

## Polimorfisme Genetik DNA Mikrosatellite GEN BoLA Lokus DRB3 pada Sapi Bali (*Bos indicus*)

Genetics Polymorphisms of BoLA Mikrosatellite DRB3 Locus in Bali Cattle (*Bos indicus*)

I Ketut Puja\*, I Nengah Wandia, Putu Suastika, dan I Nyoman Sulabda

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Udayana, Denpasar Bali

E-mail: asubali@hotmail.com \*Penulis untuk korespondensi

### Abstract

The objective of this study is to describe the gene frequency distribution of the bovine lymphocyte antigen (BoLA)-DRB3 locus in Bali cattle. Twenty two Bali cattle from Bali and twenty one Bali cattle from Nusa Penida were studied randomly for polymorphism in BoLA-DRB3 gene. The mean numbers of alleles DRB3 were 7 allele in Bali cattle from Bali and 9 allele from Nusa Penida cattle. The average heterozygosity was observed were 0.7967 and 0.7863 in Bali cattle from Bali. The mean PIC value in Bali cattle from Nusa Penida were 0.7417 and 0.742 in Bali cattle from Bali. In conclusion, the results of this study demonstrated that BoLA-DRB3 is a highly polymorphic locus in Bali cattle, with significant variation in allele frequency among cattle breeds.

**Key words:** Bali cattle, microsatellite, DRB3 gene, PIC

### Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan informasi dasar mengenai distribusi frekuensi lokus DRB3 gen BoLa (bovine lymphocyte antigen) pada sapi Bali. Untuk isolasi DNA digunakan sampel darah sapi Bali yang diambil dari populasi sapi Bali yang berasal dari Bali dan sapi Bali yang berasal dari Nusa Penida. Jumlah sampel untuk sapi Bali yang berasal dari Bali adalah 22 ekor dan sapi yang berasal dari Nusa Penida 21 ekor. Jumlah allele lokus DRB3 pada sapi Bali asal Bali adalah 7 dan 9 allele dari sapi Bali asal Nusa Penida. Rataan heterozigositas perlokus adalah 0,7967 pada sapi Bali asal Nusa Penida dan 0,7863 pada sapi Bali asal Bali. Nilai PIC lokus DRB3 pada sapi Bali asal Nusa Penida adalah 0,7417 dan 0,742 pada sapi Bali asal Bali. Dapat disimpulkan dari hasil penelitian ini adalah lokus DRB3 pada sapi Bali sangat polimorfik.

**Kata kunci:** Sapi Bali, mikrosatelite, gen DRB 3, PIC

Diterima: 24 Januari 2011, disetujui: 13 April 2011

## Pendahuluan

Kebutuhan daging sapi dari tahun ketahun terus meningkat. Untuk memenuhi kebutuhan daging tersebut, sejak sepuluh tahun yang lalu Indonesia tidak hanya mengimpor daging sapi, tetapi juga mengimpor sapi bakalan terutama dari Australia. Namun, sejak tahun 2004, import sapi bakalan dari Australia merosot drastis dan semakin sulit dilakukan, mengingat mahalannya harga sapi bakalan tersebut. Pemenuhan kebutuhan masyarakat terhadap protein hewani, khususnya daging perlu diimbangi dengan peningkatan populasi

ternak. Sapi Bali adalah ternak lokal yang diharapkan menjadi hewan primadona dalam menyediakan kebutuhan daging selain ternak import. Hal ini karena sapi Bali memiliki daya adaptasi yang tinggi. Hambatan peningkatan populasi sapi Bali adalah penyakit Jembrana yang secara spesifik hanya menyerang sapi Bali. Kenyataan ini membuktikan adanya perbedaan kerentanan pada setiap jenis sapi terhadap penyakit Jembrana.

Menurut Untalan *et al.*, (2007), faktor yang menentukan ketahanan individu terhadap penyakit adalah *major histocompatibility complex* (MHC) pada sapi dikenal dengan sebutan *bovine*

*leukocyte antigen* (BoLA). MHC dibedakan menjadi tiga kelas yaitu MHC kelas I, kelas II, dan kelas III (Bastos-Silveira *et al.*, 2008). Fungsi keseluruhan dari BoLA ini adalah berperan imunitas yang berhubungan dengan kerentanan atau ketahanan terhadap penyakit (Miretti *et al.*, 2001).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui peran BoLA dengan kerentanan terhadap penyakit. Kulberg *et al.*, (2007) menyatakan bahwa terdapat hubungan antara keragaman kepekaan sapi terhadap penyakit dengan gen BoLA-DRB3. Menurut Caron *et al.*, (1997), MHC berhubungan dengan kepekaan terhadap infeksi parasit. Acosta-Rodríguez *et al.*, (2005) menyatakan bahwa lokus mikrosatelit gen MHC kelas II berhubungan dengan kepekaan sapi terhadap caplak. MHC kelas II telah pula diketahui berhubungan dengan ketahanan dan kepekaan sapi dengan penyakit Bovine leukaemia virus (Juliarena *et al.*, 2008).

MHC adalah mencari dengan jumlah allel yang besar pada setiap lokus dan terdapat perbedaan jumlah asam amino yang besar pada setiap allelnya. Keragaman ini berhubungan dengan keragaman reseptor pada limfosit T, yang berkontribusi pada perbedaan respon kekebalan pada individu (Sommer, 2005).

Menurut Bastos-Silveira *et al.*, (2008), terdapat perbedaan yang signifikan pada keragaman allel, lokus mikrosatelit region gen BoLA terhadap delapan jenis sapi di Portugal. Perbedaan ini dihubungkan dengan posisi pada kromosom. Lokus BM1815 dan RM185 terletak pada sisi BoLA-DRB gen. RM185 berlokasi pada 3' dan BM1815 berlokasi pada 5'. Kedua lokus ini menunjukkan keragaman yang rendah. Lokus DRB3 dan DRBP1 berlokasi di dalam intron gen BoLA-DRB3 dan gen DRB3 merupakan gen yang paling polimorfik diantara gen BoLA (Baxter *et al.*, 2008). Sifat polimorfisme yang tinggi ini menimbulkan variasi ekspresi yang berbeda pada setiap individu. Miretti *et al.*, (2001) melaporkan bahwa Gen BoLA DRB3 bersifat polimorfik, karena itu gen tersebut sebagai kandidat gen dalam mempelajari dasar genetik terjadinya ketahanan terhadap penyakit serta analisis populasi genetik.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui distribusi frekuensi gen BoLA DRB3 pada sapi

Bali. Informasi dasar ini dijadikan pedoman atau pertimbangan pengambilan keputusan pada proses seleksi bibit sapi Bali yang tahan penyakit atau sebagai bahan pertimbangan dalam strategi konservasi sapi bali.

## Metode Penelitian

### Ekstraksi DNA

Sebanyak 43 ekor sapi Bali yang berasal dari Bali dan Nusa Penida digunakan untuk analisis polimorfisme lokus BoLa DRB3. Jumlah sampel untuk sapi Bali yang berasal dari Bali adalah 22 ekor dan dari Nusa Penida 21 ekor. Untuk isolasi DNA, sampel dari darah sapi yang diambil dari populasi sapi Bali diekstraksi menggunakan QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Prosedur yang digunakan disesuaikan protokol pembuatnya.

### Amplifikasi Lokus Mikrosatelit

Penelitian ini menggunakan Primers mikrosatelit DRB3 pada kromosom no 23. Reaksi amplifikasi pada PCR dilakukan pada PCT 100 (MJ Research, Inc, Watertown, Mass, USA). Kondisi PCR yang digunakan adalah volume akhir 12,5 µl. Satu unit reaksi terdiri 10xbuffer Taq 1,25 µl, 25 mMol MgCl<sub>2</sub> 1µl, 10 mMol dNTP 0,2 µl, 10 µm Primer F 0,5 µl dan 10 µm Primer R 0,5 µl, Air murni 7,95 µl, 1 µl Templet DNA, dan Taq DNA Polimerase 0,5–,07 U. Reaksi PCR dilakukan pada denaturasi awal (94°C) selama lima menit, selanjutnya 30 siklus dengan program denaturasi 94°C (30 detik), annealing pada 68°C (30 detik), dan elongasi (72°C) selama 30 detik, dilanjutkan extension pada 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dipisahkan dengan gel bis-Acrylamide 6% dan visualisasi pewarnaan perak. DNA typing dilakukan dengan mengukur jarak migrasi tiap-tiap pita DNA pada gel dibandingkan dengan *DNA size marker* (Behl *et al.*, 2007).

### Analisis Data

#### Frekuensi Allel

Frekuensi allel dihitung berdasarkan rumus Nei, 1987 :

$$X1 = \frac{(2N1.1 + N1.2)}{2N}$$

Keterangan:

- X1 = frekuensi allel 1  
 N1.1 = jumlah individu yang bergenotif homozigot allel 1  
 N2.1 = jumlah individu yang bergenotif heterozigot allel 1  
 N = jumlah total individu

### Heterozygositas

Heterozygositas dihitung menggunakan rumus penduga tidak bias (Nei, 1987).

$$H = \frac{2N(1 - \sum X_i^2)}{2N - 1}$$

Keterangan :

- H = heterozygositas  
 N = jumlah individu  
 X = frekuensi allel

### PIC

PIC dihitung berdasarkan frekuensi allel dengan persamaan Botstein *et al.*, (1980) sebagai berikut:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^j P_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^j \sum_{j=1}^{j-1} P_i^2 P_j^2$$

Keterangan:

- Pi dan Pj = frekuensi allel ke- i dan ke- j

Frekuensi allel, jumlah allel, Ho (*observed heterozygosities*), dan He (*expected heterozygosities*) dihitung dengan program *Microsatellite Toolkit V.3.1.*

### Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini menggunakan marka DRB3 untuk menganalisis variasi genetik sapi Bali. Hasil analisis mikrosatelite gen BoLa pada sapi Bali asal Bali dan sapi Bali di Nusa Penida, dengan mengacu pada jumlah allel dan ukuran allel, frekuensi allel dapat dilihat pada Tabel 1. Lokus DRB3 teramplifikasi dengan baik pada sapi Bali asal Bali dan sapi Bali asal Nusa Penida. Hasil visualisasi pada elektroferesis produk PCR dari sapi Bali dengan lokus mikrosatelite DRB3 dalam gel acrilamid 7% menunjukkan bahwa jumlah allel pada sapi

Bali yang dipelihara di Bali lebih banyak dibanding sapi Bali asal Nusa Penida.

Mikrosatelite DRB3 pada sapi Bali yang berasal dari Bali mempunyai 9 allel berbeda. Allel 1 berukuran 155 bp, allel 2 berukuran 170 bp, allel 3 berukuran 178 bp, allel 4 berukuran 194 bp, allel 5 berukuran 211 bp, allel 6 berukuran 229 bp, allel 7 berukuran 238 bp, allel 8 berukuran 258 bp, dan allel 9 berukuran 267 bp. Allel 2 terdeteksi 2 homozigot dan 1 heterozigot. Allel 4 terdeteksi 3 homozigot dan 11 heterozigot. Sapi Bali yang berasal dari Nusa Penida mempunyai 7 allel. Allel 1 berukuran 140 bp, allel 2 berukuran 155 bp, allel 3 berukuran 170 bp, allel 4 berukuran 178 bp, allel 5 berukuran 194 bp, allel 6 berukuran 211 bp, dan allel 7 berukuran 229 bp. Pada allel 4 dan 5 terdeteksi masing-masing 1 allel bersifat homozigot. Jumlah allel DRB3 pada sapi Bali asal bali (allel = 9) dan sapi Bali asal Nusa Penida (allel = 7) lebih kecil dibanding bangsa sapi lainnya seperti yang dilaporkan Bastos-Silveira *et al.*, (2008). Hasil penelitian Bastos-Silveira *et al.*, (2008) mengidentifikasi jumlah allel 28 menggunakan penanda yang sama pada jenis sapi berbeda (bangsa sapi Portugal). Acosta-Rodriguez *et al.*, (2005) mengidentifikasi 18 allel pada sapi persilangan antara bangsa sapi Eropa, Simmenthal, Holstein dan Zebu. Menurut Dietz *et al.*, (1997) bahwa teridentifikasi 22 allel pada bangsa sapi Holstein dan 22 allel pada sapi zebu di India (Sachinandan De *et al.*, 2011), sedangkan Martines *et al.*, (2006) mengidentifikasi 20 allel pada sapi persilangan antara Gyr dengan Holstein. Nascimento *et al.*, (2006) menemukan 37 allel pada sapi Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). Jumlah allel DRB3 yang paling banyak ditemukan oleh Fernández *et al.*, (2008) pada sapi Creole Cattle dari Mexico, yaitu sebesar 52 allel.

Pada penelitian ini ukuran allel 194 bp merupakan allel yang paling dominan, dengan frekuensinya 23% pada sapi Bali asal Nusa Penida dan 40% pada sapi asal Bali. Allel 238, 258, dan 267 hanya ditemukan pada sapi Bali asal Bali. Adanya sejumlah allel yang hanya ditemukan pada sapi Bali asal Bali sebagai hasil mutasi terkini sehingga belum tersebar ke seluruh anggota populasi sapi Bali asal Nusa Penida.

Dari hasil genotyping pada populasi sapi Bali asal Bali dan Nusa Penida terlihat bahwa lokus mikrosatelit DRB3 yang digunakan bersifat polimorfik. Sifat polimorfik lokus DRB3 ini telah banyak dilaporkan oleh peneliti pada bangsa sapi lainnya. Behl *et al.*, (2007) menyatakan bahwa lokus DRB3 bersifat sangat polimorfik pada Kankrej Cattle (*Bos indicus*). Hasil penelitian Firouzmandi *et al.*, (2010) pada *sarabi cattle* (sapi asli Iran) juga menemukan lokus DRB3 sangat polimorfik. Takashima *et al.*, (2002) menyatakan polimorfik pada Japanese Shorthorn cattle.

Rataan heterozigositas dari populasi dan *Polymorphic information content* (PIC) terlihat pada Tabel 2. Rata-rata heterozigositas untuk lokus DRB3 pada sapi Bali asal Bali adalah 0,7863 dan sapi Bali asal Nusa Penida adalah 0,7967. Rata-rata heterozigositas ini lebih kecil dibanding rata-rata heterozigositas pada sapi *Saavedreño Creole*, yaitu 0,919 (Ripoli *et al.*, 2004).

PIC untuk lokus mikrosatelit DRB3 ini dihitung berdasarkan persamaan Botstein's (Botstein *et al.*, 1980). Rata-rata nilai PIC untuk sapi Bali asal Bali adalah 0,742 dan sapi Bali asal Nusa Penida adalah 0,7417. Nilai PIC yang cukup tinggi memberi indikasi bahwa populasi sampel sangat heterogen dan terindikasi sedikit terjadi seleksi untuk karakteristik tertentu. Nilai PIC pada populasi sapi Bali lebih rendah dibanding PIC sapi Finnish Ayrshire seperti yang dilaporkan oleh Elo *et al.*, (1999) yaitu 0,830.

Analisis dari panjang allel untuk lokus mikrosatelit DRBP3 antara sapi Bali asal Bali dan sapi Bali asal Nusa Penida didapatkan bahwa ukuran allel 140 bp tidak ditemukan pada sapi Bali asal Bali, ukuran allel 238, 258, dan 267 ditemukan pada sapi Bali asal Bali namun tidak pada sapi Bali asal Nusa Penida. Adanya perbedaan ini memberikan pengaruh pada perbedaan pada penampilan sapi tersebut.

**Tabel 1.** Jumlah, Ukuran, dan Frekuensi allel lokus DRB3 pada sapi Bali asal Nusa Penida dan asal Bali.

Sapi	Jumlah Allel	Ukuran Allel	Frekuensi Allel
Sapi NP	7	140	2,38
		155	2,38
		170	19,05
		178	23,81
		194	28,57
		211	21,43
		229	2,38
Sapi BB	9	155	7,14
		170	11,90
		178	19,05
		194	40,48
		211	9,52
		229	2,38
		238	2,38
		258	4,76
		267	2,38

**Tabel 2.** *Expected Heterozygosity*, *Observed heterozygosity*, dan PIC pada populasi sapi Bali asal Nusa Penida dan asal Bali.

Sapi	Expected Heterozygosity	Observed Heterozygosity	PIC Values
Sapi NP	0,7967	0,9048	0,7417
Sapi BB	0,7863	0,7619	0,742

## Simpulan dan Saran

### Simpulan

Hasil penelitian pada sapi Bali asal Bali dan sapi Bali asal Nusa Penida menunjukkan bahwa lokus mikrosatellit yang digunakan menunjukkan polimorfik dengan jumlah alel 7 pada sapi Bali asal Nusa Penida dan 9 pada sapi Bali asal Bali. Rata-rata heterozigositas untuk lokus DRB3 pada sapi Bali asal Bali adalah 0,7863 dan sapi Bali asal Nusa Penida adalah 0,7967. Rata-rata nilai PIC untuk sapi Bali asal Bali adalah 0,742 dan sapi Bali asal Nusa Penida adalah 0,7417.

### Saran

Di masa mendatang perlu dilakukan penelitian mengenai MHC menggunakan lebih banyak marka genetik serta SNP (*single nucleotide polymorphisms*) untuk dasar seleksi dan sertifikasi sapi Bali.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Universitas Udayana, telah mendanai Proyek Penelitian Strategis Nasional ini dari dana DIPA Universitas Udayana No.0161/023-04.2/XX/2010 Tanggal 31 Desember 2009.

## Daftar Pustaka

- Acosta-Rodriguez, R., Alonso-Morales, R., Balladares, S., Flores-Aguilar, H., Garcia-Vazquez, Z. dan Gorodezky, C. 2005. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Vet. Parasitol.*, 127: 313–21.
- Bastos-Silveira, C., Luis, C., Ginja, C., Gama, L.T. dan Oom, M.M. 2008. Genetic variation in BoLA microsatellite loci in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetic*, 40: 101–105.
- Baxter, R., Hastings, N., Law, A. dan Glass, E.J. 2008. A rapid and robust sequence-based genotyping method for BoLA-DRB3 alleles in large numbers of heterozygous cattle. *Animal Genetic*, 39: 561–563.
- Behl, J.D., Verma, N.K., Behl, R., Mukesh, M. dan Ahlawat, S.P.S. 2007. Characterization of Genetic Polymorphism of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Locus in Kankrej Cattle (*Bos indicus*). *J. Dairy Sci.*, 90: 2997–3001.
- Botstein, D., Raymond, White, L., Skolnick, M. dan Davis, R.W. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J. Hum. Genet.*, 32: 314–331.
- Caron, L.A., Abplanalp, H. dan Taylor, R.L. 1997. Resistance, susceptibility, and immunity to *Eimeria tenella* in major histocompatibility (B) complex congenic lines. *Poult Sci.*, 76: 677–682.
- Dietz, A.B., Dettelleux, J.C., Freeman, A.E., Kelley, D.H., Stabel, J.R. dan Kehrl, M.E. 1997. Genetic Association of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 Alleles with Immunological Traits of Holstein Cattle. *J. Dairy Sci.*, 80: 400–405.
- Elo, K.T., Vilkki, J., de Koning, D.J., Velmala, R.J. dan Ma'ki-Tanila, A.V. 1999. A quantitative trait locus for live weight maps to bovine Chromosome 23. *Mammalian Genome*, 10: 831–835.
- Firouzamandi, M., Shoja, J., Barzegari, A. dan Roshani, E. 2010. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Iranian Holstein and Sarabi (Iranian native) cattle. *African J. Biotechnology*, 9 (15): 2224–2228.
- Juliarena, M.A., Poli, M., Sala, L., Ceriani, C., Gutierrez, S., Dolcini, G., Rodriguez, E.M., Mariño, B., Rodriguez-Dubra, C. dan Esteban, E.N. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Animal Genetic*, 39: 432–438.
- Kulberg, S., Heringstad, B., Guttersrud, O.A. dan Olsaker, I. 2007. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. *J. of Animal Breeding and Genetics*, 124: 201–7.
- Martinez, M.L., Machado, M.A., Nascimento, C.S., Silva M.V.G.B., Teodoro, L.R., Furlong, J., Prata, M.C.A., Campos, A.L., Guimarães, M.F.M., Azevedo, A.L.S., Pires, M.F.A. dan Verneque, R.S. 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genetics and Molecular Research*, 5 (3): 513–524.
- Miretti, M.M., Ferro, J.A., Lara, M.A. dan Contel, E.P.B. 2001. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in Exon 2 of the BoLA-DRB3 Gene in South American Cattle. *Biochemical Genetics*, 39 (9–10): 311–324.

- Nascimento, C.S., Machado, M.A., Martinez, M.L., Vinícius, G.M., da Silva, B., Marta Guimarães, F.M., Campos, A.L., Azevedo, A.L.S., Teodoro, R.L., Verneque, R.S., Guimarães, S.E.F. dan Oliveira, D.A.A. 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*). *Genet. Mol. Biol.*, 29 (4).
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetic*. New York, Colombia University Press.
- Ripoli, M.V., Lir'on, J.P., De Luca, J.C., Rojas, F., Dulout, F.N. dan Giovambattista, G. 2004. Gene Frequency Distribution of the BoLA-DRB3 Locus in Saavedreño Creole Dairy Cattle. *Biochemical Genetics*, 42 (7–8): 231–240.
- Sachinandan De, Singh, R.K. dan Brahma, B. 2011. Allelic Diversity of Major Histocompatibility Complex Class II DRB Gene in Indian Cattle and Buffalo. *Molecular Biology International*, 1–7.
- Sommer, S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, 2: 1.
- Takeshima, S., Nakai, Y., Ohta, M. dan Aida, Y. 2002. Characterization of *DRB3* Alleles in the MHC of Japanese Shorthorn Cattle by Polymerase Chain Reaction-Sequence-Based Typing. *J. Dairy Sci.*, 85: 1630–1632.
- Untalan, P.M., Pruett, J.H. dan Steelman, C.D. 2007. Association of the bovine leucocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3\*4401 allele with host resistance to the Lone Star Tick, *Amblyoma americanum*. *Vet. Parasitol*, 145: 190–195.