

IDENTIFIKASI KERAGAMAN GEN GH, GHRH, DAN PIT-1 PADA KERBAU DI PROVINSI BANTEN

(Identification of GH, GHRH, and Pit-1 Genes Polymorphism in Buffalo at
Banten Province)

ROHMAT D¹, C. SUMANTRI¹ dan A. FARAJALLAH²

¹Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Rasamala Kampus IPB Darmaga Bogor

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

The objectives of this study were to get information of genetic variation of Banten buffalo population consisted of Pandeglang and Lebak subpopulations. Three loci of growth hormone genes (GH|*MspI*, GHRH|*HaeIII* and Pit-1|*HinfI*) were used on molecular polymorphism study. Molecular analysis showed that GH|*MspI* and GHRH|*HaeIII* loci of Banten population were polymorphic, while Pit-1|*HinfI* locus was monomorphic. Genetic polymorphisms of GH|*MspI* locus was low showed by expected heterosigosity value ($H_e = 0.0469$). While, genetic polymorphisms of GHRH|*HaeIII* locus was higher ($H_e = 0.4908$). F_{IS} index showed negative value indicated that there was a random mating system in Banten buffalo population. F_{IT} value for GH|*MspI* locus near to 0 (- 0.0207) indicated that there was a balanced population according to Hardy-Weinberg principle. A bias of Hardy Weinberg principle was on GHRH|*HaeIII* locus showed by F_{IT} value near to -1 (- 0.7224). Population differentiation indicator, F_{ST} index showed a small value (0.0024) indicated that differentiation of Banten population to two subpopulations (Pandeglang and Lebak) only decreased a small number of genetic diversity (0.24%).

Key Words: Polymorphism, Growth Hormone Genes, Buffalo, Banten

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk: mengidentifikasi polimorfisme gen GH, GHRH dan Pit-1 pada lokus GH|*MspI*, GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI* pada populasi kerbau Banten di Kabupaten Pandeglang dan Lebak. Identifikasi polimorfisme lokus GH|*MspI*, GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI* dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms* (PCR-RFLP). Lokus GH|*MspI* dan GHRH|*HaeIII* bersifat polimorfik, sedangkan lokus Pit-1|*HinfI* bersifat monomorfik pada populasi kerbau Banten. Alel GH (-) pada lokus GH|*MspI* hanya ditemukan pada subpopulasi Pandeglang dengan frekuensi 0,04. Frekuensi genotipe GH (+/+) dan GH (+/-) pada subpopulasi Pandeglang adalah 0,92 dan 0,08. Pada subpopulasi Lebak, lokus GH|*MspI* bersifat monomorfik dengan hanya ditemukannya alel GH (+). Pada subpopulasi Pandeglang, frekuensi alel A dan B lokus GHRH|*HaeIII* adalah 0,41 dan 0,59, sedangkan pada subpopulasi Lebak adalah 0,3 dan 0,57. Pada subpopulasi Pandeglang, frekuensi genotipe AB dan BB lokus GHRH|*HaeIII* adalah 0,86 dan 0,14, sedangkan pada subpopulasi Lebak adalah 0,81 dan 0,19. Pada populasi total Banten Lokus GH|*MspI* mempunyai keragaman yang rendah ($H_e = 0,0469$) dan lokus GHRH|*HaeIII* mempunyai keragaman yang tinggi ($H_e = 0.4908$). Nilai F_{IT} untuk lokus GH|*MspI* pada populasi kerbau di Banten mendekati nilai 0 (- 0,0207) Penyimpangan keseimbangan Hardy-Weinberg terjadi pada lokus GHRH|*HaeIII* ditunjukkan dengan nilai F_{IT} mendekati -1 (- 0,7224). Populasi kerbau Banten mempunyai nilai F_{ST} rata-rata sebesar 0,0024.

Kata Kunci: Ukuran Tubuh, Polimorfisme, Gen Hormon Pertumbuhan, Kerbau, Banten

PENDAHULUAN

Penurunan populasi kerbau hampir terjadi di semua wilayah nusantara yang merupakan basis pengembangan populasi kerbau, termasuk

di Provinsi Banten. Penurunan populasi yang tidak terkontrol dikhawatirkan akan mengakibatkan hilangnya gen-gen penting yang terkait dengan daya hidup dan kemampuan reproduksi serta gen-gen yang

mengontrol sifat ekonomis. Upaya peningkatan mutu genetik ternak dapat dilakukan melalui seleksi terhadap sifat yang mempunyai nilai ekonomis tinggi. Salah satu sifat yang bernilai ekonomi tinggi yaitu sifat pertumbuhan. Kemajuan dalam bidang biologi molekuler berupa penerapan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), memungkinkan upaya seleksi dapat dilakukan dengan bantuan marka molekuler yang telah terbukti mengontrol sifat ekonomis. Kandidat gen yang dapat digunakan yaitu gen yang tergabung dalam keluarga hormon pertumbuhan diantaranya gen *growth hormone* (GH), *growth hormone releasing hormone* (GHRH), dan *pituitary transcription factor* (Pit-1). Gen-gen ini merupakan pengontrol sifat pertumbuhan yang keberadaan dan polimorfismenya penting untuk mendukung seleksi terhadap sifat pertumbuhan. Pada penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa terdapat polimorfisme pada ketiga gen tersebut khususnya pada sapi yaitu pada pada lokus GH|*MspI* (ZHANG *et al.*, 1992), GHRH|*HaeIII* (MOODY *et al.*, 1995) dan Pit-1|*HinfI* (WOLLARD *et al.*, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme gen GH, GHRH dan Pit-1 pada lokus GH|*MspI*, GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI* pada populasi kerbau Banten di Kabupaten Pandeglang dan Lebak.

MATERI DAN METODE

Sampel kerbau

Sampel kerbau yang digunakan untuk analisis keragaman lokus GH|*MspI*, GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI* sebanyak 77 ekor yang terdiri dari 44 ekor dari Pandeglang dan 33 ekor dari Lebak. Pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling* yaitu dipilih pada lokasi dengan kepadatan ternak kerbau tinggi.

Pengambilan sampel darah

Darah diambil dari *vena jugularis* sekitar 2 ml dengan menggunakan tabung vacutainer berheparin. Sampel darah tersebut selanjutnya direndam dalam etanol 95% untuk menghindari kerusakan sel-sel darah.

Isolasi DNA total

DNA diisolasi menggunakan metode fenol kloroform (SAMBROOK dan RUSSEL 2001).

Sampel darah total yang disimpan dalam etanol 95% disentrifugasi 3500 rpm selama 5 menit. Endapan sel-sel darah yang diperoleh dicuci dengan buffer TE sebanyak 2 kali. Sekitar 100 μ l sel-sel darah yang telah bebas dari etanol disuspensikan dengan 1 \times STE sampai volume mencapai 350 μ l. Sel-sel darah kemudian dilisis dengan 20 μ l proteinase K (10 mg/ml) dan 40 μ l 10% SDS. Campuran ini dikocok pelan-pelan selama 2 jam pada suhu 55°C.

Pemurnian DNA dilakukan dengan metode fenol-kloroform, yaitu dengan menambahkan 1/10 volume 5 M NaCl, 1 \times volume larutan fenol, dan 1 \times volume kloroform iso amil alkohol (24 : 1), kemudian dikocok pelan-pelan pada suhu ruang selama 2 jam. Fase DNA dipisahkan dari fase fenol dengan sentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 5 menit. Molekul DNA diendapkan dengan menambahkan 1/10 \times volume 5 M NaCl dan 2 \times volume etanol absolut. Endapan DNA yang dihasilkan selanjutnya dicuci dengan etanol 70% kemudian diendapkan lagi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit. Sisa etanol dibuang dan diuapkan dengan menggunakan pompa vakum. DNA selanjutnya dilarutkan dengan 80 μ l 80% buffer TE.

Amplifikasi gen dengan teknik PCR

Pasangan primer digunakan untuk mengapit sekuens DNA target pada reaksi PCR, untuk GH|*MspI* berdasarkan MITRA *et al.* (1995), GHRH|*HaeIII* (MOODY *et al.*, 1995) dan Pit1|*HinfI* (WOLLARD *et al.*, 1994). Reaksi PCR dilakukan dengan volume total 25 μ l dari campuran larutan yang terdiri dari 10 sampai 100 ng DNA genom, 1 U enzim taq polimerase dan 10 \times buffernya (New England Biolab); 2 mM dNTP mix; 2.5 mM MgCl₂ dan dH₂O steril. Kondisi reaksi PCR dilakukan dengan suhu pradenaturasi 94°C selama 4 menit, selanjutnya 30 siklus reaksi yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 10 detik, *annealing* (suhu spesifik primer) selama 1 menit, perpanjangan 72°C selama 2 menit. Pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Suhu *annealing* untuk primer lokus GH|*MspI*, GHRH|*HaeIII*, dan Pit1|*HinfI* secara berurutan yaitu: 62, 60 dan 60°C.

Genotiping teknik RFLP

Produk PCR selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi yang spesifik dengan gen tersebut. Enzim restriksi yang digunakan untuk gen GH, GHRH dan Pit-1 secara berurutan

yaitu *MspI*, *HaeIII* dan *HinfI*. Enzim restriksi *MspI* mengenali situs restriksi C*CGG, sedangkan enzim restriksi *HaeIII* dan *HinfI* masing-masing mengenali situs GG*CC dan G*ANTC.

Visualisasi pita DNA

Visualisasi pola pita hasil RFLP menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid 6% yang diikuti dengan metode pewarnaan perak (*silver staining*). Gel dibuat dengan cara mencampurkan 12 ml air destilata, 4 ml larutan 5 x TBE, 4 ml larutan akrilamid 30%, 15 µl larutan TEMED, dan 160 µl APS 10%. Sebanyak 2 µl produk RFLP dicampur dengan ± 6 µl *loading dye* (bromthymol blue 0,01%, xilene cyanol 0.01 dan gliserol 50%). Elektroforesis dilakukan pada tegangan konstan 200 mVolt selama 40 menit. Pewarnaan gel dilakukan dengan pewarnaan perak, sedangkan untuk agarose dengan ETBr.

Analisis data

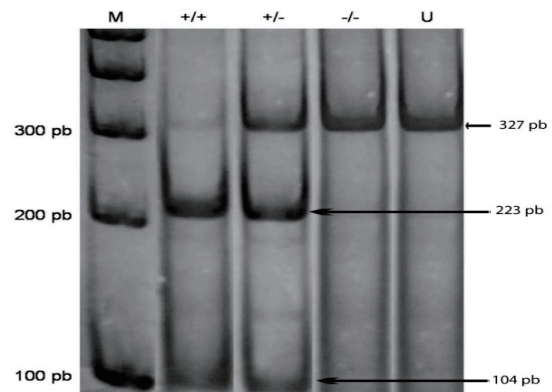
Analisis data molekuler lokus GH|*MspI*, GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI* pada populasi kerbau Banten meliputi frekuensi alel berdasarkan NEI DAN KUMAR (2000), keseimbangan Hardy-Weinberg, diuji dengan *chi-square* (χ^2), heterosigositas yang meliputi heterosigositas pengamatan (H_o) dan heterosigositas harapan (H_e), dan nilai-nilai indeks fiksasi meliputi F_{IS} , F_{IT} dan F_{ST} menurut HARTL (1988).

HASIL DAN PEMBAHASAN

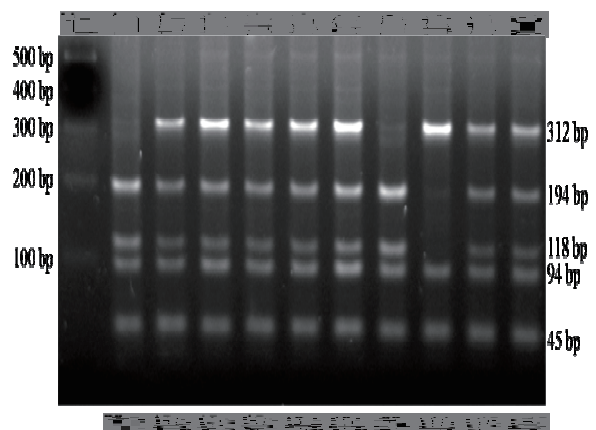
Keragaman gen GH| Frekuensi alel dan frekuensi genotipe

Hasil visualisasi PCR-RFLP lokus GH|*MspI*, GHRH|*HaeIII*, dan Pit-1 masing-masing diperlihatkan pada Gambar (1, 2 dan 3). Frekuensi alel, frekuensi genotipe dan keseimbangan Hardy-Weinberg (χ^2) untuk lokus GH|*MspI*, GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI* pada subpopulasi kerbau Pandeglang dan Lebak disajikan pada Tabel 1. Lokus GH|*MspI* bersifat polimorfik pada subpopulasi kerbau Pandeglang dengan frekuensi alel GH (+) yang tinggi yaitu 0,96, dan frekuensi alel GH (-) sebesar 0,04. Pada subpopulasi Lebak, lokus GH|*MspI* bersifat monomorfik dengan hanya ditemukannya alel GH (+). Tingginya frekuensi alel GH (+) ini juga ditemukan pada

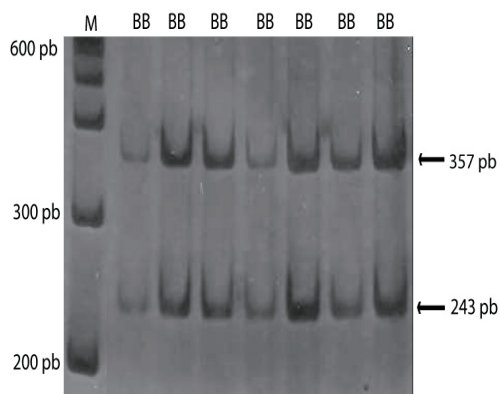
beberapa populasi ternak sapi (FALAKI *et al.*, 1996; LAGZIEL *et al.*, 2000). Lokus GHRH|*HaeIII* pada populasi kerbau di Banten bersifat polimorfik, baik pada subpopulasi Pandeglang maupun Lebak. Secara umum, frekuensi alel B lebih tinggi dibandingkan dengan alel A dan tidak ditemukan genotipe AA pada kedua subpopulasi. Pada populasi kerbau perah Murrah yang termasuk dalam kelompok kerbau sungai (*riverine buffalo*), lokus GHRH|*HaeIII* bersifat monomorfik dengan tidak ditemukannya alel A (RAJAMURUGAN *et al.*, 2007). Gen Pit-1 pada populasi kerbau di Banten, bersifat monomorfik. Berbeda dengan yang dilaporkan oleh Javanmard *et al.* (2005), bahwa pada populasi kerbau di Iran yang merupakan kerbau sungai (tipe perah), frekuensi alel A dan B dilaporkan sebesar 0,15 dan 0,85.



Gambar 1. Pola pita pemotongan ruas gen GH dengan enzim restriksi *MspI* pada gel Agarose 2%.



Gambar 2. Pola pita pemotongan ruas gen GHRH dengan enzim restriksi *HaeIII* pada gel Agarose 2%.



Gambar 3. Pola pita pemotongan ruas gen Pit-1 dengan enzim restriksi HinfI pada gel poliakrilamid 6%.

Heterosigositas dan indeks fiksasi pada subpopulasi Pandeglang dan Lebak

Berdasarkan Tabel 2, dapat diketahui bahwa keragaman genetik pada lokus GH|MspI di Pandeglang adalah rendah yang ditunjukkan dengan nilai heterosigositas pengamatan (H_o) sebesar 0,0811. Lokus GHRH|HaeIII mempunyai keragaman genetik yang tinggi baik pada subpopulasi Pandeglang dan Lebak dengan nilai heterosigositas pengamatan masing-masing 0,8636 dan 0,8125. Lokus Pit-1|HinfI bersifat monomorfik baik pada subpopulasi Pandeglang maupun Lebak. Perbedaan nilai H_o dan H_e pada lokus GHRH|HaeIII, baik pada populasi Pandeglang

maupun Lebak, mengindikasikan adanya ketidakseimbangan Hardy-Winberg pada populasi yang diamati (TOMBASCO *et al.*, 2003)

Heterosigositas dan indeks fiksasi pada populasi Banten

Secara keseluruhan nilai heterosigositas pengamatan (H_o) pada populasi kerbau di Banten sebesar 0,2966 dan nilai heterosigositas harapan (H_e) sebesar 0,1792. Perbedaan yang signifikan antara nilai H_o (0,8421) dan H_e (0,4908) dijumpai pada lokus GHRH|HaeIII yang mengindikasikan terjadinya penyimpangan keseimbangan Hardy-Weinberg pada lokus tersebut. Pada lokus GH|MspI tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai H_o dan H_e , sehingga tidak ada penyimpangan keseimbangan Hardy-Weinberg. Pada populasi kerbau di Banten, nilai H_o lebih tinggi dibandingkan dengan nilai H_e mengindikasikan bahwa belum ada kegiatan seleksi yang dilakukan secara intensif dengan menggunakan pejantan tertentu (MACHADO *et al.*, 2003).

Nilai FIS pada penelitian ini pada populasi Banten untuk semua lokus bernilai negatif. Nilai FIS yang bernilai negatif mengindikasikan bahwa pada populasi tersebut, sistem perkawinannya secara acak. Pada kedua lokasi di Pandeglang dan Lebak, ternak dibiarkan melakukan perkawinan sendiri pada saat ternak digembalakan. Hal ini berkaitan dengan belum adanya proses seleksi yang dilakukan oleh peternak baik di Banten

Tabel 1. Frekuensi alel, frekuensi genotipe dan keseimbangan Hardy-Weinberg (χ^2 dan p) pada subpopulasi Pandeglang dan Lebak

Subpopulasi	GH MspI			GHRH HaeIII			Pit-1 HinfI		
	Frek. Alel		χ^2 (p)	Frek. Alel		χ^2 (p)	Frek. Alel		χ^2 (p)
	+	-		A	B		A	B	
Pandeglang	0,96	0,04	0,04 (0,83)	0,41	0,59	24,68 (0,00)**	0,00	0,00	Td
Lebak	1,00	0,00	Td	0,43	0,57	14,33 (0,00)**	0,00	0,00	Td

** Menunjukkan nilai χ^2 yang menyimpang dari keseimbangan Hardy-Weinberg dengan $P < 0,01$

Tabel 2 Nilai heterosigositas pengamatan (H_o) dan heterosigositas harapan (H_e)

Lokus	Pandeglang			Lebak		
	N	H_o	H_e	N	H_o	H_e
GH MspI	37	0,0811	0,0789	26	0,0000	0,0000
GHRH HaeIII	44	0,8636	0,4963	32	0,8125	0,4901
Pit1 HinfI	44	0,0000	0,0000	33	0,0000	0,0000
Rata-rata	0,3193	0,2708	0,1634			

Tabel 3. Heterosigositas dan indeks fiksasi pada populasi Banten

Lokus	N	H _o H	e	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
GH/ <i>MspI</i>	63	0,0476	0,0469	-0,0423	-0,0207	0,0207
GHRH/ <i>HaeIII</i>	76	0,8421	0,4908	-0,7224	-0,7213	0,0007
Pit-1/ <i>HinfI</i>	77	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

dengan cara penggunaan pejantan tertentu untuk digunakan sebagai bibit.

Nilai F_{IT} untuk lokus GH/*MspI* pada populasi kerbau di Banten mendekati nilai 0 (-0,0207). Hal ini berarti bahwa distribusi genotipe gen tersebut memenuhi prinsip keseimbangan Hardy-Weinberg. Hasil yang sama juga dapat dilihat dari nilai *chi square* (Tabel 1) sebesar 0,04 ($P > 0,05$) yang menunjukkan adanya keseimbangan Hardy-Weinberg. Penyimpangan keseimbangan Hardy-Weinberg terjadi pada lokus GHRH/*HaeIII* ditunjukkan dengan nilai F_{IT} mendekati -1 (-0,7224). Hal ini terjadi karena kekurangan genotipe homosigot pada lokus tersebut, tetapi bukan karena adanya seleksi yang mengarah ke peningkatan frekuensi genotipe heterosigot. Pola perkawinan berlangsung secara acak seperti ditunjukkan dengan nilai F_{IS} yang bernilai negatif.

Nilai F_{ST} menunjukkan ada atau tidaknya diferensiasi genetik antar subpopulasi. Populasi kerbau Banten yang dipisah menjadi dua subpopulasi yaitu Pandeglang dan Lebak mempunyai nilai F_{ST} rata-rata sebesar 0,0024. Nilai F_{ST} lebih kecil dari 0,05 mengindikasikan diferensiasi genetik yang kecil (WRIGHT 1978), yang berarti bahwa pemisahan populasi Banten menjadi dua subpopulasi Pandeglang dan Lebak hanya akan menurunkan keragaman genetik yang tidak signifikan yaitu sebesar 0,24%. Hal ini berarti bahwa sebenarnya antara subpopulasi Pandeglang dan Lebak belum terdiferensiasi secara genetik berdasarkan lokus GH/*MspI*, GHRH/*HaeIII* dan Pit-1/*HinfI*.

KESIMPULAN

Lokus GH/*MspI* dan GHRH/*HaeIII* bersifat polimorfik, sedangkan lokus Pit-1/*HinfI* bersifat monomorfik pada populasi kerbau Banten. Pada lokus GH/*MspI*, alel GH (-) hanya ditemukan pada subpopulasi Pandeglang

dengan frekuensi 0,04 dan frekuensi alel GH (+) sebesar 0,96. Pada subpopulasi Lebak lokus GH/*MspI* bersifat monomorfik. Frekuensi alel A dan B pada lokus GHRH/*HaeIII* yaitu 0,41 dan 0,59 pada subpopulasi Pandeglang, dan 0,43 dan 0,57 pada subpopulasi Lebak. Pada populasi Banten secara keseluruhan, Lokus GH/*MspI* mempunyai keragaman yang rendah (0,0469) dan lokus GHRH/*HaeIII* mempunyai keragaman yang tinggi (0,4908).

DAFTAR PUSTAKA

- FALAKI, M., N. GENGLER, M. SNEYERS, A. PRANDI, S. MASSARTA, FORMIGONI, A. BURNYD, PORTETELLE and R. RENAVILLE. 1996. Relationships of polymorphism for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.* 79: 1446 – 1453.
- HARTL D.L. 1988. *Principle of Population Genetic*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publisher.
- JAVANMARD, A., N. ASADZADEH, M. HOSSEIN, BANABAZI and J. TAVAKOLIAN. 2005. The allele and genotype frequencies of bovine pituitary specific transcription factor and leptin genes in Iranian cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. *Iran J. Biotechnol.* 3: 104 – 108.
- LAGZIEL, A., S. DENISE, O. HANOTTE, S. DHARA, V. GLAZKO, A. BROADHEAD, R. DAVOLI, V. RUSSO and M. SOLLER. 2000. Geographic and breed distribution of an *MspI* PCR-RFLP in the bovine growth hormone (bGH) gene. *Anim. Genet.* 31:210-213.
- MACHADO, M.A., I. SCHUSTER, M.L. MARTINEZ, A.L. CAMPAS. 2003. Genetic diversity of four breed using microsatellite markers. *Rev Bras De Zool* 32: 93 – 98
- MITRA, A., P. SCHELE, C.R. BALAKRISNAN and F. PIRCHNER. 1995. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *J Anim Bred Genet* 112: 71 – 74.

- MOODY, D.E., D. POMP, and W. BARENDSE. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in amplification product in the bovine growth hormone releasing hormone gene. *J. Anim. Sci.* 73: 3789.
- NEI, M and S. KUMAR. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- RAJAMURUGAN, J., S. KUMAR, O.P. PANDEY, S.M. DEB, A. MITRA and A. SHARMA. 2007. Characterization of growth hormone releasing hormone (GHRH) partial gene in buffalo. *Indian J. Anim. Sci.* 77: 749 – 751.
- SAMBROOK, J., and D. RUSSELL. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United State of America.
- TAMBASCO, D.D., C.C.P. PAZ, M. TAMBASCO-STUDART, A.P. PEREIRA, M.M. ALENCAR, A.R. FREITAS, L.L. COUTINHO, I.U. PACKER and L.C.A. REGITANO. 2003. Candidate gene for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus x Bos indicus*. *J. Anim. Breed. Gene.t* 120: 51 – 56
- WOOLLARD, J., C.B. SCHIMTZ, A.E. FREEMAN, and C.K. TUGGLE. 1994. Rapid Communication: HinfI polymorphisms at the bovine Pit-1 locus. *J Anim. Sci.* 72: 3267.
- WRIGHT S. 1978. *Variability Within and Among Natural Populations*. Chicago: University of Chicago Press.
- ZHANG, H.M., D.R. BROWN, S.K. DENISE, and R.L. AX. 1992. Nucleotide sequence determination of bovine somatotropin allele. *J. Anim. Genet* 23: 578.