

Identifikasi Keragaman SNP Gen MSTN Pada Sapi Limousin

Diversity Identification SNPs of MSTN Gene in Limousine Cattle

Wenny Ladhunka Nur Aliyya¹, Jakaria², dan Ronny Rachman Noor³

¹Fakultas Peternakan, Universitas Islam Lamongan, Jl. Veteran No. 53A Kabupaten Lamongan, Jawa Timur, 62211. wennyl@unisla.ac.id, Whatsapp: 081233821018

^{2,3}Fakultas Peternakan, IPB University, Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, 16680.
Corresponding email: wennyl@unisla.ac.id

Abstract

Limousin cattle (*Bos Taurus*) are beef cattle that have a large, long, body shape, with have advantages of fast body growth, high fertility and easy reproducibility. Myostatin gene is a family of TGF- β which plays a role in muscle growth and meat quality. This study aims to identify diversity of the Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) Myostatin gene in the coding region in limousine cattle. Blood samples were taken from 15 limousine cattle from BPTU-HPT Padang Mangatas, West Sumatra Province. SNPs identification is finish by amplifying the coding region using the sequencing method. This study revealed 12 SNPs spread over 2 SNPs in exon 1 (c.400 G>A, c.415 C>A), 8 SNPs in exon 2 (c.2411 C>T, c.2477 G>A, c.2489 G>A, c.2503 G>A, c.2521 G>A, c.2577 C>T, c.2609 G>A, c.2636 G>A), and in exon 3 find 2 SNPs (c.5107 C>A, c.5113 T>C) are polymorphic with allele frequencies in general being in Hardy-Weinberg equilibrium except for SNP c.2411 C>T which is not in balance. SNPs identified in the MSTN gene of limousine cattle are expected can function as candidate genetic markers, especially for the perfection of beef cattle in Indonesia.

Key words: Limousin Cattle, MSTN, SNP

Abstrak

Sapi Limousin (*Bos Taurus*) merupakan sapi pedaging yang memiliki bentuk tubuh besar, panjang, padat, dengan keunggulan pertumbuhan badan cepat, fertilitas tinggi dan mudah melahirkan. Gen Myostatin merupakan keluarga dari TGF- β yang berperan dalam menekan pertumbuhan otot dan kualitas daging. Penelitian ini bertujuan untuk identifikasi keragaman SNP gen Myostatin di wilayah coding pada sapi limousin. Sampel berupa darah 15 ekor sapi limousin yang diambil dari lokasi BPTU-HPT Provinsi Sumatera Barat. Identifikasi SNP dilakukan dengan mengamplifikasi daerah coding menggunakan metode sekuensing. Dalam penelitian ini ditemukan 12 SNP yang tersebar 2 SNP di ekson 1 (c.400 G>A, c.415 C>A), 8 SNP di ekson 2 (c.2411 C>T, c.2477 G>A, c.2489 G>A, c.2503 G>A, c.2521 G>A, c.2577 C>T, c.2609 G>A, c.2636 G>A), dan 2 SNP di ekson 3 (c.5107 C>A, c.5113 T>C) bersifat polimorfik dengan frekuensi alel berada dalam keseimbangan kecuali pada SNP c.2411 C>T tidak dalam keadaan seimbang. SNP yang ditemukan pada gen MSTN sapi limousin diharapkan dapat digunakan sebagai kandidat marka genetik khususnya untuk pengembangan sapi pedaging di Indonesia.

Kata kunci: Sapi limousin, MSTN, SNP

PENDAHULUAN

Sapi limousin (*Bos taurus*) merupakan sapi tipe pedaging yang berasal dari Perancis. Menurut Yulianto dan Saparinto (2014), kelebihan sapi limousin yaitu bentuk tubuh panjang, padat, besar, pertumbuhan cepat, fertilitas cukup tinggi, dan mudah melahirkan, dengan bobot lahir mencapai 39-40 kg, sedangkan bobot sapih \pm 198 kg. Sapi limousin mulai ditenakkan di Indonesia pada tahun 1990an dan sudah menyebar diberbagai daerah di Indonesia, dan terus di kembangkan sampai saat ini sebagai salah satu sapi potong yang potensial dalam mengatasi permintaan

masyarakat terkait protein hewani. Salah satu program dalam menjaga kelestarian sapi limousin di Indonesia adalah melalui metode pemuliaan dengan dilakukan perbaikan dan peningkatan input-input produksi peternakan, melalui pola pengembangan dan perbibitan (Shadiq *et al.* 2017). Pelaksanaan kegiatan pemuliaan sapi limousin tetap dilaksanakan hingga saat ini dengan perubahan nomenklatur baru menjadi BPTU-HPT dengan tujuan selain pemuliaan juga untuk peningkatan produktivitas ternak. Pendekatan seleksi merupakan salah satu metode yang dilakukan agar memperoleh performa di atas rata-rata

sebagai upaya meningkatkan produktivitas. Salah satu pendekatan seleksi dengan penggunaan penanda molekuler berbasis marka genetik diharapkan dapat digunakan sebagai salah satu peningkatan dalam ketepatan seleksi (Meuwissen *et al*, 2001) terutama menggunakan gen- gen pengontrol sifat pertumbuhan, salah satunya adalah gen *Myostatin* (MSTN).

Gen MSTN merupakan keluarga dari TGF- β yang berfungsi mengatur kualitas daging dan pertumbuhan otot (Zhang *et al*. 2011). Mutasi gen MSTN di dalam sel dapat menyebabkan pertumbuhan jaringan otot diatas rata-rata secara hipertrofi dan hiperplasia. Mutasi gen MSTN telah terjadi pada sapi Belgian Blue yang menyebabkan pertumbuhan otot ganda (*double muscling*) (Oldham *et al*, 2001) akibat hilangnya 11 basa nucleotida pada daerah ekson 3. Identifikasi keragaman gen myostatin dapat dilakukan dengan pendekatan SNP. SNP (*single nucleotide polymorphism*) adalah bentuk ragam genetik berupa basa nucleotida dan ditemukan dalam rangkaian basa DNA di

daerah *coding* atau *non- coding*. Perubahan dan mutasi SNP yang terjadi di daerah *coding* memiliki potensi merubah asam amino dan struktur protein di dalam tubuh. Penelitian tentang gen MSTN pada sapi limousin masih terbatas sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai calon penanda genetik sifat pertumbuhan terutama pada sapi pedaging.

MATERI DAN METODE

Materi penelitian berupa sampel darah yang diambil dari 15 ekor sapi limousin umur 1-3 tahun sebanyak \pm 6 mL di BPTU-HPT Provinsi Sumatera Barat. DNA di Ekstraksi di Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Molekuler Fakultas Peternakan IPB University berdasarkan prosedur ekstraksi DNA kit GeneAid. Amplifikasi fragmen gen MSTN menggunakan Primer data sekuensial dari genBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) dengan nomor akses AY794986,1 (Aliyya, *et al*, 2020). Tabel 1 merupakan data sekuen primer yang diaplikasikan dalam penelitian.

Table 1. Data sekuen primer gen MSTN^{*)} yang digunakan dalam penelitian.

Fragmen	Sekuens Primer	Suhu	Produk
Ekson 1	F: 5'-CAAGTTGTCTCTCAGACTGG-3' R: 5'-CTCCTCCTTACATAACAAGCC-3'	55 °C	608 bp
Ekson 2	F: 5'-GATTGATATGGAGGTGTTCG-3' R: 5'-TAGGATGTGAAATGGGACAC-3'	56 °C	622 bp
Ekson 3	F: 5'-CTCTTCTTTCCTTTCCATACAGAC-3' R:5'-AGGGGAAGACCTTCCATGTT-3'	60 °C	451 bp

^{*)}mengacu pada sekuen gen MSTN di GenBank AY794986.1, F = forward, R = reverse

^{*)}Sumber : Aliyya *et al* (2020)

Amplifikasi DNA (PCR) dilakukan di mesin thermocycler (*Applied Biosystem 9700*) menurut primer. Reagen terdiri dari 12,5 μ L PROMEGA Hijau MMix, 9,9 μ L NFW, 0,28 μ L primer *forward*, 0,28 μ L primer *reverse*. Selanjutnya, campuran reagen DNA siap untuk diamplifikasi dengan suhu sesuai Tabel

1. Elektroforesis adalah tahap lanjutan setelah amplifikasi PCR. Bahan yang digunakan adalah DNA produk PCR, gel agarosa, 0,5xTBE, 1.0 μ L *flourosafe* dan marker DNA 100 pb. Sekuensing produk PCR dilakukan dengan menggunakan jasa analisis yaitu perusahaan 1st BASE di Selangor, Malaysia.

Analisis hasil sekuensing gen MSTN diuji menggunakan program sesuai Tamura *et al* (2013), yaitu FinchTV, BioEdit dan MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versi 7.0.

Analisis Data

Keragaman Genotipe dan Alel

Keragaman genotipe dan alel di hitung berdasarkan metode Nei dan Kumar (2000)

dengan rumus:

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

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

Keterangan:

X_i = frekuensi alel

X_{ii} = frekuensi genotipe

n_{ii} = jumlah individu bergenotipe ii

n_{ij} = jumlah individu bergenotipe ij

N = jumlah sampel

Heterozigositas

Estimasi heterozigositas dapat dilakukan dengan menghitung nilai H_o (pengamatan) dan H_e (harapan) (Nei dan Kumar, 2000):

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

Keterangan:

H_o = heterozigositas pengamatan

H_e = heterozigositas harapan

n_{ij} = jumlah individu heterozigot

N = jumlah sampel

X_i = frekuensi alel

q = jumlah alel

Keseimbangan Hardy-Weinberg

Uji keseimbangan dan penyimpangan di hitung sesuai prosedur Nei dan Kumar (2000):

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

Keterangan:

χ^2 = nilai Hardy-Weinberg (Chi square)

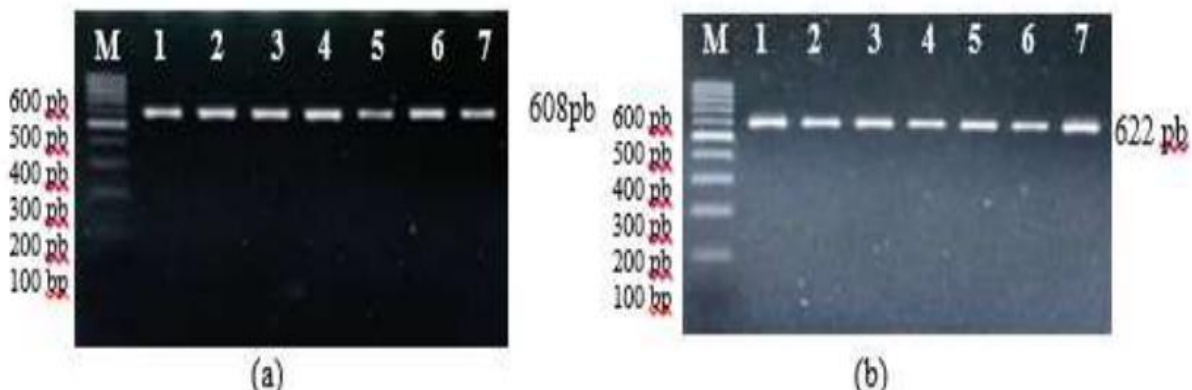
O = sampel genotipe

E = genotipe kemungkinan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen MSTN

Amplifikasi Gen MSTN pada daerah *coding* pada sapi limousin berhasil di amplifikasi masing- masing pada suhu *annealing* 55 °C panjang 608 pb (ekson 1), 56 °C panjang 622 pb (ekson 2) dan 60 °C panjang 451 pb (ekson 3). Gambar 1 yaitu hasil amplifikasi ekson 1 dan ekson 2.



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen MSTN sapi limousin ekson 1 (a), ekson 2 (b) menggunakan 1.5% gel elektorforesis, marker (M).

Keragaman Gen MSTN

Keragaman gen MSTN pada sapi limousin yang diperoleh berdasarkan SNP di daerah *coding* telah ditemukan 12 SNP yang

tersebar 2 SNP di ekson 1, 8 SNP di ekson 2 dan 2 SNP di ekson 3 dengan tipe mutasi transisi dan transversasi (Tabel 2). Gambar 2

dan Gambar 3 merupakan visualisasi parsial lokasi SNP pada gen MSTN sapi limousin.

Tabel 2. Posisi SNP dan tipe mutasi gen MSTN pada sapi limosin di daerah *coding*.

Bangsa	Daerah Gen MSTN	SNP	Tipe mutasi	Posisi asam amino
Sapi Limosin	Ekson 1	c.400 G>A	Transisi	Glu89Glu
		c.415 C>A	Transversi	Phe94Leu
	Ekson 2	c.2411 C>T	Transisi	Cys138Cys
		c.2477 G>A	Transisi	Leu160Leu
		c.2489 G>A	Transisi	Lys164Lys
		c.2503 G>A	Transisi	Phe170Cys
		c.2521 G>A	Transisi	Arg175Lys
		c.2577 C>T	Transisi	Leu194Phe
		c.2609 G>A	Transisi	Gln204Gln
		c.2636 G>A	Transisi	Glu213Glu
	Ekson 3	c.5107 C>T	Transisi	Ile359Ile
		c.5113 T>G	Transversi	Tyr316Tyr

*Sumber: Data diolah

Ditemukan tipe mutasi yaitu 10 mutasi transisi dan 2 mutasi transversi, dengan 3 mutasi *non-synonimus* dan 9 mutasi *synonimus*. Mutasi transisi merupakan substitusi basa yang memiliki struktur sama yaitu basa purin berpasangan basa purin atau basa primidin berpasangan basa pirimidin,

sedangkan mutasi transversi merupakan substitusi basa yang memiliki struktur berbeda yaitu basa purin dengan basa pirimidin (Luo *et al.* 2016). Mutasi transversi yang ditemukan di ekson berpotensi menyebabkan perubahan asam amino (Allendorf *et al.* 2013).

Tabel 3 frekuensi genotipe, frekuensi alel dan Hardy-Weinberg gen MSTN pada sapi limosin

Bangsa	Ekson	SNP	Frekuensi genotipe			Frekuensi alel		χ^2
			AA	AB	BB	A	B	
Sapi Limosin	1	c.400 G>A	-	-	1.00	-	1.00	0.00
		c.415 C>A	-	0.20	0.80	0.10	0.90	0.12
	2	c.2411 C>T	0.80	-	0.20	0.80	0.20	10.00*
		c.2477 G>A	0.90	0.10	-	0.95	0.05	0.03
		c.2489 G>A	0.90	0.10	-	0.95	0.05	0.03
		c.2503 G>A	0.90	0.10	-	0.95	0.05	0.03
		c.2521 G>A	0.80	0.20	-	0.90	0.10	0.12
		c.2577 C>T	0.90	0.10	-	0.95	0.05	0.12
		c.2609 G>A	0.50	0.50	-	0.75	0.25	1.11
		c.2636 G>A	0.70	0.30	-	0.85	0.15	0.31
	3	c.5107 C>A	-	-	1.00	-	1.00	0.00
		c.5113 T>C	-	-	1.00	-	1.00	0.00

AA = genotipe referensi, AB = heterozigot, BB = mutasi, A = alel referensi, B = mutasi, χ^2 = Hardy-Weinberg, (*) = berpengaruh pada α 5% (χ^2 obs \geq 3.84), χ^2 dengan nilai 0.00 = alel monomorfik.

Keragaman gen MSTN pada sapi limosin dicerminkan oleh SNP yaitu ditemukan 9 SNP bersifat polimorfik dan 3

SNP bersifat monomorfik (Tabel 3). Menurut Nei dan Kumar (2000), nilai frekuensi alel diatas 0.01 (1%) mencerminkan terdapat

keragaman dalam populasi. Keragaman gen adalah salah satu analisis yang digunakan sebagai acuan program pemuliaan. Program pemuliaan berupa seleksi dapat dilakukan apabila populasi beragam dan dilakukan persilangan jika seragam (Noor, 2010).

Identifikasi suatu populasi dalam keadaan seimbang atau tidak, dapat di analisis menggunakan Uji keseimbangan Hardy-Weinberg (χ^2). Hasil penelitian diperoleh uji (χ^2) pada sapi limousin secara umum seimbang kecuali pada SNP c.2411 C>T tidak berada dalam keseimbangan. Uji *chi-square* (χ^2) dengan nilai 0.00 terdeteksi alel bersifat monomorfik sehingga tidak dapat dihitung. Mutasi yang berada dalam keadaan keseimbangan memiliki arti frekuensi gen dan frekuensi alel dalam populasi tidak mengalami perubahan generasi, telah dilakukan perkawinan acak, dan tidak terdapat faktor penyebab perubahan gen. Noor (2010), menyatakan beberapa faktor dapat mempengaruhi keseimbangan dan perubahan genetik adalah migrasi, seleksi, mutasi, tidak ada perkawinan acak, dan penyimpangan genetik. SNP gen MSTN yang ditemukan pada sapi limousin di BPTU-HPT Padang Mangatas, Sumatera Barat, menunjukkan frekuensi seimbang dan relatif stabil kecuali pada SNP c.2411 C>T frekuensi tidak dalam keadaan seimbang.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian yang telah dilakukan yaitu ditemukan Gen MSTN di daerah *coding* pada sapi limousin sebanyak 12 SNP yang tersebar di ekson 1 (2 SNP), ekson 2 (8 SNP) dan ekson 3 (2 SNP) bersifat polimorfik dengan frekuensi alel berada dalam keadaan Hardy-Weinberg (seimbang) kecuali SNP c.2411 C>T tidak dalam keadaan seimbang. SNP yang ditemukan pada gen MSTN sapi limousin diharapkan dapat digunakan sebagai kandidat marka genetik khususnya untuk pengembangan sapi potong di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Aliyya W L N, Noor RR, Jakaria. 2020. Exploring SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) of Myostatin gene in coding region in Bali Cattle. IOP International Conference of Animal Science and Technology. Vol. 492.
- Allendorf FW, Luikart GH, Aitken SN. 2013. Conservation and the Genetics of Populations. Edisi ke-2. West Sussex (UK): Wiley-Blackwell Publishing.
- Luo G, Li X, Han Z, Zhang Z, Yang Q, Guo H, Fang J. 2016. Transition and Transversion Mutations Are Biased towards GC in Transposons of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Nanjing (CN): Jiangsu Academy of Agricultural Sciences.
- Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetic journal*. 157(4): 1819-1829.
- Nei M, Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York (USA): Oxford Univ Pr.
- Noor RR. 2010. Genetika Ternak. Edisi ke-6. Jakarta (ID): Penebar Swadaya.
- Oldham JM, Martyn JAK, Sharma M, Jaenplong F, Kambadur R, Bass JJ. 2001. Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscled than normal-muscled cattle fetuses. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 280: R1488-R1493.
- Sodiq A, Suwarno, Fauziyah FR, Wakhidati YN, Yuwono P. 2017. Sistem produksi peternakan sapi potong di pedesaan dan strategi pengembangannya. *Agripet*. 17(1):60-66.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis versions 6.0. *Mol Biol Evol.* 30(12):2725-2729.
- Yulianto P, Saporinto C. 2014. *Beternak Sapi Limousin; Panduan pembibitan, pemsaran dan penggemukan.* Penebar Swadaya. Semarang.
- Zhang C, Liu Y, Xu D, Wen Q, Li X, Zhang W, Yang L. 2011. Polymorphisms of myostatin gene (MSTN) in four goat breeds and their effects on boer goat growth performance. *Mol Biol Rep.* 39(3):3081-3087.