

# ASOSIASI POLIMORFISME GENETIKA LOKUS *DEOXYNUCLEIC ACID* (DNA) MIKROSATELIT GEN *BOVINE LYMPHOCYTE ANTIGEN* (BoLA) DENGAN KUALITAS SEMEN PADA SAPI BALI

## *Genetic Association of Bovine Lymphocyte Antigen Microsatellite Loci with Semen Quality of Bali Cattle*

I Ketut Puja<sup>1</sup>, I Nengah Wandia<sup>2</sup>, Putu Suastika<sup>1</sup>, dan I Nyoman Sulabda<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Histologi Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

<sup>2</sup>Laboratorium Anatomi Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

<sup>3</sup> Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Udayana, Denpasar

E-mail: asubali@hotmail.com

### ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan informasi dasar mengenai struktur genetika menggunakan marka melokuler DNA mikrosatelit gen *bovine lymphocyte antigen* (BoLA) dan hubungannya dengan kualitas semen sapi bali. Data diambil dari 8 ekor sapi jantan yang ada di Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Inseminasi Buatan, Baturiti, Tabanan, Bali. Hasil pemeriksaan kualitas sperma menunjukkan bahwa volume semen sapi bali 3,0-6,5 ml, konsentrasi spermatozoa 800-11.000 juta sel/ml, dan persentase spermatozoa motil 70-75%. Hasil penelitian pada sapi bali menunjukkan bahwa ketiga lokus mikrosatelit yang digunakan teramplifikasi pada sapi bali dan jumlah alel pada lokus RM185 dan BM1815 adalah 2 sedangkan jumlah alel pada lokus DRB3 adalah 1. Heterozigositas per lokus berkisar 0-0,533. Nilai PIC per lokus antara 0-0,375. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ukuran alel pada ketiga mikrosatelit berpotensi sebagai marka molekuler yang berperan terhadap kualitas semen pada sapi bali.

Kata kunci: sapi bali, mikrosatelit DNA, PIC, kualitas semen

### ABSTRACT

*Major histocompatibility complex (MHC) typing based on microsatellites can be a valuable approach to understanding the selective processes occurring at linked or physically close MHC genes and can provide important information on variability and relationships of populations. Using microsatellites within or in close proximity with bovine lymphocyte antigen (BoLA) genes, we investigated the polymorphisms in the bovine MHC and were used to study associations of BoLA microsatellites loci with semen quality in Bali cattle. Data collected from 8 Bali cattle in UPTD Inseminasi Buatan, Baturiti, Tabanan Bali. The result showed, the semen volume obtained from Bali cattle ranged from 3.0 ml to 6.5 ml, spermatozoa concentration ranged between 800 million to 11,000 million cells / ml, and the percentage of motile spermatozoa ranged from 70 to 75%. In Bali cattle from Bali, the mean numbers of alleles RM185 were found 2, BM1815 were 2, and DRB3 were found to be 1 respectively. The average heterozygosity for the locus RM 185 is 0.533, the locus BM1815 was 0.533, and DRB3 is 0. The mean PIC value in Bali cattle were 0 -0,375. From the results of this study can be concluded that on a third mikrosatelit allele those seen as potential molecular marker that contribute to semen quality in Bali cattle.*

Key words: bali cattle, microsatellite DNA, PIC, semen quality

### PENDAHULUAN

Di antara sapi-sapi lokal yang ada di Indonesia, sapi bali merupakan sapi asli Indonesia yang memiliki beberapa keunggulan yaitu daya adaptasinya sangat baik terhadap lingkungan dan sebagai sapi potong, persentase karkasnya tinggi sekitar 54-56%. Sapi bali lebih toleran terhadap pakan yang kasar serta memiliki efisiensi penggunaan pakan yang lebih lebih baik dibanding sapi-sapi lokal lainnya. Di samping itu, sapi bali juga terkenal karena derajat fertilitasnya yang tinggi. Permasalahan yang terjadi pada sapi bali adalah rendahnya kinerja biologis seperti tingginya angka kematian anak, lambatnya pertumbuhan anak mencapai umur jual, dan interval kelahiran yang panjang. Oleh karena itu, perlu dilakukan upaya konkret untuk peningkatan mutu genetika sapi bali.

Salah satu upaya peningkatan mutu genetika sapi bali ini adalah melalui seleksi yang diarahkan untuk menghasilkan sapi bali unggul. Seleksi berdasarkan peran gen yang berpengaruh terhadap angka

pertumbuhan, ketahanan dari penyakit, serta karakteristik reproduksi merupakan dasar genetika untuk seleksi bibit unggul. Apabila gen-gen yang berpengaruh terhadap sifat yang bermanfaat seperti fertilitas diketahui maka tujuan menyeleksi bibit unggul yang mempunyai sifat ekonomis tinggi akan dapat dilakukan lebih awal. Hal ini akan dapat meningkatkan efisiensi produksi pada peternakan.

Beberapa kajian untuk mengetahui hubungan antara keragaman genetika dengan beberapa sifat ekonomi pada ternak telah banyak dilakukan. Pada sapi perah, sifat produksi telah diketahui berhubungan dengan keragaman alel pada gen *major histocompatibility complex* (MHC) yang pada sapi disebut dengan *bovine lymphocyte antigen* (BoLA) (Sharif *et al.*, 1999). Pada sapi, sifat produksi dan sifat yang berhubungan dengan ketahanan penyakit telah diketahui berhubungan dengan polimorfisme alel pada gen BoLA (Firouzmandi *et al.*, 2010). Menurut Stear *et al.* (2007) beberapa keragaman yang sifatnya non-imunologik telah diketahui berhubungan dengan gen BoLA, seperti

misalnya angka pertumbuhan, berat lahir, karkas, dan fertilitas. Polimorfisme pada alel gen BoLa tersebut juga berhubungan dengan produksi, persentase lemak dan protein air susu, angka pertumbuhan, kinerja reproduksi, respons imun, dan ketahanan penyakit (Nascimento *et al.*, 2006). Sejak diketahui bahwa gen BoLa tersebut sangat polimorfik, maka sangat memungkinkan menggunakan mikrosatelit *deoxynucleic acid* (DNA) sebagai penanda untuk seleksi sifat yang bernilai ekonomi tinggi. Sampai saat ini tidak ada penelitian yang mengungkap keragaman lokus mikrosatelit gen BoLa pada sapi bali dan hubungannya dengan tingkat kualitas semen.

Gen BoLa mempunyai ciri khas dengan banyaknya alel dalam setiap lokus serta keragaman asam amino pada setiap alelnya. Sifat polimorfisme yang tinggi ini menimbulkan variasi ekspresi yang berbeda pada setiap individu. Keragaman alel pada gen BoLa sangat memungkinkan menggunakan keragaman ini sebagai marka untuk seleksi. Pengungkapan keragaman genetika dengan marka molekuler DNA mikrosatelit akan mampu mendeteksi variasi dan polimorfisme pada DNA di antara anggota kelompok ternak. Polimorfisme ini dapat digunakan untuk mengetahui perbedaan marka spesifik dengan ekspresi fenotipe pada suatu populasi (Albert *et al.*, 1994).

## MATERI DAN METODE

### Pengumpulan Sampel

Untuk isolasi DNA digunakan sampel darah sapi bali jantan milik Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Inseminasi Buatan di Baturiti, Tabanan Bali. Fertilitas sapi jantan diukur dari kuantitas dan kualitas sperma yang meliputi volume, konsentrasi, dan motilitas spermatozoa menggunakan *automatic sperm analyzer*.

### Ekstraksi DNA

Sampel dari darah sapi yang diambil dari populasi sapi bali diekstraksi menggunakan QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

### Amplifikasi Lokus Mikrosatelit

Sebanyak 4 primer mikrosatelit pada kromosom nomor 23 digunakan dalam penelitian ini. Reaksi amplifikasi pada *polymerase chain reaction* (PCR) dilakukan pada PCT 100 (MJ Research, Inc, Watertown, Mass, USA) sebanyak 30 siklus dengan program sebagai berikut: denaturasi pada 95° C (5 menit), penganealan pada 56° C selama 30 menit, dan penambahan pada 72° C selama 10 menit. Hasil amplifikasi dipisahkan dengan gel *bis-acrylamide* 6% dan visualisasi dilakukan dengan pewarnaan perak. *Typing* DNA dilakukan dengan mengukur jarak migrasi masing-masing pita DNA pada gel dibandingkan dengan pita-pita DNA standar 100 pb *ladder*.

### Analisis Data

Polimorfisme genetika sapi bali diukur dengan rataan heterozigositas (H), jumlah dan frekuensi alel

yang dihitung untuk semua lokus. Frekuensi alel, jumlah alel,  $H_o$  (*observed heterozygosities*), dan  $H_e$  (*expected heterozygosities*) dihitung dengan menggunakan program *Microsatellite Toolkit* V.3.1. Asosiasi gen BoLa dengan tingkat fertilitas dianalisis menggunakan *the least squares maximum-likelihood method* (Harvey, 1991).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Spermatozoa Sapi Bali

Sapi bali jantan yang dipelihara di UPTD. Inseminasi Buatan adalah sapi-sapi jantan unggul yang diambil spermanya sebanyak dua kali seminggu. Sperma sapi tersebut diproses untuk selanjutnya disebarkan ke seluruh Bali. Sapi bali jantan tersebut merupakan hasil seleksi yang ketat yang telah melewati hasil uji kinerja dan progeni. Dari hasil penelitian ini diperoleh volume semen 3,0-6,5 ml, konsentrasi spermatozoa 800-11.000 juta sel/ml, dan persentase spermatozoa motil 70-75% seperti yang disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Karakteristik spermatozoa sapi bali jantan

No	Nama Sapi	Kode	Volume (ml)	Konsentrasi (juta)	Motilitas (%)
1	Kertalaba	19909	5,0	1.400	70
2	Sultan	10010	5,8	1.300	70
3	Banuarsa	10017	4,0	8.00	70
4	Brani	10322	3,0	1.400	75
5	Mertasari	10424	6,5	1.200	70
6	Nitih	10525	3,0	1.100	70
7	Denpur	10626	4,0	1.300	70
8	Basudewa	10627	6,5	1.000	70

### Keragaman Genetika DNA Mikrosatelit Gen BoLa

Hasil analisis mikrosatelit gen BoLa pada sapi bali jantan disajikan pada Tabel 1. Ketiga lokus teramplifikasi dengan baik pada sapi bali jantan. Ketiga lokus berada pada kromosom nomor 23. Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk alel RM185 dan BM1815 mempunyai jumlah alel dua sedangkan DRB3 satu (monomorfisme). Mikrosatelit RM 185 mempunyai 2 alel berbeda, alel 1 berukuran 107 bp sedangkan alel 2 berukuran 131 bp. Mikrosatelit BM1815 mempunyai 2 alel berbeda, alel 1 berukuran 100 bp sedangkan alel 2 berukuran 140 bp. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya pada sapi bali. Baxter *et al.* (2008) menyatakan bahwa DRB3 merupakan gen yang paling polimorfisme di antara gen BoLA.

**Tabel 2.** Jumlah, ukuran, dan frekuensi alel lokus DRB3 pada sapi bali jantan

Lokus	Jumlah alel	Ukuran alel	Frekuensi alel (%)
RM185	2	107 131	50 50
BM1815	2	100 140	50 50
DRB3	1	100	100

Dari hasil genotipe di atas, terlihat bahwa dua lokus mikrosatelit yang digunakan bersifat polimorfisme dan satu monomorfisme. Rataan heterozigositas dari populasi dan *polymorphic information content* (PIC) yang dihitung berdasarkan persamaan Botstein's disajikan pada Tabel 2. Rata-rata heterozigositas untuk lokus RM 185; BM1815; dan DRB3 masing-masing adalah 0,533; 0,533; dan 0. Rata-rata heterozigositas ini lebih kecil bila dibandingkan rata-rata heterozigositas pada sapi *Saavedreño Creole*, yaitu sebesar 0,919 (Ripoli *et al.*, 2004). Nilai PIC yang cukup tinggi memberi indikasi bahwa populasi sampel sangat heterogen dan terindikasi sedikit terjadi seleksi untuk karakteristik tertentu sedangkan nilai PIC yang kecil memberi indikasi bahwa populasi sampel sangat homogen dan terindikasi adanya seleksi untuk karakteristik tertentu. Nilai PIC pada populasi sapi bali jantan ini lebih rendah dibandingkan dengan PIC sapi Finnish Ayrshire seperti yang dilaporkan oleh Elo *et al.* (1999) yaitu sebesar 0,830 untuk RM185.

Hasil analisis panjang alel untuk ketiga lokus mikrosatelit didapatkan bahwa alel pada lokus RM185 dan BM1815 bersifat heterozigot, sedangkan alel pada lokus DRB3 bersifat homozigot. Hal ini jelas sebagai akibat dari seleksi kinerja dan uji progeni yang telah dilakukan sebelumnya dalam rangka pemilihan bibit jantan unggul.

### KESIMPULAN

Hasil penelitian pada sapi Bali menunjukkan bahwa ketiga lokus mikrosatelit yang digunakan teramplifikasi pada sapi bali dan jumlah alel pada lokus RM185 dan BM1815 sedangkan jumlah alel pada lokus DRB3

adalah 1. Heterozigositas per lokus berkisar 0-0,533. Nilai PIC per lokus 0-0,375. Ukuran alel pada ketiga mikrosatelit berpotensi sebagai marka molekuler yang berperan terhadap kualitas semen pada sapi bali.

### DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M.B. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1994. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc., New York.
- Baxter, R., N. Hastings, A. Law, and E.J. Glass. 2008. A rapid and robust sequence-based genotyping method for BoLA-DRB3 alleles in large numbers of heterozygous cattle. **Anim. Genetics** 39:561-563.
- Elo, K.T., J. Vilkkilä, D.J. de Koning, R.J. Velmalu, and A.V. Mäki-Tanila. 1999. A quantitative trait locus for live weight maps to bovine chromosome 23. **Mammalian Genome** 10:831-835.
- Firouzmandi, M., J. Shoja, A. Barzegari, and E. Roshani. 2010. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Iranian Holstein and Sarabi (Iranian native) cattle. **African J. Biotechnol.** 9(15):2224-2228.
- Harvey, W.R. 1991. **User's Guide for LSMLMW: Mixed Model Least Squares and Maximum Likelihood Computer Programs**. Ohio State University, USA.
- Nascimento, C.S., M.A. Machado, and M.L. Martinez. 2006. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). **Genetic Mol. Biol.** 29:641-647.
- Ripoli, M.V., J.P. Lirón, J.C. De Luca, F. Rojas, F.N. Dulout, and G. Giovambattista. 2004. Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in saavedreño creole dairy cattle. **Biochem. Genetics** 42(7-8):231-240.
- Sharif, S., B.A. Mallard, B.N. Wilkie, J.M. Sargeant, H.M. Scott, J.C. Dekkers, and K.E. Leslie. 1999. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA) with production traits in Canadian dairy cattle. **Anim. Genetics** 30:157-160.
- Stear, M.J., T.S. Pokony, S.E. Echtenkamp, and D.D. Lunstra. 2007. The influence of the BoLA-a locus on reproductive traits in cattle. **Inter. J. Immunogenetics** 16(1):77-88.