

Keragaman Mikrosatelit DNA Sapi Perah Friesian-Holstein di Balai Pembibitan Ternak Unggul Baturaden

C. SUMANTRI¹, A. ANGGRAENI², A. FARAJALLAH³ dan D. PERWITASARI³

¹Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan
Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor

²Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002

³Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Pertanian Bogor, Bogor

(Diterima dewan redaksi 2 Januari 2007)

ABSTRACT

SUMANTRI, C., A. ANGGRAENI, A. FARAJALLAH and D. PERWITASARI. 2007. Variation on DNA microsatellite of Holstein-Friesian dairy cows in Baturaden Dairy Cattle Breeding Center. *JITV* 12(2): 124-133.

Eight microsatellite loci of which the locations were three on chromosome 6 (BTA6) namely CSN 3, BM 143 and BM 415; two on chromosome 9 (BTA9) namely ETH 225 and BM 4208; and three on chromosome 10 (BTA10) namely BP 31, BM 1237 and BM 888 were used to investigate genotypic variation of Holstein-Friesian (HF) dairy cows in Baturraden Dairy Cattle Breeding Centre. Research activities were carried out through some steps involving blood collection, DNA isolation, amplification on DNA fragments by *polymerase chain reaction* (PCR) and separation by electrophoresis with silver staining. Frequency and heterozygosity of genes under consideration were calculated. The results showed that the eight microsatellite loci exhibited a total number of 33 alleles. Locations of those alleles were five in BM 143 and BM 4208 loci; four in BM 415, CSN 3, ETH 225, BM 1237, BM 888 loci; and three in BP 31 locus. A number of 14 out of 33 alleles might be specific alleles for HF dairy cattle in Baturraden Dairy Cattle Breeding Centre. The lowest heterozygosity per locus (\hat{h}) was 0.6151 for BM 415 whilst the highest one was 0.7301 for BM 888. Additionally, the average heterozygosity for all loci (\bar{H}) detected in this study was 0.6768. The genotype BB on locus BM 143 and AC on locus CSN-3 significantly affected ($P < 0.05$) the estimated breeding value of milk yield of HF cows in this location.

Key Words: Holstein-Friesian Cows, DNA Microsatellite, Allele, EBV of Milk Yield

ABSTRAK

SUMANTRI, C., A. ANGGRAENI, A. FARAJALLAH dan D. PERWITASARI. Keragaman mikrosatelit DNA sapi perah Friesian-Holstein di Balai Pembibitan Ternak Unggul Baturaden. *JITV* 12(2): 124-133.

Delapan lokus mikrosatelit yang mana tiga terletak pada kromosom 6 (BTA6) yaitu CSN 3, BM 143 dan BM 415; dua pada kromosom 9 (BTA9) yaitu lokus ETH 225 dan BM 4208; dan tiga lainnya pada kromosom 10 (BTA10) yaitu lokus BP 31, BM 1237 dan BM 888 telah dipakai untuk mendeteksi keragaman genetik sapi betina Friesian-Holstein (FH) di Balai Pembibitan Ternak Unggul (BPTU) Baturraden. Sejumlah tahapan kegiatan meliputi pengambilan sampel darah sapi laktasi, ekstraksi DNA, amplifikasi fragment DNA dengan delapan primer khusus melalui teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan pemisahan dengan elektrophoresis menggunakan spot perak. Dilakukan perhitungan frekuensi dan heterozigositas dari gen yang dipertimbangkan. Hasil menunjukkan ada 33 alel yang terdeteksi pada kedelapan lokus tersebut. Lokasi dari alel teridentifikasi adalah lima pada lokus BM 143 dan BM 4208; empat pada lokus BM 415, CSN 3, ETH 225, BM 1237, dan BM 888; dan tiga pada lokus BP 31. Dari total 33 alel teridentifikasi, 14 alelnya kemungkinan merupakan alel spesifik pada sapi FH di BPTU Baturaden. Diperoleh heterozigositas per lokus (\hat{h}) paling rendah sebesar 0.6151 untuk lokus BM 415 dan tertinggi sebesar 0,7301 untuk lokus BM 888. Rataan heterozigositas (\bar{H}) untuk kedelapan lokus sebesar 0,6768. Genotipe BB pada lokus BM 143 dan genotipe AC pada lokus CSN 3 berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap nilai pemuliaan produksi susu sapi FH di lokasi ini.

Kata Kunci: Sapi Induk Friesian-Holstein, Mikrosatelit DNA, Alel, Nilai Pemuliaan Produksi Susu

PENDAHULUAN

Pemetaan gen pada genom sapi telah membuka cakrawala baru dalam pemuliaan ternak. Gen-gen yang dapat dipergunakan sebagai penciri genetik dalam kegiatan seleksi sifat produksi dan bernilai ekonomis

sering disebut dengan istilah *Marker-assisted Selection* (MAS) atau *Genotyped-Assisted Selection* (GAS). MAS telah menjadi fokus perhatian para peneliti dari berbagai negara. Perkembangan terakhir terhadap kemajuan identifikasi MAS membuktikan bahwa uji DNA sudah bisa diaplikasikan secara lebih sederhana

untuk mendeteksi alel positif dari lokus-lokus yang bernilai ekonomis atau *Economic Trait Loci* (ETL). Banyak ETL kemungkinan besar bersifat kuantitatif atau *Quantitative Trait Loci* (QTL). Lokus-lokus yang demikian berpotensi dalam mempercepat dan meningkatkan efisiensi kegiatan seleksi dibandingkan dengan program seleksi yang dilakukan secara konvensional (WELLER, 2001). Berbagai upaya telah ditempuh dalam mendeteksi QTL sehingga QTL sebagai pemeta wilayah yang berkemungkinan mengandung gen-gen kandidat menjadi perhatian khusus pemulia ternak, tidak terkecuali pada ternak perah. Pengkajian secara khusus pada sapi perah menunjukkan sejumlah kromosom merupakan wilayah sumber yang memberi pengaruh nyata pada hampir semua sifat bernilai ekonomis (KUČEROVÁ *et al.*, 2006). Dengan demikian pendekatan lebih sistematis untuk menemukan gen-gen pengontrol produksi susu dapat dilakukan antara lain dengan membuat peta QTL. Hal ini diupayakan melalui pemanfaatan informasi keterkaitan gen (*linkage gen*) serta mengkoleksi penciri genetik pada keseluruhan kromosom atau genom.

Penciri genetik menurut BOBE *et al.* (1999) dapat dideteksi melalui polimorfisme protein darah. Analisis polimorfisme pada gen yang langsung berpengaruh terhadap produksi susu seperti gen hormon pertumbuhan melalui *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) dilakukan dengan mengamplifikasi fragmen gen yang diinginkan dengan mesin PCR, diteruskan dengan mengidentifikasi pembedaan fragmen gen dengan pemotongan enzim restriksi. Aplikasi secara cukup baik dari metode ini dilaporkan antara lain oleh RENAVILLE *et al.* (1997) dan FALAKI *et al.* (1997). BAWDEN dan NICHOLAS (1999) menyatakan mikrosatelit DNA merupakan salah satu penciri genetik yang sudah diaplikasikan secara meluas dalam bidang peternakan. Selain untuk uji test keturunan, dapat pula di pakai untuk mengidentifikasi sejumlah sifat dengan nilai ekonomis tinggi pada banyak spesies. Hal tersebut disebabkan mikrosatelit DNA sangat polimorfik dan terdapat banyak dalam DNA genom. Gen-gen penyandi protein susu dan hormon pertumbuhan merupakan kandidat utama marka DNA untuk analisis pautan dengan QTL disebabkan signifikansi pengaruh biologisnya terhadap sifat-sifat bernilai ekonomis. Keragaman alelik dalam sekuens struktural atau regulator dari gen-gen kandidat tersebut berkemungkinan mempunyai pengaruh langsung ataupun tidak langsung pada produksi susu dan performa pertumbuhan (FALAKI *et al.*, 1997).

GEORGES *et al.* (1995) menggunakan 159 mikrosatelit sebagai penciri genetik dan menerapkan metode *grand-daughter design* dalam mendeteksi gen-gen pengontrol produksi susu. Berdasarkan cara tersebut, mereka menyimpulkan QTL pada kromosom 9

meningkatkan produksi susu, pada kromosom 6 (kasein) meningkatkan protein dan lemak susu, sedangkan pada kromosom 20 meningkatkan produksi susu tetapi menurunkan persentase lemak dan persentase protein susu. Diinformasikan lebih jauh, QTL pada kromosom 1 dan 10 mempunyai pengaruh signifikan terhadap komposisi susu. Demikian pula kajian literatur sebagai dilakukan KHATKAR *et al.* (2004) melengkapi informasi dari hubungan antara QTL dengan sejumlah sifat laktasi. QTL pada kromosom 6 (BTA6) dan kromosom 14 (BTA14) diinformasikan mempengaruhi produksi susu, kadar protein, persentase protein, kadar lemak dan persentase lemak. Diinformasikan pula QTL pada kromosom 11 (BTA11) dan kromosom 23 (BTA23) mempengaruhi persentase protein. Sementara ASHWELL *et al.* (1998) mengidentifikasi penciri genetik BM 415 dan BP 7 pada kromosom 6 dan BM 6425 pada kromosom 14 berhubungan langsung dengan persentase protein; sedangkan BM 719 pada kromosom 16 berhubungan dengan lama sapi berproduksi. Peneliti lainnya seperti HEYEN *et al.* (1999) berhasil mengidentifikasi QTL untuk persentase beberapa komponen produksi susu terletak pada kromosom 1, 2, 3, 7 dan 14; daya tahan terhadap mastitis terletak pada kromosom 5, 22 dan 23; produksi susu terletak diantara TGLA 263 dan ILTS 96 pada kromosom 3 (BTA 3); serta persentase lemak terletak antara ILTS 39 dengan CSSM66 pada kromosom 14 (BTA14). INRA003 terletak 3 cM (senti morgan) dari TGLA 263 berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) pada kadar lemak dan protein susu (RON *et al.*, 1996). ARRANZ *et al.* (1998) melaporkan satu QTL berpengaruh terhadap produksi susu terletak pada kromosom 20. Sementara itu, KÜHN *et al.* (1999) melaporkan satu QTL dari kromosom 6 (BTA6q21-23) berkorelasi nyata terhadap protein dan lemak susu. VAN TASSEL *et al.* (2000) melaporkan marka gen yang terletak pada kromosom 6, 7 dan 10 berpengaruh terhadap persentase protein, produksi susu total, dan nilai sel somatis. Peneliti lain seperti PLANTE *et al.* (2001) menunjukkan adanya QTL yang berpengaruh terhadap total produksi susu, lemak dan protein terletak pada kromosom 20 dan 26, sedangkan untuk persentase kadar protein dan lemak terletak pada kromosom 3. VITALA *et al.* (2003) mendata QTL yang berpengaruh terhadap persentase lemak terletak pada kromosom 3 dan 14 sedangkan total lemak pada kromosom 12.

Keragaman genetik pada lokus *bovine growth hormone* dan *ornithine decarboxylase* menggunakan enzim restriksi MspI pada sapi FH induk di BPTU Baturraden telah dilaporkan RAHMANI *et al.* (2004). Demikian pula investigasi polimorfisme gen κ -kasein sapi FH betina di lokasi yang sama telah dilaporkan SUMANTRI *et al.* (2004). Informasi keragaman mikrosatelit DNA pada sapi perah FH lokal di Indonesia dirasakan masih sangat kurang. Oleh karena

itu penelitian ini bertujuan: 1) mempelajari keragaman mikrosatelit DNA yang terletak pada kromosom 6 (BTA6), kromosom 9 (BTA9) dan kromosom 10 (BTA10), 2) mengidentifikasi alel spesifik yang dimiliki oleh sapi perah FH laktasi di BPTU Baturraden dan 3) mempelajari pengaruh genotipnya terhadap nilai pemuliaan (NP) untuk sifat produksi susu.

MATERI DAN METODE

Sapi FH pengamatan

Sejumlah 99 ekor sapi FH yang sudah berlaktasi di BPTU Baturraden diambil sampel darahnya untuk dianalisis genotipe DNA mikrosatelitnya. Sapi tersebut sudah dievaluasi nilai pemuliaan (NP) produksi susunya selama pengamatan produksi 10 tahun (1989 - 2002) oleh ANGGRAENI dan RAHMANAI (2002). Produksi susu setiap sapi laktasi diperoleh berdasarkan catatan produksi susu mingguan yang dicatat sejak minggu kedua setelah sapi beranak sampai laktasi lengkap atau mendekati 305 hari. Evaluasi NP produksi susu sendiri didasarkan pada catatan bulanan dengan tujuan untuk menyederhanakan tabulasi dan pengolahan data.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan sedikit memodifikasi metode SAMBROOK *et al.* (1989) menggunakan buffer lisis sel (350 µl 1xSTE, dan 40 µl 10% SDS) dan 20 µl proteinase-K. DNA dimurnikan dengan metode fenol-kloroform, yaitu dengan menambahkan 40 µl 5 M NaCl dan 400 µl fenol dan kloroform iso amil alkohol (CIAA). DNA diendapkan dengan 40 µl 5 M NaCl dan 800 µl etanol absolut. Endapan dicuci dengan menambahkan 400 µl, 70% etanol kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Selanjutnya etanol dibuang dan

diuapkan dengan menggunakan pompa vakum. DNA kemudian dilarutkan dengan 80 µl 80% *buffer* TE.

Amplifikasi Mikrosatelit DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Reaksi PCR dilakukan menurut metode SAMBROOK *et al.* (1989) yang telah dimodifikasi yaitu dengan melakukan pencampuran secara merata 2 µl 50 ng DNA, 1,5 µl 10 x PCR *buffer*, 1,25 µl 2mM MgCl₂, 1 µl 2mM dNTPs, 0,25 µl primer mikrosatelit, 0,25 µl 4 unit Ampli *Taq gold* DNA polimerase dan 7,75 *millique water* sampai volume tabung PCR 12,50 µl (BISHOP *et al.*, 1994). Daftar primer mikrosatelit DNA (BTA-6, 9 dan 10) yang dipakai dalam penelitian disajikan dalam Tabel 1. Tabung PCR ini dimasukkan kedalam mesin *thermocycler* (TaKaRa PCR Thermal Cycler MP4), dengan program berikut. Tahap I, 1 x ulangan meliputi proses denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, penempelan primer pada suhu antara 54-60°C (Tabel 1) selama 1 menit, pemanjangan molekul DNA pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap II, 30 x ulangan meliputi denaturasi pada suhu 94°C selama 55 detik, penempelan primer pada suhu pada suhu antara 54-60°C selama 1 menit, pemanjangan molekul DNA pada suhu 72°C selama 1 menit 10 detik. Tahap III, 1 x ulangan, pemanjangan akhir molekul DNA pada suhu 72°C selama tujuh menit.

Elektroforesis

DNA mikrosatelit produk PCR dipisahkan dengan teknik elektroforesis gel poliakrilamid 8% yang dilanjutkan dengan pewarnaan perak. Sebanyak 2 µl produk PCR dicampur dengan *Loading dye*. Elektroforesis dilakukan selama 2,5 jam pada arus listrik konstan 165 mA atau sampai pewarna Bromthymol blue mencapai bagian bawah gel. Pewarnaan digunakan dengan metode pewarnaan perak menurut TEGELSTROM (1992).

Tabel 1. Daftar primer Mikrosatelit DNA pada kromosom 6, 9 dan 10 yang dipakai dalam penelitian

Jenis Mikrosatelit	Letak pada kromosom	Jumlah Alel	Panjang DNA (panjang basa)	Suhu annealing (°C)
CSN3	BTA6	6	216-238	58
BM415	BTA6	14	141-171	54
BM143	BTA6	12	90-118	58
ETH225	BTA9	10	141-159	60
BM4208	BTA9	8	154-174	58
BP31	BTA10	4	199-205	54
BM1237	BTA10	9	187-223	58
BM888	BTA10	7	173-183	58

*) BISHOP *et al.*, (1994)

Penentuan posisi pita Mikrosatelit DNA

Jika terdapat dua pita maka sampel tersebut bersifat heterozigot dan jika terdapat satu pita maka bersifat homozigot. Untuk memudahkan skoring pita yang paling bawah diberi sandi A dan selanjutnya B, C, dan seterusnya sampai pita paling atas. Asumsi yang mendukung yaitu semua pita yang memiliki laju sama merupakan alel yang homolog (NEI, 1987).

Analisis Data

Frekuensi masing-masing alel setiap lokus mikrosatelit dihitung berdasarkan rumus NEI (1987) :

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

Keterangan:

- : X_i = frekuensi alel lokus ke- i .
- n_{ij} = jumlah individu untuk genotipe A_iA_j .
- n_{ii} = jumlah individu untuk genotip A_iA_i .
- N = jumlah sampel.

Derajat heterozigositas (\hat{h}) dihitung berdasarkan frekuensi alel pada tiap lokus DNA mikrosatelit dengan rumus NEI (1987) sebagai berikut:

$$\hat{h} = \frac{2 n (1 - \sum x_i^2)}{2 n - 1}$$

Keterangan:

- \hat{h} = heterozigositas lokus.
- x_i = frekuensi alel lokus ke- i .
- n = jumlah sampel.

Ragam heterozigositas $Vsl(\hat{h})$ diantara individu dalam satu kesatuan frekuensi alel populasi pada tiap lokus DNA mikrosatelit dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Vsl(\hat{h}) = \frac{2}{2n(2n-1)} \{ 2(2n-2) \sum x_i^3 - (\sum x_i^2)^2 + \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 \}$$

dan standar error (SE) diperoleh dari akar ragam heterozigositas.

Rataan heterozigositas (\hat{H}) dari semua lokus DNA mikrosatelit yang diuji (r) dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\hat{H} = \sum_{j=1}^r \hat{h}_j / r$$

Keterangan:

- \hat{h}_j = derajat heterozigositas untuk lokus ke- j .
- r = jumlah lokus yang diuji.
- \hat{H} = rata-rata heterozigositas.

Pendugaan nilai pemuliaan (NP) produksi susu diestimasi menggunakan metoda *Best Linier Unbiased Prediction* (BLUP), dengan program paket PEST (GROENEVELD 1999). Pengaruh genotipe mikrosatelit DNA terhadap NP produksi susu dianalisis menggunakan *General Linear Model* (GLM) dengan prosedur *Least Square Means* (LSM) menurut *Statistics Analytical System* (SAS 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman genotipe mikrosatelit DNA

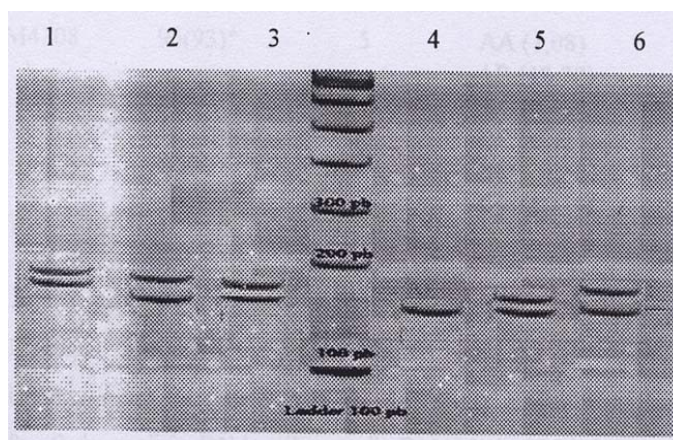
Hasil visualisasi elektroforesis untuk BM 4208 dan BM 1237 diperlihatkan pada Gambar 1 dan Gambar 2, sedangkan visualisasi elektroforesis untuk CSN 3, BM 143, BM 415, BM 888, BP 31 dan ETH 225 tidak dilampirkan di sini. Tabel 2 memperlihatkan keragaman genotipe lokus-lokus yang terletak pada BTA6, BTA9 dan BTA10. Keragaman genotipe dari setiap lokus pada dasarnya mencerminkan polimorfisme alel dari setiap lokus yang bersesuaian. Hasil pengamatan terhadap total 99 ekor sapi FH betina laktasi di BPTU Baturraden, diketahui lokus CSN 3 mempunyai genotipe BB dengan frekuensi paling rendah yaitu 2,08% sebaliknya genotipe BC dengan frekuensi paling tinggi yaitu 30,21%. Sementara itu, sapi FH dengan frekuensi genotipe diantara kedua kisaran nilai ini berurutan genotipe AD (3,13%), DD (4,16%), AB (8,33%), CC (9,38%), CD (11,46 %), BD (13,5%) dan AC (17,71%). Akan tetapi pada lokus CSN 3 tersebut tidak ditemukan individu bergenotipe AA (0%). Pada lokus BM 415 teridentifikasi frekuensi genotipe AA paling rendah (2,25%) dan genotipe BD paling tinggi (73,03%). Empat genotipe teridentifikasi memiliki frekuensi diantara kedua nilai tersebut, yaitu BC (4,50%), AC (5,62%), BB (6,74%) dan AB (7,87%). Sebaliknya, tidak ditemukan individu dengan genotipe AD, CC, CD dan DD. Pada lokus BM 143 dari kromosom 6 dan lokus BM 4208 dari kromosom 9, teridentifikasi pula genotipe CE yang tidak ditemukan pada keenam lokus lainnya.

Tabel 2. Frekuensi genotipe dari lokus BTA6, BTA9 dan BTA10 pada sapi Friesian-Holstein di BPTU Baturraden

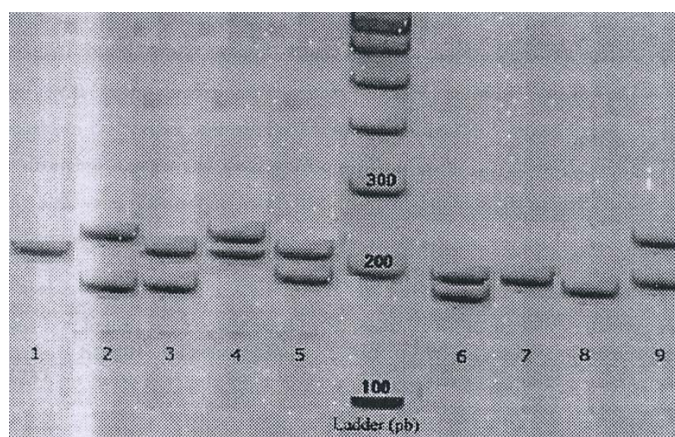
Genotipe	BTA6			BTA9		BTA10		
	CSN 3	BM 415	BM 143	ETH 225	BM 4208	BP 31	BM 1237	BM 888
	----- Jumlah pengamatan (%) -----							
AA	0 (0,0)	2 (2,25)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (5,15)
AB	8 (8,33)	7 (7,87)	5 (5,10)	25 (25,25)	17 (18,28)	29 (35,37)	8 (8,33)	0 (0,00)
AC	17 (17,71)	5 (5,62)	0 (0,00)	13 (13,13)	6 (6,45)	16 (19,51)	17 (17,70)	58 (59,80)
AD	3 (3,13)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,01)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (3,13)	34 (35,05)
BB	2 (2,08)	6 (6,74)	1 (1,02)	0 (0,00)	0 (0,00)	13 (15,85)	2 (2,08)	0 (0,00)
BC	29 (30,21)	4 (4,50)	55 (56,12)	0 (0,00)	6 (6,45)	11 (13,42)	29 (30,21)	0 (0,00)
BD	13 (13,54)	65 (73,02)	16 (16,33)	60 (60,61)	60 (64,52)	0 (0,00)	13 (13,54)	0 (0,00)
CC	9 (9,38)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	13 (15,85)	9 (9,38)	0 (0,00)
CD	11 (11,46)	0 (0,00)	6 (6,12)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11 (11,46)	0 (0,00)
CE	0 (0,00)	0 (0,00)	15 (15,31)	0 (0,00)	3 (3,22)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
DD	4 (4,16)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (4,17)	0 (0,00)
Total	96 (100)	89 (100)	98 (100)	99 (100)	93 (100)	82 (100)	96 (100)	97 (100)

Frekuensi genotipe CE untuk lokus BM 143 sebesar 15,31% dan lokus BM 4208 sebesar 3,22%. Lebih jauh, diketahui frekuensi genotipe terendah dan tertinggi pada lokus BM 413 adalah BB dan BC (15,31% vs. 56,12%), sedangkan untuk lokus BM 4208 adalah AA dan BD (1,08% vs. 64,52%). Akan tetapi tidak ditemukan genotipe AA, AC, AD, CC, dan DD pada lokus BM 143; serta lokus AD, BB, CC, CD dan DD pada lokus BM 4208. Sementara pada tiga lokus ETH 225, BP 31

dan BM 1237 teridentifikasi sebagai genotipe dengan frekuensi terendah dan tertinggi berurutan untuk genotipe AD dan BD (1,01% vs. 60,61%); genotipe BC dan AB (13,42% vs. 35,37%); dan genotipe AD dan BC (3,13% vs. 30,21%). Sebaliknya, tidak ditemukan genotipe AA, BB, BC, CC, CD dan DD pada lokus ETH 225; genotipe AA, AD, BD, CD dan DD untuk lokus BP 31; serta genotipe AA untuk lokus BM 1237.



Gambar 1. Pola elektroforesis lokus BM4208; Individu no 1, 2,3,4, 5 dan 6 bergenotipe CE,BD, BC, AA, AC dan BD



Gambar 2. Pola elektroforesis lokus BM1237. Individu no 1,2,3,4,5, 6, 7,8 dan 9 bergenotipe CC, AD, AC, CD, BC, AB, BB, AA dan BD

Lebih lanjut, pada lokus BM 888 ditemukan hanya tiga genotipe, yaitu AA (5,15%), AC (59,80%) dan AD (35,05%). Keseluruhan hasil identifikasi keragaman genotipe pada kedelapan lokus tersebut menginformasikan ada dua lokus dengan keragaman genotipe terbanyak yaitu BM 143 (pada BTA6) dan BM 4208 (pada BTA9) karena adanya tambahan kombinasi genotipe CE yang tidak diidentifikasi pada sapi FH betina pengamatan lainnya. Demikian pula sebagian lokus lainnya memiliki kombinasi genotipe tidak cukup banyak dibandingkan dengan sebagian lokus lainnya, sedangkan frekuensi keragaman mikrosatelit DNA dari genotipe yang teridentifikasi untuk setiap lokus yang dipertimbangkan juga mempunyai variasi yang besar.

Identifikasi dan keragaman alel

Jumlah alel dan ukuran panjang basa (pb) terdeteksi untuk setiap lokus ditampilkan pada Tabel 3. Hasil penelitian menunjukkan ada 33 alel terdeteksi pada kedelapan lokus tersebut yang berupa lima alel pada BM 143 dan BM 4208; empat alel pada BM 415, CSN 3, ETH 225, BM 1237 dan BM 888; dan tiga alel pada BP 31. Ada 14 alel dari 33 alel berukuran diluar yang dilaporkan oleh BISHOP *et al.* (1994). Pada lokus CSN 3 ada 3 alel yaitu B (246 pb), C (268 pb) dan D (276 pb). Terdapat lima lokus yang memiliki masing-masing 2 alel yaitu lokus BM 143 (D 120 pb, E 130 pb), ETH 225 (C 164 pb, D 176 pb), BM 4208 (D 186 pb, E 196

Tabel 3. Jenis dan frekuensi alel dari delapan lokus mikrosatelit DNA yang diamati pada kromosom 6, 9 dan 10 dari sapi Friesian-Holstein di BPTU Baturraden

Jenis Alel	BTA6		BTA9			BTA10		
	CSN 3	BM 415	BM 143	ETH 225	BM 4208	BP 31	BM 1237	BM 888
Panjang alel (pasang basa/pb) dan frekuensinya								
A	232 (0,15)	142 (0,09)	94 (0,03)	146 (0,20)	158 (0,13)	189 (0,27)	185 ** (0,15)	179 (0,35)
B	246** (0,28)	154 (0,49)	112 (0,40)	160 (0,43)	166 (0,45)	205 (0,41)	195 (0,28)	183 (0,18)
C	268** (0,39)	164 (0,05)	114 (0,39)	164** (0,06)	174 (0,08)	227** (0,32)	219 (0,39)	201** (0,29)
D	276** (0,18)	170 (0,37)	120** (0,12)	176** (0,31)	186** (0,32)	0 (0,0)	239** (0,18)	205** (0,18)
E	0 (0,0)	0 (0,0)	130** (0,06)	0 (0,0)	196** (0,02)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(1,0)
% Alel- terdeteksi	4*/6* (66,67)	4/14* (28,57)	5/12* (41,67)	4/10* (40,00)	5/8* (41,67)	3/4* (75,00)	4/9* (44,44)	4/7* (57,14)

* Jumlah alel berdasarkan BISHOP *et al* (1994)** Ukuran alel yang berbeda dengan BISHOP *et al* (1994)

pb), BM 1237 (A 185 pb, D 239 pb) dan BM 888 (C 201 pb, D 205 pb). Lokus BP 31 mempunyai hanya satu alel (C 227 pb), sedangkan lokus BM 415 mempunyai 4 alel (A, B, C, dan D) dengan ukuran panjang antara 142 - 170 pb yang berada dalam kisaran seperti dinyatakan BISHOP *et al.* (1994). Ke-14 alel tersebut kemungkinan merupakan alel baru yang belum pernah terdeteksi dari populasi sapi perah FH sebelumnya.

Frekuensi alel untuk masing-masing mikrosatelit BTA6 (lokus CSN3, BM 415 dan 143), BTA9 (lokus ETH 225 dan BM 4208) dan BTA10 (lokus BP 31, BM 1237 dan BM 888) ditabulasikan pada Tabel 3. Pada lokus CSN 3 terdapat empat alel dengan frekuensi alel dari yang tertinggi sampai terendah berurutan alel C (0,39), B (0,28), D (0,18) dan A (0,15). Seperti halnya pada lokus CSN 3, pada lokus BM 415 alelnya ada empat dengan frekuensi alel dari yang tertinggi sampai terendah berurutan B (0,49), D (0,37), A (0,09) dan C (0,05). Lokus BM 143 alelnya ada lima dengan frekuensi alel B (0,40) dan alel A terendah (0,03). Sementara itu, tiga alel lainnya dengan nilai frekuensi diantara keduanya berurutan C (0,39), D (0,12) dan E (0,06). Lokus ETH 225 jumlah alelnya ada empat dengan frekuensi alel B tertinggi (0,43) dan alel C terendah (0,07). Lokus BM 4208 alelnya ada lima

dengan frekuensi alel B tertinggi (0,45) dan alel E terendah (0,02), sedangkan tiga alel dengan nilai frekuensi diantara keduanya adalah C (0,08), A (0,13) dan D (0,32). Terlihat bahwa lokus BM 143 dan BM 4208 memiliki keragaman alelik lebih banyak bila dibandingkan dengan lokus CSN 3 dan BM 415 disebabkan adanya tambahan variasi alel E. Pada lokus BP 31 alelnya ada tiga dengan frekuensi alel B tertinggi (0,40) dan frekuensi alel A terendah (0,28). Lokus BM 1237 alelnya ada empat dengan frekuensi terendah sampai tertinggi berurutan A (0,15), D (0,18), B (0,28) dan C (0,39). Lokus BM 888 alelnya ada empat dengan frekuensi alel tertinggi A (0,35), sedangkan alel B dan D mempunyai frekuensi yang sama (0,18%). Kesemua hasil tersebut menunjukkan frekuensi alel dari satu lokus ke lokus lainnya dari sapi FH laktasi di BPTU Baturraden mempunyai tingkat kejadian yang sangat bervariasi. Namun secara jelas terlihat persentase alel tertinggi ada pada lokus BP 31 (75%) dan terendah ada pada lokus BM 415 (28,57%). Variasi alel yang besar seperti yang ditemukan pada lokus BM 143 (BTA6) dan BM 4208 (BTA9) akan secara langsung menghasilkan variasi genotipe mikrosatelit DNA yang tinggi.

Nilai heterozigositas

Nilai heterozigositas per lokus (\hat{h}) dari hasil penelitian ini mempunyai kisaran antara 0,6151- 0,7301 (Tabel 4). Kisaran ini tidak begitu lebar bila dibandingkan dengan hasil penelitian PANDEY *et al* (2006) pada sapi Kherigarh di India sebesar 0,261-0,809 dan pada sapi Tharparkar juga dari India berkisar 0,25 – 0,88 (SODHI *et al.*, 2006). Perbedaan disebabkan oleh selain bangsa sapi yang berbeda juga mikrosatelit yang dipakai dalam penelitian terdahulu lebih banyak, sejumlah 21 mikrosatelit. Lokus BM 415 (BTA6) mempunyai nilai heterozigositas terendah (0,6151) sebaliknya lokus BM 888 (BTA10) mempunyai nilai heterozigositas tertinggi (0,7301). Diperoleh heterozigositas bernilai kurang dari 0,70 berurutan untuk lokus BM 415 (BTA6), CSN 3 (BTA6), BP 31 (BTA10), BM 143 (BTA6), BM 4208 (BTA9) dan ETH 225 (BTA9). Sisanya lokus BM 1237 (BTA10) dan BM 888 (BTA10) mempunyai nilai heterozigositas diatas 0,70. Sementara nilai rata-rata untuk semua lokus (\bar{h}) sebesar 0,6766. KIM *et al.* (2002) melaporkan heterozigositas pada sapi *Japanes Black*, sapi Korea dan sapi China masing-masing sebesar 0,471, 0,728 dan 0,744. Pada sapi Holstein Cina dilaporkan MAO *et al.* (2007) sebesar 0,7719; sedangkan pada sapi India Red Kandhari dan Deoni dilaporkan SODHI *et al.* (2005) masing-masing sebesar 0,47 dan 5,47. Dinyatakan IBEAGHA-AWEMU dan ERHARDT (2005) rendahnya nilai heterozigositas (0,117) pada sapi di Kamerun dan Nigeria kemungkinan disebabkan oleh adanya faktor biak dalam.

Hubungan Genotipe Mikrosatelit DNA dengan produksi susu

Produksi susu merupakan sifat yang dikontrol oleh banyak gen, dengan demikian ekspresi dari setiap individu sapi betina dalam menghasilkan susu ditentukan oleh tiga komponen utama mencakup faktor genetik, lingkungan dan interaksi antara keduanya.

Perkembangan aplikasi teknologi pemuliaan sampai pada tingkat keragaman sekuens DNA yang terjadi secara intensif selama dekade terakhir telah memberikan banyak informasi mengenai pemetaan gen pada genom sapi. Banyak gen teridentifikasi mempunyai potensi sebagai pencari genetik atau *Marker-assisted Selection* (MAS) yang akan bermanfaat dalam mempercepat kegiatan seleksi dari sifat produksi dan bernilai ekonomis. Demikian pula, dalam penelitian ini telah dilakukan pemeriksaan hubungan antara polimorfisme mikrosatelit DNA dengan NP produksi susu dari sapi FH laktasi di BPTU Baturraden. Dilakukan analisis uji *General Linier Model* berdasarkan pertimbangan klasifikasi jumlah genotipe dari setiap lokus terhadap NP produksi susu setiap individu sapi. Hasil menunjukkan dari kedelapan mikrosatelit DNA yang di uji, diperoleh hanya dua lokus yang memberikan pengaruh signifikan ($P < 0,05$) pada NP produksi susu sapi FH laktasi, yaitu genotipe BB pada lokus BM 143 dan genotipe AC pada lokus CSN-3 (Tabel 5).

Hasil penelitian ini sama dengan yang dilaporkan oleh VELMALA *et al.* (1995) yang menyatakan mikrosatelit CSN 3 kelompok gen kasein berhubungan dengan produksi susu, produksi lemak dan persentase lemak. Untuk BM 143 yang terletak pada kromosom yang sama dan berjarak 31 cM dari CSN 3 berpengaruh langsung pada persentase protein susu (KHATKAR *et al.*, 2004). Selanjutnya BM 143 selain berpengaruh langsung terhadap persentase protein juga terhadap sifat lainnya seperti protein total, persentase lemak, lemak total dan produksi susu. CHEN *et al.* (2006) melaporkan pada sapi perah Cina ada dua marka gen pada kromosom 6 berpengaruh secara konsisten terhadap produksi susu dan protein. KÜHN *et al.* (1999) dan VELMALA *et al.* (1999) menyatakan bahwa kromosom 6 berperan langsung dalam pengontrolan sifat produksi susu karena merupakan lokasi dari gen kasein, dan terdapat tiga QTL untuk produksi susu, persentase protein, dan lemak.

Tabel 4. Jumlah alel dan nilai heterosigositas per lokus (\hat{h}) sapi Friesian-Holstein di BPTU Baturraden

Nama lokus	Nilai heterosigositas per lokus (\hat{h})	Nama lokus	Nilai heterosigositas per lokus (\hat{h})
CSN3 (BTA6)	0,6572	BM4208 (BTA9)	0,6756
BM415 (BTA6)	0,6151	BP31 (BTA10)	0,6624
BM143 (BTA6)	0,6756	BM1237 (BTA10)	0,7176
ETH225 (BTA9)	0,6811	BM888 (BTA10)	0,7301

Tabel 5. Hubungan genotipe mikrosatelit DNA lokus BM 143 dan lokus CSN 3 dengan nilai pemuliaan produksi susu

Genotipe	Lokus BM 143		Lokus CSN-3	
	Jumlah sapi (ekor)	Rataan NPS	Jumlah sapi (ekor)	Rataan NPS
AB	4	-27,8 ^b	4	100,3 ^a
AC	0	0	5	119,2 ^a
AD	0	0	34	36,2 ^b
BB	1	524,0 ^a	0	0
BC	42	44,0 ^b	0	0
BD	12	-35,8 ^b	20	-16,5 ^b
CD	5	-20,0 ^b	0	0
CE	9	31,3 ^b	0	0

Keterangan: Huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan secara statistik berbeda nyata ($P < 0,05$)

KESIMPULAN

Hasil identifikasi keragaman genotipe mikrosatelit DNA pada kedelapan lokus yang dipertimbangkan pada sapi FH betina di BPTU Baturraden menginformasikan sebagian lokus memiliki kombinasi yang cukup banyak dibandingkan sebagian lokus lainnya. Ada dua lokus dengan keragaman genotipe terbanyak yaitu BM 143 (pada BTA6) dan BM 4208 (pada BTA9) karena adanya tambahan kombinasi genotipe CE yang tidak diidentifikasi pada individu lainnya. Lebih jauh ada 33 alel yang terdeteksi pada kedelapan lokus tersebut dengan lima alel pada BM 143 dan BM 4208; empat alel pada BM415, CSN3, ETH225, BM1237, dan BM888; dan tiga alel pada BP 31. Ada 14 alel terdeteksi dengan kemungkinan sebagai alel spesifik sapi perah di Baturraden. Heterozigositas per lokus (\hat{h}) paling rendah 0,6151 untuk lokus BM415 dan tertinggi 0,7301 untuk lokus BM888. Rataan heterozigositas (H) untuk kedelapan lokus sebesar 0,6768. Hasil penelitian juga menunjukkan genotipe BB pada lokus BM 143 dan genotipe AC pada lokus CSN-3 berpengaruh nyata terhadap nilai pemuliaan produksi susu.

DAFTAR PUSTAKA

- ANGGRAENI, A. dan N. RAHMANI. 2002. Identifikasi Keunggulan Genetik Produksi Susu Sapi Perah Friesian-Holstein di BPTU Baturraden. Belum dipublikasikan.
- ARRANZ, J.J., W. COPPIETERS, P. BERZI, N. CAMBISANO, B. GRISART, L. KARIM, F. MARCQ, L. MOREAU, C. MEZER, J. RIQUET, P. SIMON, P. VANMANSHOVEN, D. WAGENAAR and M. GEORGES. 1998. A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: a confirmation. *Anim. Genet.* 29: 107-115.
- ASWELL, M.S., C.E. REXROAD Jr., R.H. MILLER and P.M. VANRADEN. 1998. Detection of loci affecting

production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. *Anim. Genet.* 28: 216-222.

- BAWDEN, W.S. and K.R. NICHOLAS. 1999. Molecular Genetics of Milk Production : In The Genetics of cattle Edited R. Fries and A. Ruvinsky. CAB International. New York. USA.
- BISHO, P., M.D., S.M. KAPPES, J.W. KEELE, R.T. STONE, S.L.F. SUNDEN, G.A. HAWKINS, S.S. TOLDO, R. FRIES, M.D. GROSZ, J. YOO and C.W. BEATTIE. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136 :619-639.
- BOBE, G., D.C. BEITZ, A.E. FREEMAN and G.L. LINDBERG. 1999. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. *J. Dairy Sci.* 82: 2797-2804.
- CHEN, H.Y., Q. ZHANG, C.C. YIN, C.K. WANG, W.J. GONG and G. MEI. 2006. Detection of quantitative trait loci affecting milk production traits on bovine chromosome 6 in Chinese Holstein population by the daughter design. *J. Dairy Sci.* 89: 782-790.
- FALAKI, M., N. GENGLER and M. SNEYERS. 1997. Relationships of polymorphisms for growth hormone receptor gene with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy. Sci.* 79: 1446-1453.
- GEORGES, M., D. NIELSON and M. MACKINNON. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139: 907-920.
- GROENVELD, E. 1999. PEST User's Manual. Institute of Animal Husbandry and Animal Behaviour, Federal Agricultural Research Centre, Germany.
- HEYEN, D.W., J.I. WELLER, M. RON, J.E. BEEVER, E. FELDMESSER, Y. DA, G.R. WIGGANS, P.M. VANRADEN and H.A. LEWIN. 1999. A genom scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol. Genom.* 1: 165-175.

- IBEAGHA-AWEMU, E.M. and G. ERHARDT. 2005. Genetic structure and differentiation of 12 African *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds, inferred from protein and microsatellite polymorphisms. *J. Anim. Breed. Genet.* 122: 12-20.
- KHATKAR, M.S., P.C. THOMSON, I. TAMMEN and H.W. RAADSMAN. 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: Review and meta-analysis. *Genet. Sel. Evol.* 36: 163-190.
- KIM, K.S., J.S. YEO and C.B. CHOI. 2002. Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data. *Anim. Genet.* 33: 201-204.
- KUČEROVA, J., M.S. LUND, P. SØRENSEN, G. SAHANA, B. GULDBRANDTSEN, V.H. NIELSEN, B. THOMSEN and C. BENDIXENT. 2006. Multitraits quantitative trait loci mapping for milk production traits in Danish Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 89: 2245-2256.
- KÜNH, C.H., G. FREYER, R. WEIKARD, T. GOLDAMMER and M. SCHWERIN. 1999. Detection of QTL for milk production traits in cattle by application of specifically developed marker map of BTA6. *Anim. Genet.* 30: 333-340.
- MAO, Y., H. CHANG, Z. YANG, L. ZHANG, M. XU, W. SUN, G. CHANG and G. SONG. 2007. Genetic structure and differentiation of three Chinese indigenous cattle populations. *Biochem Genet.* 45:195-209.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- NEI, M. and S. KUMAR. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. Inc. New York.
- PLANTE, Y., J.P. GIBSON, J. NADESALINGAM, H. MEHRABANI-YEGANEH, S. LEFEBRE, G. VANDERVOORT and G.B. JANSEN. 2001. Detection of quantitative trait loci affecting milk production traits on 10 chromosomes in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 84: 1516-1524.
- PANDEY, A.K., N. SHARMA, Y. SINGH, B.B. PRAKASH and S.P. AHLAWAT. 2006. Genetic diversity studies of Kheringharh cattle based on microsatellite markers. *J. Genet.* 85(2):117-222.
- RAHMANI, N, MULADNO dan C. SUMANTRI. 2004. Analisis polimorfisme gen *bovine growth hormone* (bGH) pada sapi perah Friesian Holstein di BPTU Baturraden. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4-5 Agustus. 2004. hlm. 183-194.
- RENAVILLE, R., N. GENGLER, E. VRECH, A. PRANDI, S. MASSART, C. CORRADINI, C. BERTOZZI, F. MORTIAUX, A. BURNY and D. PORTETELLE. 1997. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.* 80: 3431-3438.
- RON, M., M. BAND, A. YANAI and J.J. WELLER. 1994. Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellite in a commercial dairy cattle population. *Anim. Genet.* 25: 259-294.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH and T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbour Lab. Press. New York.
- SODHI, M., M. MUKESH, B.P. MISHRA, K.R. MITKARI, B. PRAKASH and S.P. AHLAWAT. 2005. Evaluation of genetic differentiation in *Bos indicus* cattle breeds from Marathawada region of India using microsatellite polymorphism. *Anim. Biotechnol.* 16: 127-137.
- SODHI, M., M. MUKESH, B. PRAKASH, S.P. AHLAWAT and R.C. SOBTI. 2006. Microsatellite DNA typing for assesment of genetic variability in Tharparkar breed of Indian zebu (*Bos indicus*) cattle, a mayor breed of Rajasthan. *Anim. Genet.* 85: 165-170.
- (SAS) STATISTICS ANALYTICAL SYSTEM. 2000. *SAS User's Guide*. SAS Inst. Inc. North Carolina. USA.
- SUMANTRI, C., A. ANGGRAENI, R.R.A. MAHESWARI, K. DIWYANTO, A. FARAJALLAH dan B. BRAHMANTIYO. 2004. Frekuensi gen kappa kasein (κ -kasein) pada sapi perah FH berdasarkan produksi susu di BPTU Baturraden. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4-5 Agustus 2004. hlm. 175-182.
- TEGELSTROM, H. 1992. Mitochondrial DNA in natural population. An improved routine for screening of genetic variation based on sensitive silver staining. *Electrophoresis* 7: 226-229.
- VAN TASSEL C.P., M.S. ASHWELL and T.S. SONSTEGARD. 2000. Detection of putative loci affecting milk, health, and conformation traits in US Holstein population using 105 microsatellite markers. *J. Dairy Sci.* 83: 1865-1872.
- VELMALA, R., J. VILKKI, K. ELO, D.J. DEKONING and A.V. MAKI-TANILA. 1995. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Anim. Genet.* 30:136-143.
- VITALA, S.M., N.F. SCHULMAN, D.J. DE KONING, K. ELO, R. KINOS, A. VIRTA, J. VIRTA, A. MÄKI-TANILA and J.H. VIKKI. 2003. Quantitative trait loci affecting milk production traits in Finnish Ayrshire dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86: 1828-1836.
- WELLER, J.I. 2001. *Quantitative Trait Loci Analysis in Animals*. CABI Publishing. New York. USA.