

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI (PTUPT) TAHUN 2018  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**



Kec  
Kk  
LP 20/19  
Utomo  
P

**Polimorfisme Gen *Growth Hormone* (GH) dan FSH  $\beta$ -Sub Unit Pada Anak Sapi Madura Hasil Inseminasi Buatan Dengan Semen Limousin Sebagai Acuan Untuk Seleksi Genetik Bibit Unggul**

Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun

Oleh

**Dr. Budi Utomo, drh., M.Si. NIDN 0018055904  
Dr. Emanuel Djoko Putranto, drh., MS. NIDN 0024125403  
Fariani Syahrul, SKM., M.Kes. NIDN 0010026902**

Dibiayai oleh :

Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat  
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan  
Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi  
Sesuai dengan Perjanjian Pendanaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Nomor : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
Nopember 2018**



**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul : Polimorfisme Gen Growth Hormone (GH) dan FSH b-Sub Unit Pada Anak Sapi Madura Hasil Inseminasi Buatan Dengan Semen Limousin Sebagai Acuan Untuk Seleksi Genetik Bibit Unggul

**Peneliti/Pelaksana**  
 Nama Lengkap : Dr BUDI UTOMO, M.Si  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
 NIDN : 0018055904  
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
 Program Studi : Paramedik Veteriner  
 Nomor HP : 081553160631  
 Alamat surel (e-mail) : budi-u-2@fkh.unair.ac.id

**Anggota (1)**  
 Nama Lengkap : Dr EMMANUEL DJOKO POETRANTO  
 NIDN : 0024125403  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**  
 Nama Lengkap : FARIANI SYAHRUL S.KM, M.Kes  
 NIDN : 0010026902  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Institusi Mitra (jika ada)**  
 Nama Institusi Mitra : -  
 Alamat : -  
 Penanggung Jawab : -  
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun  
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000  
 Biaya Keseluruhan : Rp 200,000,000

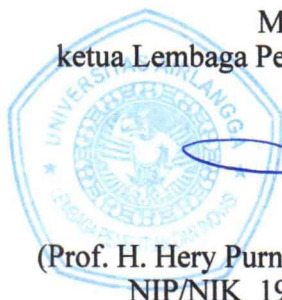



Mengetahui,  
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Unair  
  
 (Prof. Dr. Pudji Sianto, M.Kes., drh.)  
 NIP/NIK 19560105198601001

Kota Surabaya, 28 - 10 - 2018  
 Ketua,



(Dr BUDI UTOMO, M.Si)  
 NIP/NIK 195905181987011002



Menyetujui,  
 ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair  
  
 (Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., Ph.D.)  
 NIP/NIK 196705071991021001





## RINGKASAN

Kemajuan di bidang biologi molekuler memberikan kesempatan baru dalam usaha mendeteksi terjadinya variasi genetik (polimorfisme) sebagai dasar peningkatan mutu genetik dalam peternakan. Teknik molekuler yang potensial digunakan untuk mendeteksi variasi tersebut antara lain: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD), *Double Strand Conformation Polymorphism* (DSCP), dan *Marker-Assisted Selection* (MAS) (Kennedy *et al.*, 1990). Dengan adanya teknologi yang efektif dan akurat melalui pemanfaatan diagnosa berdasarkan *deoxyribonucleic acid* (DNA), akan sangat membantu program persilangan ternak (Rafalski dan Tingey, 1993). Penyediaan peta genetik melalui metode DNA rekombinan, dapat membantu program persilangan ternak melalui data-data molekuler yang didapat, yang mengatur sifat-sifat produksi (Hetzl, 1989).

Produk gen yang berupa hormon (bioregulator) akan mempengaruhi proses pengaturan metabolisme dan penampakan morfologi ternak. Variasi genetik (polimorfisme) pada lokus-lokus gen khususnya yang mengkodekan hormon merupakan hal yang sangat penting, karena variasi tersebut menentukan karakter genetik dari suatu populasi yang dapat membantu dalam peningkatan mutu genetik dari populasi tersebut (Mitra *et al.*, 1995).

Hormon pertumbuhan sebagai salah satu produk gen berpengaruh besar dalam pertumbuhan, laktasi dan perkembangan kelenjar susu pada sapi (Hoj *et al.*, 1993a,b). Polimorfisme pada gen yang mengkodekan dan mengatur hormon pertumbuhan sangat potensial sebagai penanda genetik untuk sifat-sifat fenotip dengan produktivitas yang bernilai ekonomi tinggi.

Selain hormon pertumbuhan perlu dilakukan penelitian juga pada sisi reproduksinya, untuk memperoleh gambaran polimorfisme hormon reproduksi pada anak sapi hasil silangan dengan sapi Limousin. *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) merupakan hormon glikoprotein yang dihasilkan oleh kelenjar pituitary, yang berfungsi mengatur reproduksi pada mamalia, baik jantan maupun betina (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). Pada hewan betina berfungsi untuk proliferasi dan pengembangan folikel sampai ovulasi (McGeedan Hsueh, 2000). Sedangkan pada laki-laki, kombinasi antara FSH dan testosteron adalah hormon tropik yang mengatur fungsi sel Sertoli, yang diperlukan untuk inisiasi dan pemeliharaan kualitas dan kuantitas di spermatogenesis (Ohta *et al.*, 2007). Hormon FSH terdiri dari  $\alpha$  dan  $\beta$ -sub unit.  $\beta$ -sub unit berperan dalam menentukan spesifisitas ikatan dengan reseptor (FSHR) (Fan dan Hendrickson, 2005). Telah dilaporkan bahwa adanya mutasi ekson 3 gen FSH  $\beta$ -subUnit pada sapi jantan diidentifikasi mempunyai konsentrasi semen segar yang lebih rendah, persentase yang lebih rendah dari integritas akrosom pada semen segar dan beku, lebih motilitas yang rendah pada semen beku (Dai *et al.*, 2009). Huang *et al.* (2002), Wimmers *et al.* (2005) dan Lin *et al.* (2006)

Hasil menunjukkan bahwa frekuensi gen *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Receptor Follicle Stimulating Hormone* (rFSH) pada sapi Madrasin secara berturut-turut alel A dan B yang terdeteksi memiliki frekuensi 0,50 dan 0,50. Sedangkan pada gen rFSH alel C adalah 0,50 dan alel G adalah 0,50 dengan frekuensi alel C sama besar dengan alel G. Sebagai hasil dari penelitian menyimpulkan bahwa gen *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Receptor Follicle Stimulating Hormone* (rFSH) kemungkinan tidak mengalami perubahan atau polimorfisme pada sapi Madrasin dan informasi penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar untuk seleksi bibit unggul.

*Key Words* : Polimorfisme, MAS, Gen FSH  $\beta$ -sub unit, Gen RFSH, PCR-RFLP



## PRAKATA

Berkat rahmat Tuhan Yang Maha Esa, maka kegiatan penelitian PUPT dengan judul : Polimorfisme Gen *Growth Hormone* (GH) dan FSH  $\beta$ -Sub Unit Pada Anak Sapi Madura Hasil Inseminasi Buatan Dengan Semen Limousin Sebagai Acuan Untuk Seleksi Genetik Bibit Unggul dapat berjalan sesuai dengan rencana dan berlangsung dengan baik.

Kegiatan ini dilaksanakan mulai bulan awal April 2018, pengambilan sampel darah sapi Madura di lakukan di lima tempat yang ada di kabupaten Bangkalan. Pengerjaan PCR dan sekuensing DNA dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner Denpasar Bali.

Sampel darah diambil dan digunakan untuk analisis DNA yang meliputi isolasi DNA, DNA amplifikasi dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR), dan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) metode untuk menentukan genotip. Identifikasi polimorfisme gen Hormon Pertumbuhan dan Receptor Hormon FSH dilakukan dengan memecah fragmen DNA dari 313 bp untuk gen FSH dan 306 bp untuk gen rFSH oleh enzim restriksi AluI. Dana dari program kegiatan ini berasal dari DIPA DITLITABMAS.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya atas terselenggaranya kegiatan penelitian ini disampaikan kepada :

1. Kemenristek Dikti
2. Direktur Penelitian dan Pengabdian Masyarakat  
Kemenristekdikti
3. Rektor Universitas Airlangga
4. Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga
5. Kepala Balai Besar Penelitian Veteriner Denpasar Bali
6. Semua pihak yang terlibat dalam kegiatan ini

Surabaya, 2 Nopember 2018

Penyusun  
Penelitian PUPT Unair 2018

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
BAB I PENDAHULUAN.....	1
Latar Belakang Penelitian.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Klasifikasi Sapi.....	4
2.2 Tinjauan umum sapi Madura.....	4
2.3 Keragaman Genetik.....	6
2.4. Penanda DNA Terciri.....	7
2.5. Kandidat Gen Untuk Sifat Terciri.....	8
2.6 Gen Folicle Stimulating Hormone (FSH).....	10
2.7 Analisa Keragaman DNA Dengan Teknik PCR-RFLP.....	11
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Waktu dan Tempat.....	15
3.2 Materi Penelitian.....	15
3.3 Alat dan Bahan.....	15
3.4 Metode Penelitian.....	15
3.4.1 Koleksi Sampel Darah.....	15
3.4.2 Ekstraksi DNA.....	16
3.4.3 Teknik PCR-RFLP.....	16
3.4.4 Sekuensing.....	17





3.4.5 Analisa Data .....	17
BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	18
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	24
DAFTAR PUSTAKA .....	26
LAMPIRAN.....	32



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### Latar Belakang

Sapi madura merupakan salah satu kekayaan plasma nutfah Indonesia. Beberapa Undang-undang diberlakukan sebagai upaya untuk menjaga kemurniannya. Salah satu peraturan tentang pelestarian sapi madura yang dikeluarkan sejak zaman kolonial Belanda adalah staatsblad (lembaran negara) No. 226/1923, No. 57/1934, dan No. 115/1937. Pasca kemerdekaan, pasal 13a Undang-undang No. 6/1967, telah menetapkan pokok-pokok peternakan dan kesehatan hewan, sebagai upaya untuk mempertahankan populasi, menjaga bentuk, warna kulit, serta meningkatkan kualitas produksi sapi madura (Utoyo *et al.*, 1996).

Sapi madura merupakan salah satu jenis sapi lokal Indonesia yang berkembang di pulau Madura serta pulau-pulau sekitarnya. Secara morfologi, sapi madura memiliki karakter hampir sama dengan sapi bali kecuali ukuran tubuh dan tanduknya yang lebih kecil. Warna kulit pada sapi madura jantan dan betina lebih coklat dari sapi bali, kaki bagian bawah sampai lutut (Rouse, 1972). Selain itu, sapi madura lebih tahan terhadap cuaca panas, efisien terhadap makanan, memiliki kualitas daging yang baik, dan lebih resisten terhadap parasit (Payne & Hodges, 1997).

Sapi Madura menjadi *breed*(bangsa) sapi potong lokal yang terbentuk sebagai akibat isolasi alam dan pengaruh lingkungan, sehingga mempunyai keseragaman karakteristik yang menonjol diantara *breed* sapi potong lokal lainnya di Indonesia. Dengan kontribusi sifat-sifat genetik sapi zebu seperti toleran terhadap stres akibat iklim dan daya tahan terhadap serangan caplak serta seleksi alam dan lingkungan yang ketat dalam kurun waktu yang lama, maka sapi Madura menjadi bangsa sapi yang mempunyai daya adaptasi sangat tinggi terhadap lingkungan. Disamping itu, sapi Madura mempunyai respon yang baik terhadap perbaikan pakan serta tahan terhadap pakan dengan kandungan serat kasar tinggi (Soehadji, 1993).

Eksplotasi sapi Madura melalui persilangan yang semakin luas dengan bangsa sapi eksotik akan memberikan dampak perubahan sifat-sifat fenotip dan genetik. Persilangan dilakukan oleh peternak guna memperoleh performen yang unggul terutama pada kecepatan pertumbuhan berat badan dan daya reproduksinya.



Oleh karenanya, studi genetik sapi madura yang telah disilangkan dengan bangsa Limousin menjadi menarik untuk dilakukan guna melihat anak sapi yang dihasilkan mempunyai kualitas yang baik dari segi pertumbuhan badan dan reproduksinya. Selanjutnya hasil seleksi genetik akan dapat dijadikan acuan untuk memperoleh bibit unggul terutama untuk sapi hasil silangan sapi madura dengan sapi yang diinseminas dengan semen limousin.

Kemajuan di bidang biologi molekuler memberikan kesempatan baru dalam usaha mendeteksi terjadinya variasi genetik (polimorfisme) sebagai dasar peningkatan mutu genetik dalam peternakan. Teknik molekuler yang potensial digunakan untuk mendeteksi variasi tersebut antara lain: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD), *Double Strand Conformation Polymorphism* (DSCP), dan *Marker-Assisted Selection* (MAS) (Kennedy *et al.*, 1990). Dengan adanya teknologi yang efektif dan akurat melalui pemanfaatan diagnosa berdasarkan *deoxyribonucleic acid* (DNA), akan sangat membantu program persilangan ternak (Rafalski dan Tingey, 1993). Penyediaan peta genetik melalui metode DNA rekombinan, dapat membantu program persilangan ternak melalui data-data molekuler yang didapat, yang mengatur sifat-sifat produksi (Hetzl, 1989).

Produk gen yang berupa hormon (bioregulator) akan mempengaruhi proses pengaturan metabolisme dan penampakan morfologi ternak. Variasi genetik (polimorfisme) pada lokus-locus gen khususnya yang mengkodekan hormon merupakan hal yang sangat penting, karena variasi tersebut menentukan karakter genetik dari suatu populasi yang dapat membantu dalam peningkatan mutu genetik dari populasi tersebut (Mitra *et al.*, 1995).

Hormon pertumbuhan sebagai salah satu produk gen berpengaruh besar dalam pertumbuhan, laktasi dan perkembangan kelenjar susu pada sapi (Hoj *et al.*, 1993a,b). Polimorfisme pada gen yang mengkodekan dan mengatur hormon pertumbuhan sangat potensial sebagai penanda genetik untuk sifat-sifat fenotip dengan produktivitas yang bernilai ekonomi tinggi.

Selain hormon pertumbuhan perlu dilakukan penelitian juga pada sisi reproduksinya, untuk memperoleh gambaran polimorfisme hormon reproduksi pada anak sapi hasil silangan dengan sapi Limousin. *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) merupakan hormon glikoprotein yang dihasilkan oleh kelenjar pituitary, yang berfungsi mengatur reproduksi pada mamalia, baik jantan maupun betina (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). Pada hewan betina berfungsi untuk proliferasi dan pengembangan folikel sampai ovulasi (McGeedan Hsueh, 2000). Sedangkan pada laki-laki, kombinasi antara FSH dan testosteron adalah hormon tropik yang mengatur fungsi sel Sertoli, yang diperlukan untuk inisiasi dan pemeliharaan kualitas dan kuantitas

persentase yang lebih rendah dari integritas akrosom pada semen segar dan beku, lebih motilitas yang rendah pada semen beku Dai *et al.*, 2009). Huang *et al.* (2002), Wimmers *et al.* (2005) dan Lin *et al.* (2006)

Penelitian mengenai polimorfisme genetik Gen *growth hormone* (GH) dan FSH  $\beta$ -sub unit belum banyak dilakukan pada anak sapi hasil silangan dengan sapi Limousin, untuk itu menarik diteliti lebih dalam agar hasil yang didapatkan dapat dijadikan acuan untuk memperoleh anakan sapi yang mempunyai kualitas performen dan daya reproduksi yang baik.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Klasifikasi Sapi

Penggolongan sapi ke dalam suatu bangsa (*breed*) sapi, didasarkan atas sekumpulan persamaan karakteristik tertentu yang sama. Atas dasar karakteristik tersebut, mereka dapat dibedakan dari ternak lainnya meskipun masih dalam spesies yang sama. Karakteristik yang dimiliki tersebut akan diturunkan ke generasi berikutnya. Menurut Blakely dan Bade (1992) bangsa sapi mempunyai klasifikasi taksonomi sebagai berikut :

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Sub class	: Theria
Infra class	: Eutheria
Ordo	: Artiodactyla
Sub ordo	: Ruminantia
Infra ordo	: Pecora
Famili	: Bovidae
Genus	: <i>Bos</i> (cattle)
Spesies	: <i>Bos taurus</i> (sapi Eropa) <i>Bos indicus</i> (sapi India/sapi zebu)

### 2.2 Tinjauan Umum Sapi Madura

Pada awal domestikasi, sapi diternakkan manusia untuk dimanfaatkan tenaganya guna membantu di bidang pertanian dan transportasi. Sapi juga digunakan masyarakat sebagai perlambang status sosial dan komoditi perdagangan. Sebagai hewan ternak, sapi juga dimanfaatkan sebagai sumber protein hewani.

Sapi domestik yang berkembang saat ini merupakan hasil domestikasi dari *Bos primigenius*. Leluhur sapi tersebut punah ± 2000 tahun yang lalu. Terdapat dua tipe utama sapi domestik yang berasal dari *B. Primigenius*, yaitu jenis kelompok sapi taurin (*B. taurus*) dan zebu (*B. indicus*). Zebu merupakan sapi berpunuk (*humped*) yang tersebar di Asia bagian selatan dan Afrika. Jenis sapi zebu masuk ke wilayah Asia dibawa oleh pengembara Verdic Aryan dari Irak menuju India. Berbeda dengan sapi zebu, sapi taurin merupakan sapi tanpa





punuk (*humpless*) yang berkembang di wilayah Eropa, Asia Tengah, Afrika Barat dan Amerika (Williamson & Payne, 1965; Payne & Wilson, 1999).

Keragaman sapi lokal Indonesia merupakan hasil persilangan dari sapi zebu, taurin dan banteng (Rouse, 1972). Domestikasi banteng yang merupakan nenek moyang sapi bali telah dimulai sejak sekitar 3500 SM (Lenstra & Bradley, 1999). Menurut Ugglä (2008) sebagian besar sapi lokal Indonesia berasal dari jenis sapi zebu dan sepertiganya berasal dari sapi bali.

Sapi zebu diperkirakan masuk ke Indonesia sekitar abad ke-2 M, bersamaan dengan masuknya kebudayaan Hindu ke wilayah ini (Payne & Hodges, 1997). Pada masa penjajahan Belanda, tahun 1806 – 1897 Kontrolir Rothenbuhler Surabaya melaporkan bahwa pedagang ternak di Jawa Timur telah mendatangkan sapi pejantan zebu jenis Mysore, Ongol, Hissar, Gujarat dan Gir dari India untuk dipersilangkan dengan sapi Jawa dan Madura. Tahun 1891 – 1921 di daerah Pasuruan Jawa Timur telah dilakukan usaha persilangan sapi Jawa dengan sapi madura oleh kontrolir Van Andel. Program persilangan tersebut dihentikan karena kurang memenuhi harapan para petani terhadap kerja ternak. Pada tahun 1957 dilakukan perbaikan mutu genetik sapi madura dengan jalan menyilangkannya dengan sapi Red Danis (Utoyo *et al.*, 1996; Hardjosubroto, 2004).

Sapi madura merupakan salah satu jenis sapi lokal Indonesia yang berkembang di pulau Madura serta pulau-pulau sekitarnya. Secara morfologi, sapi madura memiliki karakter hampir sama dengan sapi bali kecuali ukuran tubuh dan tanduknya yang lebih kecil. Warna kulit pada sapi madura jantan dan betina lebih coklat dari sapi bali, kaki bagian bawah sampai lutut dan sebagian bokongnya berwarna putih (Rouse, 1972). Selain itu, sapi madura lebih tahan terhadap cuaca panas, efisien terhadap makanan, memiliki kualitas daging yang baik, dan lebih resisten terhadap parasit (Payne & Hodges, 1997).

Kepastian asal domestikasi sapi Madura hingga saat ini masih belum diketahui. Masih terdapat perbedaan pada beberapa hasil penelitian mengenai asal usul sapi madura. Menurut Rouse (1972) sapi madura merupakan persilangan antara jenis sapi zebu dan banteng atau sapi bali. Literatur lain menyatakan bahwa sapi madura merupakan hasil persilangan antara sapi bali dan sapi jawa, dimana sapi jawa sendiri merupakan hibrid dari zebu, taurin, dan banteng (Payne & Hodges, 1997). Penelitian Nijman *et al.*, (2003) dengan menggunakan penanda mikrosatelit mengungkapkan bahwa sapi madura merupakan hasil persilangan antara banteng dan zebu atau taurin dan zebu. Penelitian dengan penanda mtDNA yang telah dilakukan oleh Ugglä (2008) dan Firdhausi (2010) menunjukkan bahwa terdapat dua tipe maternal origin sapi madura yaitu banteng dan zebu. Sedangkan dengan penanda gen SRY

pada kromosom Y paternal sapi madura diperkirakan adalah banteng (Verkaar *et al.*, 2003) atau sapi taurin (Kusdiantoro *et al.*, 2009).

Sapi madura merupakan sapi lokal yang dianggap sebagai salah satu kekayaan plasma nutfah Indonesia. Beberapa Undang – undang diberlakukan sebagai upaya untuk menjaga kemurniannya. Salah satu peraturan tentang pelestarian sapi madura yang dikeluarkan sejak zaman kolonial Belanda adalah staatsblad (lembaran negara) No. 226/1923, No. 57/1934, dan No. 115/1937. Pasca kemerdekaan, pasal 13a Undang-undang No. 6/1967, telah menetapkan pokok-pokok peternakan dan kesehatan hewan, sebagai upaya untuk mempertahankan populasi, menjaga bentuk, warna kulit, serta meningkatkan kualitas produksi sapi madura (Utoyo *et al.*, 1996).



Gambar 2.1 Sapi Madura

Sumber : Direktorat Jenderal Peternakan, (2012)

## 2.2 Keragaman Genetik

Genotipe hewan merupakan sebuah pendekatan yang berguna untuk menggambarkan prinsip-prinsip genetika dan penerapan langsung dalam hal pewarisan sifat. Hukum Hardy-Weinberg menyatakan bahwa frekuensi genotipe suatu populasi yang cukup besar akan selalu dalam keadaan seimbang bila tidak ditemukan seleksi, migrasi, mutasi, dan *genetic drift*. Sifat-sifat ditemukan dalam keragaman genetik dalam spesies dan bangsa atau galur dalam masing-masing spesies. Genetika dipandang dari segi populasi, terutama frekuensi gen dengan efek yang diinginkan (Yuniarsih, *dkk.*, 2011).

Frekuensi gen merupakan istilah yang digunakan untuk menunjukkan proporsi dari semua lokus untuk pasangan gen atau rangkaian alel ganda dalam suatu populasi. Frekuensi gen dari perbedaan-perbedaan itu sangat beragam dari bangsa-bangsa dan antar galur. Frekuensi gen yang timbul dipengaruhi oleh seleksi, mutasi gen, pencampuran dua populasi yang frekuensi gen berbeda, silang dalam (*inbreeding*), silang luar (*outbreeding*) dan *genetic drift* (Yuniarsih, dkk., 2011).

Eksperisi gen dapat mempengaruhi sifat yang muncul. Fenotipik yang muncul dapat dipengaruhi oleh variasi gen pada arah dan besar respon terhadap perubahan lingkungan (Noor, 2008). Fenotipik yang bersifat ekonomis merupakan sifat kuantitatif yang dikontrol oleh banyak gen dan masing-masing gen memberikan sedikit kontribusi pada sifat tersebut (Noor, 2008). Gen semacam ini disebut dengan gen mayor yang terletak pada lokus sifat kuantitatif atau *quantitative traits loci* (QTL). Gen mayor yang dapat digunakan sebagai kandidat dalam program *Marker Assisted Selection* (MAS) jika gen tersebut mempunyai fungsi dan pengaruh biologis yang nyata terhadap sifat kuantitatif (Diyono, 2009).

### 2.3 Penanda DNA Terciri (*Marker Assisted Selection*)

Salah satu tahapan penting dalam pemuliaan ternak adalah seleksi terhadap keturunan yang membawa sifat-sifat tertentu yang diinginkan. Pemanfaatan penanda molekular DNA dalam proses seleksi ternak terbukti telah memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan cara-cara konvensional. Penanda molekular DNA (marker genetik) yang sudah teridentifikasi berasosiasi dengan QTL (*Quantitative Trait Loci*) yang bernilai ekonomis dapat digunakan untuk meningkatkan akurasi, kecepatan dan intensitas seleksi (Van der Warf, 2000).

Pada pemuliaan ternak secara konvensional, seleksi terhadap keturunan yang membawa gen tertentu dilakukan pada level fenotipik pada tiap-tiap generasi. Dari segi pengaruh ekonomi dan waktu, seleksi terhadap ternak yang memiliki keunggulan genetik berdasarkan sifat fisik yang dapat diamati secara langsung adalah sangat tidak efektif dan efisien. Walaupun demikian, metode ini telah banyak digunakan terutama dalam kasus-kasus tertentu seperti diagnosa untuk pembawa penyakit-penyakit genetik tertentu. Kebutuhan untuk pemuliaan ternak telah mendorong perkembangan penanda genetik (*Marker Assisted Selection/MAS*) (Nicholas, 1996).

Penggunaan *Marker Assisted Selection* (MAS) didasarkan pada gagasan bahwa terdapat gen yang memegang peranan utama dan menjadi sasaran atau target secara spesifik

dalam seleksi (Van der Warf, 2000). Beberapa sifat yang dikendalikan oleh gen tunggal seperti warna bulu merupakan pola pewarisan sifat yang sederhana, namun beberapa sifat utamanya sifat produksi yang kompleks (kuantitatif) dikontrol oleh banyak gen (*polygenes*) (Nicholas, 1996; Noor, 2008). Gen-gen sifat kuantitatif yang memiliki pengaruh besar merupakan gen-gen disebut sebagai gen utama (*major gene*) yang terletak pada lokus sifat kuantitatif (QTL). Marker gen telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi ternak sapi yang memiliki performa lebih bagus pada beberapa sifat komersil seperti kualitas daging (keempukan) (Barendse, *et al.*, 2008).

Implementasi MAS yang dikombinasikan dengan teknologi reproduksi dalam industri peternakan telah menguasai pasaran genetik dalam bisnis global. Hal ini telah memungkinkan plasma nutfah dari suatu individu menghasilkan keturunan dalam jumlah besar untuk kemudian dievaluasi secara genetik dalam berbagai manajemen dan lingkungan. Kombinasi seleksi menggunakan Marker DNA Terciri (*Marker Assisted Selection/MAS*) dengan teknologi reproduksi dapat memperpendek interval generasi sekitar 45-69 bulan pada sapi (Bishop, *et al.*, 1995) dan mempercepat genetik yang diinginkan pada ternak.

#### 2.4 Kandidat Gen untuk Sifat Produksi

Strategi kandidat gen adalah salah satu teknik biologi molekuler untuk mengidentifikasi variasi sifat genetik pada lokus spesifik dan asosiasi antara variasi pada lokus sifat kuantitatif (*Quantitative Traits Loci/QTL*) dengan sifat produksi pada ternak. Beberapa kandidat gen telah diketahui berhubungan dengan pertumbuhan pada ternak, yaitu: *myostatin*, *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), *Pit-1*, *growth hormone* dan *growth hormone receptor* (GHR). Mutasi atau polimorfisme nukleotida tunggal (*single nucleotide polymorphisms/SNP*) pada gen-gen tersebut akan mempengaruhi proses metabolisme dalam tubuh ternak yang kemudian berpengaruh terhadap laju pertumbuhan pada ternak.

Hormon pertumbuhan (GH) berperan sebagai regulator utama metabolisme dan pertumbuhan setelah kelahiran pada hewan menyusui dan mempengaruhi laju pertumbuhan, komposisi tubuh, kesehatan, produksi susu, dan lama mengeram melalui modulasi banyak gen termasuk *insulin-like growth factor I* (IGF-I) (Sumantran, *et al.*, 1992; Ho dan Hoffman, 1993; Lincoln, *et al.*, 1995). Beberapa peneliti melaporkan pengaruh yang signifikan dari gen hormon pertumbuhan (GH) terhadap penambahan bobot badan harian pada sapi. Genotipe LL pada gen GH-*AluI* memberikan penambahan bobot badan harian yang lebih tinggi dari pada genotipe LV pada sapi persilangan antara *Bos taurus* dengan *Bos indicus* (Tambasco, *et*

*al.*, 2003) dan pada sapi Zebu (Rogério, *et al.*, 2006). Polimorfisme gen hormon pertumbuhan berhubungan dengan beberapa sifat produksi pada sapi seperti produksi dan kualitas susu (Lagziel, *et al.* 1996), pertumbuhan (Rocha, *et al.*, 1992; Unanian, *et al.*, 2000) komposisi dan kualitas karkas (Schlee, *et al.*, 1994).

*Growth hormone receptor* (GHR) memediasi aktivitas biologi hormon pertumbuhan pada sel target melalui *transduksi myogenic-stimulating signal* melewati membran sel dan menginduksi beberapa gen termasuk IGF-1 (Rotwein, *et al.*, 1994; Argetsinger dan Carter-Su, 1996). Mutasi pada GHR gen dapat menyebabkan keterlambatan pertumbuhan pada manusia dikenal sebagai GH resisten atau GH insensitif (Rosenbloom, *et al.*, 1997). Oleh karena itu, GH dan GHR gen adalah kandidat gen yang penting untuk mengidentifikasi penanda genetik pertumbuhan, karkas, dan produksi susu pada ternak.

*Growth hormone factor-1/pituitary-specific transcription factor Pit-1* gen juga merupakan salah satu kandidat gen yang telah teruji sebagai sebagai marker genetik. Pit-1 merupakan suatu faktor transkripsi spesifik-pituitary yang bertanggung jawab terhadap pengembangan pituitary dan ekspresi hormon pada mammalia (Cohen, *et al.*, 1997). Hal ini menunjukkan adanya pengontrolan transkripsi terhadap hormon pertumbuhan, prolactin (Nelson, *et al.*, 1988; Mangalam, *et al.*, 1989), *thyroid-stimulation hormon,  $\beta$ - subunit* (Simmons, *et al.*, 1990; Steinfelder, *et al.*, 1991), GHRH receptor gen (Lin, *et al.*, 1992), dan Pit-1 gen itu sendiri (Rhodes, *et al.*, 1993).

Beberapa peneliti telah melaporkan assosiasi antara polimorfisme gen Pit-1 dengan sifat produksi pada ternak. Zhao, *et al.*, (2004) melaporkan adanya hubungan yang signifikan antara gen Pit-1E6/*Hinf* dengan berat lahir dan pertumbuhan pra-sapih pada sapi Angus. Pada sapi Friesian Holstein, Pit-1 telah ditemukan berhubungan dengan komposisi dan berat badan serta produksi susu (Renaville, *et al.*, 1997). Pada babi, Pit-1 telah ditemukan berhubungan dengan berat lahir (Yu, *et al.*, 1995), berat sapih dan rata-rata penambahan berat badan harian (ADG) (Yu, *et al.*, 1995).

Beberapa peneliti telah melaporkan korelasi antara konsentrasi IGF-I dengan berbagai sifat kuantitatif, diantaranya adalah berat sapih, berat pasca-sapih (Davis dan Bioshop, 1994; Davis dan Simmen, 1997), laju pertumbuhan pada babi (Buonomo, *et al.*, 1987), pertumbuhan janin pada domba (Gluckman, *et al.*, 1983), ukuran tubuh, berat janin, total berat placentar, dan berat kelenjar susu pada tikus (Kroonsberg, *et al.*, 1989), dan dengan pertumbuhan pada manusia (Merimee, *et al.*, 1982). Ge, *et al.*, (2003) melaporkan pengaruh yang signifikan gen IGF-I/*SnaBI* terhadap penambahan bobot badan harian pada sapi Angus,

dimana genotipe BB memberikan pertambahan bobot badan yang lebih tinggi pada masa sapih dan lepas sapih dibandingkan genotipe AB maupun AA.

Leptin adalah regulator penting metabolisme energi, konsumsi pakan, pertumbuhan adiposa dan sifat reproduksi pada sapi. Leptin juga terlibat dalam regulasi berat badan dan dapat dijadikan sebagai salah satu penanda biologi terbaik untuk sifat kegemukan pada binatang dan manusia (Oprzadek, *et al.*, 2003; Münzberg, *et al.*, 2005). Beberapa penelitian telah melaporkan asosiasi antara konsentrasi serum leptin dengan depot adipose karkas dan karakteristik karkas pada sapi (Minton, *et al.*, 1998; Geary, *et al.*, 2003). Polimorfisme gen leptin dapat mempengaruhi pengaturan gen dan mempengaruhi pertambahan berat badan. Beberapa mutasi pada sapi FH berasosiasi dengan produksi susu, konsumsi pakan dan konsentrasi plasma leptin selama kehamilan (Liefers, *et al.*, 2005).

## 2.5 Gen Folicle Stimulating Hormone (FSH)

Strategi kandidat gen adalah teknik biologi molekular untuk mengidentifikasi variasi sifat genetik pada lokus spesifik dan asosiasi antara variasi pada lokus sifat kuantitatif (*Quantitative Traits Loci/QTL*) dengan cara biologi molekular. Salah satu kandidat gen pertumbuhan yang dimaksud adalah gen GH dan FSH (*Growth Hormone*) (Rahim, *dkk.*, 2012).

Selain hormon pertumbuhan perlu dilakukan penelitian juga pada sisi reproduksinya, untuk memperoleh gambaran polimorfisme hormon reproduksi pada anak sapi hasil silangan dengan sapi Limousin. Follicle Stimulating Hormone (FSH) merupakan hormon glikoprotein yang dihasilkan oleh kelenjar pituitary, yang berfungsi mengatur reproduksi pada mamalia, baik jantan maupun betina (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). Pada hewan betina berfungsi untuk proliferasi dan pengembangan folikel sampai ovulasi (McGeedan Hsueh, 2000). Sedangkan pada laki-laki, kombinasi antara FSH dan testosteron adalah hormon tropik yang mengatur fungsi sel Sertoli, yang diperlukan untuk inisiasi dan pemeliharaan kualitas dan kuantitas dispermatoogenesis (Ohta *et al.*, 2007). Hormon FSH terdiri dari  $\alpha$  dan  $\beta$ -sub unit.  $\beta$ -sub unit berperan dalam menentukan spesifisitas ikatan dengan reseptor (FSHR) (Fan dan Hendrickson, 2005). Telah dilaporkan bahwa adanya mutasi ekson 3 gen FSH  $\beta$ -subUnit pada sapi jantan diidentifikasi mempunyai konsentrasi semen segar yang lebih rendah, persentase yang lebih rendah dari integritas akrosom pada semen segar dan beku, lebih motilitas yang rendah pada semen beku Dai *et al.*, 2009). Huang *et al.* (2002), Wimmers *et al.* (2005) dan Lin *et al.* (2006)

Gen FSH dijadikan sebagai salah satu kandidat gen yang dapat digunakan sebagai penanda genetik dalam program seleksi ternak dan juga merupakan kandidat gen dalam pengaturan produksi susu, karkas, dan respon imun (Ge, *et al.*, 2003). Sekuens hormon gen FSH pada kambing memiliki panjang 2544 pasang basa (pb) (Kioka, *et al.*, 1989). Gen FSH terbagi dalam sekuens nukleotida terdiri dari 5 *exon* dan 4 *intron* yang sama pada spesies mamalia yang berbeda (Barta, *et al.*, 2001). Keragaman FSH pada kambing lokal yang diidentifikasi dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) berhubungan dengan jumlah, jenis, dan frekuensi alel, heterozigositas serta frekuensi genotipe.

## 2.6 Analisa Keragaman DNA dengan Teknik PCR-RFLP

*Polymerase chain reaction* (PCR) adalah suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA tersebut dengan enzim *polymerase* dan oligonukleotida pendek sebagai primer dalam mesin *termocycler*. Primer merupakan oligonukleotida spesifik yang menempel pada bagian sampel DNA yang akan diperbanyak. Enzim *polymerase* merupakan enzim yang dapat mencetak urutan DNA baru (Williams, 2005). Beberapa faktor seperti konsentrasi DNA, ukuran panjang primer, komposisi basa primer, konsentrasi ion Mg, dan suhu hibridasi primer harus dikontrol dengan hati-hati agar dapat diperoleh pita-pita DNA yang utuh dan baik (Suryanto, 2003).

Proses yang terjadi dalam mesin PCR meliputi tiga tahap utama, yaitu tahap pradenaturasi, tahap kedua yang terdiri dari 35 siklus yang masing-masing siklus terdiri dari denaturasi (pemisahan untai ganda DNA), penempelan (*annealing*), ekstensi awal molekul DNA, dan tahap terakhir adalah ekstensi akhir. Produk PCR dapat langsung divisualisasikan melalui proses elektroforesis dan dapat digunakan untuk analisa lebih lanjut (Muladno, 2002).

Elektroforesis merupakan metode standar untuk memisahkan dan mengidentifikasi fragmen DNA sesuai dengan ukurannya. Prinsip dasarnya adalah jika molekul DNA yang bermuatan negatif ditempatkan pada penghantar listrik (*buffer*), molekul akan bergerak menuju muatan positif. Molekul DNA yang bermuatan kecil akan bergerak cepat daripada yang berukuran besar. Ukuran fragmen DNA hasil elektroforesis dapat diketahui dengan menggunakan penanda ukuran (*marker*) yang salah satunya didapat dari lambda yang telah dipotong oleh enzim restriksi (Muladno, 2001).

Menurut Suryanto (2003), PCR-RFLP digunakan untuk melihat polimorfisme dalam genom organisme dengan menggunakan suatu enzim pemotong tertentu (enzim restriksi), karena sifatnya spesifik, maka enzim ini akan memotong situs tertentu yang dikenali oleh enzim ini. Situs enzim pemotong dari genom suatu kelompok organisme yang kemudian berubah karena mutasi atau berpindah karena *genetic rearrangement* dapat menyebabkan situs tersebut tidak lagi dikenali oleh enzim atau enzim restriksi akan memotong daerah lain yang berbeda. Proses ini menyebabkan terbentuknya fragmen-fragmen DNA yang ukurannya berbeda dari satu organisme ke organisme lainnya. Polimorfisme ini selanjutnya digunakan untuk membuat pohon filogeni kekerabatan kelompok. RFLP ditentukan ketika amplicon dipotong dengan enzim *Alu I*, *Rsa I*, *Taq I* dan *Hinf I* (Jain, 2004).





### BAB 3

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme gen FSH  $\beta$ -sub unit yang dijadikan acuan untuk memperoleh bibit unggul baik dari segi pertumbuhan badan dan daya reproduksinya.

### 3.2. Manfaat Penelitian

1. Dapat memberi informasi polimorfisme gen FSH  $\beta$ -sub unit pada anak sapi Madura hasil inseminasi buatan dengan semen sapi Limousin .
2. Karakteristik sumber daya genetik anak sapi Madura hasil inseminasi buatan dengan semen sapi Limousin sebagai acuan untuk memperoleh bibit unggul baik dari segi pertumbuhan badan dan daya reproduksinya.

### 3.3. Luaran

Penelitian ini diharapkan dapat dipublikasikan pada Jurnal Ilmiah Internasional,



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada tahun 2018, bertempat di Balai Besar Veteriner Denpasar Bali.

#### 4.2 Materi Penelitian

Materi utama penelitian ini adalah DNA Genom yang diperoleh dari darah anak sapi madura hasil inseminasi buatan dengan semen Limousin sebanyak 14 sampel darah. DNA genom kemudian diekstraksi dengan menggunakan Kit DNA ekstraksi QIAamp Mini spin column untuk mendegradasi dinding sel dan mendegradasi protein dan lemak. Sampel DNA kemudian siap dilanjutkan untuk reaksi PCR.

#### 4.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain : Kit DNA Ekstraksi, venoject, tabung vakuttainer, centrifuge, alat pendingin, tabung eppendorf besar kecil, gel agarose, mikropipet, tip, rak tabung, elektroforesis, autoclave, timbangan, sarung tangan.

Bahan utama yaitu sampel DNA yang diambil dari darah utuh (*whole blood*) anak sapi madura hasil inseminasi buatan dengan semen Limousin yang berasal dari Kabupaten Bangkalan madura dengan jumlah 14 sampel. Bahan-bahan pendukung antara lain : Primer FSH  $\beta$ - sub unit, Enzim restriksi *HaeIII*, Enzim restriksi *PstI*, Bahan Ekstraksi DNA (Proteinase K, Ethanol Absolut, Buffer Lysis, Wash buffer A&B), Bahan PCR (dNTP mix, Enzim Taq DNA polymerase), Bahan Elektroforesis (Triss Base, asam borat, agarose, Na<sub>2</sub> EDTA, Ethidium bromide, Marker DNA, DNA Loading dye), tissue dan plastik mika.

#### 4.4 Metode Penelitian

##### 4.4.1 Koleksi Sampel Darah

Sampel darah diperoleh dari Kabupaten Bangkalan. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan mengumpulkan sekitar 5 ml sampel darah dari sapi melalui *vena jugularis* dengan menggunakan *venojet* dan tabung *vacuttainer* dengan EDTA dan kemudian disimpan pada suhu 4°C.

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
PERPUSTAKAAN  
AYAH AYU

#### 4.4.2 Ekstraksi DNA

DNA diisolasi dan dimurnikan dengan menggunakan Kit DNA ekstraksi QIAamp Mini spin column dengan mengikuti protokol ekstraksi yang disediakan. Sebanyak 200  $\mu$ l sampel darah dilisiskan dengan menambahkan 200  $\mu$ l larutan *lysis buffer* dan 20  $\mu$ l proteinase K (10 mg/ml), campuran kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama 60 menit didalam *waterbath shaker*. Setelah inkubasi larutan kemudian ditambahkan 200  $\mu$ l ethanol absolute 96% dan disentrifugasi 8.000 x g selama 1 menit.

Pemurnian DNA dilakukan dengan metode *spin column* dengan penambahan 500  $\mu$ l larutan pencuci *wash buffer* I yang kemudian dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 8.000 x g selama 1 menit. Setelah supernatannya dibuang, DNA kemudian dicuci lagi dengan 500  $\mu$ l *wash buffer* II dan disentrifugasi pada 14.000 x g selama 3 menit. Setelah supernatan dibuang, DNA kemudian dilarutkan dalam 200  $\mu$ l *elution buffer* dan disentrifugasi pada 8.000 x g untuk selanjutnya DNA hasil ekstraksi ditampung dan disimpan pada suhu -20°C.

#### 4.4.3 Teknik PCR-RFLP

Komposisi reaksi PCR dikondisikan pada volume reaksi 25  $\mu$ l yang terdiri atas 100 ng DNA, 0.25 mM masing-masing primer, 150  $\mu$ M dNTP, 2.5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0.5 Taq DNA polymerase dan 1x buffer. Kondisi mesin PCR dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C x 2 menit, diikuti dengan 35 siklus berikutnya masing-masing denaturasi 94°C x 45 detik, dengan suhu annealing: 65 °C x 30 detik (GH), yang dilanjutkan dengan satu siklus ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit dengan menggunakan *GeneAmp PCR System 2400 ThermoCycler* (Perkin Elmer), untuk primer FSH  $\beta$ -sub unit annealing 60°C. Produk PCR kemudian di elektroforesis pada gel agarose 1,5% dengan buffer 1x TBE (89 mM Tris, 89 mM asam borat, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA) yang mengandung 100 ng/ml ethidium bromide. Kemudian divisualisasi pada UV transiluminator (*gel documentation system*). Alel ditentukan dengan cara menginterpretasi pita (*band*) yang berbentuk paling jauh migrasinya ke kutub anoda sebagai alel 1, alel 2, dan seterusnya.

Produk PCR yang diperoleh dari masing-masing gen target kemudian dianalisis menggunakan RFLP melalui pemotongan menggunakan enzim restriksi yang memiliki situs pemotongan pada gen FSH  $\beta$ -sub unit|*Pst*I. Sebanyak 4  $\mu$ l DNA produk PCR ditambahkan 0,5  $\mu$ l, selanjutnya dilakukan inkubasi selama 17 jam pada suhu 37°C.

**Tabel 3.1 Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi daerah Gen FSH**

Target	Nama	Primer Urutan Basa	Lokasi	Produk PCR(bp)
FSH $\beta$ - sub unit	F	5'-CTTCCAGACTACTGTA $\beta$ ACTCATC3'	Exon 3	313 bp
	R	5'-GTAGGCAGCTCAAAGCATCCG-3'		
	R	5'- GTCGTC $\beta$ ACTGCGCATGTTTG-3'		

#### 4.4.4 Sekuensing

Penentuan runutan nukleotida gen FSH  $\beta$ -sub unit dilakukan dengan cara sekuensing DNA yaitu tahapan akhir untuk memperoleh data urutan nukleotida dari fragmen hasil perbanyakan PCR -RFLP. Pita-pita DNA yang sudah terektriksi pada gel agarose sebagai produk PCR- RFLP dijadikan sebagai cetakan dalam reaksi sekuensing dengan menggunakan primer *forward* dan *reverse* seperti pada saat amplifikasi.

#### 4.4.5 Analisa Data

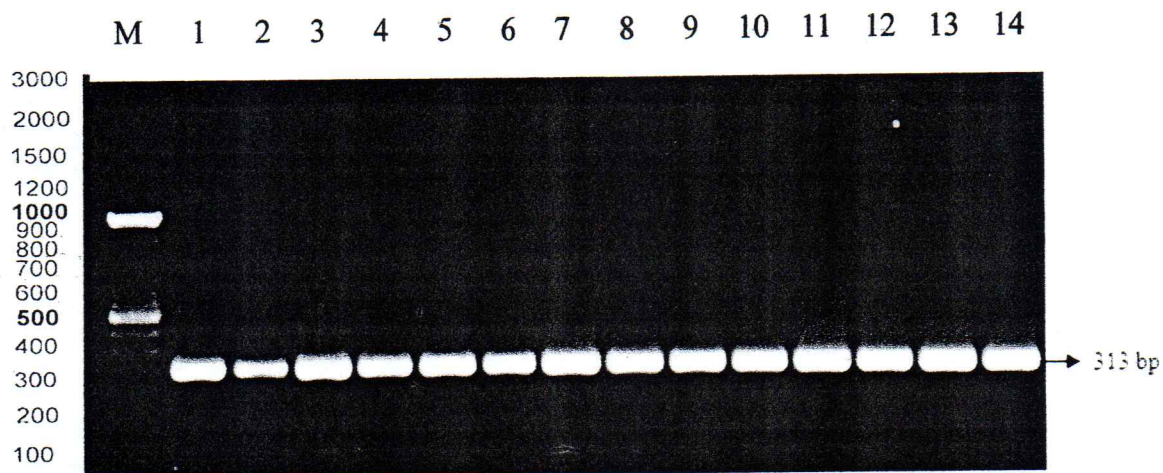
Keragaman genotipe tiap-tiap individu dapat ditentukan dari pita-pita DNA gen yang ditemukan. Masing-masing sampel dibandingkan berdasarkan ukuran (marker) yang sama dan dihitung frekuensi alelnya. Frekuensi alel bisa dihitung dengan menggunakan rumus Nei dan Kumar (2000). Analisis data hasil sekuensing menggunakan software *UGENE* 1.21.0.

## BAB 5

## HASIL PENELITIAN DAN LUARAN YANG DICAPAI

## 5.1. Hasil PCR Gen FSH

Dari 14 sample darah sapi madrasin dilakukan PCR untuk mendeteksi adanya gen FSH, hasil dari PCR menunjukkan adanya 14 *band* gen FSH dengan menggunakan primer gen FSH. Hasil positif ditunjukkan dengan gambar 5.1. sebagai berikut.



Gambar 5.1. Hasil elektroforesis PCR dengan primer gen FSH sapi Madrasin. Lajur M : Marker, Lajur 1-14 merupakan hasil elektroforesis gen FSH sapi madrasin dengan panjang 313bp.

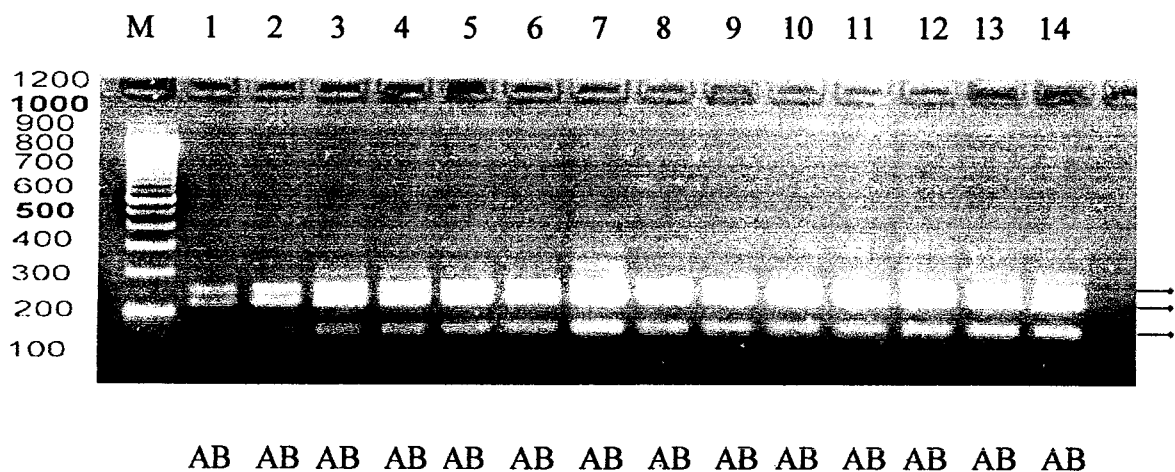
Amplifikasi ruas gen FSH sub-unit beta berhasil sepanjang 313 bp menggunakan sepasang primer sesuai dengan hasil penelitian Dai *et al.* (2009). Kondisi PCR yang digunakan pada mesin *thermocycler*, menggunakan suhu denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C, penempelan primer atau *annealing* 63°C selama 45 detik, penempelan DNA baru pada suhu 72°C selama 1 menit, dan suhu 72°C pemanjangan akhir selama 5 menit.

Hasil PCR dari gen FSH sapi madrasin menunjukkan *band* sepanjang 313 bp, hal ini sesuai dengan *band* yang ada di pustaka genom (Genbank Nomor Akses J00008 ; BALOGH *et al.*, 2009).

FSH sendiri merupakan kandidat hormon yang berperan mengatur reproduksi, dan menumbuh kembangkan folikel (Ge *et al.*, 2003). Gen FSH menjadi salah satu hal penting dalam mengatur kesuburan atau fertilitas pada ternak yang bernilai ekonomis tinggi, sehingga gen FSH menjadi kandidat gen dalam program *Marked Assisted Selection* (MAS) pada sapi.

## 5.2 Hasil PCR RFLP Gen FSH dengan Enzim *AluI*

Setelah terdeteksi adanya gen FSH pada sapi madrasin menggunakan metode PCR, selanjutnya dilakukan RFLP atau pemotongan DNA gen FSH dengan menggunakan enzim restriksi *AluI* (5'-AG | CT - 3'). Hasil dari RFLP adalah 14 sample gen FSH terbagi menjadi 3 band, yaitu 255 bp, 230 bp, dan 150 bp. Hasil RFLP gen FSH sapi madrasin dapat dilihat pada gambar 5.2. sebagai berikut.



Gambar 5.2. Hasil elektroforesis dari PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *AluI* gen FSH sapi Madrasin. Lajur M : Marker, Lajur 1-14 ( 255 bp, 237 bp, 150bp).

Amplifikasi gen FSH sapi madrasin menggunakan metode PCR diketahui memiliki panjang 313 bp, yang akan dilanjutkan dengan pemotongan situs gen FSH sapi madrasin menggunakan enzim restriksi *AluI*. Berdasarkan hasil RFLP produk PCR sepanjang 255bp, 237bp, dan 150bp menghasilkan 2 alel yaitu A dan B, sedangkan pada sapi madura hanya dapat ditemukan 1 alel yaitu alel B.



Enzim restriksi dapat mengenali gen FSH pada tempat pemotongan, hal ini disebabkan sekuen DNA pada tempat pemotongan tidak mengalami mutasi. Alel A dan B sendiri ditunjukkan dengan panjang fragmen (150 bp, 237 bp, dan 255 bp).

### 5.3. Frekuensi Genotip dan Alel Gen FSH

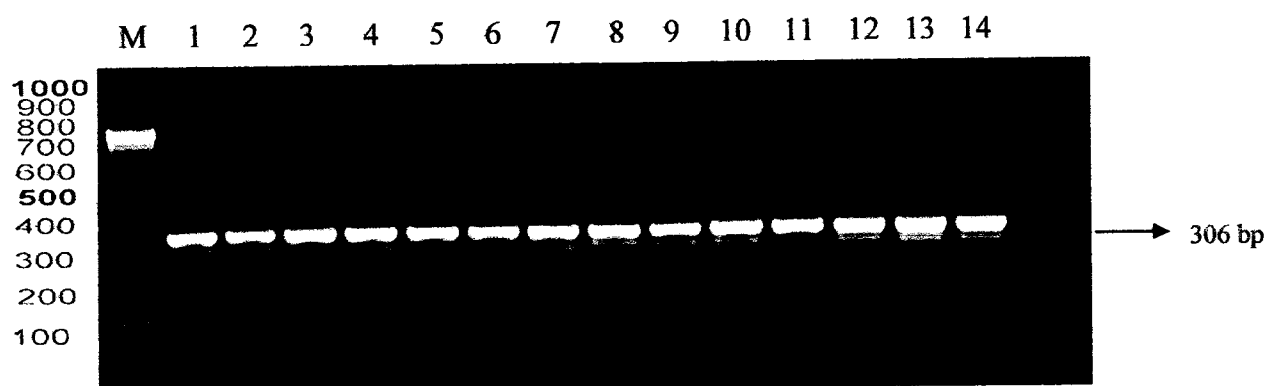
Tabel 5.3. Frekuensi genotip dan alel gen FSH pada sapi Madrasin (*genotype and allele frequencies of Madrasin cattle*). Keterangan AA, AB dan BB = genotip homozigot, A dan B = Alel

Bangsa ( <i>breed</i> )	N	Frekuensi genotip ( <i>genotype frequency</i> )			Frekuensi alel ( <i>allele frequency</i> )	
		AA	AB	BB	A	B
Madrasin	14	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
Madura	10	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00

Hasil analisis ruas gen rFSH *alul* menunjukkan bahwa frekuensi alel A sama dengan frekuensi alel B, Frekuensi alel A dan B pada sapi Madrasin secara berturut - turut sebesar 0,50 dan 0,50 (tabel 5.1) sedangkan Frekuensi genotipe AB dan BB sebesar 1,00 dan 0,00. Berdasarkan perbedaan tersebut diduga tidak terjadi perubahan frekuensi alel dan genotipe antara sapi madura dengan sapi madrasin akibat perkawinan silang dengan sapi Limousin.

### 5.4. Hasil PCR Gen rFSH

Hasil amplifikasi dari darah sapi 14 ekor Sapi Madrasin di Kabupaten Bangkalan yang dilakukan dengan metode PCR, menghasilkan 14 pita sampel DNA yang positif dengan menggunakan primer gen rFSH. Hasil positif visualisasi dari elektroforesis dapat dilihat dalam Gambar 5.4



Gambar 5.4. Hasil elektroforesis PCR dengan primer gen FSH sapi Madrasin. Lajur M : Marker, Lajur 1-14 merupakan hasil elektroforesis gen FSH sapi madrasin dengan panjang 306bp.

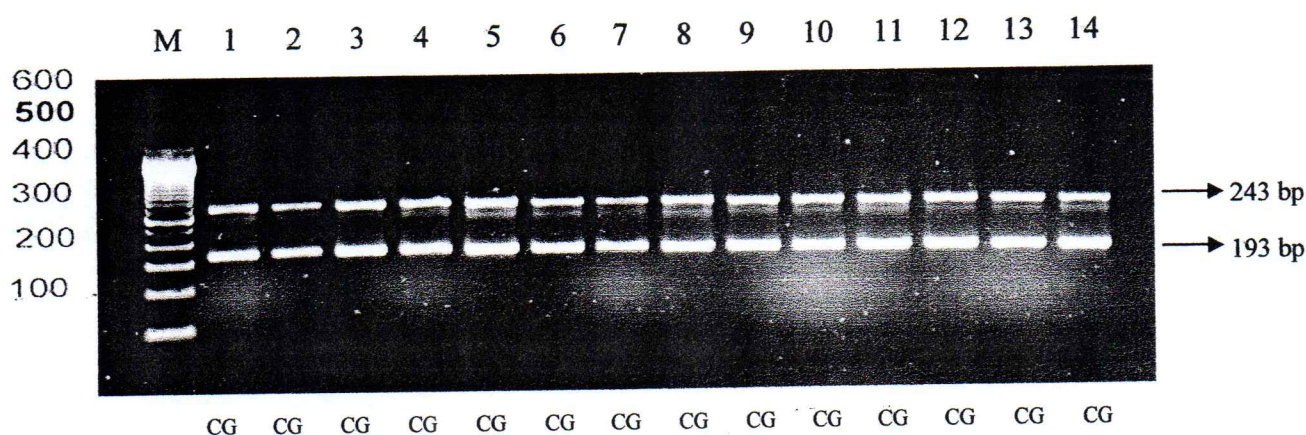
Hasil PCR RFLP Gen FSH Reseptor pada Sapi Bali Metode PCR-RFLP dengan enzim PSt1 sebesar 306 bp. Kondisi mesin *thermocycler* pada amplifikasi gen FSH reseptor adalah denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 45 detik, suhu *annealing* 60°C selama 45 detik, suhu pemanjangan DNA baru 72°C selama 5 menit.

Berdasarkan hasil amplifikasi darah dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di lanjutkan dengan pembacaan elektroforesis didapatkan hasil sampel positif. Gen rFSH yang terdapat pada seluruh sampel darah sapi Madrasin dapat terdeteksi oleh PCR dengan panjang produk hasil amplifikasi ruas gen rFSH adalah 306 bp yang terletak pada ekson 10. Hasil penelitian ini sama dengan hasil identifikasi keragaman genetik gen rFSH pada sapi *Limousin* yang sebelumnya dilakukan oleh (Ishak, 2012).

Tingkat keberhasilan amplifikasi gen rFSH dalam penelitian ini adalah 100%. Hasil amplifikasi ruas gen rFSH di visualisasikan pada gel agarose 1,5% yang disajikan pada (Gambar 5.4). Suhu dan lama waktu *annealing* juga menentukan tingkat spesifitas hasil amplifikasi dan penyebab faktor lainnya yang berperan dalam menentukan keberhasilan amplifikasi adalah kualitas atau tingkat kemurnian DNA yang digunakan sebagai DNA *template* (Misrianti dkk, 2011).

Hasil pemeriksaan amplifikasi dengan produk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang diperoleh kemudian didigesti dengan enzim restriksi *AluI*, mendapatkan hasil pita dengan panjang 243 bp dan 193 bp pada sapi Madrasin. Hasil elektroforesis pada proses PCR-RFLP sampel darah sapi Madrasin dapat di lihat pada Gambar 4.4.

### 5.5. Hasil PCR-RFLP Gen rFSH



Berdasarkan hasil perlakuan menggunakan PRC-RFLP ruas gen rFSH yang diamplifikasi terdapat dua situs pemotongan *AluI* yang dikenal dengan dua genotipe yaitu GG tervisualisasi pada 1 pita (243bp) dan CC tervisualisasi pada 2 pita (243bp dan 193bp) ditandai dengan terpotongnya fragmen 306 bp menjadi dua bagian sepanjang 243 bp dan 193 bp. Fragmen gen rFSH yang memiliki situs pemotongan enzim *AluI* akan mengindikasikan bahwa tidak terjadi mutasi namun jika tidak terdapat situs pemotongan yang ditunjukkan dengan tidak adanya pemotongan oleh enzim *AluI* maka dapat dinyatakan bahwa terjadi mutasi pada situs fragmen rFSH tersebut (Zulkarnaim, 2010). Keragaman pada ruas gen rFSH *AluI* diduga karena adanya mutasi atau perubahan basa tersebut menyebabkan berubahnya asam amino *serine* menjadi *glicine*. Perubahan tersebut menyebabkan situs pemotong tidak dikenali oleh enzim *AluI*, sehingga menghasilkan fragmen sepanjang 193 bp yang dikenal dengan alel G (Ge *et al.*, 2000; Di

dua macam fragmen yang terpotong yaitu genotipe CG yang ditunjukkan fragmen sepanjang 243 bp dan 193 bp dan fragmen yang terpotong menjadi satu pita disebut genotip CG.

## 5.6. Frekuensi Genotip dan Alel Gen rFSH

Tabel 5.6. Frekuensi genotip dan alel gen rFSH pada sapi Madrasin (*genotype and allele frequencies of Madrasin cattle*). Keterangan CC, CG dan GG = genotip homozigot, C dan G = Alel

Bangsa ( <i>breed</i> )	N	Frekuensi genotip ( <i>genotype frequency</i> )			Frekuensi alel ( <i>allele frequency</i> )	
		CC	CG	GG	C	G
Madrasin	14	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
Madura	10	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00

Hasil analisis ruas gen rFSH *alul* menunjukkan bahwa frekuensi alel C sama dengan frekuensi alel G, Frekuensi alel C dan G pada sapi Madrasin secara berturut - turut sebesar 0,50 dan 0,50 (tabel 5.2) sedangkan Frekuensi genotipe CG dan GG sebesar 1,00 dan 0,00. Berdasarkan perbedaan tersebut diduga tidak terjadi perubahan frekuensi alel dan genotipe antara sapi madura dengan sapi madrasin akibat perkawinan silang dengan sapi Limousin.

### Luaran yang dicapai :

1. Jurnal Internasional terindeks scopus (sudah terbit) → Bukti Pada Lampiran 1
2. Jurnal Internasional bereputasi (sudah terbit) → Bukti Pada Lampiran 2
3. Didaftarkan pada HAKI → Bukti Pada Lampiran 3

**BAB 6****KESIMPULAN****6.1. Kesimpulan**

Penelitian mengenai gen *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Receptor Follicle Stimulating Hormone* (rFSH) pada sapi Madrasin (persilangan madura dan limousin) dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Amplifikasi dari 14 ekor Sapi Madrasin menunjukkan gen FSH mempunyai panjang pita 313 bp dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).
2. Amplifikasi dari 14 ekor Sapi Madrasin menunjukkan gen FSH mendapatkan panjang fragmen 313 bp dan gen rFSH mendapatkan panjang fragmen 306 bp dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).
3. Hasil *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) yang memotong fragmen gen FSH hasil PCR sepanjang 313 bp menjadi 255 bp, 237 bp, dan 150 bp.
4. Hasil elektroforesis gen rFSH pada proses *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) sampel darah sapi Madrasin yang diperoleh dari amplifikasi produk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mendapatkan hasil pita dengan panjang 243 bp dan 193 bp pada sapi Madrasin.

**6.2. Saran**

Penelitian mengenai gen FSH dan *Receptor FSH* (rFSH) masih memerlukan pemeriksaan dan penelitian pendukung sehingga informasi yang di dapat akan lebih akurat.

Saran yang diberikan adalah:

1. Setelah didapatkan data mengenai profil *FSH dan Receptor FSH* sapi madrasin alangkah lebih baiknya dilakukan penelitian selanjutnya tentang sekuensing gen FSH



dan gen rFSH sapi madrasin agar dapat mengetahui perubahan urutan basa nukleotida pada DNA sapi Madrasin.

2. Setelah didapatkan data mengenai profil *FSH* dan *Receptor FSH* sapi madrasin alangkah lebih baiknya dilakukan penelitian selanjutnya tentang profil gen LH dan gen rLH sapi madrasin.



## DAFTAR PUSTAKA

- Akers, R.M. 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cow. *J. Dairy Sci.* 89:1222-1234.
- Baldi, A. 1999. Manipulation of milk production and quality by use of somatotropin in dairy ruminants other than cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17: 131-137.
- Barendse W, Harrison BE, Bunch RJ, and Thomas MB. 2008. Variation at the calpain 3 gene is associated with meat tenderness in Zebu and composite breeds of cattle. *BMC Genet* 9:41.
- Bishop, M.D., Hawkins, G.A., and Keener, C.L. 1995. Use of DNA markers in animal selection. *Theriogenology* 43:61.
- Blakely, J. and D. H. Bade. 1992. Ilmu Peternakan Edisi Ke Empat. Terjemahan Srigandono. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Buonomo, F. C., Lauterio, T. J., Baile, C. A., and Champion, D. R. 1987. Determination of insulin-like growth factor-I and IGF binding protein levels in swine. *Dom. Anim. Endocrinol.* 4:23.
- Burton, J.L., B. W. McBride, E. Block and D. R Glimm. 1994. A review of bovine growth hormone. *Can J. Anim. Sci.* 74: 167-201.
- Cohen, L. E., F. E. Wondisford, and S. Radovick. 1997. Role of pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 25:523-54.
- Dai, L., Z. Zhao, R. Zhao, S. Xiao, H. Jiang, X. Yue, X. Li, Y. Gao, J. Liu and J. Zhang. 2009. Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH beta-subunit gene on semen quality and fertility in bulls. *Anim. Rep. Sci.* 114: 14-22.
- Davis, M. E. and Bishop, M. D. 1994. A note on consequences of single-trait selection for insulin-like growth factor-1 in beef heifers. *Anim. Prod.* 59:315.
- Davis, M.E., and R. C. M. Simmen. 1997. Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor I concentration and performance traits in Angus beef cattle. *J. Anim. Sci.* 75:317-324.
- Diyono, R. 2009. Karakteristik Ukuran Tubuh dan Polimorfisme gen GH, GHRH dan Pit-1 pada Populasi Kerbau di Banten. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Fan, Q.R. and W.A. Hendrickson. 2005. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 433:269-277.





- Fanani, M.Z. 2011. Teknologi Analisis Molekular menggunakan Metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) : Aplikasinya dalam diagnosis Spesies *Candida*. <http://mazfanani.wordpress.com/2011/04/25/> [16 Februari 2013].
- Firdhausi, N.F. 2010. Asal Usul Sapi Madura Berdasarkan Penanda DNA Mitokondria [Tesis]. Institut Pertanian Bogor.
- Ge, W., M. E. Davis, H.C. Hines, K.M. Irvin and R.C.M. Simmen. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 641-648.
- Geary, T.W., E.L. McFadin, M.D. MacNeil, E.E. Grings, R.E. Short, R.N. Funston and D.H. Keisler. 2003. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *J. Animal Sci.* 8 : 1-8.
- Gluckman, P. D., Johnson-Barrett, J. J., Butler, J. H., Edgar, B. W., and Gunn, T. R. 1983. Studies of insulin-like growth factor-I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clin. Endocrinol.* 19:405.
- Guatelli JC, Gingeras TR, and Richman DD. 1989. Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2 (2): 217-226.
- Hardjosubroto. 2004. Alternatif Kebijakan Pengelolaan Berkelanjutan Sumberdaya Genetik Sapi potong Lokal dalam Sistem Pembibitan Ternak Nasional. *Wartazoa* 14:107-115.
- Hetzel, D.J.S. 1989. Construction of a bovine gene map. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 49: 53-56.
- Ho, K. K. Y., and D. M. Hoffman. 1993. Aging and growth hormone. *Horm. Res.* 40:80-86.
- Hoj, S., M. Fredholm, and V.H. Nielsen. 1993a. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Animal Genetics* 24: 91-96.
- Hoj, S., P. Lovendahl, and K. Sejrsen. 1993b. Possible association of growth hormone gene polymorphisms with growth hormone releasing calves from lines selected for high and low milk fat yield. *Acta Agriculture of Scandinavia, section Animal Science* 43: 12-135.
- Huang, S.Y., M.Y. Chen, E.C. Lin, H.L. Tsou, Y.H. Kuo, C.C. Ju and W.C. Lee. 2002. Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.* 70:99-109.

- Ishak, A.B.S. 2012. Identifikasi Keragaman Gen FSH Sunb-Unit Beta, Gen FSH Reseptor, dan Gen GH Sapi Bali Jantan Sebagai Penanda Kualitas Sperma. Thesis. Institut Pertanian Bogor. 31 – 40
- Jain S. 2004. Use of Cytochrome b Gene Variability In Detecting Meat Species By Multiplex PCR Assay (Thesis). Arand. Departement of Veterinary Public Health, College of Veterinary Science And Animal Husbandry, Anand Agricultural University.
- Kennedy, B.W., A.M. Verrinder-Gibbins, J.P. Gibson, and C. Smith.1990. Coalescence of molecular and quantitative genetics for livestock improvement. *Journal of Dairy Science* 73: 2619-2627.
- Kioka, N., E. Manabe, M. Abe, H. Hashi, M. Yato, M. Okuno, Y. Yamano, H. Sakai, T. Kumano, K. Utsumi and A. Iritani. 1989. Cloning and sequencing of goat growth hormone gene. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1538-1592. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/D00476> [16 Februari 2013].
- Kroonsberg, C., McCutcheon, S. N., Siddiqui, R. A., Mackenzie, D. D. S., Blair, H. T., Ormsby, J. E., Breier, B. H., and Gluckman, P. D. 1989. Reproductive performance and fetal growth in female mice from lines divergently selected on the basis of plasma IGF-I concentrations. *J. Reprod. Fert.* 87:349.
- Lagziel, A.; Lipkin, E.; Soller, M., 1996: Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. *Genetics* 142: 945–951.
- Lenstra, J.W., D.G. Bradley. 1999. Systematic and phylogeny of cattle. Di dalam: Fries R & Ruvinsky A, editor. *The Genetics of Cattle*. United Kingdom: CABI Publishing.
- Lin, C. Y.; Sabour, M. P.; Lee, A. J., 1992: Direct typing of milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: a review. *Anim. Breed. Abst.* 60: 1–10.
- Lincoln, D. T., F. Sinowatz, E. el-Hifnawi, R. L. Hughes, and M. Waters. 1995. Evidence of a direct role for growth hormone (GH) in mammary gland proliferation and lactation. *Anat. Histol. Embryol.* 24:107–115.
- Mangalam, H. J., V. R. Albert, H. A. Ingraham, M. Kapiloff, L. Wilson, C. Nelson, H. Elsholtz, and M. G. Rosenfeld. 1989. A pituitary POU-domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev.* 3:946–958.
- McGee, E.A. and A.J. Hsueh. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinol. Rev.* 21:200-214
- Merimee, T. J., Zapf, J., and Froesch, E. R. 1982. Insulin-like growth factors in pygmies and subjects with the pygmy trait: Characterization of the metabolic actions of IGF-I and IGF-II in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55:1081
- Minton J.E., D.J. Bindel, J.S. Drouillard, E.C. Titgemeyer, D.M. Grieger, and C.M. Hill. 1998. Serum leptin is associated with carcass traits in finishing cattle. *J. Anim. Sci.* 76: 231.

- Mitra, A., P. Schlee, C.R. Balakrishnan, and F. Pirchner. 1995. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *Journal of Animal Breeding Genetics* 112:71-74.
- Montgomery G.W and Kinghorn. 1997. Recent developments in gene mapping and progress towards marker-assisted selection in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 48:729-741.
- Muladno, 2001. Dasar-dasar Teknik DNA dan beberapa Aplikasinya. Balai Penelitian dan Pengembangan Zoologi, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi LIPI, Bogor.
- Muladno, 2002. Seputar Teknologi Rekayasa Genetika. Pustaka Wira Usaha Muda, Bogor.
- Münzberg H., M. Björnholm, S.H. Bates, M.G. Myers. 2005. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci.* 62 : 642-52.
- Nelson, C., V. R. Albert, H. P. Elsholtz, L. I. Lu, and M. G. Rosenfeld. 1988. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin gene by a common transcription factor. *Science* 239:1400-1405.
- Nicholas FW. 1996. *Introduction to Veterinary Genetics*. New York: Oxford University Press.
- Nijman, I.J., M. Otsen, E.L.C. Veekar, C. de Ruijter, E. Hanecamp, J.W. Ochieng, S. Shamshad, J.E.O. Rege, O. Hanotte, M.W. Barwegwn, Sulawati T, Lenstra JA. 2003. Hybridization of Banteng (*Bos javanicus*) and Zebu (*Bos indicus*) Revealed by Mitochondrial DNA, Satellite DNA, AFLP and Microsatellites. *Heredity* 90:10-16.
- Noor R.R. 2008. *Genetika Ternak*. Ed Ke-2 Jakarta: Penebar Swadaya.
- Ohta, T., H. Miyake, C. Miura, H. Kamei, K. Aida and T. Miura. 2007. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol. Reprod.* 77:970-977
- Oprzadek, J., K. Flisikowski, L. Zwierzchowski and E. Dymnicki. 2003. Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit-1, and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black and White bulls. *Anim. Sci. Papers Rep.* 21: 135-145.
- Payne, W.J.A., J. Hodges. 1997. *Tropical Cattle: Origin, Breed, and Breeding Policies*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Payne, W.J.A., Wilson. 1999. *An Introduction to Animal Husbandry in the Tropics*. Oxford: Blackwell science Ltd.
- Rahim. L., R.R. Sri Rachma., M.I.A. Dagong dan I.P. Kusumandari. 2012. Keragaman kelompok gen pertumbuhan (*GH*, *GHR*, *IGF-1*, *Leptin* dan *Pit-1*) dan hubungannya dengan karakteristik tumbuh kembang dan karkas pada kambing Marica dan Kacang Makassar.

- Renaville R, Gengler N, Parmentier I, Mortiaux F, Massart S, Bertozzi C, Burny A and Portetelle D. 1997., Pit1 gene *Hinf* I RFLP and growth traits in double-muscle Belgian Blue cattle. *J Anim Sci* 75 (Suppl. 1):146.
- Rhodes, S. J., R. Chen, G. E. DiMattia, K. M. Scully, K. A. Kalla, S. C. Lin, V. C. Yu, and M. G. Rosenfeld. 1993. A tissue-specific enhancer confers Pit-1-dependent morphogen inducibility and autoregulation on the Pit-1 gene. *Genes Dev.* 7:913–932.
- Rocha, J. L.; Baker, J. F.; Womack, J. E.; Sanders, J. O.; Taylor, J. F., 1992: Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 3360–3370.
- Rogério A. Curi, Dario A. Palmieri, Liliame Suguisawa, Henrique N. de Oliveira, Antonio C. Silveira and Catalina R. Lopes. 2006., Growth and carcass traits associated with *GHI/Alu* I and *POU1F1/Hinf* I gene polymorphisms in Zebu and crossbred beef cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 1, 56-61.
- Rosenbloom, A. L., R. G. Guevara-Aguirre. 1997. Growth hormone insensitivity. *Pediatr. Clin. North Am.* 44:423–442.
- Rotwein, P., A. M. Gronowski, and M. J. Thomas. 1994. Rapid nuclear actions of growth hormone. *Horm. Res.* 42:170–175.
- Rouse, J.E. 1972. *Cattle of Africa and Asia*. Oklahoma: University of Oklahoma Press.
- Schlee, P.; Graml, R.; Rottmann, O.; Pirchner, F., 1994: Influence of growth – hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. *J. Anim. Breed. Genet.* 111: 253–256.
- Simmons, D. M., J. W. Voss, H. A. Ingraham, J. M. Holloway, R. S. Broide, M. G. Rosenfeld, and L. W. Swanson. 1990. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* 4:695–711
- Soehadji, 1993 Kebijakan pengembangan ternak potong di Indonesia tinjauan khusus sapi Madura. Pros. Pertemuan Ilmiah Hasil Penelitian dan Pengembangan Sapi Madura. Sumenep. hlm. 1 – 12.
- Steinfelder, H. J., P. Hauser, Y. Nakayama, S. Radovick, J. H. McClaskey, T. Taylor, B. D. Weintraub, and F. E. Wondisford. 1991. Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSH $\beta$  expression: role of a pituitary-specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid hormone-inhibitory element. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:3130–3134.
- Sumantran, V. N., M. L. Tsai, and J. Schwartz. 1992. Growth hormone induces *c-fos* and *c-jun* expression in cells with varying requirements for differentiation. *Endocrinology.* 30:2016–2024.

- Suryanto. D. 2003. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara. 2003 Digitized By USU Digital Library.
- Tambasco D. D., C. C. P. Paz, M. Tambasco-Studart, A. P. Pereira, M. M. Alencar, A. R. Freitas, L. L. Countinho, I.U. Packer and L. C. A. Regitano. 2003. Candidate genes for growth traits in beef cattle *Bos Taurus* x *Bos Indicus*. *J. Anim. Bred. Genet.* 120: 51-60.
- Uggla, C.M. 2008. Investigating Genetic Variability Within Specific Indigenous Indonesian Cattle Breed [Disertasi]. Swedish University of Agricultural Science.
- Ulloa-Aguirre, A., A.R. Midgley, I.Z. Beitins and V. Padmanabhan. 1995. Follicle-stimulating hormones: characterization and physiological relevance. *Endocrinol. Rev.* 16:765-787
- Unanian MM., Denise SK., Zhang HM, and Ax RL. 1994. Rapid Communication: Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Polymorphism in the Bovine Growth Hormone Gene. *J. Anim. Sci.* 72: 2203.
- Utoyo, D.P, Djarsanto, S.N. Nasution. 1996. *Animal Genetic Resources and Domestic*. Jakarta: Ministry of Agriculture Directorate General of Livestock Services. Directorate of Livestock Breeding Development.
- Van der Warf J. 2000. An overview of animal breedings programs. Di dalam: Kinghorn B, Van der Warf J, editor. *QTL course : Identifying and Incorporating Genetic Markers and Major Genes in Animal Breeding Programs*. Armidale, Australia: University of New England.
- Williams, J. L. 2005. The use of marker assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Rev Sci Technol Int Epiz.* 24: 379-391.
- Williamson, G., W.J.A. Payne. 1965. *An Introduction To Animal Husbandry In The Tropic*. London: Loughman
- Wimmers, K., C.L. Lin, E. Tholen, D.G. Jennen, K. Schellander and S. Ponsuksili 2005. Polymorphisms in candidate genes as markers for sperm quality and boar fertility. *An*
- Yu, T. P., C. K. Tuggle, C. B. Schmitz, and M. F. Rothschild. 1995. Association of Pit-1 polymorphism with growth and carcass traits in pigs. *J. Anim. Sci.* 73:1282-1288.
- Yuniarsih, P., Jakaria, dan Muladno. 2011. Ekspolarasi Gen Growth Hormone Exon 3 pada Kambing Peranakan Etawah (PE), saanen dan PESA melalui Teknik PCR-SSCP. IPB, Bogor.
- Zhao Q, Davis ME, Hines HC. 2004. Associations of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle. *J Anim Sci* 82:2229-2233.

**LAMPIRAN 1.****Jurnal Internasional Bereputasi (Scopus Q4) Yang Sudah Terbit***Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Vol. 32, No. 1, 2018 (113-118)*

**Polymorphism of growth hormone gene in the artificial insemination  
result of Madura cattle with Limousin semen  
as a reference for genetic selection**

**B. Utomo and E. Safitri\***

Department of Reproduction Veteriner, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

\*Correspondence Author, ES: [ma\\_fispro@yahoo.com](mailto:ma_fispro@yahoo.com) / [ema-s@fkh.unair.ac.id](mailto:ema-s@fkh.unair.ac.id)

(Received November 27, 2017; Accepted December 30, 2017)

**Abstract**

Research on genetic polymorphism of growth hormone (GH) and receptor growth hormone (rGH) has not been done in crossbred of Limousin cattle, so it is interesting to be examined. Blood samples were taken from 14 Madura calves were artificially inseminated with Limousin semen. DNA amplification is done by using Polymerase Chain Reaction (PCR) method, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method to determine the genotype. DNA sequencing was done to determine nucleotide sequences of GH unit genes. The results showed that identification of GH and rGH gene polymorphisms was done by breaking DNA fragments from 432 and 298 bp in Madura and Limousin cattle (Madrasin) ie, L and V alleles have a frequency of 0.67 and 0.33 for the GH gene, respectively. This proves that the crossod-brooding of Madrasin have V allele that is not owned by the Madura cattle. While in the rGH gene, the A allele is 0.92 and the G allele is 0.08, with the frequency of the A allele larger than the G allele. This research concluded: that GH and rGH undergo changes on polymorphisms in Madrasin cattle can be used as a basis for selection.

**Keywords:** Polymorphism, GH Gene, rGH Gene, Madrasin, PCR, RFLP, V alleles

Available online at <http://www.vetmodmosul.org/ijvs>

**تعدد أشكال جين هرمون النمو في نتائج التلقيح الصناعي لأبقار مادورا الملقحة بعمني اليموزين  
كمراجع للاختيار الوراثي**

بودي اوتمو و إيرما سفتاري

فرع التتامل البيطري، كلية الطب البيطري، جامعة ايرلنكا، سورابايا، اندونيسيا

**الخلاصة**

لم تجرأبحاث على تعدد الأشكال الوراثي لهرمون النمو (GH) وهرمون النمو المستقبل (rGH) في الأبقار المهجنة من أبقار اليموزين، لذلك حاولنا في هذا البحث إجراء هذا الفحص. تم أخذ عينات دم من 14 من عجول مادورا تم تلقيحها اصطناعياً بعمني اليموزين. تم إجراء تضخيم الحمض النووي باستخدام طريقة تقاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)، طريقة تعدد الأشكال (RFLP) المفيد للطول لتحديد النمط الوراثي. تم إجراء تسلسل الحمض النووي لتحديد تسلسلات النوكليوتيدات من جينات الوحدة GH. أظهرت النتائج أن التعرف على تعدد الأشكال الجيني GH و rGH قد تم عن طريق تفسير شظايا الحمض النووي من 432 و 298 bp في ماشية Madura و Limousin (Madrasin) أي أن الأليلات L و V لها تردد 0.67 و 0.33 لجين GH، على التوالي. هذا يثبت أن التكاثر المتقاطع للمدرسين له الأليل V غير مملوك من قبل الماشية Madura. بينما في الجين rGH، الأليل A هو 0.92 والأليل G هو 0.08 مع تواتر الأليل A الأكبر من الأليل G. وخلص هذا البحث: أن GH و rGH يخضعان لتغيرات في الأشكال في الماشية Madura يمكن استخدامها كأساس للاختيار.



SJR

scimagojr.com

Enter Journal Title, ISSN or Publisher Name

Home

Journal Rankings

Country Rankings

Viz Tools

Help

About Us

# Iraqi Journal of Veterinary Sciences

**Country** Iraq - SIR Ranking of Iraq

# 6

**Subject Area and Category** Agricultural and Biological Sciences  
Animal Science and Zoology

Veterinary  
Veterinary (miscellaneous)

H Index

**Publisher** University of Mosul

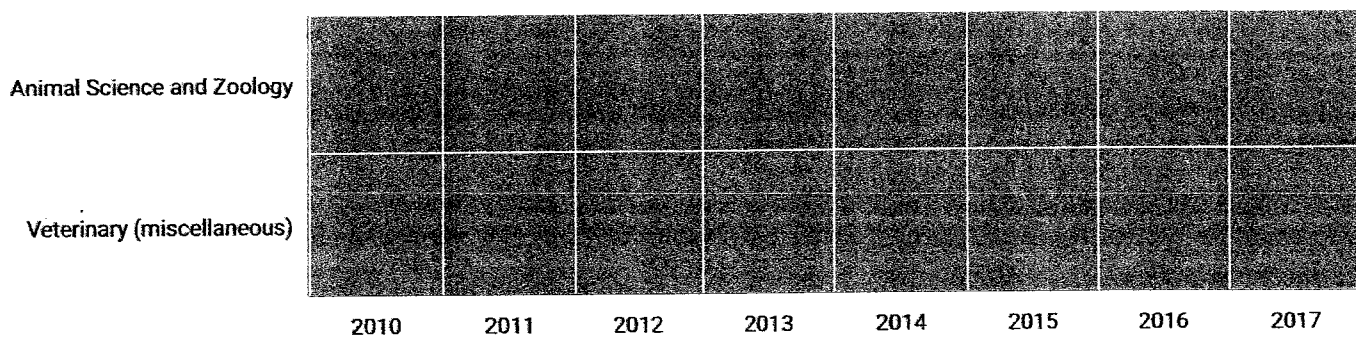
**Publication type** Journals

**ISSN** 16073894

**Coverage** 2009-ongoing

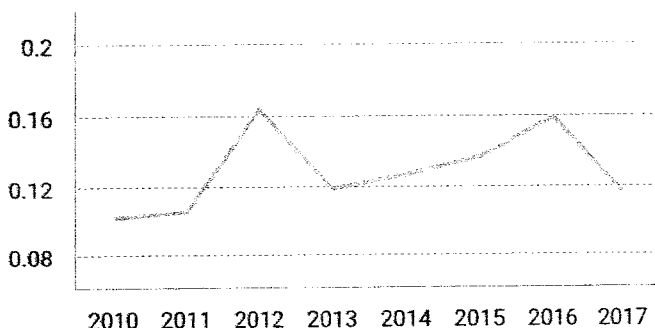
Join the conversation about this journal

## Quartiles



## SJR

## Citations per document



Total Cites

Self-Cites

LAPORAN PENELITIAN

POLIMORFISME GEN GROWTH ...

BUDI UTOMO



## Polymorphism of growth hormone gene in the artificial insemination result of Madura cattle with Limousin semen as a reference for genetic selection

B. Utomo and E. Safitri\*

Department of Reproduction Veteriner, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

\*Correspondence Author, ES: [rma\\_fispro@yahoo.com](mailto:rma_fispro@yahoo.com) / [erma-s@fkh.unair.ac.id](mailto:erma-s@fkh.unair.ac.id)

(Received November 27, 2017; Accepted December 30, 2017)

### Abstract

Research on genetic polymorphism of growth hormone (GH) and receptor growth hormone (rGH) has not been done in crossbred of Limousin cattle, so it is interesting to be examined. Blood samples were taken from 14 Madura calves were artificially inseminated with Limousin semen. DNA amplification is done by using Polymerase Chain Reaction (PCR) method, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method to determine the genotype. DNA sequencing was done to determine nucleotide sequences of GH unit genes. The results showed that identification of GH and rGH gene polymorphisms was done by breaking DNA fragments from 432 and 298 bp in Madura and Limousin cattle (Madrasin) ie, L and V alleles have a frequency of 0.67 and 0.33 for the GH gene, respectively. This proves that the crossed-breeding of Madrasin have V allele that is not owned by the Madura cattle. While in the rGH gene, the A allele is 0.92 and the G allele is 0.08, with the frequency of the A allele larger than the G allele. This research concluded: that GH and rGH undergo changes on polymorphisms in Madrasin cattle can be used as a basis for selection.

**Keywords:** Polymorphism, GH Gene, rGH Gene, Madrasin, PCR, RFLP, V alleles

Available online at <http://www.vetmedmosul.org/ijvs>

### تعدد أشكال جين هرمون النمو في نتائج التلقيح الصناعي لأبقار مادورا الملقحة بمني اليموزين كمرجع للاختيار الوراثي

بودي اوتمو و إيرما سفيتاري

فرع التناسل البيطري، كلية الطب البيطري، جامعة ايرلنكا، سورابايا، اندونيسيا

### الخلاصة

لم تجر أبحاث على تعدد الأشكال الوراثي لهرمون النمو (GH) وهرمون النمو المستقبل (rGH) في الأبقار المهجنة من أبقار اليموزين، لذلك حاولنا في هذا البحث إجراء هذا الفحص. تم أخذ عينات دم من 14 من عجول مادورا تم تلقيحها اصطناعياً بمني اليموزين. تم إجراء تضخيم الحمض النووي باستخدام طريقة تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)، طريقة تعدد الأشكال (RFLP) المقيد للطول لتحديد النمط الوراثي. تم إجراء تسلسل الحمض النووي لتحديد تسلسلات النوكليوتيدات من جينات الوحدة GH. أظهرت النتائج أن التعرف على تعدد الأشكال الجيني GH و rGH قد تم عن طريق تفسير شطايا الحمض النووي من 432 و 298 bp في ماشية Madura و Limousin (Madrasin) أي أن الأليلات L و V لها تردد 0,67 و 0,33 لجين GH، على التوالي. هذا يثبت أن التكاثر المتقاطع للمدرسين له أليل V غير مملوك من قبل الماشية Madura. بينما في الجين rGH، الأليل A هو 0,92 والأليل G هو 0,08، مع تواتر الأليل A الأكبر من الأليل G. وخلص هذا البحث: أن GH و rGH يخضعان لتغيرات في الأشكال في الماشية Madrasin يمكن استخدامها كأساس للاختيار.

## Introduction

Madura cattle is one of Indonesia's germplasm wealth. Several laws enacted in an effort to maintain its purity and set out the main points of animal husbandry and animal health, in an effort to maintain the population, shape, colour of the skin, and improve the quality of Madura cattle production.

Madura cattle is one type of local Indonesian cattle that grow on the island of Madura and surrounding islands. Morphologically, Madura cattle have almost the same characteristics as Balinese cattle except for their smaller body size and horns. The skin colour of male and female Madura cattle is browner than Bali cattle, lower legs to knees (1). In addition, Madura cattle are more resistant to hot weather, efficient to food, have good meat quality, and more resistant to parasites (2).

Madura cattle become a local breed of beef cattle that is formed as a result of natural isolation and environmental influences, so it has a uniformity characteristic that stands out among other local beef breeds in Indonesia. With the contribution of genetic characteristics of zebu cattle such as tolerance to stress due to climate, resistance to tick attack, strict natural, and environmental selection a long time, Madura cattle become a cattle breed that has a very high adaptability to the environment. In addition, Madura cattle have a good response to the improvement of feed and resistance to feed with high crude fiber content (3).

The exploitation of Madurese cattle through an increasingly widespread crossing with exotic cattle will have the effect of changing phenotypic and genetic traits. Crosses are done by breeders to obtain superior performance especially for weight growth and reproductive power.

Therefore, genetic studies of Madura cattle that have been crossed with Limousin breed become interesting to do in order to see the calves produced have a good quality in terms of body growth and reproduction. Furthermore, the results of the genetic selection will be used as a reference for obtaining superior calves from Madura cattle that are inseminated with limousin cement.

Advances in the field of molecular biology provide new opportunities in an attempt to detect the occurrence of genetic variation (polymorphism) as a basis for improving genetic quality in farms. Potential molecular techniques used to detect variations include Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD), Double Strand Conformation Polymorphism (DSCP), and Marker-Assisted Selection (MAS). With effective and accurate technology through the use of diagnostics based on deoxyribonucleic acid (DNA), it will greatly assist cattle crossing programs. Provision of genetic maps through recombinant DNA methods can assist

cattle crossing programs through obtained molecular data, which regulate the properties of production (4).

Gene products in the form of hormones will affect the regulatory process of metabolism and appearance of (bioregulators) livestock morphology. Genetic variation (polymorphism) in gene loci especially that encodes hormone is very important because it determines the genetic character of a population that can assist in improving the genetic quality (5).

Growth hormone is one of the gene products which has a major effect on the growth, lactation and development of mammary glands in cattle (6). Polymorphisms in genes that encode and regulate growth hormone are very potential as genetic markers for phenotypic properties with high economic value productivity.

In addition, the research needs to be done to show the importance the growth hormone on the reproductive side, and to obtain a picture of polymorphism of reproductive hormone in calves from cattle with Limousin cattle. Research on genetic polymorphism of growth hormone (GH) gene has not been done in crossbred calves from Limousin cattle, so it is interesting to be investigated deeper so that the results obtained can be used as a reference for obtaining cattle breeds that have a good quality of performance and power reproduction.

Follicle Stimulating Hormone (FSH) is a glycoprotein hormone produced by the pituitary gland, which functions to regulate reproduction in mammals, both male and female (7). In females, it functions for the proliferation and development of follicles until ovulation (8). While in males, the combination of FSH and testosterone is a tropical hormone that regulates Sertoli cell function, which is necessary for initiation and maintenance of spermatozoa quality and quantity (9). FSH hormones consist of  $\alpha$  and  $\beta$ -sub units.  $\beta$ -sub units play a role in determining the specificity of bonding with receptors (FSHR) (10). It has been reported that the presence of exon 3 mutations of the FSH  $\beta$ -sub-unit genes in bulls were identified to have lower fresh cement concentrations, a lower percentage of acrosome integrity on fresh and frozen cement, more low motility in frozen semen (11). Research on genetic polymorphism of growth hormone (GH) and  $\beta$ -sub-unit genes has not been done in crossbred calves from Limousin cattle, so it is interesting to obtained can be used as a reference for obtaining a cattle breeds that have a good performance and power reproduction.

## Materials and methods

### Research materials

The main material of this research is DNA Genome which obtained from the blood of Madura's calves from Limousin cement artificial insemination with 14 blood samples. Genomic DNA was then extracted using a DNA

Extraction QIAamp Mini spin column Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. Invitrogen) to degrade the cell walls, proteins, and fats. The DNA samples were then ready for PCR reactions. The primer used to amplify GH gene (Table 1).

#### Materials and equipments

The main ingredient is DNA samples taken from the whole blood of Madura calves from Limousin cement artificial insemination from Bangkalan, Madura District with ten samples. Supporting materials include: Primer (GH gene Primer), HaeIII Restriction enzyme, PstI restriction

enzyme, DNA Extraction Materials (K Proteinase, Absolute Ethanol, Lysis Buffer, A & B Wash buffer), PCR materials (dNTP mix, Taq DNA polymerase enzyme), Electrophoresis Materials (Triss Base, boric acid, agarose, Na<sub>2</sub> EDTA, Ethidium bromide, DNA Marker, DNA Loading dye), tissue and mica plastics.

#### Collection of blood samples

Madura cattles and Limousine cattle crossbred calves the sample 5 ml of blood collected from jugular vein by using venojet and vacutainer tube with EDTA and then kept at 4 °C.

Table 1: The Primer Used to Amplify GH Gene

Name	Base Sequens Primer	Location	PCR Product (bp)
F	5'-AGAATCAGGCCAGCAGAAATC-3'	Exon 3 and 4	329 bp
R	5'-GTCGTCACCTGCGCATGTTG-3'		

#### DNA extraction

The DNA was isolated and purified using a QIAamp Mini spin column extraction DNA kit following the provided extraction protocol. A total of 200 µl blood samples were lysed by adding 200 µl lysis buffer solution and 20 µl K proteinase (10 mg/ml), the mixture was then incubated at 56°C for 60 minutes in the waterbath shaker. After incubation, the solution was then added 200 µl absolute ethanol (96%) and centrifuged 8000 x g for 1 min.

DNA purification was done by spin column method with the addition of 500 µl wash buffer I then continued with centrifugation at 8000 x g for 1 minute. After the supernatant was removed, the DNA was then washed again with 500 µl wash buffer II and centrifuged at 14,000 x g for 3 min. After the supernatant was removed, the DNA was then dissolved in 200 µl elution buffer and sterilized at 8000 x g for further extraction of DNA to be stored and stored at -20°C.

#### PCR-RFLP technique

The PCR reaction composition was conditioned on 25 µl reaction volume comprising 100 ng of DNA, 0.25 mM each primer, 150 µM dNTP, 2.5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0.5 Taq DNA polymerase and 1x buffer. The condition of the PCR machine begins with the initial denaturation at 94°C x 2 minutes, followed by 35 subsequent cycles with each denaturation at 94°C x 45 seconds, with annealing temperature: 65°C x 30sec (GH), followed by one end extension cycle at temperature 72°C for 5 minutes using GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler (Perkin Elmer, Madison, Wisconsin, United States), for FSH β-sub unit

primer with annealing at 60°C. The PCR product was then electrophoresed on a 1.5% agarose gel with 1 × TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA) containing 100 ng/ml ethidium bromide. Then visualized on UV transilluminator (gel documentation system). The allele is determined by interpreting the bands that are most migratory to the anode pole as allele 1, allele 2, and so on.

The PCR products obtained from each of the target genes were then analyzed using RFLP by cutting using restriction enzymes having cutting sites in the HaeIII gene and the FSH β-PstI gene. A total of 4 µl DNA PCR product added 0.5 µl, then incubated for 17 hours at 37°C.

#### Sequencing

The determination of nucleotide sequences of GH (Growth Hormone) and rGH (receptor Growth Hormone) unit genes was done by DNA sequencing that is the final step to obtain data of nucleotide sequence from fragment result of PCR-RFLP propagation. The DNA bands that already restricted on an agarose gel as PCR-RFLP products serve as a mould in the sequencing reaction by using forward and reverse primers as in the time of amplification.

#### Data analysis

The diversity of individual genotypes can be determined from the DNA bands of the gene found. Each sample was compared to the same size (marker) and calculated the frequency of the allele. The frequency of alleles can be calculated using the Nei and Kumar formulas (12). Sequencing data analysis using UGENE 1.21.0 software.

Table 2: Genotype and allele frequencies of Madrasin cattle. LL, LV, and VV = homozygot genotype, L and V = Allele

Breed	N	Genotype Frequency			Allele Frequency	
		LL	LV	VV	L	V
Madrasin	14	0,928	0,017	0,00	0,96	0,075
Madura	10	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00

Table 3: Genotype and allele frequencies of Madrasin cattle. AA, AG and GG = homozygot genotype, A and G = Allele

Breed	N	Genotype Frequency			Allele Frequency	
		AA	AG	GG	A	G
Madrasin	14	0,857	0,142	0,000	0,925	0,075
Limousin	21	0,238	0,095	0,667	0,286	0,714

**Results**

**The PCR result of GH gene**

PCR of 14 Madrasincattle's blood samples was performed to detect the presence of the Growth Hormone (GH) gene, the result of PCR showing 14 gene band GH using GH gene primers. Positive results are shown in Figure 1.

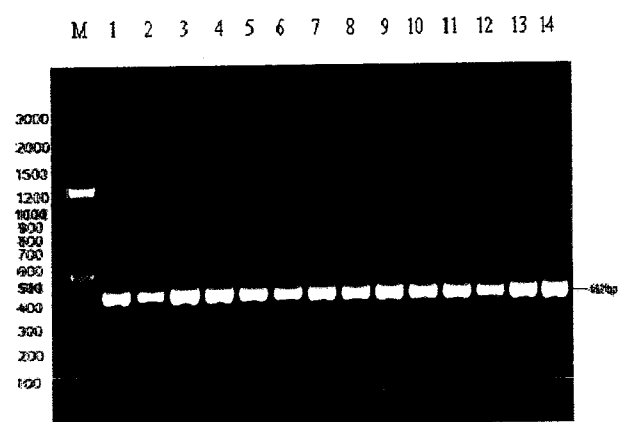


Figure 1: The PCR result of GH genes of Madrasin cattle. Lane M: Marker, Lanes 1-14 is the electrophoresis result of GH genes of Madrasin cattle with 432 bp.

**The PCR result of rGH gene**

The result of amplification of 14 Madrasin cattle in Bangkalan District conducted by PCR method resulted in 14 positive DNA samples using the rGH gene primers. The positive visualization results of electrophoresis can be seen in Figure 2.

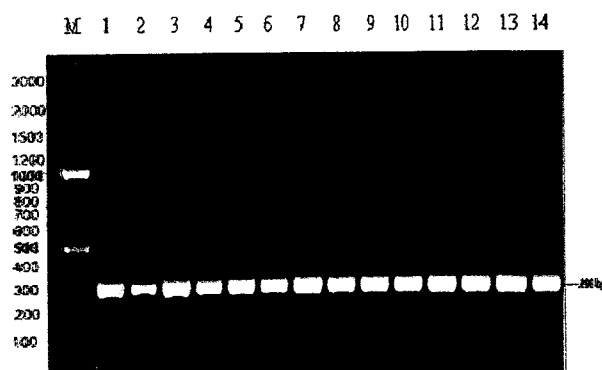


Figure 2: The electrophoresis result of PCR of Madrasin cattle's blood. M= DNA Marker. 1-14 = DNA Samples, lanes 1-14: PCR products (298 bp).

**The PCR-RFLP result of GH gene.**

After detecting the presence of the GH gene in Madrasin cattle using the PCR method, the RFLP or GH DNA gene cutting was performed using the AluI retrieval enzyme (5'-AG | CT-3'). Results of RFLP were 14 GH gene samples divided into 4 bands, ie (60 bp, 100 bp, 150 bp, and 300 bp). The result of RFLP of Madrasin cattle GH gene can be seen in Figure 3.

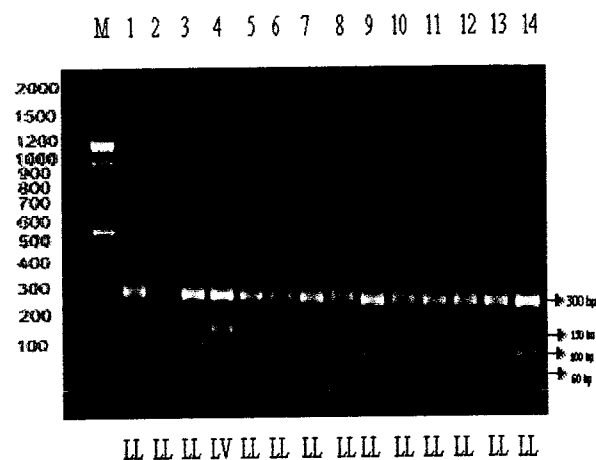


Figure 3: The electrophoresis result of PCR-RFLP using AluI restriction enzyme of Madrasin cattle's GH gene. Lane M: Marker, Lanes 1-3 and 5-14 LL genotype (60 bp, 100 bp, and 300 bp), Lane 4 LV genotype (60 bp, 100 bp, 150 bp, and 300 bp).

**The PCR-RFLP result of rGH gene**

The result of amplification test with PCR product obtained was then digested with AluI restriction enzyme,

obtaining band yield of 167 bp and 81 bp in Madrasin cattle. The electrophoresis results in the process of PCR-RFLP of Madrasin cattle's blood sample can be seen in Figure 4.

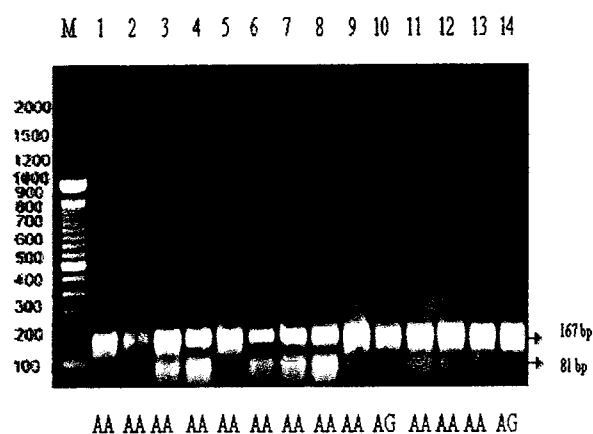


Figure 4: The electrophoresis result of PCR-RFLP using *AluI* restriction enzyme of Madrasin cattle's rGH gene. M = DNA Marker, AA and AG = Homozygot Genotype. 1-14 = DNA Samples, lanes 1-9 and 11-13 AA genotype (167 bp and 81 bp), lane 10 and 14 AG genotype (298 bp, 167 bp, 81 bp).

## Discussion

### PCR of GH

The PCR results of the Madrasin cattle's GH gene showed a 432 bp band, this corresponds to the bands in the genome library GH itself is a hormone candidate that plays a role regulating milk production, carcass and immune system (13). The GH gene is one of the most important things in managing the properties of high-value livestock so that the GH gene who Marked Assisted Selection (MAS) program in cows. GH gene plays a role in regulating postpartum growth, tissue, muscle, bone, adipose tissue development, mammary gland growth, lactation, reproduction, metabolism of carbohydrate, protein, and body fat. The GH gene requires a receptor in its expression mechanism to a network mediated by the rGH gene or growth hormone receptor (14).

### PCR of rGH

Based on the results of blood amplification by PCR method, continued with electrophoresis readings obtained positive sample results. The rGH genes found in all of Madrasin cattle's blood samples can be detected by PCR with a length of product amplified by the rGH gene segment of 298 bp located in exon 10. The results of this

research are similar to those identified by the genetic diversity of rGH genes in Limousin cattle previously performed by Zulkarnaim (15).

The success rate of rGH gene amplification in this research was 100%. The amplification results of the rGH gene segment were visualized on a 1.5% agarose gel presented (Figure 3.2). The temperature and duration of the annealing also determine the degree of amplification specificity and the cause of other factors that play a role in determining the success of amplification is the quality or purity of DNA used as template DNA.

### RFLP of GH

Amplification of Madrasin cattle's GH gene using PCR method is known to have 432 bp length, which will be followed by cutting of Madrasin gene site using *AluI* restriction enzyme. Based on RFLP result, PCR product along 432 bp produce 2 allele that is L and V, whereas in Madura cattle can only be found 1 allele that is L allele.

Restrictive enzymes can recognize the GH gene at the cutting site, this is because the DNA sequence at the cutting site is not mutated. The triplet codon thus formed is CTG which encodes the Leusin allele (L) (16). L allele itself is shown with fragment length (60 bp, 100 bp, and 300 bp).

The diversity of the Madrasin cattle's GH gene is indicated by the presence of V allele resulting from the presence of a mutation or change of base causing the change of serine amino acid (C) to glycine (G) so that the Madrasin cattle's GH gene cutting phase changes from AGTC to AGGT. As a result of this change is formed codon triplet GTG that encode the valine amino acid (V) (17). V allele itself is shown with fragment length 60 bp, 100 bp, 150 bp and 300 bp.

### Genotype frequency and GH gene allele

According to the Volkandri's research (18), the frequency of genotypes and the L allele of Madura cattle were 1.00 and 1.00 respectively. Whereas in Madrasin cattle got the frequency of genotype and allele respectively participate 0,928 and 0,96. Based on these differences allegedly occurring changes in allele and genotype frequencies between Madura cattle with Madrasin cattle due to cross-breeding with Limousin cattle.

This is in accordance with Rachman's research (19), which found the genotype of Limousin cattle's frozen cement used in artificial insemination in Larangan sub-district, Pamekasan District. Successively detected L and V alleles have frequencies of 0.67 and 0.33 and 0.82 and 0.18 respectively. This proves that Limousin cattle have a V allele that is not owned by Madura cattle.

### RFLP of rGH

Based on the results of treatment using PRC-RFLP of the amplified rGH gene segment there are two *AluI* cutting

sites known as allele A and allele G, allele A is marked by truncation of 298 bp fragments into two parts along 167 bp and 81 bp. The fragment of the rGH gene that has an AluI enzyme cutting site will indicate that no mutation occurs but if no cutting site is indicated in the absence of a cutting by the AluI enzyme, it can be stated that there is a mutation in the rGH fragment site.

The diversity in the AluI rGH gene segment is thought to be due to the mutation or alteration of the base causing the change of serine amino acids to glycine. The change causes the cutting site not to be recognized by the AluI enzyme, resulting in an 81 bp fragment known as the G allele (13,20). Results of genotyping on Madrasin cattle's segment of the rGH gene resulted in two fragments that were cut off, ie AA genotype, which showed fragments along 81 bp and 167 bp and fragments that were cut into one band called AG genotype which showed fragment along 81 bp at (Figure 3.4).

The results of this research differ from the results of previous research conducted by Zulkarnaim (15), that is cutting the fragment of rGH gene in Limousin cattle yield three genotypes namely AA, GG, AG, AA genotype is shown as fragments along 167 bp, 81 bp and 50 bp, and genotype AG is shown as fragments along 167 bp, 131 bp, 81 bp and 50 bp.

#### Frequency of genotype and rGH gene allele

The result of the analysis of the rGH aluI gene segment showed that the frequency of the allele A was 86% higher than the frequency of the allele G, the A and G allele frequencies in Madrasin cattle were 0.92 and 0.08, respectively (Table 3), while the AA and AG genotype were 0.85 and 0.14. The results of this research differed greatly from previous results of Limousin cattle which had A and G frequency in Limousin cattle respectively of 0.286 and 0.174, while AA and AG genotype were 0.238 and 0.095. That Madrasin cattle have different Allel and Genotype with Limousin cattle.

In conclusion, the GH and rGH undergo changes on polymorphisms in Madrasin cattle and this research information can be used in selection.

#### Acknowledgement

The study was supported by funding from the Directorate General of Higher Education (DIKTI) 2016. The National Education Ministry. Republic of Indonesia.

#### References

1. Rouse JE. Cattle of Africa and Asia. Oklahoma: University of Oklahoma Press. 1972.
2. Payne WJA, Wilson. An Introduction to Animal Husbandry in the Tropics. Oxford: Blackwell Science Ltd. 1999.
3. Sochadji. Kebijakan Pengembangan Ternak Potong di Indonesia Tinjauan Khusus Sapi Madura. Pros. Pertemuan Ilmiah Hasil Penelitian dan Pengembangan Sapi Madura. Sumenep. 1993;p.1-12.
4. Hetzel DJS. Construction of A bovine gene map. Proceedings of the New Zealand Soc Ani Prod. 1989;49:53-56.
5. Mitra A, Schlee P, Balakrishnan CR, Pirschner F. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. J Ani Breed Gene. 1995;112:71-74.
6. Hoj S, Fredholm M, Nielsen VH. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. Ani Gen. 1993;24:91-96.
7. Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitinsand IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating hormones: characterization and physiological relevance. Endocrinol. 1995;Rev.16:765-787.
8. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocrinol. 2000;Rev.21:200-214
9. Ohta T, Miyake H, Miura C, Kamei H, Aidaand K, Miura T. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Biol Reprod. 2007;77: 970-977
10. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. Nature. 2005;433:269-277.
11. Dai L, Zhao Z, Zhao R, Xiao S, Jiang H, Yue X, Li X, Gao Y, Liu J, Zhang J. Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH beta-subunit gene on semen quality and fertility in bulls. Anim Rep Sci. 2009;114:14-22.
12. Nei M, Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 2000.
13. Ge W, ME Davis, HC Hines, KM Irvin, RCM Simmen. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. J Anim Sci. 2003;81:641-648.
14. Akers RM. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cow. J Dairy Sci. 2006;89:1222-1234.
15. Zulkarnaim, Jakaria, Noor RR. Identifikasi keragaman genetik gen reseptor. Hormone pertumbuhan (GHR AluI) pada sapi Bali. Med Peternakan. 2010;33:81-87.
16. Woychick RP, Camper SA, Lyons RH, Horowitz S, Goodwin EC, Rottman FM. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. Nucleic Acids Res. 1982;10(22):7197- 7210.
17. Zhang HM, Brown DR, Denise SK, Ax RL. Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses of The Bovine Somatotropin Gene. J Ani Sci. 1993;(71):2276.
18. Volkandri SD, Hartatik T, Sumadi. Polimorfisme Gen Growth Hormone pada sapi Limora. Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada Buletin Peternakan. 2013;37(2):67-73.
19. Rachman MP. Polimorfisme gen *Growth Hormone* (GH) pada sapi Madura dan Persilangan Limousin-Madura. Tesis. Program Studi Bioteknologi, Jurusan Antar Bidang, Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 2011.
20. Di Stasio L, Destefanis G, Brugiapaglia A, Albera A, Rolando A. Polymorphism of the GHR gene in cattle and relationship with meat production and quality. Anim Genet. 2005;36:138-140.

**LAMPIRAN 2.**

Jurnal Internasional Bereputasi Yang Sudah Terbit



International Journal of Advanced Scientific Research and Management, Volume 3 Issue 10, Oct 2018

www.ijasrm.com

ISSN 2455-6378

# Identification Polymorphism of FSH $\beta$ -Sub Unit Gene and FSHR Gene in Madura Cattle Results of Artificial Insemination with Limousin Cattle with PCR-RFLP Technique

Budi Utomo

Department of Reproduction Veteriner, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia;

**Abstract**

The aim of this study was estimate of polymorphisms located in the FSH  $\beta$  sub unite and the receptor Follicle Stimulating Hormone (FSHR). Fourteen blood samples were collected from Madura cattle results of Artificial Insemination with Limousin Cattle called "Madrasin" cattle which lived in Bangkalan, Madura Island. The DNA was extracted following standard methods. The purified DNA was subjected to PCR-RFLP techniques to identify polymorphisms of the FSH  $\beta$  sub unite and the receptor Follicle Stimulating Hormone (FSHR) genes in "Madrasin" cattle ecotypes. The *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) amplified fragments of FSH  $\beta$  sub unite (313 bp) were digested with restriction enzymes *PstI* resulting in 255 bp, 237 bp and 150 bp fragments, that produced 2 allelic is A and B. The allelic A and B frequencies for FSH  $\beta$  sub unite of "Madrasin" cattle is 0,50 and 0,50. While, The *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) amplified fragments of FSHR (306 bp) were digested with restriction enzymes *AclI* resulting become two homozygote genotypes, there are GG in the 243 bp, CC in the 243 bp and 193 bp. So the conclusion of this research was that FSH and FSHR genes not changed.

**Key words:** *Polymorphism, MAS, FSH  $\beta$ -sub unite, FSHR, PCR-RFLP*

**1. Introduction**

Madura cattle are one of the local Indonesian cattle that develops on the island of Madura and surrounding islands. Morphologically, Madura cattle have almost the same characteristics as Bali

cattle except their smaller body size and horn. Skin color in male and female Madura cows is more brown than Bali cattle, lower legs to knees (Rouse, J.E, 1972). In addition, Madura cattle are more resistant to hot weather, food-efficient, have good meat quality, and more resistant to parasites (Payne and Hodges, 1997).

Exploitation of Madura cattle through wider crossing with exotic cattle will have a change in phenotypic and genetic traits. Crosses are carried out by farmers to obtain superior performance, especially at the speed of growth in body weight and reproductive power. Madrasin cattle have exterior characteristics that resemble Madura and Limousin cattle or a combination of the characteristics of the two cattles. Growth and Performance of Madrasin cattle is a combination of Madura and Limousin cattle (Volkandari, *et al.* 2013).

Progress in the field of molecular biology provides new opportunities in the effort to detect the occurrence of genetic variations (polymorphism) as a basis for improving genetic quality in livestock. Molecular techniques that are potentially used to detect these variations are Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). With the existence of effective and accurate technology through the use of diagnoses based on deoxyribonucleic acid (DNA), it will greatly assist the breeding program of cattle. Provision of genetic maps through recombinant DNA methods can help breeding programs through molecular data obtained, which regulates the characteristics of production (Hetzel, D.J.S. 1989).

Gene products in the form of hormones (bioregulator) will affect the process of regulating metabolism and appearance of livestock

# Identification Polymorphism of FSH $\beta$ -Sub Unit Gene and FSHR Gene in Madura Cattle Results of Artificial Insemination with Limousin Cattle with PCR-RFLP Technique

Budi Utomo

Department of Reproduction Veteriner, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia;

## Abstract

The aim of this study was estimate of polymorphisms located in the FSH  $\beta$  sub unit and the receptor Follicle Stimulating Hormone (FSHR). Fourteen blood samples were collected from Madura cattle results of Artificial Insemination with Limousin Cattle called "Madrasin" cattle which lived in Bangkalan, Madura Island. The DNA was extracted following standard methods. The purified DNA was subjected to PCR-RFLP techniques to identify polymorphisms of the FSH  $\beta$  sub unit and the receptor Follicle Stimulating Hormone (FSHR) genes in "Madrasin" cattle ecotypes. The *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) amplified fragments of FSH  $\beta$  sub unit (313 bp) were digested with restriction enzymes PstI resulting in 255 bp, 237 bp and 150 bp fragments, that produced 2 allelic is A and B. The allelic A and B frequencies for FSH  $\beta$  sub unit of "Madrasin" cattle is 0,50 and 0,50. While, The *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) amplified fragments of FSHR (306 bp) were digested with restriction enzymes AluI resulting become two homozygote genotypes, there are GG in the 243 bp, CC in the 243 bp and 193 bp. So the conclusion of this research was that FSH and FSHR genes not changed.

**Key words:** Polymorphisym, MAS, FSH  $\beta$ -sub unite, FSHR, PCR-RFLP

## 1. Introduction

Madura cattle are one of the local Indonesian cattle that develops on the island of Madura and surrounding islands. Morphologically, Madura cattle have almost the same characteristics as Bali

cattle except their smaller body size and horn. Skin color in male and female Madura cows is more brown than Bali cattle, lower legs to knees (Rouse, J.E, 1972). In addition, Madura cattle are more resistant to hot weather, food-efficient, have good meat quality, and more resistant to parasites (Payne and Hodges, 1997).

Exploitation of Madura cattle through wider crossing with exotic cattle will have a change in phenotypic and genetic traits. Crosses are carried out by farmers to obtain superior performance, especially at the speed of growth in body weight and reproductive power. Madrasin cattle have exterior characteristics that resemble Madura and Limousin cattle or a combination of the characteristics of the two cattles. Growth and Performance of Madrasin cattle is a combination of Madura and Limousin cattle (Volkandari, *et al.* 2013).

Progress in the field of molecular biology provides new opportunities in the effort to detect the occurrence of genetic variations (polymorphism) as a basis for improving genetic quality in livestock. Molecular techniques that are potentially used to detect these variations are Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). With the existence of effective and accurate technology through the use of diagnoses based on deoxyribonucleic acid (DNA), it will greatly assist the breeding program of cattle. Provision of genetic maps through recombinant DNA methods can help breeding programs through molecular data obtained, which regulates the characteristics of production (Hetzl, D.J.S. 1989).

Gene products in the form of hormones (bioregulator) will affect the process of regulating metabolism and appearance of livestock



morphology. Growth hormone as one of the gene products has a major effect on growth, lactation and development of mammary glands in cattle (Hoj, *et al.* 1993a, b). In addition to growth hormones, it is also necessary to do research on the reproductive side, to obtain a picture of reproductive hormone polymorphism in cross-bred calves with Limousin cattle. Follicle Stimulating Hormone (FSH) is a glycoprotein hormone produced by the pituitary gland, which functions to regulate reproduction in mammals, both male and female (Grigorova, *et al.* 2007). The FSH gene is one of the important things in regulating the properties of cattle that have high economic value, so the FSH gene can be a candidate gene in the Marked Assisted Selection (MAS) program in cattle.

The FSH hormone consists of  $\alpha$  and  $\beta$ -sub units.  $\beta$ -sub units play a role in determining the specificity of bonds with receptors (FSHR) (Fan and Hendrickson, 2005). FSH receptors are needed by FSH in the ovary to start and maintain follicular development by binding to specific receptors (FSH Receptor) on the surface of granulosa cells. The FSHR gene has an important role in ovarian stimulation and its physiological knowledge can be used to predict differences in FSHR function and ovarian response to FSH.

Therefore, genetic studies of madura cows that have been crossed with the Limousins are interesting to do to see the calves produced have good quality in terms of their body and reproductive growth, especially to be used as a reference as superior seeds.

## 2. Material and Methods

### Research Materials

The main ingredients are DNA samples taken from whole blood of Madura cattle from artificial insemination with Limousin cement from Bangkalan, Madura, Indonesia with a total of 14 samples. Supporting materials include: Primary FSH  $\beta$ -subunits, primary receptor FSH, HaeIII Restriction Enzymes, Restriction Enzymes, DNA Extraction Materials (Proteinase K, Absolute Ethanol, Buffer Lysis, Wash Buffers A & B), PCR Materials (dNTP mix, Taq DNA polymerase enzymes), Electrophoresis (Triss Base, boric acid, agarose, Na<sub>2</sub> EDTA, Ethidium bromide, DNA Markers, DNA Loading dye), tissue and plastic mica.

### Research Equipments

The tools used include: DNA Extraction Kit, venoject, vakuttainer tube, centrifuge, cooling device, small large eppendorf tube, agarose gel,

micropipette, tip, tube rack, electrophoresis, autoclave, scales, gloves.

### Collection of Blood Samples

Blood samples were obtained from Bangkalan, Madura, Indonesia. Blood sampling was carried out by collecting about 5 ml of blood samples from cattle through the jugular vein using venojet and vacuttainer tubes with EDTA and then stored at 4°C.

**Tabel 1.** Primers were used to amplify the FSH  $\beta$ -sub-unit and FSHR Gen

Target	Name	Primer	An
FSH $\beta$ -sub unit	F	5'CTTCCAGACTACTGTAA CTCATC'3	6 3
	R	5'GTAGGCAGTCAAAGCAT CCG'3	
FSH Receptor	F	5'CTGCCTCCCTCAAGGTG CCCCTC'3	6 0
	R	5'AGTTCCTGGTCAAATGT CTTAGGGGG'3	

Ket : An = annealing temperature, (Dai, *et al.* 2009).

### DNA Extraction

DNA was isolated and purified using the QIAamp Mini spin column DNA Extraction Kit by following the extraction protocol provided. A total of 200  $\mu$ l of blood samples were lysed by adding 200  $\mu$ l of lysis buffer solution and 20  $\mu$ l of proteinase K (10 mg / ml), the mixture was then incubated at 56°C for 60 minutes in a waterbath shaker. After incubation the solution is then added 200  $\mu$ l of absolute ethanol 96% and centrifuged 8,000 x g for 1 minute.

DNA purification is done by spin column method with the addition of 500  $\mu$ l of wash buffer I washing solution which is then followed by centrifugation at 8,000 x g for 1 minute. After the supernatant is removed, DNA is then washed again with 500  $\mu$ l of wash buffer II and centrifuged at 14,000 x g for 3 minutes. After the supernatant is removed, the DNA is then dissolved in 200  $\mu$ l of elution buffer and centrifuged at 8,000 x g for the extracted DNA to be stored and stored at -20 °C.

### PCR-RFLP Technique

The composition of the PCR reaction was conditioned on a reaction volume of 25  $\mu$ l consisting of 100 ng of DNA, 0.25 mM of each primer, 150  $\mu$ M dNTP, 2.5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0.5 Taq DNA polymerase and 1x buffer. The PCR engine

conditions began with initial denaturation at 94°C x 2 minutes, followed by 35 subsequent cycles of 94°C x 45 seconds denaturation, with annealing temperature: 63°C x 45 seconds (FSH) and 60°C x 45 seconds (FSHR), followed by one final extension cycle at 72°C for 5 minutes using GeneAmp PCR System 2400 ThermoCycler (Perkin Elmer). PCR products were then electrophoresed on 1.5% agarose gel with 1x TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA) containing 100 ng / ml ethidium bromide. Then visualized in the UV transilluminator (gel documentation system). Alleles are determined by interpreting bands in the most remote form of migration to the anode pole as 1 allele, 2 alleles, etc.

The PCR products obtained from each target gene were then analyzed using RFLP through cutting using restriction enzymes which had cutting sites on the FSH  $\beta$ -subunit gene | *Pst*I and *Alu*I for the FSHR gene. Total of 4  $\mu$ l of PCR product DNA was added 0.5  $\mu$ l, then incubated for 17 hours at 37°C.

### Sequencing

Determination of nucleotide sequences of the FSH-sub-unit and FSHR genes was carried out by DNA sequencing, which was the final step to obtain the nucleotide sequence data from fragments resulting from the PCR-RFLP multiplication. DNA bands that have been extracted on agarose gel as PCR-RFLP product are used as molds in sequencing reactions using forward and reverse primers such as during amplification.

### Data Analysis

The diversity of genotypes of each individual can be determined from the DNA bands of genes found. Each sample is compared based on the same marker and the allele frequency is calculated. The frequency of alleles can be calculated using the formula Nei and Kumar (2000). Analysis of sequencing data using UGENE 1.21.0 software.

## 3. Results and Discussion

### The PCR Result of FSH Gene

From 14 Madrasin cattle blood samples PCR was carried out to detect the presence of FSH gene, the results of PCR showed that there were 14 bands of FSH gene using the FSH gene primer. Positive results are shown in Figure 1. as follows.

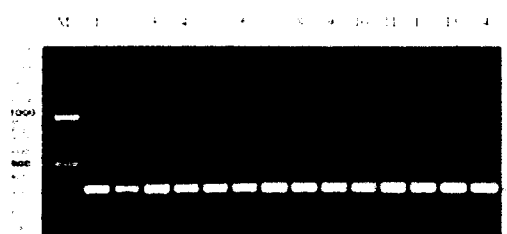


Figure 1. Results of PCR electrophoresis with the primary Madrasin cattle FSH gene. Lane M: Marker, Lane 1-14 is the result of electrophoresis of Madrasin cattle FSH gene with a length of 313bp.

The amplification of the FSH beta sub-unit gene segment was successful for 313 bp using a pair of primers according to the results of (Dai, *et al.* 2009). The condition of PCR used in thermocycler machines, uses an initial denaturation temperature of 94°C for 5 minutes, denaturation of 94°C, primary or annealing attachment of 63°C for 45 seconds, attachment of new DNA at 72°C for 1 minute, and a temperature of 72°C final elongation for 5 minutes. PCR results from Madrasin cattle FSH gene showed a band of 313 bp, this is in accordance with the band in the genome library (Genbank Access Number J00008; Balogh, *et al.* 2008).

Follicle Stimulating Hormone (FSH) is a hormone derived from basophil cells in anterior pituitary which is very instrumental in the process of reproduction. FSH itself is a hormone candidate that plays a role in regulating reproduction, and growing follicles (Ge, *et al.* 2003). FSH gene becomes one of the important things in regulating fertility or fertility in livestock with high economic value, so that the FSH gene becomes a candidate gene in the Marked Assisted Selection (MAS) program in cattle.

### The PCR-RFLP Results of FSH Gene

The results of the RFLP were 14 FSH gene samples divided into 3 bands, namely 255 bp, 237 bp, and 150 bp. The RFLP results of Madrasin cattle FSH gene can be seen in Figure 2. as follows.

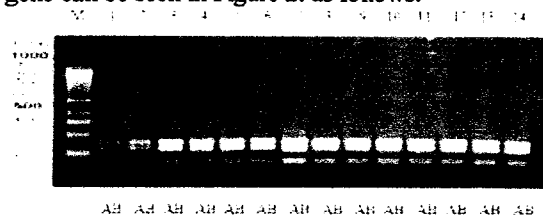


Figure 2. Electrophoresis results of PCR-RFLP FSH gene Madrasin cattle using *Pst*I enzyme restriction. Lane M: Marker, Lane 1-14 (255 bp, 237 bp, 150bp).

Amplification of Madrasin cattle FSH gene using PCR method is known to have a length of 313 bp, which will be continued by cutting the site of Madrasin cattle FSH gene using *AluI* retention enzyme. Based on the RFLP results, 255bp, 237bp, and 150bp PCR products produced 2 alleles, namely A and B, whereas in Madura cattle, only 1 allele, allele B. The restriction enzyme can recognize the FSH gene at the site of cutting, this is because the DNA sequence at the cutting site does not undergo mutation. The A and B alleles themselves are indicated by the length of the fragment (150 bp, 237 bp, and 255 bp).

**Frekuensi Genotipe and Alel of FSH Gene**

Table 2. Genotype frequency and alleles FSH gene in Madrasin cattle (genotype and allele frequencies of Madrasin cattle). Description AA, AB and BB = heterozygous genotypes, A and B = alleles

Bangsa (breed)	N	Frekuensi genotip (genotype frequency)		Frekuensi alel (allele frequency)		
		AB		A	B	
		AA	BB	A	B	
Madrasin	14	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
Madura	10	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00

Analysis results showed that allele A frequency was the same as B allele frequency, the frequency of A and B alleles in Madrasin cattles were 0.50 and 0.50 respectively (table 2) while the frequency of genotypes AB and BB were 1, 00 and 0.00. Based on these differences, it was suspected that there was no change in allele frequency and genotype between Madura cattles and Madrasin cattles due to crossbreeding with Limousin cattle.

**The PCR Results of FSHR Gene**

The results of amplification of 14 Madrasin Cattle blood in Bangkalan, Madura, Indonesia were carried out by PCR method, resulting in 14 positive DNA samples using the FSHR gene primer. The positive results of visualization of electrophoresis can be seen in Figure 3.



Figure 3. PCR electrophoresis results with the primary Madrasin cattle FSHR gene. Lane M: Marker, Lane 1-14 is the result of electrophoresis of Madrasin cattle FSHR gene with a length of 306bp.

The PCR results of FSH receptor gene in Madrasin cattle with *AluI* enzyme is 306 bp. The condition of the thermocycler machine on the FSH receptor gene amplification is 94°C initial denaturation for 5 minutes, 94°C denaturation for 45 seconds, annealing temperature of 60°C for 45 seconds, a new DNA elongation temperature of 72°C for 5 minutes.

Based on the results of blood amplication using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method, it was continued by electrophoresis reading with positive samples. The FSHR gene found in all Madrasin cattle blood samples can be detected by PCR with the product length of the FSHR gene amplification is 306 bp which is located on exon 10 (Ishak, 2013). The temperature and duration of the annealing also determine the level of specificity of the amplification results and other factors that play a role in determining the success of amplification are the quality or level of DNA purity used as DNA templates.

The FSHR gene has an important role in ovarian stimulation and its physiological knowledge can be used to predict differences in FSHR function and ovarian response to FSH. Simoni, *et al.* 1999 reported that changes in DNA sequences could influence FSHR gene activation and they also showed that genotypes play an important role in ovarian physiology. The follicle that stimulates the hormone begins and maintains follicular development by binding to its specific receptors on the surface of granulosa cells in the ovary (Simoni, *et al.* 1999; Dierich, *et al.*1998). This binding allows activation of the follicular stimulation hormone coding gene (Simoni, *et al.* 1999). The importance of identifying DNA polymorphisms lies in their relationship to productive and reproductive genotypes (Allan, *et al.* 2007; Tambasco, *et al.* 2000).

**The PCR-RFLP of FSHR Gene**

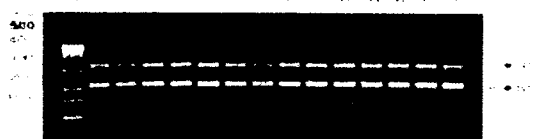


Figure 4. Electrophoresis results of PCR-RFLP FSHR gene Madrasin cattle using *AluI* enzyme restriction. Lane M: Marker, Lane 1-14 (243 bp and 193 bp).

Based on the results of the treatment using the PRC-RFLP the amplified FSHR gene segment contained *AluI* enzyme are two cutting sites known as two genotypes, namely GG visualized on 1 band

(243bp) and visualized CC on 2 bands (243bp and 193bp) marked with a 306 bp fragment cut into two parts along 243 bp and 193 bp. The fragment of the FSHR gene which has an *AluI* enzyme cutting site will indicate that there is no mutation but if there is no cutting site which is indicated by the absence of cutting by the *AluI* enzyme it can be stated that there is a mutation in the FSHR fragment site (Nawal, *et al.* 2016).

Diversity in the *AluI* FSHR gene segment is thought to be due to mutations or changes in bases causing changes in serine amino acids to glycine. These changes cause the cutting site not to be recognized by the *AluI* enzyme, resulting in a 193 bp fragment known as the G allele (Ge, *et al.* 2003). Genotyping results in Madrasin cattle FSHR gene segment produced two types of truncated fragments namely CG genotype which was shown as 243 bp and 193 bp fragments and fragments cut into one band were called CG genotypes.

The characterization of the allelic variability of the FSHR gene in different cattle breeds allows taking advantage of heterozygosis and selecting individuals that are carriers of specific alleles in loci of reproductive importance. The *FSHR* gene has an important role in ovarian stimulation and the knowledge of its physiology can be used to predict differences in the function of the FSHR and the ovarian response to FSH (Nawal, *et al.* 2016).

### Frekuensi Genotipe and Alel of FSHR Gene

Table 3. Genotype and allele frequencies of the FSHR gene in Madrasin cattle (genotype and allele frequencies of Madrasin cattle). Description of CC, CG and GG = heterozygous genotypes, C and G = alleles

Bangsa (breed)	N	Frekuensi genotip (genotype frequency)		Frekuensi alel (allele frequency)		
		CG		C		
		CC	GG	G	C	
Madrasin	14	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
Madura	10	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00

The results of *AluI* FSHR gene analysis showed that the C allele frequency was the same as the G allele frequency, the frequency of C and G alleles in Madrasin cattles were 0.50 and 0.50 respectively (table 3) while the CG and GG genotypes were 1, 00 and 0.00. Based on these differences, it was suspected that there was no change in allele frequency and genotype between Madura cattles

and Madrasin cattles due to crossbreeding with Limousin cattle.

### 4. Conclusion

Therefore, it can be concluded that the isolates in this research that that FSH and FSHR genes not changed.

### Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Ethical approval

The research does not need ethical approval. However, samples were collected as per standart collection methods without any harm and stress to the animals.

### References

- [1] Rouse, J.E. 1972. Cattle of Africa and Asia. Oklahoma: University of Oklahoma Press.
- [2] Payne ,W.J.A., J. Hodges. 1997. Tropical Cattle: Origin, Breed, and Breeding Policies. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- [3] Volkandari, S. D., Hartatik, T., and Sumadi. 2013. Growth Hormone (GH) Polymorphism of Limura Cattle. Buletin Peternakan. 37(2): 67 –73
- [4] Hetzel, D.J.S. 1989. Construction of a bovine gene map.Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production49: 53-56.
- [5] Hoj, S., M. Fredholm, and V.H. Nielsen. 1993a. Growth hormonegene polymorphism associated with selection for milk fatproduction in lines of cattle. Animal Genetics 24: 91-96.
- [6] Hoj, S., P. Lovendahl, and K. Sejrsen. 1993b. Possible associationof growth hormon gene polymorphisms with growth hormonereleasin calves from lines selected for high and low milk fatyield. Acta Agriculture of Scandinavia, section Animal Science43: 12-135.
- [7] Grigorova, M., Rull, K., Laan, M. 2007. Haplotype structure of FSHB, the beta subunit gene for fertility-associated follicle-stimulating hormone: Possible influence of balancing selection. Ann of Hum Gen 71: 18 – 28

- [8] Fan, Q.R. and W.A. Hendrickson. 2005. Structure of human follicle-stimulating hormone complex with its receptor. *Nature* 433:269-277.
- [9] Dai, L., Z. Zhao, R. Zhao, S. Xiao, H. Jiang, X. Yue, X. Li, Y. Gao, J. Liu and J. Zhang. 2009. Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH beta-subunit gene on semen quality and fertility in bulls. *Anim. Rep. Sci.* 114: 14-22.
- [10] Genbank Access Number J00008
- [11] Balogh O et al. 2008. Interrelationships of growth hormone *AluI* polymorphism, insulin resistance, milk production and reproductive performance in Holstein-Friesian cows. *Vet Med* 11 : 604 - 616.
- [12] Ge, W., M. E. Davis, H.C. Hines, K.M. Irvin and R.C.M. Simmen. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 641-648.
- [13] Ishak, A.B.S. 2012. Identifikasi Keragaman Gen FSH Sub-Unit Beta, Gen FSH Reseptor, dan Gen GH Sapi Bali Jantan Sebagai Penanda Kualitas Sperma. Thesis. Institut Pertanian Bogor. 31 - 40
- [14] M. J. Simoni, W. Gromoll, A. Hoppner, T. Kamischke, D. Krafft, E. Sthle and Nieschlag, "Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: Identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 75-755, 1999
- [15] M. Dierich, L. Ram Sairam, G.M. Monaco, A. Fimia, M. Gansmuller, LeMeur, and P. Sassone-Corsi, "Impairing follicle-stimulating hormone [FSH] signalling in vivo; Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance." *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1998, 95:136113617. PMI:9811848
- [16] M.F. Allan, R.M. Thallman, R.A.; Cushman, S.E. Echtenkamp and S.N. White et al. "Association of a single nucleotide polymorphism in *SPP1* with growth traits and twinning in a cattle population selected for twinning rate." *J. Anim. Sci.*, 85: 341-347, 2007.
- [17] D. D. Tambasco, M. M. Alencar, L.L. Coutinho. and A.J. Tambasco. "Molecular characterization of a Nellore beef cattle sample using microsatellites and candidate genes." *Rev. Bras Zootec.* 29: 1044-1049 units. *World Animal Review*, 65(2), pp. 2 - 10, 2000.
- [18] Nawal N. Omera, Nahid Gornas, Siham A. Rahmatalla, Mohamed-Khair A. Ahmed. 2016. Genetic Characterization of Indigenous Sudanese Cattle Using FSHR and LHR Genes. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*. 24: 1 - 9

**LAMPIRAN 3.****Pendaftaran HAKI Pada Lembaga Hak Paten****HAKI**

No Urut : 20 Nama : Budi Utomo Universitas : Airlanga No HP : 081553160631 Email : budi_reprovet@yahoo.com
--

**Diskripsi**

**Polimorfisme Gen *Growth Hormone* (GH) dan FSH  $\beta$ -Sub Unit Pada Anak Sapi Madura Hasil Inseminasi Buatan Dengan Semen Limousin Sebagai Acuan Untuk Seleksi Genetik Bibit Unggul**

**Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme gen FSH  $\beta$ -sub unit yang dijadikan acuan untuk memperoleh bibit unggul baik dari segi pertumbuhan badan dan daya reproduksinya.

**Latar Belakang Invensi**

Sapi madura merupakan salah satu kekayaan plasma nutfah Indonesia. Beberapa Undang-undang diberlakukan sebagai upaya untuk menjaga kemurniannya. Salah satu peraturan tentang pelestarian sapi madura yang dikeluarkan sejak zaman kolonial Belanda adalah staatsblad (lembaran negara) No. 226/1923, No. 57/1934, dan No. 115/1937. Pasca kemerdekaan, pasal 13a Undang-undang No. 6/1967, telah menetapkan pokok-pokok peternakan dan kesehatan hewan, sebagai upaya untuk mempertahankan populasi, menjaga bentuk, warna kulit, serta meningkatkan kualitas produksi sapi madura (Utoyo *et al.*, 1996).

Sapi madura merupakan salah satu jenis sapi lokal Indonesia yang berkembang di pulau Madura serta pulau-pulau sekitarnya. Secara morfologi, sapi madura memiliki karakter

hampir sama dengan sapi bali kecuali ukuran tubuh dan tanduknya yang lebih kecil. Warna kulit pada sapi madura jantan dan betina lebih coklat dari sapi bali, kaki bagian bawah sampai lutut (Rouse, 1972). Selain itu, sapi madura lebih tahan terhadap cuaca panas, efisien terhadap makanan, memiliki kualitas daging yang baik, dan lebih resisten terhadap parasit (Payne & Hodges, 1997).

Sapi Madura menjadi *breed*(bangsa) sapi potong lokal yang terbentuk sebagai akibat isolasi alam dan pengaruh lingkungan, sehingga mempunyai keseragaman karakteristik yang menonjol diantara *breed* sapi potong lokal lainnya di Indonesia. Dengan kontribusi sifat-sifat genetik sapi zebu seperti toleran terhadap stres akibat iklim dan daya tahan terhadap serangan caplak serta seleksi alam dan lingkungan yang ketat dalam kurun waktu yang lama, maka sapi Madura menjadi bangsa sapi yang mempunyai daya adaptasi sangat tinggi terhadap lingkungan. Disamping itu, sapi Madura mempunyai respon yang baik terhadap perbaikan pakan serta tahan terhadap pakan dengan kandungan serat kasar tinggi (Soehadji, 1993).

Eksplotasi sapi Madura melalui persilangan yang semakin luas dengan bangsa sapi eksotik akan memberikan dampak perubahan sifat-sifat fenotip dan genetik. Persilangan dilakukan oleh peternak guna memperoleh performen yang unggul terutama pada kecepatan pertumbuhan berat badan dan daya reproduksinya.

Oleh karenanya, studi genetik sapi madura yang telah disilangkan dengan bangsa Limousin menjadi menarik untuk dilakukan guna melihat anak sapi yang dihasilkan mempunyai kualitas yang baik dari segi pertumbuhan badan dan reproduksinya. Selanjutnya hasil seleksi genetik akan dapat dijadikan acuan untuk memperoleh bibit unggul terutama untuk sapi hasil silangan sapi madura dengan sapi yang diinseminas dengan semen limousin.

Kemajuan di bidang biologi molekuler memberikan kesempatan baru dalam usaha mendeteksi terjadinya variasi genetik (polimorfisme) sebagai dasar peningkatan mutu genetik dalam peternakan. Teknik molekuler yang potensial digunakan untuk mendeteksi variasi tersebut antara lain: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD), *Double Strand Conformation Polymorphism* (DSCP), dan *Marker-Assisted Selection* (MAS) (Kennedy *et al.*, 1990). Dengan adanya teknologi yang efektif dan akurat melalui pemanfaatan diagnosa berdasarkan *deoxyribonucleic acid* (DNA), akan sangat membantu program persilangan ternak (Rafalski dan Tingey, 1993). Penyediaan peta genetik melalui metode DNA rekombinan, dapat membantu program persilangan ternak melalui data-data molekuler yang didapat, yang mengatur sifat-sifat produksi (Hetzl, 1989).

Produk gen yang berupa hormon (bioregulator) akan mempengaruhi proses pengaturan metabolisme dan penampakan morfologi ternak. Variasi genetik (polimorfisme) pada lokus-locus gen khususnya yang mengkodekan hormon merupakan hal yang sangat penting, karena variasi tersebut menentukan karakter genetik dari suatu populasi yang dapat membantu dalam peningkatan mutu genetik dari populasi tersebut (Mitra *et al.*, 1995).

Hormon pertumbuhan sebagai salah satu produk gen berpengaruh besar dalam pertumbuhan, laktasi dan perkembangan kelenjar susu pada sapi (Hoj *et al.*, 1993a,b). Polimorfisme pada gen yang mengkodekan dan mengatur hormon pertumbuhan sangat potensial sebagai penanda genetik untuk sifat-sifat fenotip dengan produktivitas yang bernilai ekonomi tinggi.

Selain hormon pertumbuhan perlu dilakukan penelitian juga pada sisi reproduksinya, untuk memperoleh gambaran polimorfisme hormon reproduksi pada anak sapi hasil silangan dengan sapi Limousin. *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) merupakan hormon glikoprotein yang dihasilkan oleh kelenjar pituitary, yang berfungsi mengatur reproduksi pada mamalia, baik jantan maupun betina (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). Pada hewan betina berfungsi untuk proliferasi dan pengembangan folikel sampai ovulasi (McGeedan Hsueh, 2000). Sedangkan pada laki-laki, kombinasi antara FSH dan testosteron adalah hormon tropik yang mengatur fungsi sel Sertoli, yang diperlukan untuk inisiasi dan pemeliharaan kualitas dan kuantitas dispermatoogenesis (Ohta *et al.*, 2007). Hormon FSH terdiri dari  $\alpha$  dan  $\beta$ -sub unit.  $\beta$ -sub unit berperan dalam menentukan spesifisitas ikatan dengan reseptor (FSHR) (Fan dan Hendrickson, 2005). Telah dilaporkan bahwa adanya mutasi ekson 3 gen FSH  $\beta$ -sub Unit pada sapi jantan diidentifikasi mempunyai konsentrasi semen segar yang lebih rendah, persentase yang lebih rendah dari integritas akrosom pada semen segar dan beku, lebih motilitas yang rendah pada semen beku Dai *et al.*, 2009). Huang *et al.* (2002), Wimmers *et al.* (2005) dan Lin *et al.* (2006)

Penelitian mengenai polimorfisme genetik Gen *growth hormone* (GH) dan FSH  $\beta$ -sub unit belum banyak dilakukan pada anak sapi hasil silangan dengan sapi Limousin, untuk itu menarik diteliti lebih dalam agar hasil yang didapatkan dapat dijadikan acuan untuk memperoleh anakan sapi yang mempunyai kualitas performen dan daya reproduksi yang baik.



### Uraian Singkat Invensi

Genotipe hewan merupakan sebuah pendekatan yang berguna untuk menggambarkan prinsip-prinsip genetika dan penerapan langsung dalam hal pewarisan sifat. Hukum Hardy-Weinberg menyatakan bahwa frekuensi genotipe suatu populasi yang cukup besar akan selalu dalam keadaan seimbang bila tidak ditemukan seleksi, migrasi, mutasi, dan *genetic drift*. Sifat-sifat ditemukan dalam keragaman genetik dalam spesies dan bangsa atau galur dalam masing-masing spesies. Genetika dipandang dari segi populasi, terutama frekuensi gen dengan efek yang diinginkan (Yuniarsih, *dkk.*, 2011).

Frekuensi gen merupakan istilah yang digunakan untuk menunjukkan proporsi dari semua lokus untuk pasangan gen atau rangkaian alel ganda dalam suatu populasi. Frekuensi gen dari perbedaan-perbedaan itu sangat beragam dari bangsa-bangsa dan antar galur. Frekuensi gen yang timbul dipengaruhi oleh seleksi, mutasi gen, pencampuran dua populasi yang frekuensi gen berbeda, silang dalam (*inbreeding*), silang luar (*outbreeding*) dan *genetic drift* (Yuniarsih, *dkk.*, 2011).

Eksperesi gen dapat mempengaruhi sifat yang muncul. Fenotipik yang muncul dapat dipengaruhi oleh variasi gen pada arah dan besar respon terhadap perubahan lingkungan (Noor, 2008). Fenotipik yang bersifat ekonomis merupakan sifat kuantitatif yang dikontrol oleh banyak gen dan masing-masing gen memberikan sedikit kontribusi pada sifat tersebut (Noor, 2008). Gen semacam ini disebut dengan gen mayor yang terletak pada lokus sifat kuantitatif atau *quantitative traits loci* (QTL). Gen mayor yang dapat digunakan sebagai kandidat dalam program *Marker Assisted Selection* (MAS) jika gen tersebut mempunyai fungsi dan pengaruh biologis yang nyata terhadap sifat kuantitatif (Diyono, 2009).

### Uraian Lengkap Invensi

Salah satu tahapan penting dalam pemuliaan ternak adalah seleksi terhadap keturunan yang membawa sifat-sifat tertentu yang diinginkan. Pemanfaatan penanda molekular DNA dalam proses seleksi ternak terbukti telah memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan cara-cara konvensional. Penanda molekular DNA (marker genetik) yang sudah teridentifikasi berasosiasi dengan QTL (*Quantitative Trait Loci*) yang bernilai ekonomis dapat digunakan untuk meningkatkan akurasi, kecepatan dan intensitas seleksi (Van der Warf, 2000).

Pada pemuliaan ternak secara konvensional, seleksi terhadap keturunan yang membawa gen tertentu dilakukan pada level fenotipik pada tiap-tiap generasi. Dari segi

pengaruh ekonomi dan waktu, seleksi terhadap ternak yang memiliki keunggulan genetik berdasarkan sifat fisik yang dapat diamati secara langsung adalah sangat tidak efektif dan efisien. Walaupun demikian, metode ini telah banyak digunakan terutama dalam kasus-kasus tertentu seperti diagnosa untuk pembawa penyakit-penyakit genetik tertentu. Kebutuhan untuk pemuliaan ternak telah mendorong perkembangan penanda genetik (*Marker Assisted Selection/MAS*) (Nicholas, 1996).

Penggunaan *Marker Assisted Selection* (MAS) didasarkan pada gagasan bahwa terdapat gen yang memegang peranan utama dan menjadi sasaran atau target secara spesifik dalam seleksi (Van der Warf, 2000). Beberapa sifat yang dikendalikan oleh gen tunggal seperti warna bulu merupakan pola pewarisan sifat yang sederhana, namun beberapa sifat utamanya sifat produksi yang kompleks (kuantitatif) dikontrol oleh banyak gen (*polygenes*) (Nicholas, 1996; Noor, 2008). Gen-gen sifat kuantitatif yang memiliki pengaruh besar merupakan gen-gen disebut sebagai gen utama (*major gene*) yang terletak pada lokus sifat kuantitatif (QTL). Marker gen telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi ternak sapi yang memiliki performa lebih bagus pada beberapa sifat komersil seperti kualitas daging (keempukan) (Barendse, *et al.*, 2008).

Implementasi MAS yang dikombinasikan dengan teknologi reproduksi dalam industri peternakan telah menguasai pasaran genetik dalam bisnis global. Hal ini telah memungkinkan plasma nutfah dari suatu individu menghasilkan keturunan dalam jumlah besar untuk kemudian dievaluasi secara genetik dalam berbagai manajemen dan lingkungan. Kombinasi seleksi menggunakan Marker DNA Terciri (*Marker Assisted Selection/MAS*) dengan teknologi reproduksi dapat memperpendek interval generasi sekitar 45-69 bulan pada sapi (Bishop, *et al.*, 1995) dan mempercepat genetik yang diinginkan pada ternak.

*Polymerase chain reaction* (PCR) adalah suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA tersebut dengan enzim *polymerase* dan oligonukleotida pendek sebagai primer dalam mesin *termocycler*. Primer merupakan oligonukleotida spesifik yang menempel pada bagian sampel DNA yang akan diperbanyak. Enzim *polymerase* merupakan enzim yang dapat mencetak urutan DNA baru (Williams, 2005). Beberapa faktor seperti konsentrasi DNA, ukuran panjang primer, komposisi basa primer, konsentrasi ion Mg, dan suhu hibridasi primer harus dikontrol dengan hati-hati agar dapat diperoleh pita-pita DNA yang utuh dan baik (Suryanto, 2003).

Proses yang terjadi dalam mesin PCR meliputi tiga tahap utama, yaitu tahap pradenaturasi, tahap kedua yang terdiri dari 35 siklus yang masing-masing siklus terdiri dari

denaturasi (pemisahan untai ganda DNA), penempelan (*annealing*), ekstensi awal molekul DNA, dan tahap terakhir adalah ekstensi akhir. Produk PCR dapat langsung divisualisasikan melalui proses elektroforesis dan dapat digunakan untuk analisa lebih lanjut (Muladno, 2002).

Elektroforesis merupakan metode standar untuk memisahkan dan mengidentifikasi fragmen DNA sesuai dengan ukurannya. Prinsip dasarnya adalah jika molekul DNA yang bermuatan negatif ditempatkan pada penghantar listrik (*buffer*), molekul akan bergerak menuju muatan positif. Molekul DNA yang bermuatan kecil akan bergerak cepat daripada yang berukuran besar. Ukuran fragmen DNA hasil elektroforesis dapat diketahui dengan menggunakan penanda ukuran (*marker*) yang salah satunya didapat dari lambda yang telah dipotong oleh enzim restriksi (Muladno, 2001).

Karakteristik-karakteristik dari PCR adalah efisiensi, spesifitas dan nilai eror/kesalahan. Efisiensi dari amplifikasi PCR tergantung pada banyaknya variabel, beberapa diantaranya jumlah siklus, jumlah target asli, panjang sekuens target yang diamplifikasi dan temperatur primer untuk *annealing* dan ekstensi. Spesifitas PCR terutama tergantung pada sekuens target, temperatur *annealing*, jumlah DNA *polymerase* yang digunakan dan polimerisasi setiap siklus. Sedangkan nilai eror/kesalahan merupakan hal yang penting dimana hasil amplifikasi menggambarkan kopian DNA sekuens target yang tepat dan juga mempunyai beberapa kesalahan, khususnya ketika hasil dianalisa oleh hibridasi asam nukleat atau sekuens nukleotida (Guatelli, *et al*, 1989).

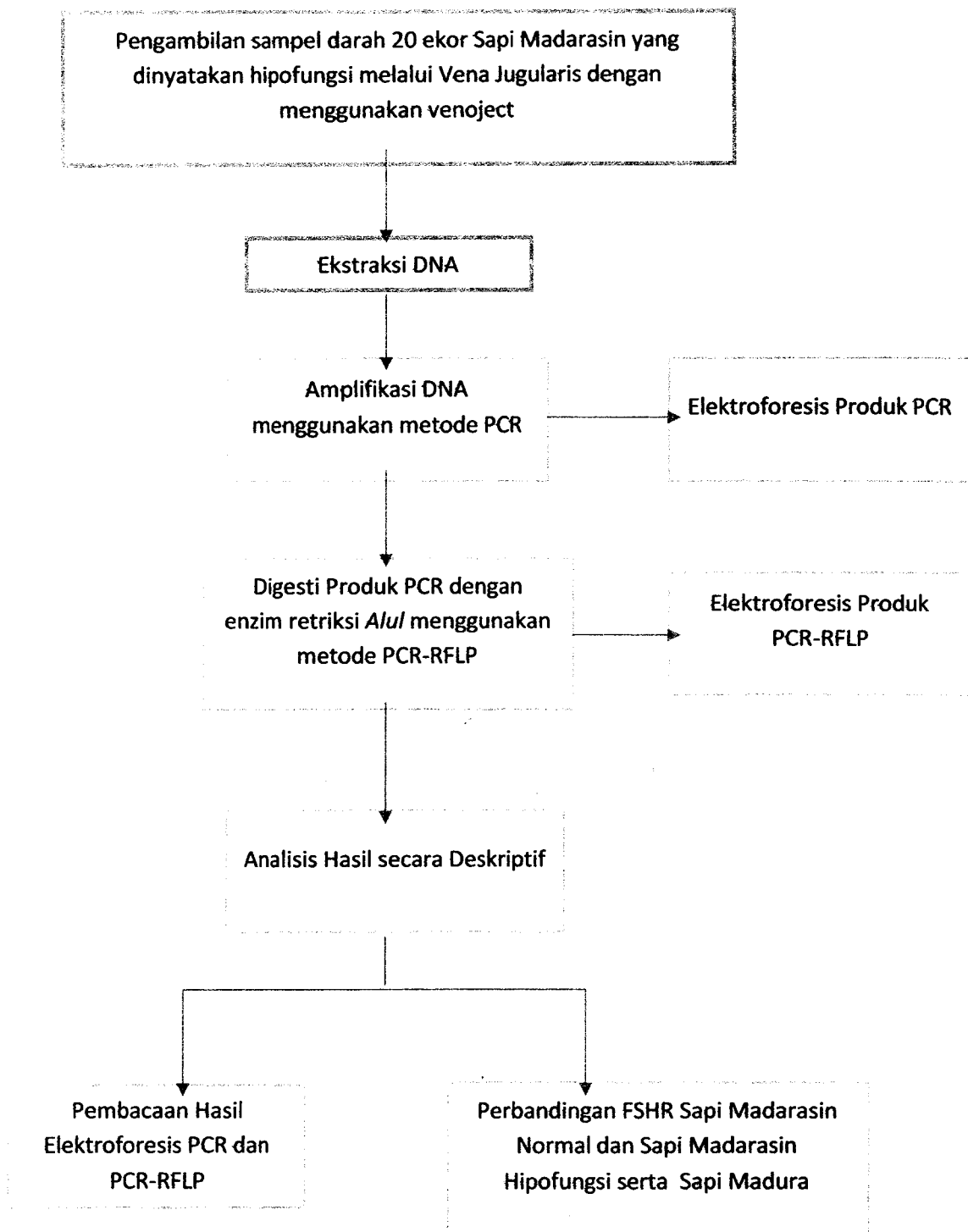
Keunggulan metode PCR adalah kemampuannya dalam melipatgandakan suatu fragmen DNA sehingga dapat mencapai 109 kali lipat. Dengan demikian kontaminasi fragmen DNA dalam jumlah sangat sedikit sekalipun dapat menyebabkan terjadinya kesalahan yaitu dengan didapatkannya produk amplifikasi yang tidak diinginkan (Yuwono, 2006).

Perbedaan pola pemotongan DNA dari jenis gen yang sama antar beberapa ternak disebut *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). RFLP merupakan perbedaan pada homolog urutan DNA yang dapat dideteksi dengan menggunakan adanya perbedaan fragmen DNA yang telah dipotong dengan menggunakan enzim endonuklease tertentu. RFLP digunakan sebagai marker molekular karena spesifik untuk setiap tunggal atau kombinasi dari enzim restriksi. Tahapan RFLP meliputi 4 tahap yaitu isolasi DNA, pemotongan DNA dengan enzim restriksi endonuklease, elektroforesis hasil pemotongan DNA dan *southern blot* (Fanani, 2011).

Pada prinsipnya RFLP merupakan semua mutasi yang menghilangkan atau menciptakan sekuen rekognisi baru bagi enzim restriksi. Penyisipan (insersi), penghilangan (delesi), maupun substitusi nukleotida yang terjadi pada daerah rekognisi suatu enzim restriksi menyebabkan tidak lagi dikenalnya situs pemotongan enzim restriksi dan terjadinya perbedaan pola pemotongan DNA (Lewin, 1994). Metode RFLP telah diterapkan untuk mendeteksi *Quantitative Traits Loci* (QTL) pada ternak. Pendeteksian RFLP telah dikembangkan dan digunakan untuk studi *linkage* pada ternak seperti sapi, ayam dan babi.

Pendeteksian RFLP dilakukan pada sekuen DNA yang telah diketahui fungsinya, misalnya gen (penyandi protein), dan juga pada sekuen DNA yang belum jelas fungsinya (Montgomery dan Kinghorn, 1997).

Menurut Suryanto (2003), PCR-RFLP digunakan untuk melihat polimorfisme dalam genom organisme dengan menggunakan suatu enzim pemotong tertentu (enzim restriksi), karena sifatnya spesifik, maka enzim ini akan memotong situs tertentu yang dikenali oleh enzim ini. Situs enzim pemotong dari genom suatu kelompok organisme yang kemudian berubah karena mutasi atau berpindah karena *genetic rearrangement* dapat menyebabkan situs tersebut tidak lagi dikenali oleh enzim atau enzim restriksi akan memotong daerah lain yang berbeda. Proses ini menyebabkan terbentuknya fragmen-fragmen DNA yang ukurannya berbeda dari satu organisme ke organisme lainnya. Polimorfisme ini selanjutnya digunakan untuk membuat pohon filogeni kekerabatan kelompok. RFLP ditentukan ketika amplikon dipotong dengan enzim *Alu I*, *Rsa I*, *Taq I* dan *Hinf I* (Jain, 2004).



## Klaim

### 4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada tahun 2017, bertempat di *Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga dan *Lab. Biomolekuler* Fak. Kedokteran Hewan Unair, Surabaya.

### 4.2 Materi Penelitian

Materi utama penelitian ini adalah DNA Genom yang diperoleh dari darah anak sapi madura hasil inseminasi buatan dengan semen Limousin sebanyak 14 sampel darah. DNA genom kemudian diekstraksi dengan menggunakan Kit DNA ekstraksi QIAamp Mini spin column untuk mendegradasi dinding sel dan mendegradasi protein dan lemak. Sampel DNA kemudian siap dilanjutkan untuk reaksi PCR.

### 4.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain : Kit DNA Ekstraksi, venoject, tabung vakuttainer, centrifuge, alat pendingin, tabung eppendorf besar kecil, gel agarose, mikropipet, tip, rak tabung, elektroforesis, autoclave, timbangan, sarung tangan.

Bahan utama yaitu sampel DNA yang diambil dari darah utuh (*whole blood*) anak sapi madura hasil inseminasi buatan dengan semen Limousin yang berasal dari Kabupaten Bangkalan madura dengan jumlah 14 sampel. Bahan-bahan pendukung antara lain : Primer FSH  $\beta$ - sub unit, Enzim restriksi *HaeIII*, Enzim restriksi *PstI*, Bahan Ekstraksi DNA (Proteinase K, Ethanol Absolut, Buffer Lysis, Wash buffer A&B), Bahan PCR (dNTP mix, Enzim Taq DNA polymerase), Bahan Elektroforesis (Triss Base, asam borat, agarose, Na<sub>2</sub> EDTA, Ethidium bromide, Marker DNA, DNA Loading dye), tissue dan plastik mika.

### 4.4 Metode Penelitian

#### 4.4.1 Koleksi Sampel Darah

Sampel darah diperoleh dari Kabupaten Bangkalan. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan mengumpulkan sekitar 5 ml sampel darah dari sapi melalui *vena jugularis* dengan menggunakan *venojet* dan tabung *vacuttainer* dengan EDTA dan kemudian disimpan pada suhu 4°C.

#### 4.4.2 Ekstraksi DNA

DNA diisolasi dan dimurnikan dengan menggunakan Kit DNA ekstraksi QIAamp Mini spin column dengan mengikuti protokol ekstraksi yang disediakan. Sebanyak 200  $\mu$ l sampel darah dilisiskan dengan menambahkan 200  $\mu$ l larutan *lysis buffer* dan 20  $\mu$ l proteinase K (10 mg/ml), campuran kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama 60 menit didalam *waterbath shaker*. Setelah inkubasi larutan kemudian ditambahkan 200  $\mu$ l ethanol absolute 96% dan disentrifugasi 8.000 x g selama 1 menit.

Pemurnian DNA dilakukan dengan metode *spin column* dengan penambahan 500  $\mu$ l larutan pencuci *wash buffer* I yang kemudian dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 8.000 x g selama 1 menit. Setelah supernatannya dibuang, DNA kemudian dicuci lagi dengan 500  $\mu$ l *wash buffer* II dan disentrifugasi pada 14.000 x g selama 3 menit. Setelah supernatan dibuang, DNA kemudian dilarutkan dalam 200  $\mu$ l *elution buffer* dan disentrifugasi pada 8.000 x g untuk selanjutnya DNA hasil ekstraksi ditampung dan disimpan pada suhu -20oC.

#### 4.4.3 Teknik PCR-RFLP

Komposisi reaksi PCR dikondisikan pada volume reaksi 25 ul yang terdiri atas 100 ng DNA, 0.25 mM masing-masing primer, 150 uM dNTP, 2.5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0.5 Taq DNA polymerase dan 1x buffer. Kondisi mesin PCR dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C x 2 menit, diikuti dengan 35 siklus berikutnya masing-masing denaturasi 94°C x 45 detik, dengan suhu annealing: 65 °C x 30 detik (GH), yang dilanjutkan dengan satu siklus ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit dengan menggunakan *GeneAmp PCR System 2400 ThermoCycler* (Perkin Elmer), untuk primer FSH  $\beta$ -sub unit anealling 60°C. Produk PCR kemudian di elektroforesis pada gel agarose 1,5% dengan buffer 1x TBE (89 mM Tris, 89 mM asam borat, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA) yang mengandung 100 ng/ml ethidium bromide. Kemudian divisualisasi pada UV transiluminator (*gel documentation system*). Alel ditentukan dengan cara menginterpretasi pita (*band*) yang berbentuk paling jauh migrasinya ke kutub anoda sebagai alel 1, alel 2, dan seterusnya.

Produk PCR yang diperoleh dari masing-masing gen target kemudian dianalisis menggunakan RFLP melalui pemotongan menggunakan enzim restriksi yang memiliki situs pemotongan pada gen FSH  $\beta$ -sub unit|*Pst*I. Sebanyak 4  $\mu$ l DNA produk PCR ditambahkan 0,5  $\mu$ l, selanjutnya dilakukan inkubasi selama 17 jam pada suhu 37°C.

**Tabel 3.1 Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi daerah Gen FSH**

Target	Nama	Primer Urutan Basa	Lokasi	Produk PCR(bp)
FSH $\beta$ -sub unit	F	5'-CTTCCAGACTACTGTAACTCATC3'	Exon 3	313 bp
	R	5'-GTAGGCAGCTCAAAGCATCCG-3'		
	R	5'-GTCGTCACTGCGCATGTTTG-3'		

#### 4.4.4 Sekuensing

Penentuan runutan nukleotida gen FSH  $\beta$ -sub unit dilakukan dengan cara sekuensing DNA yaitu tahapan akhir untuk memperoleh data urutan nukleotida dari fragmen hasil perbanyakan PCR-RFLP. Pita-pita DNA yang sudah terektriksi pada gel agarose sebagai produk PCR-RFLP dijadikan sebagai cetakan dalam reaksi sekuensing dengan menggunakan primer *forward* dan *reverse* seperti pada saat amplifikasi.

#### 4.4.5 Analisa Data

Keragaman genotipe tiap-tiap individu dapat ditentukan dari pita-pita DNA gen yang ditemukan. Masing-masing sampel dibandingkan berdasarkan ukuran (marker) yang sama dan dihitung frekuensi alelnya. Frekuensi alel bisa dihitung dengan menggunakan rumus Nei dan Kumar (2000). Analisis data hasil sekuensing menggunakan software *UGENE* 1.21.0.

### ABSTRAK

Polimorfisme Gen *Growth Hormone* (GH) dan FSH  $\beta$ -Sub Unit Pada Anak Sapi Madura Hasil Inseminasi Buatan Dengan Semen Limousin Sebagai Acuan Untuk Seleksi Genetik Bibit Unggul

Kemajuan di bidang biologi molekuler memberikan kesempatan baru dalam usaha mendeteksi terjadinya variasi genetik (polimorfisme) sebagai dasar peningkatan mutu genetik dalam peternakan. Teknik molekuler yang potensial digunakan untuk mendeteksi variasi tersebut antara lain: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD), *Double Strand Conformation Polymorphism* (DSCP), dan *Marker-Assisted Selection* (MAS) (Kennedy *et al.*, 1990). Dengan adanya teknologi yang efektif dan akurat melalui pemanfaatan diagnosa berdasarkan *deoxyribonucleic acid* (DNA), akan sangat membantu program persilangan ternak (Rafalski dan Tingey, 1993). Penyediaan peta genetik melalui metode DNA rekombinan, dapat membantu program persilangan ternak melalui data-data molekuler yang didapat, yang mengatur sifat-sifat produksi (Hetzl, 1989).



Produk gen yang berupa hormon (bioregulator) akan mempengaruhi proses pengaturan metabolisme dan penampakan morfologi ternak. Variasi genetik (polimorfisme) pada lokus-lokus gen khususnya yang mengkodekan hormon merupakan hal yang sangat penting, karena variasi tersebut menentukan karakter genetik dari suatu populasi yang dapat membantu dalam peningkatan mutu genetik dari populasi tersebut (Mitra *et al.*, 1995).

Hormon pertumbuhan sebagai salah satu produk gen berpengaruh besar dalam pertumbuhan, laktasi dan perkembangan kelenjar susu pada sapi (Hoj *et al.*, 1993a,b). Polimorfisme pada gen yang mengkodekan dan mengatur hormon pertumbuhan sangat potensial sebagai penanda genetik untuk sifat-sifat fenotip dengan produktivitas yang bernilai ekonomi tinggi.

Selain hormon pertumbuhan perlu dilakukan penelitian juga pada sisi reproduksinya, untuk memperoleh gambaran polimorfisme hormon reproduksi pada anak sapi hasil silangan dengan sapi Limousin. Follicle Stimulating Hormone (FSH) merupakan hormon glikoprotein yang dihasilkan oleh kelenjar pituitary, yang berfungsi mengatur reproduksi pada mamalia, baik jantan maupun betina (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). Pada hewan betina berfungsi untuk proliferasi dan pengembangan folikel sampai ovulasi (McGeedan Hsueh, 2000). Sedangkan pada laki-laki, kombinasi antara FSH dan testosteron adalah hormon tropik yang mengatur fungsi sel Sertoli, yang diperlukan untuk inisiasi dan pemeliharaan kualitas dan kuantitas di spermatogenesis (Ohta *et al.*, 2007). Hormon FSH terdiri dari  $\alpha$  dan  $\beta$ -sub unit.  $\beta$ -sub unit berperan dalam menentukan spesifisitas ikatan dengan reseptor (FSHR) (Fan dan Hendrickson, 2005). Telah dilaporkan bahwa adanya mutasi ekson 3 gen FSH  $\beta$ -subUnit pada sapi jantan diidentifikasi mempunyai konsentrasi semen segar yang lebih rendah, persentase yang lebih rendah dari integritas akrosom pada semen segar dan beku, lebih motilitas yang rendah pada semen beku (Dai *et al.*, 2009). Huang *et al.* (2002), Wimmers *et al.* (2005) dan Lin *et al.* (2006)

Hasil menunjukkan bahwa frekuensi gen *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Receptor Follicle Stimulating Hormone* (rFSH) pada sapi Madrasin secara berturut-turut alel A dan B yang terdeteksi memiliki frekuensi 0,50 dan 0,50. Sedangkan pada gen rFSH alel C adalah 0,50 dan alel G adalah 0,50 dengan frekuensi alel C sama besar dengan alel G. Sebagai hasil dari penelitian menyimpulkan bahwa gen *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Receptor Follicle Stimulating Hormone* (rFSH) kemungkinan tidak mengalami perubahan atau polimorfisme pada sapi Madrasin dan informasi penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar untuk seleksi bibit unggul.

**Key Words :** Polimorfisme, MAS, Gen FSH  $\beta$ -sub unit, Gen RFSH, PCR-RFLP

