

Polimorfisme Gen *Calpastatin* (CAST-Msp1) dan Pengaruhnya terhadap Bobot Hidup Domba Lokal

C. SUMANTRI¹, R. DIYONO¹, A. FARAJALLAH² dan I. INOUNU³

1. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, FAPET IPB

2. Departemen Biologi, FMIPA IPB

3. Puslitbang Peternakan, Bogor.

(Diterima dewan redaksi 11 Februari 2008)

ABSTRACT

SUMANTRI, C., R. DIYONO, A. FARAJALLAH and I. INOUNU. 2008. Polymorphism of Calpastatin gene and its effect on body weight of local sheeps. *JITV* 13(2): 117-126.

The objectives of this research were to identify polymorphism of calpastatin gene and to investigate any association of calpastatin genotype on body weight of local sheeps. A total number of DNA samples were collected from 288 heads of local sheeps from 8 populations. Two local sheep samples were medium tail sheeps (MTSs) of a Garut fighting type from Ciomas/Bogor (29) and a Garut meat type from Margawati (29). The remaining six local sheep population were one thin tail sheep (TTS) from Jonggol (36); and five fat tail (FTSs) from Indramayu (43), Madura (43), Sumbawa (26), Rote (36) and Donggala (46) respectively. Genomic DNAs of those blood of local sheeps were extracted by a standard phenol-chloroform protocol and amplified using a polymerase chain reaction (PCR) technique. PCR reaction was carried out in a *thermocycler* (Takara PCR of Thermal Cycler MP4) and PCR products were digested with Msp 1 enzyme restriction using a Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technique. The PCR-RFLP products were separated at 8% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). A silver-staining method then was applied to detect fragments. Genetic variations between local sheep populations were calculated based on frequencies of genotypes and alleles. The association between genotype of *calpastatin* gene and body weight of local sheeps were calculated by General Linear Model method by SAS version 6.12. A length of 622 base pairs (bp) of the calpastatin gene of the Indonesian local sheeps was successfully amplified by the PCR technique. An *MspI* restriction enzyme cut the PCR product into two different length fragments, those were 336 bp and 286 bp designated as M allele of the CAST-Msp1; whilst that unsuccessfully cut PCR product resulted one fragment 622 bp designated as N allele of the CAST-Msp1. Locus of the CAST-Msp1 gene in most local sheeps studied was polymorphic, the exception was in the FTS from Rote of which monomorphic. The highest frequency of the M allele was in the fighting Garut sheep from Ciomas (0.29), whilst the lowest was in the FTS from Rote (0.00). However, frequencies of the M allele of FTSs from Sumbawa and Madura were similar (0.04). Further, frequencies of the M allele of local sheeps from Margawati, Jonggol, Indramayu, and Donggala were 0.24, 0.16, 0.13 and 0.12 respectively. The highest frequency of MN genotype was observed in the Garut fighting sheep from Ciomas (0.58), but the lowest was in the FTS from Rote (0.00). The heterosigosity was observed differently among populations. The highest heterosigosity was also identified in the Garut fighting sheep in Ciomas (0.43), while FTSs of both of Sumbawa and Madura were for the lowest (0.08). Results of this study showed that there was a definit association between calpastatin genotype and body weight of male sheeps from which the MN genotype significantly related to a higher body weight compared to that of the NN genotype.

Key Words : Local Sheeps, Calpastatin Gene, Polymorphism, Live Weight

ABSTRAK

SUMANTRI, C., R. DIYONO, A. FARAJALLAH dan I. INOUNU. 2008. Polimorfisme gen *Calpastatin* (CAST-Msp1) dan pengaruhnya terhadap bobot hidup pada domba lokal. *JITV* 13(2): 117-126.

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi polimorfisme dari gen *calpastatin* (lokus CAST-Msp1) dan memeriksa hubungan antara genotipe *calpastatin* dari lokus CAST-Msp1 dengan bobot hidup pada domba lokal. Jumlah sampel DNA dikoleksi pada 288 ekor domba lokal dari 8 populasi. Dua sampel adalah Domba Ekor Sedang (DES) tipe tangkas Garut dari Ciomas/Bogor (29), dan tipe pedaging Garut dari Margawati (29). Enam sampel lainnya adalah Domba Ekor Tipis (DET) dari Jonggol (36); serta Domba Ekor Gemuk (DEG) dari Indramayu (43), Madura (43), Donggala (46), Sumbawa (26), dan Rote (36). Genom DNA diekstrak menggunakan *phenol-chloroform protocol* kemudian diamplifikasi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Produk PCR dipotong menggunakan enzim Msp1 dengan teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Produk PCR-RFLP selanjutnya dipisahkan menggunakan *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE). 8% Metoda pewarnaan perak dipakai dalam mendeteksi adanya fragmen. Keragaman genetik antara populasi domba lokal dihitung berdasarkan frekuensi genotipe dan alel. Pengaruh genotipe *calpastatin* terhadap bobot hidup ternak dianalisis menggunakan prosedur *General Linear Model* SAS versi 6.12. Satu pita 622 pb (pasangan basa) dari gen *calpastatin* berhasil diamplifikasi pada domba lokal Indonesia menggunakan teknik PCR. Enzim Msp1 memotong produk PCR menjadi dua fragmen, yakni 336 pb dan 286 pb, yang dinyatakan sebagai alel M dari gen *calpastatin* lokus CAST-Msp1; sebaliknya produk PCR yang tidak terpotong

menghasilkan 622 pb, yang dinyatakan sebagai alel N. Hampir semua domba lokal pengamatan bersifat polimorfik untuk gen *calpastatin* lokus CAST-Msp1, kecuali untuk DEG dari Rote yang bersifat monomorfik. Frekuensi tertinggi dari alel M ditemukan pada domba adu tangkas Garut dari Ciomas (0,29), sebaliknya frekuensi terendah pada DEG dari Rote (0,00), dan frekuensi alel M di Sumbawa dan Madura adalah sama (0,04). Frekuensi alel M domba lokal dari Margawati, Jonggol, Indramayu, dan Donggala berurutan 0,24, 0,16, 0,13 dan 0,12. Identifikasi polimorfisme gen *calpastatin* dengan teknik RFLP dengan demikian menghasilkan dua genotipe yaitu MN dan NN. Frekuensi tertinggi dari genotipe MN teramati pada domba tangkas Garut di Ciomas (0,58), sebaliknya terendah pada DEG di Rote (0,00). Heterosigositas tinggi teridentifikasi antara populasi. Frekuensi heterosigositas tertinggi ditemukan pada domba tangkas Garut di Ciomas (0,43); sebaliknya DEG di Sumbawa dan Garut mempunyai frekuensi heterosigositas terendah (0,08). Hasil menunjukkan bahwa domba domba jantan bergenotipe MN mempunyai bobot hidup lebih tinggi ($P < 0,05$) bila dibandingkan dengan domba bergenotipe NN.

Kata Kunci: Domba Lokal, Gen Calpastatin, Polimorfisme, Bobot Hidup

PENDAHULUAN

Keempukan daging merupakan salah satu faktor penentu kualitas daging dan berdampak langsung terhadap kepuasan konsumen (MILLER *et al.*, 1995). Sejumlah faktor lingkungan berpengaruh terhadap keempukan daging ternak, diantaranya umur dan jenis kelamin (HUFF-LONERGAN *et al.*, 1995), serta cara pemberian pakan (VAN KOEVERING *et al.*, 1995). Suplementasi vitamin D3 sebelum pemotongan membuat daging menjadi lebih empuk (SWANEK *et al.*, 1999). Penanganan karkas (daging) misalnya selama proses pendinginan (MAY *et al.*, 1992), simulasi listrik (NOUR *et al.*, 1994) dan lama pelayuan (MAY *et al.*, 1992) juga mempengaruhi keempukan daging. Keempukan daging tentunya sangat ditentukan pula oleh faktor genetik dari ternak itu sendiri. Salah satu komponen genetik sebagai penentu pada keempukan daging adalah gen *calpastatin*. Variasi aktivitas *calpastatin* tergantung pada spesies atau bangsa ternak (KOOHMAIE *et al.*, 1991). Sapi *Bos taurus* memiliki keempukan daging lebih baik dibandingkan dengan sapi *Bos indicus* dan persilangannya (O'CONNOR *et al.*, 1997) dan *calpastatin* berpengaruh juga terhadap daging masak (MORRIS *et al.*, 2006). Sehubungan dengan hal ini, dilaporkan adanya korelasi negatif antara aktivitas enzim *calpastatin* dengan keempukan, semakin tinggi aktivitas enzim *calpastatin* akan menurunkan keempukan daging *postmortem* (WOODWARD *et al.*, 2000). Gen *calpypge* berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan otot, peningkatan aktifitas *calpastatin* dan penurunan keempukan daging pada domba (DUCKETT *et al.*, 2000; FREKING *et al.*, 2004).

Enzim yang sangat berperan pada keempukan daging yaitu *calpain* dan *calpastatin*. *Calpain* merupakan enzim protease terkait dengan ion kalsium (Ca^{2+}). *Calpain* terbagi dalam dua bentuk, yaitu μ -*calpain* (CAPN1) yang memerlukan ion kalsium (Ca^{2+}) rendah, dan *m-calpain* (CAPN2). μ -*calpain* yang memerlukan ion kalsium (Ca^{2+}) tinggi. *Calpain* berfungsi untuk mendegradasi protein sel-sel otot (myofibril) di dalam jaringan otot (GOLL *et al.*, 1992). Selanjutnya dinyatakan oleh KILLEFER dan KOOHMAIE (1994) bahwa aktivitas *calpain* dalam

jaringan otot *postmortem* dapat menyebabkan struktur protein sel otot menjadi lemah, yang menyebabkan kualitas daging menjadi lebih empuk. *Calpastatin* merupakan enzim protease utama dan bersifat inhibitor spesifik terhadap fungsi μ -*calpain* dan *m-calpain*. MORGAN *et al.* (1993) menyatakan ketika aktivitas degradasi protein pada jaringan otot hewan hidup menurun, maka aktivitas *calpastatin* meningkat. *Calpastatin* berfungsi untuk menghambat proses degradasi protein sel otot. Gen *calpastatin* diduga terkait dengan sifat pertumbuhan otot dan keempukan daging pada mamalia.

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP) merupakan teknik yang sering dipakai untuk mendeteksi alel-alel pada *calpastatin* sebagai kandidat gen pengontrol keempukan daging (COCKETT *et al.*, 1995; LONERGAN *et al.*, 1995). Gen *calpastatin* pada domba terletak pada kromosom nomor 5 (HEDIGER *et al.*, 1991), pada sapi terletak pada kromosom nomor 7 (BISHOP *et al.*, 1993; KAPPES *et al.*, 1997) dan pada babi terletak pada kromosom nomor 2 (MALEK *et al.*, 2001). Polimorfisme gen *calpastatin* dengan PCR-RFLP pada domba Dorset telah dilaporkan PALMER *et al.* (1998) yang mengidentifikasi dua alel, yaitu alel M ditunjukkan oleh dua fragment berukuran 336 dan 286 pb (pasangan basa) dan N ditunjukkan oleh satu fragment berukuran 622 pb. Selanjutnya PALMER *et al.* (2000) mengidentifikasi tiga alel baru karena adanya mutasi pada daerah intron. ZHOU *et al.* (2007) mengidentifikasi adanya mutasi pada exon 6 yang menyebabkan perbedaan asam amino Gln/leu yang berhubungan langsung dengan keempukan daging domba. Mutasi gen *calpastatin* pada sapi telah dilaporkan oleh CHUNG *et al.* (1999) yang mengidentifikasi adanya dua alel, yaitu alel A dan B. Keragaman gen *calpastatin* tersebut terkait erat dengan sifat pertumbuhan. Sapi Angus bergenotip BB mempunyai bobot hidup lebih berat daripada sapi bergenotip AB dan AA. SCHENKEL *et al.* (2006) melaporkan adanya mutasi G/C pada gen *calpastatin*. Dilaporkan alel C sangat sering ditemukan pada sapi persilangan (63%) dibandingkan dengan alel G. Genotip CC mempunyai daging lebih empuk bila

dibandingkan dengan genotipe GC dan GG, selanjutnya CASAS *et al.* (2006) mendapatkan genotipe TT dari *calpastatin* (CAST) menghasilkan daging lebih empuk daripada genotipe CC, sedangkan genotipe CC dari *calpain* (CAPN1) menghasilkan daging lebih empuk daripada genotipe TT. Pada babi, CIOBANU *et al.* (2004) melaporkan adanya dua mutasi pada gen yang (CAST Arg249Lys dan Ser638Arg) menyebabkan adanya perubahan aktifitas *calpastatin* yang berhubungan langsung dengan keempukan daging.

Perbaikan mutu genetik kualitas daging seperti derajat keempukan pada domba lokal diharapkan dapat lebih meningkatkan hasrat pecinta daging merah untuk lebih banyak mengkonsumsi daging domba. Saat ini kontribusi daging domba baru meyeimbang relatif kecil sekitar 66.500 ton (3,15%) dari total produksi daging dalam negeri (DIREKTORAT JENDRAL PETERNAKAN, 2005). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi polimorfisme genetik dari gen *calpastatin* lokus Cast-MspI dan pengaruhnya terhadap bobot hidup pada domba lokal.

MATERI DAN METODE

Sampel darah

Sampel darah yang digunakan berasal dari 288 ekor domba lokal berasal dari UP3J Jonggol (36) sebagai Domba Ekor Tipis (DET); Garut-tangkas dari Ciomas (29) dan UPTD BPPTD Garut-pedaging dari Margawati (29) sebagai Domba Ekor Sedang (DES); domba lokal Indramayu (43), Madura (43), Donggala (46), Sumbawa (26) dan Rote (36) sebagai Domba Ekor Gemuk (DEG). Dari seluruh sampel darah ini hanya 201 (70%) yang berhasil teramplifikasi, dan digunakan dalam analisis selanjutnya. Domba yang diambil sampel darahnya mempunyai catatan bobot hidup (kg) dan berasal dari tiga kelompok umur yang berbeda, yaitu umur kurang dari 1 tahun, 1-2 tahun dan 3-4 tahun. Semua data distandarisasi ke salah satu umur terbanyak yaitu umur 2 tahun.

Ekstraksi DNA

Keseluruhan sampel darah yang disimpan dalam etanol 95% disentrifugasi 3500 rpm selama 5 menit. Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode SAMBROOK *et al.* (1989) yang telah dimodifikasi dengan menggunakan buffer lisis sel (350 µl 1 x STE, 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 isoamil alkohol (CIAA). DNA diendapkan dengan 40 µl 5 M NaCl dan 800 µl etanol absolut. Endapan dicuci dengan menambahkan 400 µl, etanol

70%, disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit, etanol dibuang dan diuapkan menggunakan pompa vakum, selanjutnya DNA dilarutkan dengan 80 µl *buffer* TE 80%

Identifikasi keragaman gen *Calpastatin* (CAST-MspI)

Amplifikasi DNA dilakukan pada total volume 25 µl terdiri dari 10-100 ng DNA, 25 pmol pasangan primer masing-masing dari PALMER *et al.* (1998), yaitu primer *forward* (AF33) 5' TGGGGCCCAATGACGCC ATCGATG 3' (ekson 1C) dan primer *reverse* (AF34) 5' GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACC 3' (ekson 1D) sebagai tertera pada Gambar 1. Ditambahkan 0,87 unit enzim *Taq polymerase* dan buffernya (*New England BioLabs*), 2 mM dNTP, dan 2,5 mM MgCl₂. Inkubasi dilakukan pada mesin *thermocycler* (TaKaRa PCR Thermal Cycler MP4), dengan program sebagai berikut ini. Tahap I dilakukan dengan 1 x siklus, meliputi proses denaturasi awal pada suhu 94°C selama 4 menit. Tahap II dilakukan dengan 30 x siklus, meliputi denaturasi pada suhu 94°C selama 10 detik, penempelan primer pada suhu 48°C selama 1 menit, pemanjangan molekul DNA pada suhu 72°C selama 2 menit. Tahap III dilakukan dengan 1 x siklus, meliputi pemanjangan akhir molekul DNA pada suhu 72°C selama 7 menit.

Analisis PCR-RFLP dilakukan dengan cara produk PCR dipotong dengan enzim restriksi *MspI* (*New England BioLabs*) pada situs C|CGG, yaitu 2 µl produk PCR dicampur dengan 1-2 Unit *MspI* dalam 1 x bufer, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Elektroforesis dilakukan pada gel poliakrilamida 6% dengan tegangan konstan 220 mVolt selama 30 menit dan pewarnaan perak dilakukan dengan metode (TEGELSTROM, 1992).

Pendeteksian keragaman gen *Calpastatin* (CAST-MspI)

Keragaman gen CAST-*MspI* diperlihatkan pada Gambar 4. Genotipe NN ditunjukkan dengan satu pita fragmen DNA berukuran 622 pb, dan genotipe MN ditunjukkan dengan tiga fragment DNA yaitu 622, 336 dan 286 pb.

Analisis data

Keragaman genotipe tiap-tiap individu dapat ditentukan dari pita-pita DNA gen yang ditemukan. Masing-masing sampel dibandingkan berdasarkan ukuran (marker) yang sama dan dihitung frekuensi alelnya. Frekuensi alel dihitung berdasarkan rumus NEI (1987):

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

Keterangan:

X_i = frekuensi alel ke- i

n_{ii} = jumlah individu yang bergenotipe ii

n_{ij} = jumlah individu yang bergenotipe ij

n = jumlah sampel

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

$$\hat{h} = 2n(1 - \sum X_i^2)/(2n - 1)$$

Keterangan:

X_i = frekuensi alel

$\hat{h}$ = nilai heterozigositas lokus

Uji kesetimbangan dari frekuensi genotipe κ -kasein yang teramati dengan frekuensi harapan dihitung menggunakan Uji Kebaikan-Suai (χ^2) menurut WALPOLE (1993) dengan rumus:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

Keterangan :

χ^2 = Sebaran khi-kuadrat

O_i = Frekuensi teramati

e_i = Frekuensi harapan bagi sel ke- i

Pengaruh umur terhadap bobot hidup domba lokal dikoreksi dengan menstandarisasi bobot hidup setiap umur terhadap umur 2 tahun. Rataan bobot hidup masing-masing domba bergenotipe *calpastatin* dianalisis menggunakan prosedur *general linier model* (GLM) dengan menggunakan perangkat lunak *statistics analytical system* (SAS) versi 6.12 (SAS,1989). Data yang digunakan untuk analisis ini berjumlah 140 ekor

(45 jantan dan 95 betina) berasal dari domba daerah Jonggol (22), Garut-Ciomas (12), Garut Margawati (29), Indramayu (36) dan Donggala (41), sedangkan sisanya 61 ekor berasal dari Madura (28), Sumbawa (13) dan Rote (20) tidak dianalisis karena monomorfic.

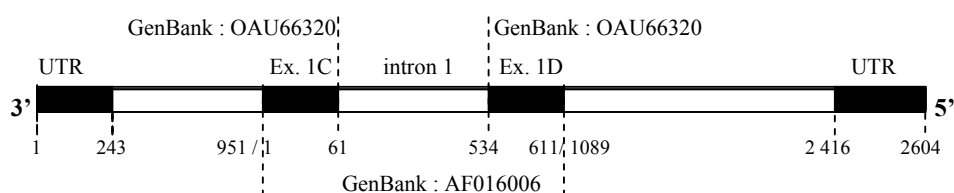
HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman genetik gen *Calpastatin* (CAST-Msp1) pada domba Lokal

Struktur gen *calpastatin* pada domba lokal dicantumkan pada Gambar 1. Primer yang digunakan berhasil mengamplifikasi fragmen dari gen *calpastatin* sebesar 622 pb (Gambar 2). Suhu penempelan primer dalam penelitian ini adalah 48°C. Kondisi ini berbeda dengan suhu penempelan primer 62°C seperti yang disarankan oleh PALMER *et al.* (1998).

Persentase keberhasilan primer dalam mengamplifikasi lokus dari gen *calpastatin* (CAST-Msp1) dalam penelitian ini hanya sekitar 70%. Sebanyak 201 sampel berhasil teramplifikasi dari total 288 sampel. Menurut PALUMBI (1996) keberhasilan dalam mengamplifikasi DNA tergantung pada interaksi komponen campuran PCR. AL-SOUD dan RADSTROM (2001) menyatakan bahwa keberhasilan amplifikasi juga dipengaruhi oleh adanya haemoglobin yang dapat menghambat kerja enzim *taq polymerase*.

Keragaman gen *calpastatin* lokus CAST-Msp1 domba disebabkan oleh adanya mutasi titik yang terjadi pada posisi basa ke-261 nomor akses GenBank AF016006. Terjadinya substitusi basa (transisi) G – A (Gambar 3) menyebabkan situs pemotongan untuk enzim restriksi *Msp1* berubah. Pada gen *calpastatin* lokus CAST-Msp1, ternak domba dikatakan mempunyai genotipe MM apabila terdapat dua fragmen (pita) DNA dengan panjang 336 dan 286 pb. Genotipe MN ditunjukkan dengan tiga fragment DNA yaitu 622, 336 dan 286 pb. Genotipe NN ditunjukkan dengan terdapatnya satu fragmen DNA yaitu 622 pb (Gambar 4). Genotipe MM mempunyai 2 pita berukuran 336 dan 286, tetapi pada penelitian ini tidak ditemukan individu bergenotipe MM.



Gambar 1. Struktur gen *calpastatin* domba (PALMER *et al.*, 1998)

```

tctacctaca tagaggaact gggtaaaaga gaagtcacac ttctccaaa
atatagggaa cttttgaata aagaagaagg gatcgaggg cctcctccag

                AF 33
actcctcgaa acccctgggg cccaatgacg ccacgatgc cttgtcatca
gacttcacct gcagttcccc tacagctgat gcaaaagaaa ctgagaaaga ggtattgttt ttaatgcact
cagggaact tgtagaacc tacctccac tttaagacaa caacttttt ttaaacttta tttttgactt
cgctgggtct tcattgctgt gttcgggctt tctctagttg gggcaagcga gggctattct ctagttgcga
tgtgcagcct tctgcaggtg gcttctcttg ttgcagagtc ggggctcttg gtgcacaggg ttcagttgtt
gtgacttgag agctctagag cacaggtctc gtggctgttg ctacagggct tactccacgg catgtgggat
cttcctggc caggagcga acccgtgtcc cctgcgttgc aaggcggcct ctaaccact ggccaccagg
gaagcccaa gatgccaagg ctttttactt ctggttctta ccgtctggtt aatacatttc cttcatctgc
cagtcaaacc ttcttttga tttcattttt cagaaatcta cagaagaggc ttaaaagct cagtcagctg
gggtgatcag aagtgtctgt ccacccaaag agaaaagaag

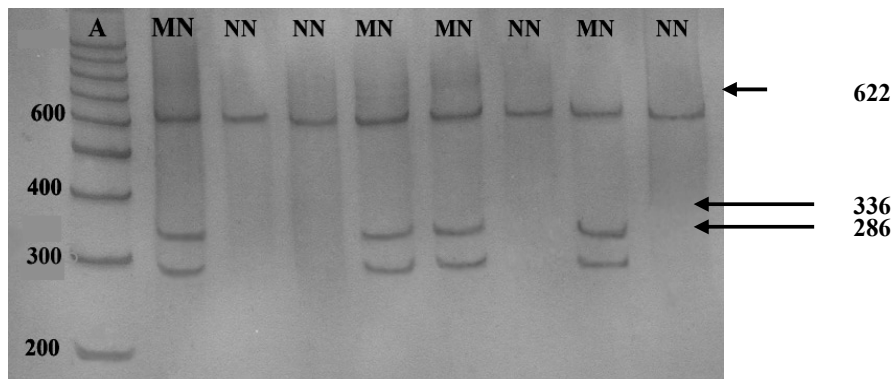
                AF 34
aaaagtggaa gaggatacca tgactgagca agccctggag gccctgtctg cctccctggg caccgggaag
ccaaggccag agctgaccc cagctccatt

```

Gambar 2. Sekuen nukleotida gen *calpastatin* pada lokus CAST-MspI dari AF33 dan AF34 masing-masing merupakan primer *forward* dan primer *reverse* dan tanda panah menunjukkan situs pemotong enzim MspI (PALMER *et al.*, 1998)

Alel M (AF016006) : -----TTGCAGAGCC | GGGGCTCTGG-----
 Alel N (AF016007) : -----TTGCAGAGCC | AGGGCTCTGG-----

Gambar 3. Perbedaan sekuen nukleotida pada gen *calpastatin* lokus CAST-MspI yang disebabkan karena substitusi basa G – A. Alel M mempunyai nukleotida G pada posisi basa ke-261, sedangkan alel N mempunyai nukleotida A (Nomor akses GenBank: AF016006 dan AF016007) (PALMER *et al.*, 1998)



Gambar 4. Pola pita gen *calpastatin* (CAST-MspI) domba lokal dalam gel poliakrilamid 6%. Genotipe MN ditunjukkan dengan adanya tiga pita dengan ukuran 622, 336, dan 286 pb. Genotipe NN ditunjukkan dengan satu pita 622 pb. Huruf A = marker

Hasil uji signifikansi X^2 menunjukkan distribusi ketiga genotipe *calpastatin* (Cast-MspI) MM, MN dan NN dalam populasi ada dalam ketidak setimbangan (Tabel 1). Genotipe MM tidak ditemukan, kemungkinan disebabkan oleh karena seleksi atau sistim perkawinan yang tidak acak (BOURDON, 2000). Frekuensi alel adalah frekuensi relatif dari suatu alel dalam populasi atau jumlah suatu alel terhadap jumlah total alel yang terdapat dalam suatu populasi (NEI dan KUMAR, 2000). Selanjutnya dinyatakan keragaman genetik terjadi

apabila terdapat dua alel atau lebih dalam suatu populasi (biasanya lebih dari 1%). Menurut NEI (1987), keragaman genetik dapat diukur secara akurat dengan Nilai heterosigositas (h).

Pada penelitian lain dilaporkan adanya polimorfisme gen *calpastatin* lokus CAST-MspI teridentifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphisms* (PCR-SSCP) (PALMER *et al.*, 2000). Tiga jenis alel yaitu alel A, B, dan C, dengan tiga genotipe yaitu AA,

Tabel 1. Frekuensi genotipe observasi (o) dan harapan (e) *calpastatin* (Cast-Msp1) domba lokal

Genotipe	Frekuensi observasi (o)	Frekuensi harapan (e)	χ^2 hitung	χ^2 tabel (0.01; 2)
MM	0	50,25	304,63	9,21
MN	50	100,5		
NN	151	50,25		
Jumlah	201	201		

AB dan AC dihasilkan pada PCR-SSCP. Frekuensi tipe A, B dan C masing-masing 0,77; 0,16 dan 0,06, sedangkan frekuensi genotipe AA, AB dan AC masing-masing 0,55; 0,32 dan 0,13. Berdasarkan referensi nomor akses GenBank AF016006, alel M pada penelitian ini sama dengan alel A. Nomor akses GenBank AF016007 menunjukkan bahwa alel N sama dengan B. Alel C yang ditunjukkan dengan nomor akses GenBank AF016008 tidak dapat teridentifikasi dengan metode PCR-RFLP pada penelitian ini. KURLY *et al.* (2003) telah melaporkan adanya keragaman gen *calpastatin* pada ternak babi Stambeek (dengan metode PCR-RFLP) menggunakan enzim restriksi *HinfI*, *MspI* dan *RsaI*. Polimorfisme pada gen *calpastatin* juga telah dilaporkan pada berbagai bangsa domba seperti Dorset Down, Hoggets, persilangan Dorset Down dengan Coopworth, Kurdi, Corridale, dan Karakul (PALMER *et al.*, 2000; NASSIRY *et al.*, 2006; SHAHROUDI *et al.*, 2006). Penyebaran genotipe *Calpastatin* (CAST-Msp1)

Penyebaran genotipe *calpastatin* lokus CAST-Msp1 dicantumkan pada Tabel 2. Frekuensi genotipe NN pada kelompok DEG dari populasi Rote, Sumbawa, Madura, Donggala dan Indramayu dengan kisaran 0,75- 1,00. Nilai tersebut lebih tinggi bila dibandingkan dengan frekuensi genotipe NN kelompok DET Jonggol yakni 0,68 dan kelompok DES dari populasi Garut Ciomas, dan Margawati yang berkisar 0,42-0,68. Sebaliknya frekuensi genotipe MN pada kelompok DES (dari Garut Ciomas, dan Margawati) berkisar 0,48-0,58 lebih tinggi bila dibandingkan dengan DET Jonggol sebesar 0,32 dan DEG (dari populasi yang ada di Pulau Rote, Sumbawa, Madura, Donggala dan Indramayu) dengan kisaran 0,00-0,25. Frekuensi alel M dalam semua populasi sebesar 0,13, lebih tinggi bila dibandingkan dengan DEG Rote (0,00) serta DEG Sumbawa dan Madura (0,04). Frekuensi alel M dalam semua populasi tersebut (0,13) adalah sama dengan DEG Indramayu, tetapi lebih kecil bila dibandingkan dengan DET Jonggol (0,16), DES Margawati (0,24) dan DES Ciomas (0,29).

Perbedaan frekuensi genotipe dan alel pada populasi yang diuji menunjukkan masih tingginya keragaman pada domba lokal. Hal ini memperkuat penelitian sebelumnya melalui analisis morfologi dengan pendekatan teknik diskriminan dan kanonikal

(SUMANTRI *et al.*, 2007). Populasi domba lokal di Indonesia mempunyai frekuensi alel N yang lebih tinggi dibandingkan dengan alel M pada semua populasi yang diamati. Hasil penelitian ini berlawanan dengan beberapa penelitian sebelumnya yang dilakukan terhadap populasi domba di luar negeri. PALMER *et al.* (1998) melaporkan bahwa genotipe *calpastatin* pada domba Corridale yaitu MM, MN dan NN, dengan frekuensi alel untuk alel M dan N masing-masing 79% dan 21%. NASSIRY *et al.* (2006) menemukan frekuensi alel sebesar 88% untuk alel M dan 12% untuk alel N dan frekuensi genotipe MM, MN dan NN masing-masing 76, 24 dan 0%, serta nilai heterosigositas 36% pada populasi domba Kurdi Iran. Hasil yang sama juga diperoleh SHAHROUDI *et al.* (2006) yang melakukan penelitian serupa pada domba Arkhamerino dan persilangan Ghezel x Arkhamerino dengan frekuensi genotipe MN masing-masing 48 dan 47%.

Hubungan antara keragaman Genotipe *Calpastatin* (CAST-Msp1) dengan bobot hidup Domba Lokal

Hasil Uji lanjut menunjukkan bahwa rata-rata bobot hidup domba jantan dengan genotipe MN lebih besar dibandingkan dengan genotipe NN, sedangkan pada domba betinanya tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata, meskipun ada kecenderungan genotipe MN lebih besar dari NN (Tabel 3). Alel M kemungkinan terkait dengan sifat bobot hidup yang lebih tinggi, didukung dengan frekuensi alel M tertinggi 0,29 pada populasi domba Garut tangkas Ciomas dan 0,24 pada domba Garut pedaging Margawati (Tabel 2).

Tabel 3. Rataan bobot hidup dan simpangan baku antara genotipe MN dan NN *calpastatin* (CAST-Msp1) pada domba lokal jantan dan betina

Genotipe	Jantan (kg)	Betina (kg)
MN	(15) 43,4 ± 4,0 ^a	(57) 26,97 ± 5,86
NN	(30) 35,1 ± 2,9 ^b	(38) 24,42 ± 3,29

Superskrip berbeda menyatakan berbeda nyata (P<0,05)

Tabel 2. Frekuensi genotipe, frekuensi alel dan nilai heterosigositas ($\hat{h}$) gen *calpastatin* lokus CAST-*MspI* pada domba lokal

Daerah	Jumlah ternak (ekor)	Genotipe	Frekuensi genotipe	Frekuensi alel	Heterosigositas ($\hat{h}$)
Jonggol (DET)	22	MM	0(0,00)	M = 0,16	0,28
		MN	7(0,32)	N = 0,84	
		NN	15(0,68)		
Garut-Ciomas (DES)	12	MM	0(0,00)	M = 0,29	0,43
		MN	7(0,58)	N = 0,71	
		NN	5(0,42)		
Garut-Margawati (DES)	29	MM	0(0,00)	M = 0,24	0,37
		MN	14(0,48)	N = 0,76	
		NN	15(0,52)		
Indramayu (DEG)	36	MM	0(0,00)	M = 0,13	0,23
		MN	9(0,25)	N = 0,87	
		NN	27(0,75)		
Madura (DEG)	28	MM	0(0,00)	M = 0,04	0,08
		MN	2(0,07)	N = 0,96	
		NN	26(0,93)		
Donggala (DEG)	41	MM	0(0,00)	M = 0,12	0,21
		MN	10(0,24)	N = 0,88	
		NN	31(0,76)		
Sumbawa (DEG)	13	MM	0(0,00)	M = 0,04	0,08
		MN	1(0,08)	N = 0,96	
		NN	12(0,92)		
Rote (DEG)	20	MM	0(0,00)	M = 0,00	0,00
		MN	0(0,00)	N = 1,00	
		NN	20(1,00)		
Total	201	MM	0(0,00)	M = 0,13	
		MN	50(0,25)	N = 0,87	
		NN	151(0,75)		

Domba Garut secara umum mempunyai parameter tubuh lebih besar dan bobot hidup yang lebih berat bila dibandingkan dengan domba lokal lainnya (SUMANTRI *et al.*, 2007). Penelitian lain menunjukkan bahwa genotipe dari gen *calpastatin* terkait dengan sifat pertumbuhan. TAHMOORESPOUR (2005) melaporkan pada domba Baluchi genotipe dari AB mempunyai bobot hidup harian lebih berat dari genotipe AA dan AC. NASSIRY *et al.* (2006) melaporkan adanya

hubungan antara genotipe *calpastatin* pada domba Kurdi Iran (metode PCR-SSCP) dengan sifat pertumbuhan. Genotipe AB terkait dengan pertambahan bobot hidup domba harian prasapih dan pertambahan bobot hidup harian dari umur 9 bulan sampai umur 1 tahun (AB>AA>AC). Hasil yang sama juga ditemukan pada sapi oleh CHUNG *et al.* (2001) yang melaporkan *calpastatin* genotipe BB mempunyai bobot hidup lebih berat dari pada genotipe AB dan AA.

Hasil penelitian ini memberikan informasi bahwa gen *calpastatin* bersifat polimorfik dan dapat digunakan untuk studi keragaman populasi domba lokal di Indonesia. Selain itu, informasi keragaman ini dapat digunakan dalam penelitian berikutnya untuk menganalisis hubungan antara genotipe gen *calpastatin* dengan sifat pertumbuhan dan keempukan daging pada domba lokal. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan materi ternak yang lebih banyak pada populasi lain untuk mengetahui hubungan antara gen *calpastatin* locus Cast-MspI dengan parameter sifat pertumbuhan lainnya serta dengan sifat kualitas daging.

KESIMPULAN

Gen *calpastatin* locus CAST-MspI pada domba lokal di Indonesia bersifat polimorfik (beragam), terkecuali pada domba lokal di Rote yang bersifat monomorfik. Melalui penggunaan teknik PCR-RFLP teridentifikasi polimorfisme gen *calpastatin* locus CAST-MspI menghasilkan dua alel yaitu M dan N, serta dua genotipe yaitu MN dan NN. Frekuensi alel M tertinggi ditemukan pada populasi Domba Garut tangkas Ciomas (0,29) dan terendah pada populasi Domba Ekor Gemuk di Rote (0,00). Frekuensi genotipe MN tertinggi diperoleh pada Domba Garut tangkas Ciomas (0,58) dan terendah Rote di (0,00). Nilai heterosigositas bervariasi antara populasi dan berkisar antara 0,08 pada domba lokal di Sumbawa dan Madura, sampai 0,43 pada domba lokal Garut di Ciomas. Domba jantan dengan genotipe MN mempunyai rata-rata bobot hidup lebih berat dibandingkan dengan genotipe NN. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa gen *calpastatin* locus CAST-MspI merupakan gen kandidat untuk seleksi bobot hidup pada domba lokal jantan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi RI yang telah mendanai penelitian ini melalui Program RUT XII No. 12/Perj/Dep.III/RUT/PPKI/II/2005.

DAFTAR PUSTAKA

- AL-SOUD, W.A. and P. RADSTROM. 2001. Purification and characterization of PCR inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 39: 485-493.
- BISHOP, M.D., M. KOOHMARAIE, J. KILLEFER and S. KAPPES. 1993. Restriction fragment length polymorphisms of the bovine calpastatin gene. Rapid communication. *J. Anim. Sci.* 71: 2277-2277.
- BOURDON, R.M. 2000. Understanding Animal Breeding. 2nd Edition. Prentice Hall Inc. Upper Saddle River, New Jersey. USA.
- CASAS, E., S.N. WHITE, T.L. WHEELER, S.D. SHACKELFORD, M. KOOHMARAIE, D.G. RILEY, C.C. CHASE, JR., D.D. JOHNSON and T.P.L. SMITH. 2006. Effect of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84: 520-525.
- CHUNG, H.Y., M.E DAVIS, H.C. HINES and D.M. WULF. 1999. Effect of the calpain proteolysis and calpain genotype on meat tenderness of Angus bulls. *J. Anim. Sci.* 77: 31-38.
- CIOBANU, M.F.D.C., J.W.M. BASTIANSEN, S.M. LONERGAN, H. THOMSEN, J.C.M. DEKKERS, G.S. PLASTOW and ROTHSCILD. 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J. Anim. Sci.* 82: 2829-2839.
- COCKETT, N.E., T.L. SHAY, R.D. GREEN and D.L. HANCOCK. 1995. A TaqI restriction fragment length polymorphism in the bovine gene. Rapid Communication. *J. Anim. Sci.* 73: 3790-3790.
- DUCKETT, S.K., G.D. SNOWDER and N.E. COCKETT. 2000. Effect of the callipyge gene on muscle growth, calpastatin activity, and tenderness of three muscles across the growth curve. *J. Anim. Sci.* 78: 2836-2841.
- DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN. 2005. Buku Statistik Peternakan. Direktorat Jendral Peternakan. Departemen Pertanian RI. Jakarta.
- FREKING, B.A., T.P.L. SMITH and K.A. LEYMASTER. 2004. The callipyge mutation for sheep muscular hypertrophy-genetics, physiology and meat quality. In: Muscle Development of Livestock Animals Physiology, Genetics and meat Quality. M.F.W. te Pas, M.E. Evert and H.P. Haagsman (Editor). CABI Publishing. Cambridge. USA.
- GEESINK, G.H. and M. KOOHMARAIE. 1999. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem condition. *J. Anim. Sci.* 77: 2685-2692.
- GOLL, D.E., V.F. THOMPSON, R.G. TAYLOR and J.A. CHRISTIANSEN. 1992. Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie.* 74: 225-237.
- HEDIGER, R., H.A. ANSARI and G.F. STRANZINGER. 1991. Chromosome banding and gene localizations support extensive conservation of chromosome structure between cattle and sheep. *Cytogenet. Cell Genet.* 57: 127-134.
- HUFF-LONERGAN, E., F.C. PARRISH JR., and R.M. ROBSON. 1995. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 73: 1064-1073.
- KAPPES, S.M., J.W. KEELE, R.T. STONE, T.S. SONSTEGARD, T.P.L. SMITH, R.A. MCGRAW, N.L. LOPEZCORRALES and C.W. BEATTIE. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7: 235-249.
- KILLEFER, J. and M. KOOHMARAIE. 1994. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. *J. Anim. Sci.* 72: 606-614.

- KOOHMARAIE, M., G. WHIPPLE, D.H. KRETCMAR, J.D. CROUSE and H.J. MERSMANN. 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J. Anim. Sci.* 69: 617-624.
- KOOHMARAIE, M., S.D. SHACKELFORD, T.L. WHEELER, S.M. LONERGAN and M.E. DOUMIT. 1995. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *J. Anim. Sci.* 73: 3596-3607.
- KURLY, J., W. KAPELANSKI, M. PIERZCHALA, S. GRAJEWSKA, and M. BOCIAN. 2003. Preliminary observation on the effects of calpastatin gene (CAST) polymorphisms in carcass traits in pigs. *Anim. Sci. Paper Rep.* 2: 87-95.
- LONERGAN, S.M., C.W. ERNST, M.D. BISHOP, C.R. CALKINS and M. KOOHMARAIE. 1995. Relationship of restriction fragment length polymorphisms at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. *J. Anim. Sci.* 73: 3608-3612
- MALEK, M., J.C. DEKKERS, H.K. LEE, T.J. BAAS, K. PRUSA, E.H. LONERGAN and M.F. ROTHSCHILD. 2001. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mamm. Genome* 12: 637-645.
- MAY, S.G., H.G. DOLEZAL, D.R. GILL, F.K. RAY and D.S. BUCHANAN. 1992. Effect of days fed, carcass grade traits, and subcutaneous fat removal on postmortem muscle characteristics and beef palatability. *J. Anim. Sci.* 70: 444-453.
- MILLER, M.F., K.L. HUFFMAN, S.Y. GILBERT, L.L. HAMMON, and C.B. RAMSEY. 1995. Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. *J. Anim. Sci.* 73: 2308-2314.
- MORGAN, J.B., T.L. WHEELER, M. KOOHMARAIE, J.W. SAVELL and J.D. CROUSE. 1993. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in the longissimus muscle of young bulls and steers. *J. Anim. Sci.* 71: 1471-1476.
- MORRIS, C.A., N.G. CULLEN, S.M. HICKEY, P.M. DOBBLE, B.A. VEENVLIET, T.R. MANLEY, W.S. PITCHFORD, Z.A. KRUK, C.D. BOTTEMA and T. WILSON. 2006. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked M. Longissimus dorsi steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Anim. Genet.* 37: 411-414.
- NASSIRY, M.R., M. TAHMOORESPOUR, A. JAVADMANESH, M. SOLTANI and S.F. FAR. 2006. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. *Iran. J. Biotechnol.* 4: 188-192.
- 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.
- NOUR, A.Y., L.A. GOMIDE, E.W. MILLS, R.P. LEMENAGER and M.D. JUDGE. 1994. Influence of production and postmortem technologies on composition and palatability of USDA select grade beef. *J. Anim. Sci.* 72: 1224-1231.
- O'CONNOR, S.F., J.D. TATUM, D.M. WULF, R.D. GREEN and G.C. SMITH. 1997. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. *J. Anim. Sci.* 75: 1822-1830.
- PALMER, B.R., N. ROBERTS, J.G.H. HICKFORD and R. BICKERSTAFFE. 1998. Rapid communication: PCR-RFLP for *MspI* and *NcoI* in the ovine calpastatin gene. *J. Anim. Sci.* 76: 1499-1500.
- PALMER, B.R., H.Y. SU, N. ROBERTS, J.G. HICKFORD and R. BICKERSTAFFE. 2000. Single nucleotide polymorphisms in an intron of the ovine calpastatin gene. *Anim. Biotechnol.* 11: 63-67.
- PALUMBI, S.R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. *In*: D.M. HILLIS, C. MORITZ dan B.K. MABLE (Editor). Molecular Systematics. 2nd Edition. Sinauer Associates. Inc., Massachusetts USA.
- ROBERTS, N., B. PALMER, J.G.H. HICKFORD and R. BICKERSTAFFE. 1996. PCR-SSCP in the ovine calpastatin gene. *Anim. Genet.* 27: 211-222.
- SAMBROOK, J., F. FRITSCH and T. MINIATIS. 1989. Molecular Cloning Laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- SAS INSTITUTE. 1989. SAS/STAT Guide for Personal Computer. Version 6. Edit. SAS Institute Cary, NC. USA.
- SCHENKEL, F.S., S.P. MILLER, Z. JIANG, I.B. MANDEL, X. YE, H. LI and J.W. HILTON. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84: 291-299.
- SHAHROUDI, F.E., M.R. NASSIRY, R. VALIZADH, A.H. MOUSSAVI, M.T. POUR, AND H. GHIASI. 2006. Genetic polymorphisms at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul Sheep. *Iran J. Biotechnol.* 4: 117-122.
- SUMANTRI, C., A. EINSTIANA, J.F. SALAMENA dan I. INOUNU. 2007. Keragaan dan hubungan phylogenetik antar domba lokal di Indonesia melalui pendekatan analisis morfologi. *JITV.* 12: 42-54.
- SWANEK, S.S., J.B. MORGAM, F.N. OWENS, D.R. GILL, C.A. STRASIA, H.G. DOLEZAL and F.K. RAY. 1999. Vitamin D3 supplementation of beef steers increases longissimus tenderness. *J. Anim. Sci.* 77: 874-881.
- TAHMOORESPOUR, M. 2005. Genetic polymorphism in calpain and calpastatin genes and association with growth traits in Baluchi sheep. *In*: SHAHROUDI, F.E., M.R. NASSIRY, R. VALIZADH, A.H. MOUSSAVI, M.T. POUR, and H. GHIASI (Editor). Genetic polymorphisms at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul Sheep. *Iran. J. Biotechnol.* 4: 117-122.
- 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 KOEVERING, M.T., D.R. GILL, F.N. OWEN, H.G. DOLEZAL and C.A. STRASIA. 1995. Effect of time on feed on performance of feedlot steers, carcass characteristic, and tenderness and composition of longissimus muscles. *J. Anim. Sci.* 73: 21-28.
- WALPOLE, R.E. 1993. Pengantar Statistik. Edisi ke-3. Terjemahan. Bambang Sumantri. Gramedia. Jakarta
- WOODWARD, B.W., S.K. DENISE and J.A. MARCHELLO. 2000. Evaluation of calpastatin activity measures in ante- and postmortem muscle from half-sib bulls and steers. *J. Anim. Sci.* 78: 804-809.
- ZHOU, H., J.G. HICKFORD and H. GONG. 2007. Polymorphism of the ovine calpastatin gene. *Mol. Cell Probes.* 21: 242-244.