

Terakreditasi

Ditjen Penguatan Riset dan Pengembangan, Kemenristekdikti
Keputusan No: 21/E/KPT/2018, Tanggal 9 Juli 2018

DOI: <http://dx.doi.org/10.33772/jitro.v6i2.6165>
<http://ojs.uho.ac.id/index.php/peternakan-tropis>

Filogeni Beberapa Sapi Lokal Indonesia Menggunakan DNA Mitokondria COI (*Cytochrome Oxidase Sub unit I*)

Anisa Wulandari^{1*}, V.M. Anis Nurgartiningih¹, Kuswati¹, Tri Eko Susilorini¹,
Paskah Partogi Agung²

¹Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

Jl. Veteran, Lowokwaru, Malang, Jawa Timur 65145

²Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong, Jawa Barat

*Email korespondensi: answlnr@gmail.com

(Diterima: 04-04-2019; disetujui 30-04-2019)

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan konstruksi pohon filogeni berdasarkan keragaman DNA Mitokondria khususnya COI (*Cytochrome Oxidase Sub unit I*). Sampel yang digunakan yakni darah sapi PO, DNA sapi SO, sapi pesisir, sapi bali, sapi madura dan sapi pasundan masing-masing 12 sampel. Sekuen COI dianalisis menggunakan MEGA 7.0 *software* dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* (NJ) 1000 kali pengulangan berdasarkan *between group* untuk merekonstruksi pohon filogeni. Hasil penelitian menunjukkan sapi pesisir dekat dengan sapi SO, sapi madura dan sapi pasundan tidak memiliki kekerabatan dengan sapi lokal Indonesia lainnya sehingga membentuk garis tersendiri dan sapi PO dekat dengan sapi bali.

Kata Kunci: COI, DNA mitokondria, filogeni sapi lokal indonesia

ABSTRACT

The purpose of this study was to obtain the construction of phylogeny trees based on the diversity of Mitochondrial DNA especially COI. The samples used were PO cattle blood, SO cow DNA, Coastal cattle, bali cattle, madura cattle, and pasundan cattle every 12 samples. COI sequences were analyzed using MEGA 7.0 software with the bootstrapped Neighbor-Joining (NJ) method 1000 repetitions based on the between groups to reconstruct the phylogeny tree. The results showed that coastal cattle close to SO cattle, madura cattle, and pasundan cattle did not have a kinship with other local Indonesian cows to form a separate line and PO cattle close to bali cattle.

Keywords: mitochondrial DNA, coi, indonesian local cow, phylogeny

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki berbagai bangsa ternak sapi potong, diantaranya sapi bali, aceh, madura, pesisir, SO, PO, pasundan, dan katingan. Saat ini informasi genetik pada beberapa bangsa sapi lokal tersebut sudah tersedia namun masih terbatas, misalnya studi mengenai potensi sumber daya genetik sapi PO (Astuti, 2004) dan sapi SO (Agung *et al.*, 2015). Adanya dugaan hubungan kekerabatan (filogenetik) antar bangsa sapi yang ada di Indonesia menjadi hal penting untuk diketahui mengingat sapi lokal (pesisir, SO dan PO) merupakan persilangan banteng dan sapi luar yang masuk ke Indonesia namun, telah cukup

lama berada di Indonesia sehingga berkembang biak sesuai dengan lingkungan lokal (Abdullah *et al.*, 2008). Adanya persilangan antar bangsa sapi lokal tersebut menyebabkan kemungkinan adanya keragaman genetik seperti keragaman di DNA mitokondria (mtDNA) diantara sapi-sapi lokal Indonesia. DNA mitokondria merupakan penciri genetik yang memiliki tingkat variabilitas tinggi, merupakan jalur maternal (induk) dan lebih mendekati model evolusi yang netral, sehingga mtDNA menjadi salah satu sarana penting untuk memahami asal-usul bangsa dan proses domestikasi sapi (Avise, 2004). Penciri yang umumnya digunakan untuk studi keragaman adalah DNA *barcode* yang

merupakan penciri menggunakan gen *cytochrome oxidase* subunit I (COI) (Hebert *et al.*, 2004). Gen COI memiliki banyak kelebihan untuk mempelajari karakteristik genetik karena sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuennya, serta banyak bagian yang bersifat *conserve* (lestari) sehingga dapat digunakan sebagai DNA *barcoding* pada sebagian besar spesies (Hebert *et al.* 2003). Gen COI juga dapat digunakan untuk merekonstruksi filogenetik pada cabang evolusi tingkat spesies. Selain itu susunan asam amino dari protein yang disandi gen COI jarang mengalami substitusi sehingga gen COI bersifat stabil dan dapat digunakan sebagai penanda analisis filogeni, namun basa-basa pada *triple* kodonnya masih berubah dan bersifat *silent* yaitu perubahan basa yang tidak merubah jenis asam amino. Hal ini telah dilakukan pada berbagai *species* seperti sapi (Syed-Shabthar *et al.*, 2013) dan ayam (Yu-Shi *et al.*, 2011). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan konstruksi pohon filogeni berdasarkan keragaman DNA mitokondria khususnya COI.

MATERI DAN METODE

Materi DNA

Materi yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari sampel darah sapi PO yang berasal dari Kecamatan Palang dan Jatirogo, Kabupaten Tuban sebanyak 12 sampel. Seluruh sampel disimpan dalam tabung vacuntainer dengan EDTA. Sampel DNA yang meliputi, sapi SO dari Waingapu sebanyak 12; dan sapi pesisir dari

Sumatera Barat sebanyak 12. Ekstraksi DNA yang berasal dari sampel darah menggunakan DNA mini kit (Jena Ltd. Jerman) dan dilakukan sesuai prosedur yang disediakan.

PCR Amplifikasi dan Sekuensing

Pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini untuk mengamplifikasi gen CYTB mengacu pada Chung (2013) dengan rincian yang disajikan dalam Tabel 1. Reaksi PCR dilakukan dengan volume akhir 25 µl dengan komposisi PCR mix yang terdiri dari *Go Taq* 10 µl, primer forward 2,5 µl, primer reverse 2,5 µl, sampel DNA 2,5 µl dan DW (*Destilated water*) 7,5 µl. Reaksi PCR diatur dengan kondisi sebagai berikut: pradenaturasi 94°C selama 5 menit, diikuti oleh 30 siklus denaturasi 94°C selama 25 detik, annealing 54°C selama 25 detik dan ekstensi 72°C selama 25 detik. Langkah ekstensi terakhir adalah pada 72°C selama 5 menit. Visualisasi DNA hasil amplifikasi menggunakan elektroforesis dengan media gel agarosa 1% dan dijalankan menggunakan tegangan 100 volt selama 60 menit dan dilanjutkan dengan pengambilan gambar menggunakan gel documentation (G:Box). Analisis sekuensing dilakukan di Laboratorium 1st BASE (Malaysia). Sekuens DNA dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA 7.0 metode *neighbor-joining* dengan model kimura 2-parameter yang diterapkan untuk merekonstruksi pohon filogeni (Saputra, *et al.*, 2013).

Tabel 1. Primer COI

Basa Sekuen (5'-3')	Panjang	Posisi*
F: 5' TTC TCA ACC AAC CAT AAA GAT ATT GG 3'	709 bp	14144-14162
R: 5' TAG ACT TCG GGG TGT CCA AAG AAT CA 3'		14944-14968

* menurut Genbank kode akses AY126697.1 dan FJ997262.1

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman mtDNA COI meliputi jenis mutasi, nilai frekuensi genotipe dan alel pada beberapa sapi lokal Indonesia disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 2, posisi SNP yang terjadi pada beberapa sapi lokal Indonesia dengan COI dan ditemukan mutasi substitusi yang meliputi transisi dan translokasi. Mutasi substitusi merupakan mutasi

yang terjadi karena adanya penggantian basa nukleotida dengan nukleotida lainnya. Hal ini didukung oleh Campbell *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa mutasi jenis substitusi pasangan basa (*base-pair substitution*) merupakan penggantian satu nukleotida dan pasangannya dengan sepasang nuklotida lainnya. Didukung pula oleh Elord & Wiliam (2002) yang menyatakan bahwa mutasi substitusi terdiri dari transisi dan transversi.

Tabel 2. Keragaman mtDNA COI pada sapi pesisir, PO, dan SO

Bangsa	Jumlah Sampel	SNP	Jumlah SNP	Jenis Mutasi	Frekuensi Genotipe			Frekuensi Alel	
					AA*	AB	BB**	A	B
Pesisir	12	T>C	10	Transisi	0.83	-	0.17	0.83	0.17
	12	C>T	15	Transisi	0.84	-	0.16	0.84	0.16
	12	A>G	10	Transisi	0.84	-	0.16	0.84	0.16
	12	G>A	2	Transisi	0.84	-	0.16	0.84	0.16
	12	T>A	1	Transversi	0.83	-	0.17	0.83	0.17
	12	C>A	1	Transversi	0.83	-	0.17	0.83	0.17
PO	12	T>C	47	Transisi	0.84	-	0.16	0.84	0.16
	12	C>T	38	Transisi	0.82	-	0.18	0.82	0.18
	12	A>G	23	Transisi	0.84	-	0.16	0.84	0.16
	12	G>A	19	Transisi	0.85	-	0.15	0.85	0.15
	12	T>A	8	Transversi	0.89	-	0.11	0.89	0.11
	12	A>T	5	Transversi	0.92	-	0.08	0.92	0.08
	12	A>C	6	Transversi	0.90	-	0.10	0.90	0.10
	12	C>A	8	Transversi	0.90	-	0.10	0.90	0.10
	12	G>T	3	Transversi	0.92	-	0.08	0.92	0.08
	12	T>G	1	Transversi	0.92	-	0.08	0.92	0.08
	12	C>G	1	Transversi	0.92	-	0.08	0.92	0.08
	12	G>C	1	Transversi	0.92	-	0.08	0.92	0.08
SO	12	T>C	6	Transisi	0.86	-	0.14	0.86	0.14
	12	C>T	3	Transisi	0.89	-	0.11	0.89	0.11
	12	A>G	1	Transisi	0.92	-	0.08	0.92	0.08
	12	G>A	1	Transisi	0.92	-	0.08	0.92	0.08

*Genotipe AA merupakan genotipe yang tidak terjadi mutasi (Sesuai dengan GenBank)

**Genotipe BB merupakan genotipe yang terjadi mutasi (Berbeda dengan GenBank)

Mutasi transisi merupakan mutasi yang terjadi karena basa purin digantikan oleh basa purin lainnya atau basa pirimidin digantikan oleh basa pirimidin lainnya. Mutasi transversi merupakan mutasi yang terjadi karena basa pirimidin digantikan dengan basa purin atau sebaliknya. Hal ini didukung oleh Allendorf & Luikart (2007) yang menyatakan bahwa mutasi transisi merupakan mutasi yang menggantikan basa purin (A) dengan basa purin lainnya (G) atau basa pirimidin (T) dengan basa pirimidin lainnya (C). Mutasi transversi merupakan mutasi yang terjadi karena basa pirimidin (T) digantikan dengan basa purin (A) atau basa pirimidin (C) digantikan dengan basa purin (G).

Berdasarkan hasil perhitungan jarak genetik, diketahui bahwa hubungan kekerabatan yang rendah ditunjukkan oleh nilai jarak genetik antara sapi SO dengan sapi pesisir (3,312). Rincian informasi nilai jarak genetik yang

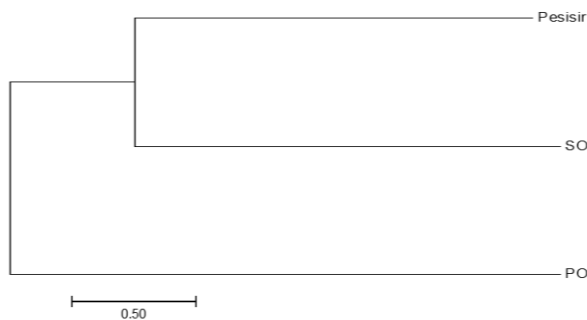
diperoleh dalam penelitian ini disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Matriks perbedaan rata-rata menggunakan metode *between group distance* daerah COI pada beberapa sapi lokal Indonesia.

	Pesisir	PO	SO
Pesisir	-		
PO	4.320	-	
SO	3.312	4.430	-

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan nilai jarak genetik pada sapi pesisir dengan sapi PO yakni 4.320 dan sapi pesisir dengan sapi SO yakni 3.312 yang menunjukkan adanya kedekatan secara genetik. Hasil penelitian Abdullah *et al.* (2008) menunjukkan bahwa nilai jarak genetik sapi PO dengan sapi pesisir yakni 8,95 sehingga sapi PO memiliki kedekatan dengan sapi pesisir menggunakan analisis mtDNA d-loop. Hasil penelitian Sharma *et al.*

(2015) menunjukkan bahwa sapi PO memiliki nilai jarak genetik yang paling dekat dengan sapi gangatiri yang merupakan sapi dari bangsa *Bos indicus* pada analisis mtDNA d-loop. Secara morfologi sapi pesisir dan sapi SO memiliki kesamaan morfologi warna tubuh. Menurut (Sarbaini, 2004) sapi pesisir memiliki warna tubuh yang bervariasi, salah satunya yakni berwarna putih dan sapi SO (BSN, 2016) mempunyai warna tubuh dominan putih hingga keabu-abuan. Sapi pesisir memiliki gelambir, bertanduk kecil (Kementan, 2011). Sapi SO memiliki gelambir dan bertanduk kecil (BSN, 2016). Berdasarkan kesamaan morfologi ini dan didukung dengan nilai jarak genetik yang dekat yakni 3,312 menunjukkan bahwa adanya kekerabatan dekat antara sapi pesisir dengan sapi SO.



Gambar 1. Konstruksi pohon filogeni dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* (NJ) 1000 kali pengulangan berdasarkan *between group* dari basa-basa nukleotida COI pada sapi lokal Indonesia

Gambar 1. menunjukkan bahwa sapi pesisir memiliki tingkat kekerabatan yang paling dekat dengan sapi SO, secara morfologi sapi pesisir dengan sapi SO memiliki beberapa kesamaan, yakni sapi SO memiliki tubuh berwarna putih, bergelambir, dan bertanduk kecil (BSN, 2016). Sapi pesisir memiliki variasi warna tubuh, salah satunya yakni berwarna putih (Sarbaini, 2004), bergelambir dan bertanduk kecil (Kementan, 2011). Berdasarkan beberapa kesamaan morfologi ini dan didukung dengan adanya kekerabatan secara genetik, menunjukkan bahwa diduga salah satu tetua dari sapi pesisir yakni sapi SO. Pada sapi PO memiliki kedekatan dengan sapi SO akan tetapi tidak memiliki kedekatan dengan sapi pesisir. Menurut Hardjosubroto (1994) sapi PO merupakan hasil dari persilangan antara sapi SO dengan sapi jawa.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan adanya variasi genetik pada beberapa sapi lokal Indonesia menggunakan COI. Pada Sapi PO memiliki variasi genetik yang lebih beragam, dan pada sapi SO tidak memiliki keragaman variasi genetik. Kekerabatan sapi lokal Indonesia menggunakan COI menunjukkan bahwa sapi pesisir dekat dengan sapi SO, dan sapi PO memiliki kedekatan dengan sapi SO.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A.N., R.R. Noor, & E. Handiwirawan. 2008. Identifikasi penanda genetik daerah *D-loop* pada sapi aceh. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 33
- Agung, P.P., S. Anwar., A.S. Wulandari, A. Sudiro., S. Said, & B. Tappa. 2015. The Potency of sumbawa ongole (SO) Cattle: a study of genetic characterization and carcass productivity. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 40(2):71-78.
- Allendorf, F.W., & G.H. Luikart. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Australia.
- Astuti, M. 2004. Potensi dan keragaman sumber daya genetik sapi peranakan ongole (PO). *Wartazoa.* 4(4):30-39.
- Avise, J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution Second edition. Sinauer Associates, Inc Publisher. USA.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional). 2016. SNI Bibit Sapi Potong Bagian 7: Sumba Ongole. SNI 7651.7:2016. ICS 65.020.30. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Chung, H. 2013. Phylogenetic Analysis and Characterization of Mitochondrial DNA for Korean Native Cattle. *OJGen.* 3:12-23.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman., P.V. Minorsky, & R.B. Jackson. 2008. Biology. Pearson Pearson Benjamin Cummings. San Fransisco.
- Elord, S.L. & D.S. William. 2002. Schaum's Outline of Theory and Problems of GENETICS, *Fourth Edition.* The McGraw-Hill Companies.

- Hardjosubroto, W. 1994. Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan. PT. Gramedia. Jakarta.
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham, & J.R. de Waard. 2003. Barcoding animal life: Cytochrome C Oxidase Subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*. 270(1):S96-S99.
- Hebert, P.D.N., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemplak, & C.M. Francis. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol*. 2:e312.
- Kementan. 2011. Keputusan Menteri Pertanian Penetapan Rumpun Sapi Pesisir Nomor 2908/Kpts/OT.140/6/2011. Kementerian Pertanian. Jakarta.
- Saputra, F., Jakaria, & C. Sumantri. 2013. Genetics variation of mtDNA cytochrome oxidase subunit I (COI) in lokal swamp buffaloes in Indonesia. *Media Peternakan* 36(3):165-170.
- Sarbaini. 2004. Kajian Keragaman Karakteristik Eksternal dan DNA Mikrosatelit Sapi Pesisir Sumatera Barat. Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sharma, R., A. Kishore., M. Mukesh, S. Ahlawat, A.K. Pandey, & M.S. Tania. 2015. Genetic diversity and relationship of indian cattle inferred from microsatellite and mitochondrial DNA markers. *J .BMS Genetics* 16(73):1-12.
- Syed-Shabthar, S.M., M.K. Rosli., N.A. Mohd-Zin, S.M. Romaino, Z.A. Fazly-Ann, M.C. Mahani, O. Abas-Mazni, R. Zainuddin, S. Yaakop, & B.M. Md-Zain. 2013. The molecular phyogenetic signature of Bali cattle revealed by maternal and paternal markers. *Mol Biol Rep* 40(8):5165-5176.
- Yu-Shi, G., T. Yun-Jie, T. Xiu-Jun, L. Jun-Xian, & Z. Xiao-Yan. Studies on the DNA barcoding on two newly discovered chicken breeds by mtDNA COI gene. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10:1171-1173.