuk amplifikasi DNA. Dari hasil optimasi, didapat suhu 55°C untuk amplifikasi DNA.

Tabung mikrosentrifus disusun dalam rak kemudian setiap tabung diberi label, lalu dituangkan cairan NFW 6,1 µL dan DNA 1 µL menggunakan mikropipet. Cairan dihomogenkan menggunakan *vortex* dan *spin down* selama 10 detik. Tabung diletakkan kembali pada rak kemudian ditambahkan primer *forward* dan *reverse* (sesuai label) sebanyak 0,2 µL serta cairan *MyTaq HS Red Mix* 7,5 µL lalu dihomogenkan kembali menggunakan *vortex* dan *spin down* selama 10 detik. Produk pencampuran akan diproses menggunakan alat PCR *Bio AB Systems*.

2.3.4 Elektroforesis

Serbuk *agarose* ditimbang seberat 0,45 gram dan TBE sebanyak 30 mL kemudian dimasukkan dalam gelas piala dan dipanaskan menggunakan *microwave* selama 10 menit. Kedua bahan tersebut kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 50 rpm hingga uap memudar lalu dimasukkan *fluoro safe* 0,1 µL kemudian dituang kedalam rak elektroforesis. Gel didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit hingga

memadat. Setelah itu hasil produk PCR dan *marker* 100 pb dimasukkan kedalam gel yang telah diletakkan dalam bak elektroforesis menggunakan mikropipet sebanyak 1 μL dan bak elektroforesis dialiri tegangan 100 volt. Apabila *marker* sudah menampilkan warna pada bak elektrolisis, maka gel elektroforesis siap diangkat dan diproses menggunakan komputer dan *UV Transiluminator*.

2.3.5 Analisis PCR-RFLP gen myostatin

Gen myostatin dianalisis menggunakan metode PCR-RFLP dan ditentukan genotipenya. Produk amplifikasi DNA (amplikon) sebanyak 5 μL dimasukkan dalam tabung PCR 0,5 mL kemudian ditambahkan *mix* (enzim restriksi *Alu-I* 0,3 μL , *buffer Alu-I* 0,7 μL dan *NFW* 1 μL) sebanyak 2 μL pada tabung PCR 1,5 mL. Setelah itu diinkubasi selama 4 jam dengan suhu 37°C. Sampel DNA yang telah terpotong dielektroforesis pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis dipindai menggunakan *UV Transilluminator*. Pita-pita DNA yang muncul dibandingkan dengan *marker* untuk diketahui panjang fragmennya dan jumlah pita DNA dari setiap sampel dibandingkan untuk menentukan genotipe pita DNA. Penentuan alel *MSTN* ditunjukkan dengan jumlah dan ukuran besar fragmen yang terpotong.

2.4 Analisis data

Frekuensi genotipe, frekuensi alel, nilai heterosigositas pengamatan dan harapan, dan keseimbangan *Hardy-Weinberg* dihitung dengan dengan rumus Nei dan Kumar (2000). Rumus frekuensi genotipe:

$$X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Keterangan:

X_{ii} = frekuensi genotipe ke-ii

n_{ii} = jumlah individu bergenotipe ii

n = jumlah total sampel

Frekuensi alel dihitung berdasarkan rumus Nei dan Kumar (2000):

$$X_i = \frac{(2n_{ii} + \sum_{i \neq j} n_{ij})}{2N}$$

Keterangan:

X_i = frekuensi alel ke-i

n_{ii} = jumlah individu bergenotipe ii

n_{ij} = jumlah individu bergenotipe ij

N = jumlah total sampel

Nilai heterozigositas adalah parameter untuk mengukur keragaman genetik suatu populasi. Nilai heterozigositas pengamatan (H_o) dan harapan (H_e) dihitung dengan rumus (Nei dan Kumar 2000):

$$H_o = \sum_{i \neq j}^N \frac{n_{ij}}{N}, H_e = 1 - \sum_{i=1}^q X_i^2$$

Keterangan:

H_o = heterozigositas pengamatan (populasi)

H_e = nilai heterozigositas harapan

n_{ij} = jumlah individu heterozigot

N = jumlah individu yang diamati

X_i = frekuensi alel

q = jumlah alel

Penyimpangan frekuensi genotipe yang muncul dari keseimbangan *Hardy-Weinberg* di analisis menggunakan rumus Nei dan Kumar (2000):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(O - E)^2}{E}$$

Keterangan:

χ^2 = nilai *Chi Square*

O = frekuensi genotipe sampel yang diamati

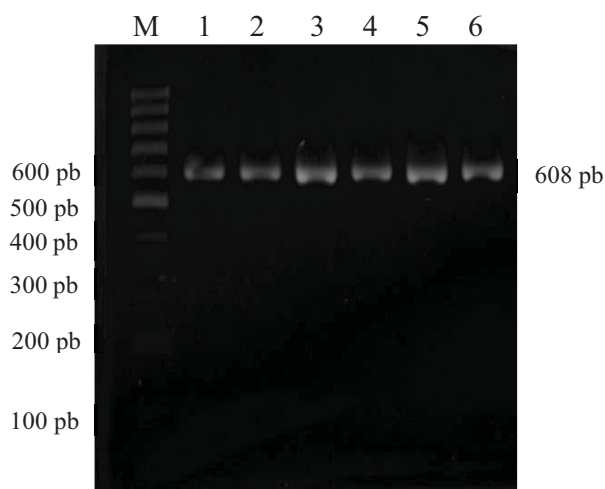
E = frekuensi genotipe harapan



III HASIL DAN PEMBAHASAN

2.5 Amplifikasi Gen *Myostatin* (MSTN|*Alu-I*)

Seluruh sampel gen myostatin berhasil teramplifikasi dengan sempurna pada kondisi suhu annealing 55°C dengan panjang produk PCR adalah 608 panjang basa (pb) dan menghasilkan amplikon yang jelas dan tepat sasaran (Gambar 2).



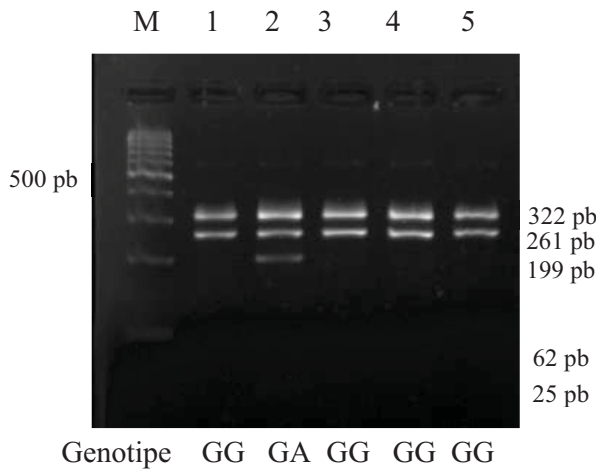
Gambar 2 Hasil amplifikasi gen myostatin menggunakan gel agarose 1,5%. M adalah marker 100 pb. 1-6 adalah sampel yang dianalisis

Keberhasilan PCR sangat ditentukan oleh reaksi amplifikasi pada PCR ditentukan oleh kombinasi primer sekuens yang sesuai dengan target DNA yang akan di amplifikasi (van Pelt-Verkuil *et al.* 2008). Selain itu, proses amplifikasi DNA juga ditentukan oleh beberapa factor lain, seperti konsentrasi primer, suhu amplifikasi, durasi denaturasi, sampel DNA itu sendiri serta konsentrasi $MgAl_2$ (Williams 2005; Putri *et al.* 2015). Ada beberapa cara dalam menentukan suhu *annealing* optimal. Berdasarkan penelitian Rychlik *et al.* (1990) menyatakan bahwa suhu optimal *annealing* (T_a Opt) untuk satu pasang primer pada target tertentu dihitung dengan rumus: T_a Opt = $0.3 \times (T_m \text{ primer}) + 0,7 \times (T_m \text{ produk}) - 14.9$; dimana T_m primer merupakan suhu leleh dari pasangan *template* primer yang kurang stabil, dan T_m produk adalah suhu leleh produk PCR.

2.6 Penentuan Genotipe Gen MSTN

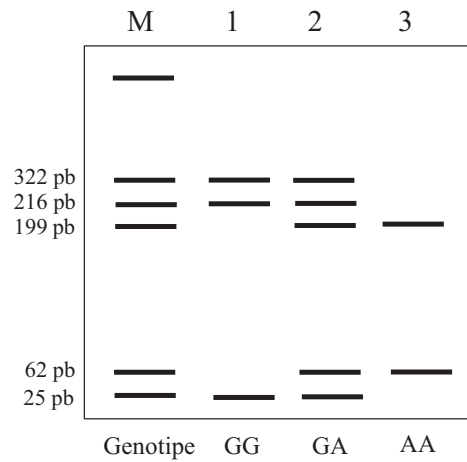
Penentuan genotipe SNP c.400G>A di ekson-I gen MSTN dilakukan menggunakan metode PCR-RFLP dengan enzim restriksi *Alu-I* diperoleh dua genotipe, yaitu genotipe GG dan GA. Genotipe GG memiliki pita sepanjang 322 pb dan 261 pb sedangkan genotipe GA sepanjang 322 pb, 261 pb, dan 199 pb.

Enzim *Alu-I* merupakan enzim restriksi atau enzim pemotong yang bertugas memotong DNA dengan sekuens pengenalan yang berbeda pada utas DNA dengan panjang basa umumnya 4-6 pasang basa. Enzim *Alu-I* memotong pada situs AG|CT pada suhu 55°C.

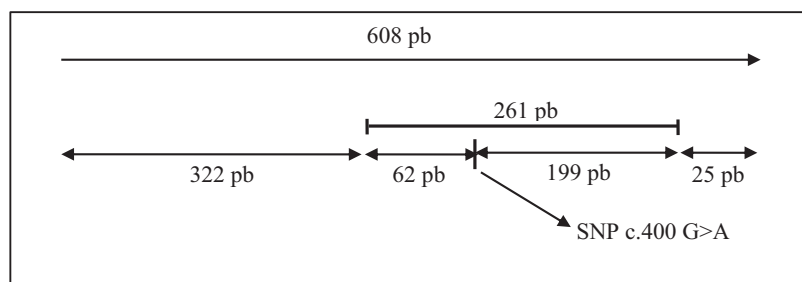


Gambar 3 Visualisasi hasil inkubasi gen myostatin sapi bali BPTU Denpasar menggunakan gel agarose 2%. M adalah marker 100 pb, 1-5 adalah sampel yang dianalisis

Gambar 3 menunjukkan bahwa pada sampel nomor dua, terdapat tiga pita yang jelas dengan genotipe GA (heterozigot) dengan pemotongan yaitu pada sekitar 322 pb, 261 pb, dan 199 pb, sedangkan fragmen 62 pb dan 25 pb tidak terlihat karena terlalu pendek ukuran panjang basanya. Adapun genotipe GG adalah genotipe yang memiliki dua pita yang jelas dengan ukuran yaitu 322 pb dan 261 pb, sedangkan ukuran 25 pb tidak terlihat. Genotipe AA dalam penelitian ini tidak ditemukan baik pada sapi bali dan sapi limosin dengan kemungkinan panjang basa sekitar 199 pb dan 62 pb.



Gambar 4 Rekonstruksi kemungkinan genotype gen MSTN ekson 1 (AY94986.1)



Gambar 5 Visualisasi pemotongan pita DNA serta titik pemotongan SNP c.400 G>A

Berdasarkan teknik PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) merupakan metode yang mengkombinasikan dua teknik dalam teknologi molekuler yaitu teknik PCR dan RFLP menjadi sangat mudah dalam penentuan genotipe dibandingkan dengan metode sekuensing. Metode ini didasarkan pada pengolahan hasil amplikasi PCR dengan enzim restriksi yang sesuai untuk memproduksi fragmen polimorfik yang berbeda sebagai *marker* untuk identifikasi suatu spesies (Kim *et al.* 2017). Penggunaan metode RFLP lebih menguntungkan dibandingkan beberapa metode lain karena dapat dilakukan dengan cepat, mudah, dan akurat dalam menggambarkan dan mengidentifikasi suatu populasi (Tabit 2016).

2.7 Keragaman Gen MSTN

Keragaman SNP c.400G>A di ekson-1 gen MSTN pada sapi bali dan sapi limosin disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 Frekuensi genotipe dan alel gen MSTN SNP c.400G>A

Populasi sapi	Jumlah sampel	Frekuensi genotipe			Frekuensi alel	
		GG	GA	AA	G	A
Sapi bali BPTU-HPT Denpasar	50	0,94	0,06	0,00	0,97	0,03
Sapi bali BPT-HMT Serading	50	0,92	0,08	0,00	0,96	0,04
Sapi limosin	20	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00

Genotipe GG pada sapi bali sangat tinggi dan mendominasi hasil penelitian baik di BPTU HPT Bali dan BPT-HPT Serading, sedangkan genotipe GA memiliki frekuensi yang rendah di kedua lokasi tersebut. Frekuensi alel G tinggi baik di BPTU HPT Bali dan BPT-HPT Serading, sebaliknya frekuensi alel A rendah. Frekuensi alel G monomorfik pada sapi limosin. Polimorfisme didefinisikan sebagai sifat turunan yang diatur oleh satu lokus dengan dua alel, dimana alel yang resesif memiliki frekuensi 1% (0,01) atau lebih (Ismail dan Essawi 2012). Berdasarkan definisi tersebut, titik mutasi pada SNP c.400 populasi sapi bali BPTU-HPT Denpasar dan populasi sapi bali BPT-HMT Serading dapat dikatakan polimorfik dikarenakan alel A pada kedua populasi memiliki frekuensi di atas 0,01, yaitu sebesar 0,03 dan 0,04. Namun lain halnya dengan sapi limosin yang tidak

memiliki frekuensi alel A menandakan bahwa pada populasi sapi limosin bersifat monomorfik atau tidak adanya keragaman dalam populasi tersebut.

Mutasi yang terjadi pada gen myostatin SNP c.400 merupakan mutasi transisi dari basa guanine (G) menjadi basa adenine (A) pada nukleotida ke-400 dengan posisi Glu89Glu (Aliyya *et al.* 2020). Mutasi lain yaitu mutase transisi basa nitrogen G-A pada gen myostatin pada sapi bangsa piedmontese yang mempengaruhi asam amino sistein menjadi tirosin pada ekson 3 (Kambadur *et al.* 1997).

2.8 Nilai Heterozigositas dan Keseimbangan *Hardy-Weinberg*

Hasil analisis nilai heterozigositas pengamatan dan harapan serta uji keseimbangan Hady-Weinberg disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 Nilai heterozigotas pengamatan dan nilai heterosigositas harapan gen MSTN SNP c.400G>A

Populasi sapi	Jumlah sampel	H _o	H _e	Uji χ^2
Sapi bali BPTU-HPT Denpasar	50	0,06	0,05	0,03 ^{tn}
Sapi bali BPT-HMT Serading	50	0,08	0,07	0,04 ^{tn}
Sapi limosin Padang Mangatas	20	0,00	0,00	td

H_o = nilai heterozigositas pengamatan, H_e = nilai heterozigositas harapan, tn yaitu tidak nyata (Tabel, db=2; $\alpha 5\%=5,99$, td yaitu tidak dianalisis).

Tabel 3 menunjukkan bahwa populasi sapi bali di BPT-HMT Serading memiliki nilai heterozigositas pengamatan tidak ada perbedaan, namun kedua nilai heterozigositas (heterozigositas pengamatan dan harapan) pada dua populasi sapi bali (sapi bali BPTU-HPT Denpasar dan BPT-HMT Serading) masih rendah yaitu dibawah 0,5 sedangkan nilai heterosigositas pengamatan dan harapan pada sapi limosin memiliki nilai heterozigositas nol. Nilai heterozigositas yang berada dibawah 0,5 mengindikasikan rendahnya keragaman gen pada populasi yang dianalisis (Allendorf dan Gordon 2007; Javanmard *et al.* 2011).

Seluruh hasil perhitungan uji χ^2 memiliki hasil yang lebih rendah daripada hasil uji χ^2 tabel yaitu 5,99 (tidak nyata) sehingga dapat dikatakan bahwa gen MSTN SNP c.400 G>A pada seluruh sampel populasi sapi, baik sapi bali maupun sapi limosin berada pada kesetimbangan *Hardy-Weinberg*. Secara teori keseimbangan *Hardy-Weinberg* dalam suatu populasi akan tetap konstan berada dalam kesetimbangan apabila terjadi perkawinan acak, tidak terjadi mutasi, seleksi, dan tidak terjadi genetik *drift* (Speicher *et al.* 2010).

III SIMPULAN DAN SARAN

3.1 Simpulan

Gen myostatin SNP c.400G>A pada sapi bali bersifat polimorfik pada sapi bali di BPTU-HPT Denpasar dan BPT-HMT Serading namun memiliki nilai keragaman yang rendah dan berada dalam keadaan kesetimbangan *Hardy-Weinberg*. Sapi limosin tidak memiliki keragaman (monomorfik) untuk SNP c.400G>A ekson 1 gen MSTN.

3.2 Saran

Studi lanjutan diperlukan dengan menganalisis SNP c.400G>A gen MSTN pada populasi lain pada sapi Bali yang tersebar di Indonesia.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



DAFTAR PUSTAKA

- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2019. Produksi Daging Sapi Menurut Provinsi (Ton). Jakarta: BPS
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2017. SNI 7651-4:2017. Tentang Bibit Sapi Potong – Bagian 4 : Bali. Jakarta: BSN
- [DPKH] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018.
- [PUSDATIN] Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2020. Buku Outlook Komoditas Peternakan Daging Sapi Tahun 2020. Pus Data dan Sist Inf Pertan Sekr Jenderal Kementerian Pertan. Jakarta: PUSDATIN.
- Aliyya WLN, Noor RR, Jakaria. 2020. Exploring SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) of Myostatin gene in coding region in Bali cattle. Di dalam: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Volume ke-492. Institute of Physics Publishing.
- Allendorf FW, Luikart G. 2007. Conservation and The Genetics of Populations. Padstow: Blackwell Publishing. [diakses 2022 Jul 6]. <http://baloun.entu.cas.cz/popevol/prikladny/Conservation%20and%20the%20Genetics%20of%20Populations.pdf>.
- Beyer TA, Narimatsu M, Weiss A, David L, Wrana JL. 2013. The TGF β superfamily in stem cell biology and early mammalian embryonic development. *Biochim Biophys Acta*. 1830(2):2268–2279. doi:10.1016/J.BBAGEN.2012.08.025.
- Brinkmann B. 2010. Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches. Speicher MR, Antonarakis SS, Motulsky AG, editor. London: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [diakses 2022 Jul 6]. <https://books.google.co.id/books?id=FlfPSPbvKLGc&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>.
- Dairoh D, Jakaria J, Ulum MF, Ishak ABL, Sumantri C. 2021. Association of SNP g.232 G>T Calpain gene with growth and live meat quality prediction using ultrasound images in bali cattle. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 26(2):49–56. doi:10.14334/JITV.V26I2.2701.
- Hashim HO, Al-Shuhaib MBS. 2019. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 6(4):137–144. doi:10.29252/JABR.06.04.02.
- Ismail S, Essawi M. 2012. Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*. 1(2):57–63. doi:10.1097/01.MXE.0000415225.85003.47.
- Javanmard A, Azadzadeh N, Esmailzadeh AK. 2011. Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds. *Veterinary Research Communications*. 35(3):157–167. doi:10.1007/S11259-011-9467-9.



- Kambadur R, Sharma M, Smith TPL, Bass JJ. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7(9):910–916. doi:10.1101/GR.7.9.910.
- Khasanah H, Gunawan A, Priyanto R, Ulum MF, Jakaria. 2016. Polymorphism of Myostatin (MSTN) promoter gene and its association with growth and muscling traits in Bali cattle. *Media Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.* 39(2):95–103. doi:10.5398/medpet.2016.39.2.95.
- Kim Y, Choi SJ, Choi C. 2017. An Efficient PCR-RFLP Method for the Rapid Identification of Korean Pyropia Species. *Molecules* . 22(12):1–8. doi:10.3390/MOLECULES22122182.
- Kobolák J, Gócza E. 2002. The role of the myostatin protein in meat quality - A review. *Archives Animal Breeding.* 45(2):159–170. doi:10.5194/AAB-45-159-2002.
- Mirhoseini SZ, Zare J. 2012. The role of Myostatin on growth and carcass traits and its application in animal breeding. *Life Science Journal.* 9(3):1097–8135. [diakses 2022 Jul 2]. <http://www.lifesciencesite.com><http://www.lifesciencesite.com><http://www.lifesciencesite.com>.340.
- Nei Masatoshi, Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics.* Oxford: Oxford University Press. [diakses 2022 Jul 2]. https://books.google.com/books/about/Molecular_Evolution_and_Phylogenetics.html?id=hcPSag2pn9IC.
- van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. 2008. *Principles and technical aspects of PCR amplification.* Springer Netherlands.
- Putra WPB, Indriastuti R. 2018. Leptin gene as potential gene for molecular selection on cattle in Indonesia. *WARTAZOA.* 27(3):105–116. doi:10.14334/WARTAZOA.V27I3.1579.
- Putri R, Priyanto R, Gunawan A, Jakaria. 2015. Association of calpastatin (CAST) gene with growth traits and carcass characteristics in bali cattle. *Media Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.* 38(3):145–149. doi:10.5398/medpet.2015.38.3.145.
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research.* 18(21):6409–6412.
- Salim MA, Susilawati T, Wahyuningsih DS. 2012. Pengaruh metode thawing terhadap kualitas semen beku sapi bali, sapi madura dan sapi PO. *Jurnal Agripet.* 12(2):14–19. doi:10.17969/AGRIPET.V12I2.197.
- Saputra EA, Ulum MF, Jakaria J. 2020. Association of SNP g.643G>A of MYF5 gene polymorphism with body weight and body measurements in Bali cattle. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture.* 45(1):1–6. doi:10.14710/JITAA.45.1.1-6.



Tabit FT. 2016. Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: a review. *J Food Sci Technol.* 53(1):42–49. doi:10.1007/s13197-015-1993-y.

Tait-Burkard C, Doeschl-Wilson A, McGrew MJ, Archibald AL, Sang HM, Houston RD, Whitelaw CB, Watson M. 2018. Livestock 2.0 - genome editing for fitter, healthier, and more productive farmed animals. *Genome Biol.* 19(1). doi:10.1186/S13059-018-1583-1.

Williams JL. 2005. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *OIE Revue Scientifique et Technique.* 24(1):379–391. doi:10.20506/RST.24.1.1571.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak mengizinkan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di kota Jakarta pada tanggal 15 bulan November tahun 2000 sebagai anak pertama dari pasangan bapak Seto Tjahjono dan ibu Fathya Ulfah. Tahun 2018 penulis lulus dari SMA Negeri 58 Jakarta Timur dan pada tahun yang sama penulis lulus seleksi masuk Institut Pertanian Bogor (IPB) melalui jalur mandiri.

Selama perkuliahan, penulis aktif dalam kegiatan *event* kampus maupun organisasi. Penulis pernah menjadi panitia *Cowboy Show Time* dan Dekan Cup sebagai staf desain, dekorasi dan dokumentasi, serta pernah tergabung dalam HIMAPROTER sebagai staf divisi Ruminansia. Selain itu, penulis tergabung dalam UKM Agria Swara. Penulis pernah menyanyi dan berkontribusi dalam *event – event* Agria Swara seperti konser internal, resital vokal, dan konser tahunan. Penulis konsisten tergabung dalam divisi media, desain, dan dokumentasi (MDD). Penulis juga pernah memimpin divisi MDD pada konser resital vokal serta pernah memimpin terlaksananya konser “Asa” yang dilakukan secara *hybrid* pada masa pandemi.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University