DISTRIBUSI DAN FREKUENSI GEN KEJADIAN DELESI DAN MUTASI PADA EXON-14 GEN MX1 (GEN RESISTEN TERHADAP VIRUS INFLUENSA) PADA BERBAGAI BANGSA BABI

Sumantri, C.

Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Ternak, Jurusan Ilmu Produksi Ternak, Fakultas Peternakan IPB

ABSTRACT

The study was done to know the distribution and frequency gene the incidence of deletion and mutation in exon 14th of Mx1 gene in pig. Six hundred base pairs at the position (1937 to 2537) of the 14th exon of the pig Mx1 gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) from 15 breed of pig DNA sample. The amplified PCR products were digested by Nar I enzyme that called Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) technique. The results show genetic polymorphism at the 14th exon of pig Mx1 gene. The Nar I digested revealed three phenotyphic variation (C/C, C/N and N/N, designated for Nar I cut homozygote, heterozygote and for Nar I no cut homozygote, respectively). Type 1, the Nar I (N/N or C/N) is corresponding to the deletion 11 bp at the position 2064 to 2075. This type was observed only in Landrace breed. Type 2, the Nar I (N/N or C/N) is corresponding to incidence of two point mutation at the position 2065 Guanine (G) change to Thymine (T) and at the position 2124 Guanine (G) change to Adenine (A). This type was observed in Chinese native pig (Meishan), Vietnamese native pig (I and Moncai), Yucatan miniature and Goettingen. The gene frequency of (N) type 1 observed most commontly in Landrace (0.49). The (N) type 2 observed in Meishan (0.63), I pig (0.86), Mongcai (0.25), Yucatan miniature (0.25) and Goettingen (0.25).

Key words **: Deletion, mutation, frequency gene, pig Mx1 gene and PCR-RFLP.**

PENDAHULUAN

Pada mencit ketahanan tubuh terhadap virus influensa (*mycovirus*) ternyata dikontrol oleh gen Mx1 (Staeheli *et al.* 1988). Runutan gen Mx1 mencit telah dilaporkan oleh Hug *et al.*, (1988) terdiri dari 14 exon dengan total panjang runutan DNAnya sekitar 5,5 Kilo basa (Kb).

Staeheli *et al.* (1988) juga melaporkan gen Mx1 mencit dikontrol oleh dua alel yaitu $Mx1^{+}$ dan $Mx1^{-}$. Alel $Mx1^{+}$ sangat resisten terhadap influensa dan ditemukan umumnya pada mencit liar, sebaliknya alel $Mx1^{-}$ sangat rentan ditemukan umumnya pada mencit laboratorium. Alel $Mx1^{+}$ memberikan kode kepada interferon (IFN) –alpha dan beta untuk memproduksi 72 Kda Mx1 protein yang berfungsi untuk memblokir replikasi virus didalam inti. Alel $Mx1^{-}$, tidak mampu memproduksi protein Mx1 disebabkan oleh dua hal (1) adanya delesi pada exon 9, 10 dan 11, kasus ini ditemukan pada strain mencit C57BL/6J, C3H/HeJ dan BALB/cJ. Dan (2) adanya mutasi pada exon 10, kasus ini ditemukan pada strain mencit CBA/J.

Gen Mx I pada babi menurut Muller *et al.*, (1992) juga terdiri dari 14 exon dengan total panjang runutan DNAnya 2,54 Kb dan sekuense asam aminonya menunjukkan homologi yang tinggi dengan mencit. Mx1 protein pada babi juga ditemukan homolog dengan berbagai spesies lainnya seperti pada manusia (Aebi *et al.*, 1989), domba (Charleston dan Stewart, 1993), itik (Bazzigher *et al.*, 1993), ayam (Bernasconi *et al.*, 1995), sapi (Ellinwood *et al.*, 1998) dan ikan (Leong *et al.*, 1998).

Sumantri *et al.* (2001) telah melaporkan adanya kejadian delesi dan mutasi pada exon-14 gen Mx1 babi. Dengan ditemukannya delesi dan mutasi tersebut, maka penelitian ini bertujuan: (1) untuk mengetahui lebih lanjut tentang distribusi dan frekuensi gen kejadian delesi atau mutasi pada berbagai bangsa babi dan (2) untuk mengetahui hubungan antara delesi dan mutasi dengan resistensi terhadap influensa pada berbagai bangsa babi.

Sampel DNA dari 15 bangsa babi diisolasi, dan sepanjang enam ratus pasangan basa pada exon-14 posisi 1937 sampai dengan 2537 telah berhasil diamplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pemotongan hasil produk PCR dilakukan dengan mengunakan enzim restriksi Nar I yang disebut *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) tekhnik. Hasil dari PCR-RFLP menunjukkan adanya polimorfisme dengan tiga variasi fenotipik dengan simbul (C/C dapat dipotong homozigot, C/N dapat dipotong heterozigot dan N/N tidak dapat dipotong homozigot). N/N atau C/N tipe 1 diakibatkan oleh adanya delesi 11 bp pada 2064 s/d 2075. Tipe ini hanya ditemukan pada bangsa babi Landrace. N/N atau C/N tipe 2 diakibatkan oleh adanya dua mutasi pada posisi 2065 Guanin (G) berubah menjadi Thimin (T) dan pada posisi 2124 Guanin (G) berubah menjadi Adenin (A), type ini ditemukan pada bangsa babi asli dari China (Meishan) dan babi asli dari Vietnam (I dan Mongcai), Yucatan miniature dan babi Jerman (Goettingen).

Frekuensi gen (N) tipe 1, pada umumnya hanya ditemukan pada Landrace (0.49). Frekuensi gen (N) tipe 2 ditemukan pada Meishan (0,63), I (0,86), Mongcai (0,25), Yucatan miniature (0,25) dan Goettingen (0,25).

MATERI DAN METODE

Analisis PCR-RFLP

Ektraksi DNA dilakukan menurut Sambrook *et al.* (1989) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 302 sampel kulit telinga lebih kurang seluas (5 mm²) dari 15 bangsa babi diekstrasi untuk diambil DNAnya. Setiap sampel kulit telinga dimasukkan kedalam tabung *eppendorf* 1,5 ml yang berisi 70 µl NP-40 buffer, 500 µl SDS buffer dan 10 µl proteinase-K (10 mg/ml). Larutan dalam tabung dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu 55 °C dalam waterbath selama 24 jam. Setelah itu, tambahkan 4 µl Rnase (0.1µg /ml) dan diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 2 jam. Setelah proses inkubasi selesai, kedalam larutan ditambahkan 30 µl 3M Na-asetat dan 300 µl phenol. Tabung disentrifugasi 15000 rpm selama 5 menit, supernatan dipindahkan kedalam tabung baru, tambahkan 1,2 ml etanol dan sentrifugasi 15000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, endapan putih dalam tabung dikeringkan. Setelah pengeringan selesai tambahkan 500 µl milique water steril atau TE buffer steril.

Analisis PCR dilakukan dengan cara sebagai berikut. 50 ng sampel DNA, 50 ng primer *forward* (F) dengan runutan DNA (5` AAG CGC ATC TCC AGC CAC ATC), 50 ng primer *reverse* dengan runutan DNA (5` TGA CCC TTC TAT GAT GCT ATG), 2 µl 15 mM $MgCl_2$, 2 µl 2 mM dNTPs dan 0,2 µl 4 Unit AmpliTaq gold DNA polimerase dan tambahkan milique water steril sampai total volume 20 µl. Tabung tersebut dimasukkan kedalam mesin PCR dengan program sebagai berikut. Tahap 1, proses denaturasi 94 °C selama 10 menit, 1 X ulangan. Tahap 2, proses denaturasi pada 94 °C selama 30 detik, diikuti dengan proses *annealing* (penggabungan kembali) pada suhu 55 °C selama 30 detik dan proses ektensi pada suhu 72 °C selama 1 menit. Seluruh proses pada Tahap 2 dilakukan dengan 40 X ulangan. Tahap 3, ektensi tambahan pada suhu 72 °C selama 5 menit, 1 X ulangan.

Analisis PCR-RFLP dilakukan dengan cara produk PCR, dipotong dengan enzim restriksi Nar I. Sebanyak 5 µl DNA produk PCR, 0,2 µl 5 Unit Nar I, 1 µl 10x *low* buffer dimasukkan kedalam 0,5 ml *eppendorf*, tambahkan milique water steril sampai volume total 10 µl, dan inkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam.

Elekroforesis dilakukan sebagai berikut: 5 µl produk PCR-RFLP, 2 µl loading dye, 3 µl milique water dicampurkan secara homogen dan kemudian dimasukkan kedalam sumur gel agarose 1%. Elektroforesis dilakukan dengan 50 Volt, selama 25 menit dan pewarnaan dengan etidium bromide selama 20 menit. Pemotretan gel dilakukan diatas UV transiluminator dengan kamera polaroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis produk PCR exon-14 gen Mx1 sepanjang 600 bp pada posisi (1937 sampai dengan 2537) dari sampel DNA Berkshire, Duroc, Goettingen, Large White, Landrace, Yucatan mini, babi China (Meishan) dan babi Vietnam (Homong, I pig dan Mongcai) teramplifikasi dan dipotong oleh enzim restriksi Nar I (PCR-RFLP) diperlihatkan pada Gambar 1 dan pola DNA sekuennya dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil memperlihatkan adanya tiga variasi fenotipe yang dapat digambarkan sebagai berikut : (1) Satu garis pita menunjukkan bahwa kedua rantai DNA tidak bisa dipotong oleh enzim Nar I, diberi kode N/N (homozigot); (2) Dua garis pita menunjukkan bahwa kedua rantai bisa dipotong oleh enzim Nar I, diberi kode C/C (homozigot); dan (3) Tiga garis pita menunjukkan bahwa ada satu rantai DNA yang bisa dipotong, dan pasangannya tidak bisa dipotong diberi kode C/N (heterozigot).

N/N tipe 1, diakibatkan oleh adanya faktor delesi sepanjang 11 bp (GGCGCCGGCTC) dari posisi 2064 sampai dengan 2075. Tipe ini hanya ditemukan pada babi Landrace sebagai contoh individu L5-39 No.5. N/N tipe 2, diakibatkan oleh adanya dua mutasi pada posisi 2065 Guanin (G) berubah menjadi Thimin (T) dan pada posisi 2124 Guanin (G) berubah menjadi Adenin (A). Kasus ini ditemukan pada Meishan M6-27 No. 12 dan I pig IL-31 No.17. Tipe C/C dapat dipotong oleh enzim Nar I, disebabkan oleh tidak adanya delesi maupun mutasi pada DNA sekuennya, seperti yang terlihat pada bangsa babi Large White (W3-288) No. 4, Duroc (D5-757) No.7, Berkshire (B-2303) No.16. dan Homong (HL4) No.18

Tabel 1. Sekuensing Exon-14 Gen Mx1 pada Berbagai Bangsa Babi

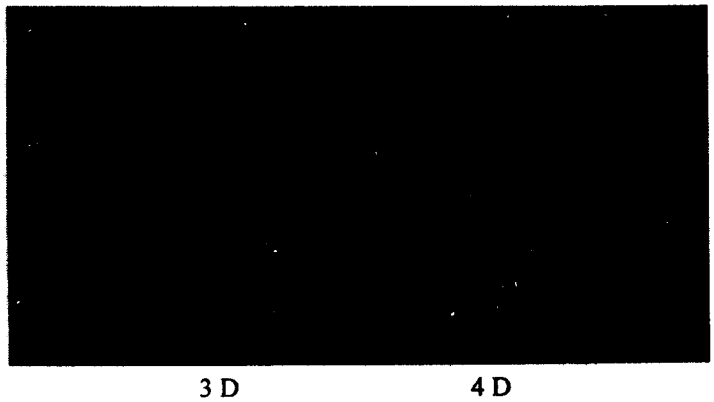
Bangsa Babi	Type Nar I C: bisa dipotong N: Tidak bisa dipotong (No identitas)	Pola sekuen gen Mx I pada posisi 2051 s/d 2131 bp
Large White	CC (W3-288)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Yucatan Mini	CC (Y6-60)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Duroc	CC(D5-757)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Berkshire	CC(B-2303	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Goetingen	CC(G2-101)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Homong	CC(HL4)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Mongkai	CC(Mc-57)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
I pig	NN(IL-31)	CTGACCCAGG CTCTGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AAGGCACGT
Meishan	NN(M6-27)	CTGACCCAGG CTCTGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AAGGCACGT
Meishan	CC(M6-88)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Landrace	CC(L-133)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Landrace	NN(L5-39)	CTGACCCAGG CTC ———————— GCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Babi Liar (Jepang)	CC(WI-2104)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT

Sumber Sumantri *et al* (2001)

Gambar 1. Superpool No. 7, 8, 11, 13, 19 dan 21 Menunjukkan Positif Terhadap Exon-3 Gen Mx Babi dengan Panjang Molekul 193 bp

Gambar 2. Superpool No. 3, 4, 7, 8, 11, 13, 19 dan 20 Menunjukkan Positif Terhadap Exon-14 Gen Mx 1 Babi dengan Panjang Molekul 594 bp

Gambar 3. Superpool No. 7 Menunjukkan Positif Pada Jalur 5 untuk Skreening (1-D) dan Pada Jalur 3 (2-D)



Gambar 4. Superpool No. 7 Menunjukkan Positif Pada Jalur 7 untuk Screening (3-D) dan Pada Jalur 4 untuk (4-D)

Pada kasus delesi yaitu hilangnya rantai DNA sepanjang 11 bp (2064 sd 2075) dan mutasi gen, enzim restriksi Nar I tidak bisa memotong rantai DNA disebabkan oleh runutan DNA pengkodenya hilang atau berubah. Enzim restriksi Nar I pada gen Mx1 mempunyai satu daerah runutan DNA pengkode (*Recognition sequence*) yang spesifik dengan runutan basa DNA GGCGCC.

Distribusi geographi dan frekuensi gen dari kejadian delesi dan mutasi diperlihatkan pada Tabel 2. Frekuensi gen (N) tipe 1, pada umumnya hanya ditemukan pada Landrace (0.49). Frekuensi gen (N) tipe 2 ditemukan pada Meishan (0.63), I (0.86), Mongkai (0.25), Yucatan mini (0.25) dan Goettingen (0.25). N/N tipe 1 (delesi) dan tipe 2 (mutasi) tidak ditemukan pada bangsa babi Large White dan Duroc, kemungkinan bisa disebabkan oleh jumlah sampel yang masih sedikit, sehingga kurang mewakili populasi yang sebenarnya.

Tabel 2. Distribusi Geography dan Frekuensi Gen Kejadian Delesi dan Mutasi Gen Mx 1 Exon-14 pada Berbagai Bangsa Babi

Bangsa Babi	Jumlah Individu	Phenotife			Frekuensi gen	
		C/C	C/N	N/N	C	N
Landrace	79	17	47	15	0,51	0,49
Large White	29	29	0	0	1,00	0,00
Duroc	18	18	0	0	1,00	0,00
Berkshire	3	3	0	0	1,00	0,00
Hamshire	1	1	0	0	1,00	0,00
Goettingen	2	1	1	0	0,75	0,25
Meishan	39	6	23	10	0,37	0,63
Cheju	3	3	0	0	1,00	0,00
Jinhau	1	1	0	0	1,00	0,00
Homong	9	9	0	0	1,00	0,00
I	7	0	2	5	0,14	0,86
Mongcai	12	7	4	1	0,75	0,25
Clawn miniature	2	2	0	0	1,00	0,00
Yucatan miniature	2	1	1	0	0,75	0,25
Babi Liar Jepang	4	4	0	0	1,00	0,00

Gen delesi atau mutasi Mx 1exon-14 pada babi dikontrol oleh dua alel secara kodominan dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil ini sesuai dengan yang ditemukan pada mencit oleh Staeheli *et al.* (1988) yaitu $Mx1^{+}$ dan $Mx1^{-}$.

Perubahan struktur Mx1 protein pada kasus delesi dan mutasi pada mencit dijelaskan oleh Staeheli *et al.*, (1993). Struktur Mx1 protein mempunyai dua fungsi domain yaitu : (1) Domain terminal-N sebagai regulator GTP (guanosine-5'-triphosphate) binding protein yang berkemampuan mengikat dan menghidrolisa GTP. (2) Domain terminal-C yang berperanan penting sebagai regulator protein binding protein terutama dalam interaksi protein dengan protein, karena domain ini kaya akan *leucine zipper motif*. GTP binding protein dan regulator protein binding-protein ini merupakan faktor penting dalam menghambat aktivitas virus. Terjadinya delesi dan mutasi pada kedua domain ini, akan mengakibatkan individu mencit tersebut menjadi rentan terhadap influensa.

Tabel 3. Pola Pewarisan Mutasi pada exon-14 Gen Mx 1 pada Persilangan Goettingen tipe (C/C) dengan Meishan tipe (C/N)

Tipe Persilangan	Jumlah Ternak	Penotipe			Frekuensi Gen		$\chi 2$	
		C/C	C/N	N/N	C	N	Hit	Tabel
C/C x C/N	23	6	17	0	0,63	0,37	0,08tn	3,87
C/N x C/N	68	22	28	18	0,53	0,47	0,04tn	5,99

Perubahan struktur Mx1 protein pada kasus delesi dan mutasi pada exon-14 pada babi belum menunjukkan adanya hubungan yang positive dengan resistensi terhadap influensa. Hasil sementara berdasarkan pencatatan data kematian akibat influensa tidak mempunyai kaitan yang erat dengan terjadinya delesi maupun mutasi Mx1 pada exon ke–14 (Data tidak terlampir). Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh exon-14 tidak mengontrol dua fungsi domain terminal-N sebagai regulator GTP *binding protein* dan domain terminal-C sebagai GTP *binding protein* dan *regulator protein binding-protein* yang mempunyai peranan penting dalam menghambat aktivitas virus. Hasil yang sama juga ditemukan pada itik (Bazzigher *et al.* 1993) dan ayam (Bernasconi *et al.* 1995), yang menyatakan bahwa Mx1 protein pada unggas kurang mempunyai kemampuan dalam menghambat aktivitas virus influensa.

KESIMPULAN

Hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: (1) Delesi ditemukan hanya pada babi bangsa Landrace. (2) Mutasi ditemukan pada bangsa babi China (Meishan), babi Vietnanm (I dan Mongcai) dan juga pada babi Goettingen. (3) Perubahan struktur Mx1 protein pada kasus delesi dan mutasi pada exon-14 pada babi belum menunjukkan adanya hubungan yang positive dengan resistensi terhadap influensa.

DAFTAR PUSTAKA

Aebi, M., J. Fah., N. Hurt., C.C. Samuel., D. Thomis., L. Bazzigher., J. Pavlovic, O. Haller & P. Staeheli. 1989. *cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins*. Mol.Cell.Biol. 9(11):5062-5072 .

Bazzigher, L., A. Schwarz, & P. Staeheli. 1993. *No enhanced influenza virus resistance of murine and avian cells expressing cloned duck Mx protein*. Virology. 195(1):100-112.

Bernasconi,D., U.Schultz, & P. Staeheli. 1995. *The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity*. Virology. 15(1):47-53.

Charleston, B. & H.J. Stewart.1993. *An interferon-induced Mx protein: cDNA sequence and high level expression in the endometrium of pregnan sheep*. Gene. 137 (2):327-331.

Ellinwood, N.M., J.M. McCue, P.W. Gordy, & R.A. Bowen. 1998. Cloning and characterization of cDNAs for a bovine (Bos taurus) Mx protein. *J. Interferon Cytokine Pres.* 18 (9):745-755.

Hug, H., M. Costas., P. Staeheli., M. Aebi. & C. Weissmann. 1988. Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon and virus-inducible promotor. *Molec. Cell. Biol.* 8,3065-3079.

Leong, J.C., G.D. Trobridge, C.H. Kim, M. Johnson, & B. Shimon. 1998. Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunol Rev.* 166:349-363.

Muller, M., E.L. Winnacker, & G. Brem. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *J. Interferon Res.* 12(2):119-129.

Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring* Harbour Lab. Press. New York.

Staeheli, P., R. Grob, E. Meir, J.G. Sutcliffe. & O. Haller. 1988. Influenza-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol. Cell. Biol.* 8(10):4518-4523.

Staeheli,P., F. Pitossi & J. Pavlopic. 1993. Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends Cell Biol.* 3,268-272

Sumantri,C., T. Morozumi & N. Hamashima. 2001. Deteksi delesi dan mutasi pada gen Mx1 (gen resisten terhadap virus influensa) pada babi dengan PCR-RFLP Nar I restriksi. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(1):34-37.