

**Analisis Keragaman Exon-1 Gen Hormon Pertumbuhan pada Itik Lokal (Bayang)
Sumatera Barat Menggunakan Metoda PCR-RFLP**

***Polymorphism Analysis of the Exon-1 Growth Hormone Gene in Local (Bayang) Ducks of
West Sumatera Using PCR-RFLP Method***

Sarbaini*, Yurnalis, Hendri dan R. Dahnil

Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Padang, 25163

*E-mail: sarbaini56@yahoo.com

(Diterima: 23 Februari 2018; Disetujui: 20 Mei 2018)

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi polimorfisme *BfmI* ekson-1 gen hormon pertumbuhan itik Bayang. Sebanyak 100 sampel DNA genom diekstrak dari sampel darah individu itik. Prosedur PCR digunakan untuk mengamplifikasi fragmen ekson-1 gen hormon pertumbuhan sepanjang 801 bp menggunakan sepasang primer F: 5'-CTGGAGCAGGCAGGAAAATT-3' dan R: 5'-TCCAGGGACAGTGACTCAAC-3'. DNA produk amplifikasi kemudian direstriksi menggunakan enzim restriksi *BfmI*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa identifikasi keragaman itik Bayang menggunakan *GH/BfmI* bersifat monomorfik dengan frekuensi alel T adalah 1,00 dan frekuensi alel A adalah 0,00.

Kata kunci: Itik Bayang, *BfmI*, exon-1, gen hormon pertumbuhan, keragaman

ABSTRACT

The study analyzed the polymorphism of BfmI exon-1 growth hormone gene effect on Bayang ducks (West Sumatra local variety of duck). A total of 100 genomic DNA samples was extracted from blood sample of the duck. The PCR procedure was used to amplify 801 bp of GH exon-1 gene using a pair of primer F: 5'-CTGGAGCAGGCAGGAAAATT-3' and R: 5'-TCCAGGGACAGTGACTCAAC-3'. The amplification product was then digested by BfmI restriction enzyme. The results showed that GH/BfmI gene of Bayang ducks are monomorphic, supported by both frequencies of T allele and A allele at 1.00 and 0.00 respectively.

Keywords: Bayang ducks, BfmI, exon-1, growth hormone gene, polymorphism

PENDAHULUAN

Salah satu kekayaan plasma nutfah nasional di sub-sektor peternakan adalah ternak itik. Ternak itik merupakan salah satu komoditi unggas yang mempunyai peran cukup penting sebagai penghasil telur dan daging untuk mendukung ketersediaan protein hewani yang murah dan mudah didapat (Apriyantono, 2011).

Jenis itik lokal di Indonesia diberi nama sesuai dengan tempat asalnya dan mempunyai ciri-ciri morfologi yang khas. Di Sumatera tepatnya di Provinsi Sumatera Barat, ditemui beberapa itik lokal yang telah berkembang luas di tengah masyarakat sebagai sumber

pendapatan dan sumber daya genetik seperti itik Pitalah, itik Kamang, dan itik Bayang.

Populasi itik di Sumatera Barat pada tahun 2014 berjumlah sekitar 1.240.190 ekor dengan produksi telur dan daging masing-masing sebanyak 6.809 dan 729 ton (Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2015).

Itik Bayang merupakan salah satu sumberdaya genetik ternak lokal Sumatera Barat. Secara kuantitatif rumpun itik ini memiliki bobot badan $1,8 \pm 0,3$ kg untuk yang jantan dan $1,6 \pm 0,2$ kg untuk yang betina. Produksi telur mencapai 184-215 butir/tahun dengan bobot telur 65 gr. Rumpun itik ini mencapai dewasa kelamin pada umur $5,5 \pm 0,6$ bulan dan lama produksi 2,5-3 tahun

(Kepmentan, 2012). Rumpun itik ini memiliki potensi untuk dikembangkan, terutama karena memiliki kemampuan adaptasi yang baik terhadap lingkungan dan pakan yang marjinal. Walaupun demikian, secara simultan perbaikan mutu genetik perlu dilakukan untuk meningkatkan produktivitas rumpun itik ini.

Salah satu upaya perbaikan genetik dapat dilakukan dengan seleksi, jika memungkinkan seleksi akan lebih baik dilakukan pada masa awal kehidupan ternak. Dengan metoda konvensional, seleksi di awal ini sulit atau bahkan mustahil dilakukan karena mereka belum memperlihatkan performan produksinya. Seiring dengan perkembangan teknologi molekuler, seleksi pada awal kehidupan dapat dilakukan dengan bantuan penanda DNA di dekat atau dalam gen-gen yang berkaitan dengan sifat produksi tertentu.

Beberapa gen yang diketahui memiliki pengaruh pada pertumbuhan ternak diantaranya adalah gen *Growth Hormone* (GH), reseptor hormone pertumbuhan (GHR), dan IGF1. Salah satu gen yang berkaitan erat dengan pertumbuhan itik adalah gen *growth hormone* (GH). Gen bGH terletak di kromosom 19 pada posisi 19q26-qter (Sole *et al.*, 2006; Montaldo *et al.*, 1998) dan memiliki panjang sekuen nukleotida sebesar 4350 *base pair* (bp) yang terdiri atas lima exon dan dipisahkan oleh empat intron (Montaldo *et al.*, 1998; Falconer *et al.*, 1996). Gen GH pada itik sangat berpengaruh terhadap performannya (Ip *et al.* 2001).

Gen GH pada itik mempunyai keragaman yang tinggi, Hiyama *et al.* (2012) mendapatkan 8 keragaman pada daerah promoter gen GH pada itik Myanmar, (Kashi *et al.*, 2003) juga melaporkan adanya keragaman pada daerah promoter gen GH pada itik Peking dan Xu *et al.* (2007) mendapatkan 8 keragaman pada itik Beijing yaitu pada posisi 2593(C-T), 2770(G-A), 2813(T-A), 2829(C-A), 2894(C-T), 2896(T-C), dan 3100(C-G) dalam intron 2 dan 3270(A-G) dalam intron-3. Berdasarkan pada beberapa hal dikemukakan diatas, maka tujuan dari penelitian ini adalah

untuk mengidentifikasi keragaman alel *BfmI* exon-1 gen hormon pertumbuhan (GH) pada itik Bayang menggunakan metode PCR-RFLP.

METODE

Ternak yang diteliti

Penelitian ini menggunakan 100 ekor itik Bayang muda (umur 5-6 bulan) yang dipelihara secara intensif di Kelurahan Binuang Kampung Dalam, Kecamatan Pauh, Kota Padang.

Pengambilan sampel darah

Sampel darah sebanyak \pm 1 ml diambil dari 100 ekor itik Bayang menggunakan jarum suntik (*Disposable Syringe*) melalui *vena brachialis*. Sampel darah yang diperoleh kemudian ditampung pada tabung vacutainer yang berisi EDTA dan disimpan dalam *freezer* -20°C.

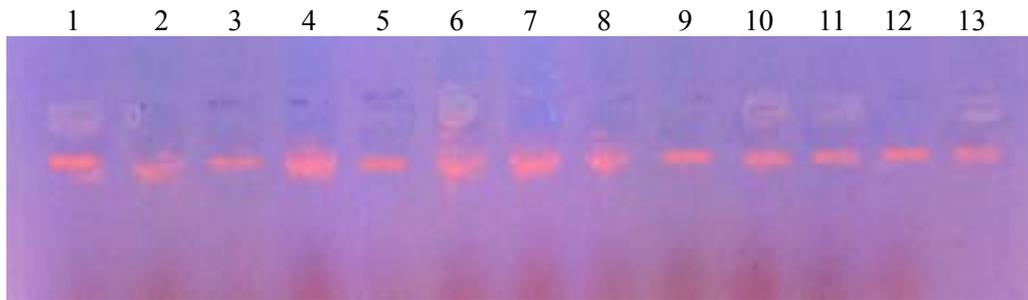
Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dari sampel darah dilakukan menggunakan prosedur *genomic DNA purification kit* (Promega, USA).

Amplifikasi fragmen gen GH ekson-1

Sampel DNA genom yang diperoleh dari 100 sampel itik Bayang digunakan untuk reaksi PCR. Reaksi PCR dilakukan dalam mesin *Eppendorf Mastercycler® Gradient* untuk mendapatkan fragmen ekson-1 gen GH sepanjang 801 bp menggunakan pasangan primer *forward*: 5'-CTGGAGCAGGCAGGAAAATT-3' dan *reverse*: 5'-TCCAGGGACAGTGACTCAAC-3'.

Reaksi amplifikasi dilakukan dalam volume 25 μ l dengan komposisi 4 μ l DNA *template*, 15 μ l *master mix*, 1,5 μ l masing-masing primer *forward* dan *reverse*, dan 8 μ l *nuclease free water*. Proses PCR dijalankan sebanyak 35 siklus dengan program setiap siklus: predenaturasi 95°C selama 3 menit, denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 59°C selama 30 detik,



Gambar 1. Hasil Elektroforesis isolasi DNA sampel darah itik Bayang betina. (No. 1-13 = individu sampel isolasi DNA)

extention pada 72°C selama 1 menit, dan extention akhir pada 72°C selama 5 menit.

Untuk mengetahui keberhasilan amplifikasi dilakukan elektroforesis pada agarose 2% dengan pewarnaan *ethidium bromide* dan dievaluasi pada *Gel Box* menggunakan sinar UV transluminator. Produk elektroforesis disimpan dalam unit computer yang tersambung dengan *gel box* untuk kemudian dianalisis.

RFLP analisis

Identifikasi genotip gen GH ekson-1 dilakukan dengan mendigesti produk PCR menggunakan enzim restriksi *BfmI* dengan situs pengenal (C↓TGTAG). Reaksi restriksi dilakukan dengan prosedur: ambil 15 µl sampel DNA produk PCR masukkan kedalam tabung eppendorf 200 µl, kemudian tambahkan enzim restriksi *BfmI* sebanyak 0,5 µl. Campuran bahan ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 5 jam. Produk restriksi kemudian dielektroforesis pada *gel agarose* 1,5% dengan pewarnaan *ethidium bromide* pada tegangan 100 volt selama 2 jam dan diamati menggunakan UV *trans illuminator* dan berdasarkan elektropenogram ditentukan tipe genotip dan macam alel yang terbentuk.

Analisa data

Analisis frekuensi genotip dan frekuensi alel menggunakan rumus Falconer dan Mackay (1996):

$$p^2+2pq+q^2=1$$

Keterangan: p² = Frekuensi TT

2pq= Frekuensi TA

q² = Frekuensi AA

Keseimbangan Hardy-Weinberg (H-W) diuji menggunakan uji Chi-square (Kaps dan Lamberson, 2004), dengan rumus:

$$X^2_h = \sum \frac{(O-E)^2}{E};$$

dengan χ² adalah uji khi-kuadrat, O adalah jumlah pengamatan genotipe ke-i, dan E adalah jumlah harapan genotipe ke-i. Kemudian nilai X²_h dibandingkan dengan nilai X² tabel pada level 0,05.

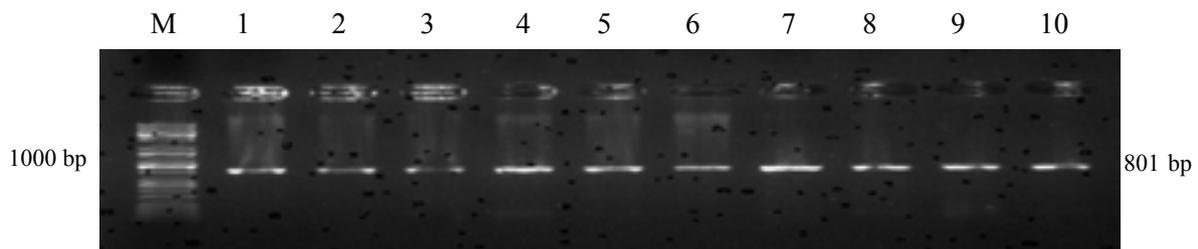
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA

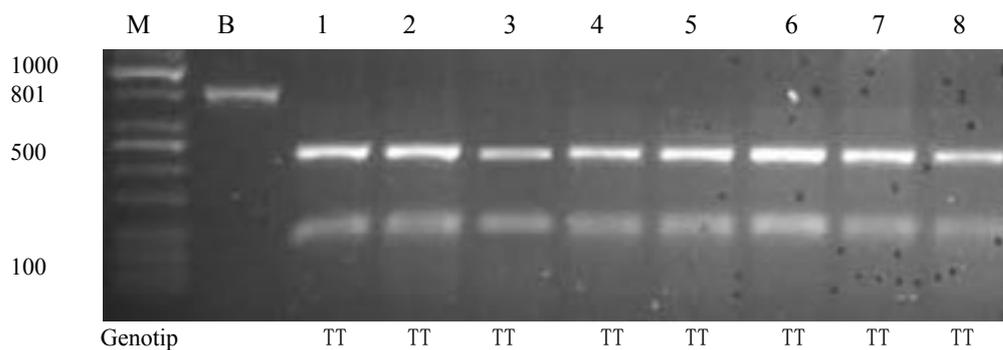
Sebanyak 100 sampel DNA genom itik Bayang berhasil diekstrak mengikuti prosedur *DNA purification kit* (Promega, USA). Contoh produk ekstraksi DNA dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil DNA isolasi menunjukkan DNA semakin tebal dan terang maka DNA yang diperoleh semakin banyak, begitu pun sebaliknya jika hasil DNA isolasi semakin tipis maka DNA yang diperoleh semakin sedikit dan berukuran kecil.

Amplifikasi ekson-1 gen GH

Seratus sampel DNA genom itik Bayang telah diamplifikasi menggunakan sepasang primer F: 5'-CTGGAGCAGGCAGGAAAATT-3' dan R: 5'-TCCAGGGACAGTGACTCAAC-3'



Gambar 2. Hasil Amplifikasi ekson-1 Gen GH itik Bayang sepanjang 801 bp. (No.1-10 = individu sampel, M = Marker (Kapa Universal 100 bp))



Gambar 3. Produk pemotongan dengan enzim *BfmI* pada fragmen exon-1 gen GH itik Bayang (M = Marker, B = Blangko (produk PCR), 1-8 nomor sampel)

dan menghasilkan fragmen ekson-1 gen GH sepanjang 801 bp (Gambar 2).

Gambar 2 menjelaskan bahwa hasil amplifikasi gen GH dengan primer tersebut dapat dinyatakan teramplifikasi secara spesifik karena hanya terdapat satu pita DNA di setiap sumur pada saat dilakukan elektroforesis. Proses amplifikasi dinyatakan berhasil apabila dalam satu slot blok gel (sumur) pada saat elektroforesis hanya terlihat satu pita DNA yang ukurannya sesuai dengan yang diharapkan saat primer dirancang untuk mengamplifikasi daerah yang akan diamplifikasi. Panjang fragmen hasil amplifikasi dapat diketahui dengan cara mencocokkan situs penempelan pasangan primer pada sekuens gen GH itik (Primer3 Output).

Menurut Viljoen *et al.* (2005) keberhasilan dalam mengamplifikasi DNA bergantung pada interaksi komponen PCR dalam konsentrasi yang tepat dan beberapa hal yang umum dilakukan untuk optimasi PCR diantaranya adalah suhu penempelan primer,

kosentrasi Mg^{2+} , kosentrasi primer, dan kosentrasi DNA target.

Identifikasi genotip ekson-1 gen GH

Hasil restriksi ekson-1 gen GH itik Bayang dengan enzim *BfmI* pada produk PCR disajikan pada Gambar 3. Restriksi ini menghasilkan satu pola pemotongan dengan 2 pita berukuran kurang dari 801 bp, diperkirakan berukuran 622 dan 179 bp sehingga membentuk satu tipe genotip TT sebagaimana dikemukakan oleh Nei (1987) bahwa semua pita yang memiliki laju migrasi yang sama merupakan alel yang homolog, dan karena itu gen ini hanya memiliki satu macam alel, yaitu alel T.

Dengan membandingkan jumlah pita hasil pemotongan reaksi restriksi (Gambar 3) sebagaimana dikemukakan diatas, mengindikasikan bahwa fragmen gen ini bersifat monomorfik atau masih terpelihara (*conserved*) dari kejadian mutasi pada itik Bayang, hal ini penting artinya bagi konservasi itik Bayang sebagai salah satu plasma nutfah

Tabel 1. Distribusi Genotip dan Frekuensi Alel *BfmI* pada *exon-1* gen GH itik Bayang

Gen	N	Distribusi Genotip			Frekuensi Alel		Uji Chi-square
		TT	TA	AA	T	A	
<i>GH/BfmI</i>	100	100	0	0	1,00	0,00	NS

Keterangan: $X^2_{0,05}=5,99$; GH: *Growth Hormone*

itik di Sumatera Barat.

Distribusi Genotip dan Frekuensi Alel *BfmI* Ekson-1 Gen GH pada itik Bayang

Hasil analisa semua produk elektroforesis fragmen *exon-1* gen GH itik Bayang yang direstriksi menggunakan enzim *BfmI* diperoleh macam dan frekuensi genotip serta macam dan frekuensi alel yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. menjelaskan bahwa itik Bayang bersifat monomorfik dengan frekuensi TT sebesar 100% dan frekuensi alel T sebesar 1,00. Suatu gen dikatakan monomorfik jika frekuensi salah satu alelnya lebih dari 99% (Nei dan Kumar, 2000). Keseragaman genotip ini diduga dapat disebabkan rumpun itik yang diteliti berada dalam populasi tertutup dan tidak ada rumpun itik lain yang bermigrasi ke populasi itik ini dan hal ini menguntungkan bagi pelestarian sumberdaya genetik ternak lokal serta untuk menjaga ternak asli daerah sehingga dapat dijadikan sebagai plasma nutfah daerah tersebut.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa fragmen ekson-1 gen GH itik Bayang terpelihara (*concerned*) dari kejadian mutasi gen dan dampak persilangan yang tidak terarah, serta distribusi genotip dan alel *BfmI* pada fragmen ini bersifat monomorfik (seragam).

KEPUSTAKAAN

Apriyantono, Anton. 2011. Pedoman Budidaya Itik Pedaging yang Baik. Jakarta: Gramedia.

Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2015. Produksi daging dan telur itik Sumatera Barat.

Falconer, D.S and T.F.C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetic. 4th Ed. Essex, England: Longman Group Ltd.

Hiyama, G., H. Okabayashi, N. Kansaku and K. Tanaka., 2012. Genetic Variation in the Growth Hormone Promoter Region of *Anas platyrhynchos*, a Duck Native to Myanmar. *J. Poult. Sci.*, 49: 245-248.

Ip SCY, X. Zhang, and F.C. Leung. 2001. Genomic growth hormone gene polymorphism in native Duck. *Expe. Biol. Med.* 226 (6) 458-462.

Kaps, M. dan W.R. Lamberson. 2004. Biostatistic for Animal Science. UK: CABI Publishing.

Kashi, Y., E. Hallerman and M. Soller. 2003. Marker-assisted selection of candidate bull for progeny testing programmes. *Anim Prod.* 51 63

Kepmentan. 2012. Penetapan Rumpun Itik Bayang. Jakarta

Montaldo, H.H. and C.A.M. Herrera. 1998. Use of Molecular Markers and Major Genes in The Genetic Improvement of Livestock. EJB Universidad Catolica de Valparaso-Chili.

Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York

Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular Evolution and Genetics. Oxford University Press, New York.

Sole, X., E. Guino, J. Valls, R. Iniesta and V. Morena. 2006. SNPstats: a web tool

- for the analysis of association studies. *Bioinformatics Advance Access*. 22:1928-1929.
- Viljoen GJ , Nel LH, Crowther JR . 2005. *Molecular diagnostic PCR handbook*. Springer, Dordrecht, Netherland.
- Warwick, E. J., J. M. Astuti dan W. Hardjosubroto. 1994. *Pemuliaan Ternak. Edisi V*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Xu, S. H., W. B. Bao, and J. H. Cheng. 2007. Polymorphism analysis on coding and regulation regions of growth hormone gene in duck.–*Acta Vet. Zootech. Sin.* 38: 907 – 912.