

BAB 5

Deteksi Pewarisan Gen *GH* Kaitan Teori Mendel Pada Populasi Sapi PO

Hormon pertumbuhan (*Growth hormone, GH*) merupakan hormone anabolic yang disintesis dan disekresikan oleh sel somatotrof pada lobus anterior dalam pituitary, yang berperan penting pada pertumbuhan dan perkembangan individu setelah lahir, pertumbuhan jaringan, laktasi, reproduksi serta metabolisme karbohidrat, lemak dan protein (Ayuk and Sheppard, 2006). Gen GH dengan potensi dan fungsinya telah digunakan secara luas untuk penanda (*marker*) dalam beberapa spesies ternak termasuk sapi lokal Indonesia (Jakaria et al., 2009; Sutarno, 2010).

Sapi Peranakan Ongole (PO) member kontribusi besar terhadap suplai daging nasional guna memenuhi kebutuhan protein hewani bagi manusia. Namun peningkatan populasi ternak sapi tidak seimbang dengan kebutuhan konsumsi daging nasional disebabkan peningkatan populasi penduduk yang lebih cepat. Jika kondisi ini tidak dikontrol, kita akan kehilangan plasma nutfah bangsa ternak sapi. Seleksi negatif oleh perternak dan penelitian yang kurang dibidang pemuliaan ternak sapi lokal menyisakan populasi sapi lokal yang inferior dengan mutu genetik rendah yang umumnya digunakan sebagai bibit tetua dalam program pemuliaan. Kalau perkembangbiakan ternak konvensional ini terus berjalan, maka kita dapat kehilangan dan bahkan terjadi kepunahan plasma nutfah ternak superior (Hardjosubroto, 2002).

Penerapan teknik inseminasi buatan (IB) secara luas dalam kegiatan reproduksi ternak sapi lokal di Sulawesi Utara, bibit pejantan sapi Ongole telah digunakan dalam program perkembangbiakan ternak guna memperbaiki performan bangsa sapi lokal tersebut. Sebagai bagian dari program pemuliaan melalui program seleksi memakai penanda (*marker assisted selection (MAS)*) guna membantu perbaikan sifat-sifat genetik sapi Ongole, maka penelitian ini telah mengidentifikasi melalui ‘polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)’ pada lokus *GH* dengan enzim restriksi *MspI*. Program pemuliaan yang tidak terkontrol dalam genotip berbeda yang terseleksi dari pejantan dan induk melalui kawin IB dapat merupakan faktor penyebab ketidakseimbangan frekuensi genetik populasi ternak, sebagai bagian dari sistem perkawinan tanpa terjadi secara acak dalam populasi (Van Vleck et al., 1987). Tipe pewarisan sifat gen *GH* dengan enzim restriksi *MspI* dalam hubungan teori Mendel belum dikaji secara luas pada populasi ternak sapi lokal, khususnya sapi PO. Tujuan penelitian ini adalah mendeteksi pewarisan sifat mengikuti teori Mendel dan menentukan frekuensi genotip *GH* dengan enzim restriksi *MspI* pada sapi PO yang dikawinkan melalui teknik IB di provinsi Sulawesi Utara.

A. Pengambilan Darah Untuk Analisis DNA Sampel Ternak

Sampel darah untuk analisis DNA dalam kajian ini diambil dari ternak sapi PO di Sulawesi Utara dan dua pejantan sapi PO dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari, provinsi Jawa Timur. Total 74 ternak (induk dan anak) yang terbagi atas 37 induk (umur 4 sampai 5 tahun) generasi awal (G0), dan 37 anak-anak betina dari sapi PO (umur 5 sampai 56 hari) generasi 1 (G1) digunakan dalam koleksi sampel darah

sebagai sumber DNA (Lampiran 3, Foto 3). Semua induk dipelihara secara pribadi oleh petani pemilik wilayah areal tanah milik mereka dengan tidak diketahui persentase komposisi tetua ternak. Anak (G1) dilahirkan oleh induk sapi PO melalui perkawinan teknik IB dengan memakai semen yang berasal dari dua pejantan sapi Ongole (G0) yang disebut “Krista” dan “Tunggul” dari BBIB Singosari, provinsi Jawa Timur, yang telah diambil pula sampel darah sebagai sumber DNA pejantan.

Sebelum koleksi darah, bobot badan induk diperoleh melalui penimbangan dengan timbangan “*digital monitor*” berkapasitas 2000 kg. Parameter lingkar dada dan panjang badan diukur menggunakan pita ukur dalam satuan unit cm ketika ternak berdiri tegak seperti digambarkan Ozkaya & Bozkurt (2008). Untuk mempermudah upaya peningkatan kualitas genetik populasi sapi PO di Sulawesi Utara, dilakukan seleksi performan produksi dan gen hormon pertumbuhan ternak pada kelompok performan produksi ekstrim (*superior* dan *inferior*) guna melihat apakah terjadi perbedaan frekuensi genetik gen tersebut (Xiao, 2006). Prosedur teknik pengembangan kumpulan “*DNA target*” hasil seleksi dapat dilakukan melalui tiga tahapan (Xiao, 2006), yaitu (1) data fenotip individu dikumpulkan dan dirunut berdasarkan runutan (*ranking*), (2) individu-individu dalam kedua kelompok bagian teratas dan terbawah dari distribusi fenotip dilakukan seleksi jumlah “*DNA target*” melalui penyandi (*marker*) yang memiliki sifat restriksi diantara kumpulan DNA dari setiap individu dalam masing-masing kelompok teratas dan terbawah, dan (3) kumpulan “*DNA target*” dikembangkan dalam kelompok genotip ternak yang diinginkan melalui persilangan.

Pada penelitian ini, induk yang memiliki bobot badan ekstrim (bobot badan lebih dari 450 kg per ekor dan bobot badan lebih rendah dari 350 kg per ekor) diambil darah dalam kajian ini. Total 37 ekor induk betina telah dibagi kedalam 20 ekor yang memiliki bobot badan *superior* (induk dengan bobot badan lebih berat dari pada seperdelapan standar deviasi di atas rataaan populasi) dan 17 ekor yang memiliki bobot badan *inferior* (induk dengan bobot badan lebih ringan dari pada satu seperdua standar deviasi di bawah rataaan populasi) antara populasi induk berjumlah 363 ekor, dengan rataaan bobot badan yang disesuaikan (*adjusted*) pada umur lima tahun (454.55 ± 58.69 kg) seperti digambarkan dalam Papatungan *et al.* (2000). Pengelompokan performan induk *superior* dan *inferior* dalam penelitian ini kemudian diamati frekuensi genetik gen hormon pertumbuhan (restriksi enzim *MspI*) generasi anak (G1) yang terdapat pada masing-masing kelompok induk *superior* dan *inferior*.

B. Ekstraksi DNA

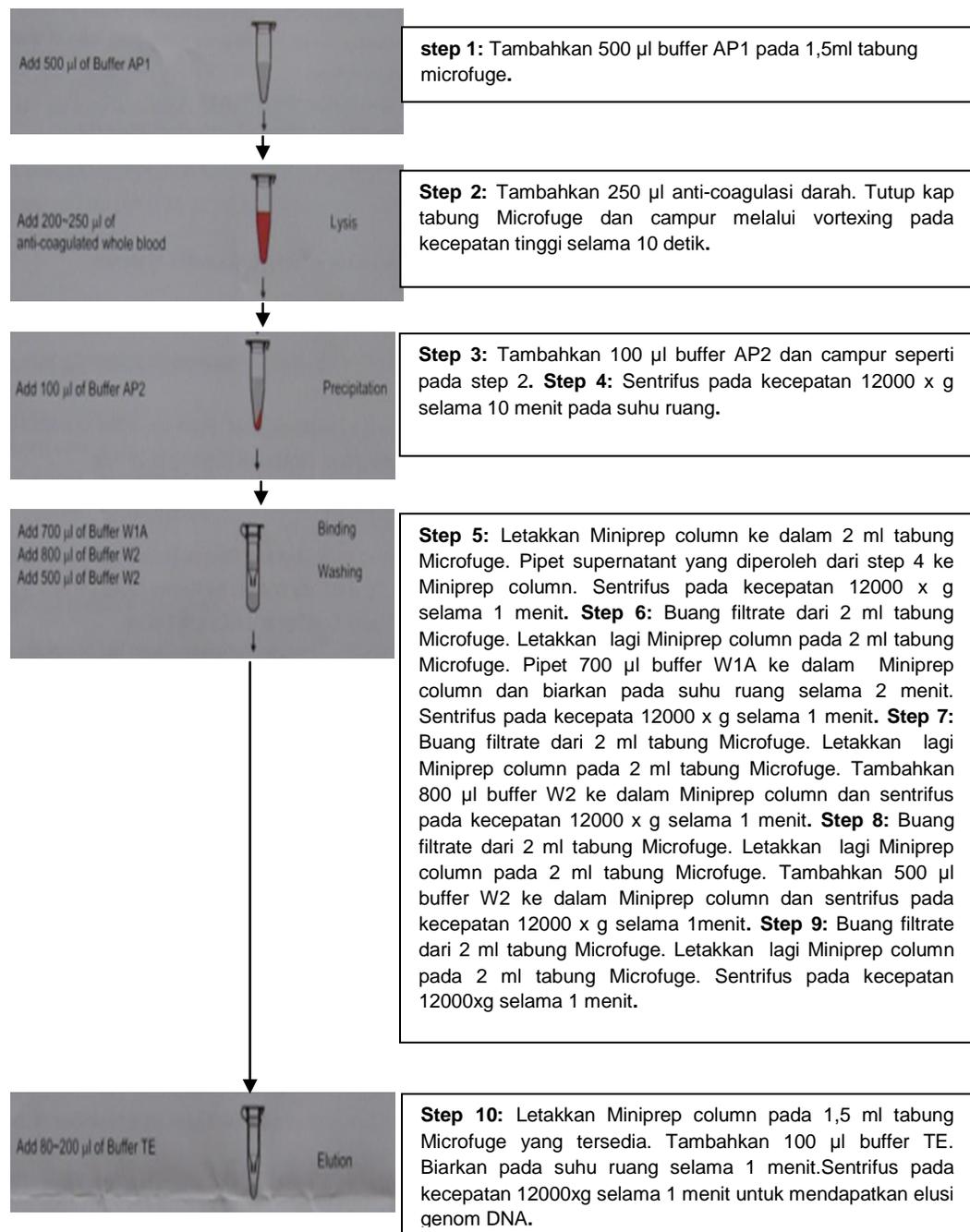
Proses penentuan alel dan genotip ternak dilakukan di



Gambar 5.1. Sampel Darah Sapi PO Disimpan Dalam Lemari Es (4°C) Untuk Analisis DNA dan Proses Isolasi/Ekstraksi DNA Sapi PO Dengan Kit Genomic Purification System (Axygen, USA)

Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Sam Ratulangi, Manado. Sampel darah dari tiap induk sapi PO disertai anak oleh tiap induk dan dari dua pejantan Ongole telah diambil pada bulan Juli 2011 dari “jugular vein” ternak dengan venojack dan memakai tabung 10 ml yang terisi 10% EDTA. Sampel darah disimpan dalam lemari pendingin (4°C) sampai siap untuk proses isolasi DNA (Gambar 5.1).

DNA Genom dari sel-sel darah induk, anak dan pejantan sapi PO diambil dan dimurnikan mengikuti protokol standar dari digesti proteinase K seperti digambarkan melalui “*DNA extraction kit*” (*AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep kit, AXYGEN Biosciences, Union city, CA, 94587, USA*), seperti terlihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2. Tahapan Proses Ekstraksi DNA Darah (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit, AXYGEN Biosciences, USA)

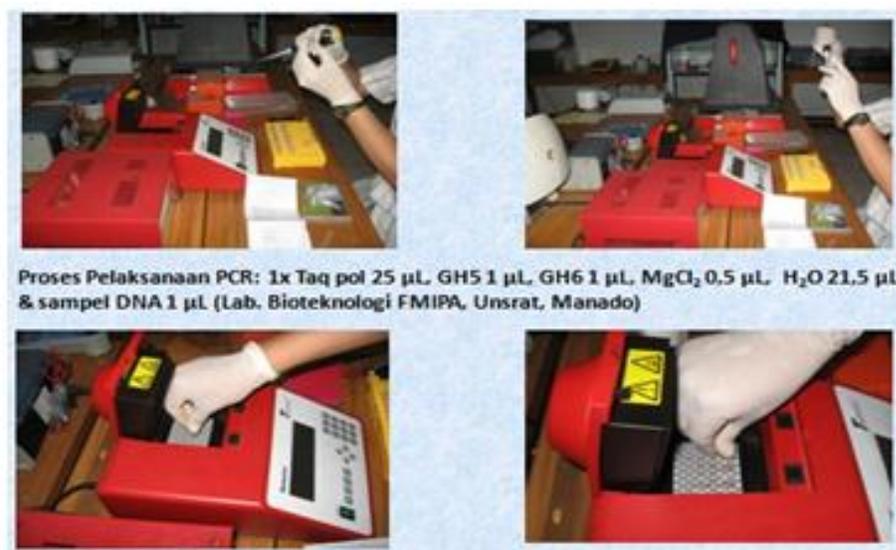
C. Identifikasi Genotip dan Alel *GH* (Restriksi Enzim *MspI*)

Genotip lokus hormon pertumbuhan dilakukan dengan memakai PCR-RFLP yang melibatkan restriksi enzim *MspI* diproduksi perusahaan *Vivantis* yang dapat diakses melalui situs www.vivantechнологies.com (Product No. RE1302) dan divisualisasi pada 1,2% elektroforesis gel agarose sesuai standard (Sulandari and Zein, 2003). Amplifikasi fragmen 327 bp pada intron 3 (Dybus, 2002) dilakukan dengan metode PCR yang memakai forward primer GH5: 5'-CCCACGGGCAAGAATGAGGC-3' dan reverse primer GH6: 5'-TGAGGAACTGCAGGGGCCCA-3' (Gordon, *et al.*, 1983) diproduksi oleh Laboratorium "*The Midland Certified Reagent Company Inc. Texas, USA (Product Lot Number: 280511-03B)*", dengan order number: 55183 tertanggal 11 Oktober 2011. Campuran reaksi PCR dibuat melalui aplikasi 1x Taq pol 25 μ l dari master mix yang diproduksi oleh perusahaan "*Axygen Biosciences, CA 94587, USA*", e-mail: support.axyprepkits@axxygenbio.com.

Komposisi reaksi PCR kit (Solis Biodyne) merupakan "master mix" yang mengandung reaksi $MgCl_2$ 1.5 μ M 1x yang terdiri dari 5 μ l Firepol Master Mix (Ready-to-Load), 1 μ l Primer GH5 (10 pmol/ μ l), 1 μ l Primer GH6 (10 pmol/ μ l), 0.75 μ l $MgCl_2$ (50 μ M), 14,5 μ l H_2O (MiliQ water), dan 2 μ l DNA sampel, sehingga volume total reaksi PCR adalah 25 μ l. Konsentrasi akhir dari 25 μ l PCR untuk komponen reaksi terdiri dari Taq Polymerase 1.2 U, Reaction Buffer B 1x, dNTPs 200 μ M (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Primer GH5 (*forward*) 0.4 μ M, Primer GH6 (*reverse*) 0.4 μ M, dan $MgCl_2$ 3.0 mM.

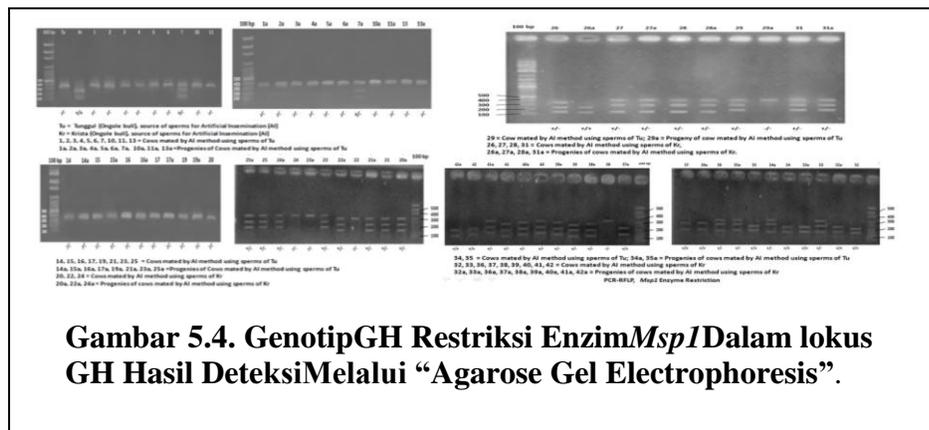
Campuran reaksi ditempatkan dalam mesin thermal cycler PCR (tipe Biometra T personal) dengan kondisi diatur sebagai berikut:

temperature denaturasi awal pada 94 °C selama 5 menit untuk 1 siklus diikuti dengan 35 siklus, setiap siklus adalah denaturasi pada 94 °C untuk 30 detik, *annealing* pada 60 °C untuk 30 detik, elongasi pada 72 °C untuk 30 detik dan ekstensi akhir pada 72 °C untuk 1 menit. Digesti fragmen dibuat dengan memakai protokol dari “*restricted fragment length polymorphism (RFLP)*” dengan enzim restriksi *MspI* untuk mengenali letak khusus dari susunan nukleotida C↓CGG. Produk PCR gen *GH* didigesti pada suhu 37° C selama 3 jam dengan enzim *MspI*. Reaksi enzim *MspI* terdiri dari 2 µl Buffer V2 10X, 7.5 µl H₂O, 0.5 µl enzim *MspI* (20 U/µl), dan 10 µl produk PCR (Gambar 5.3).



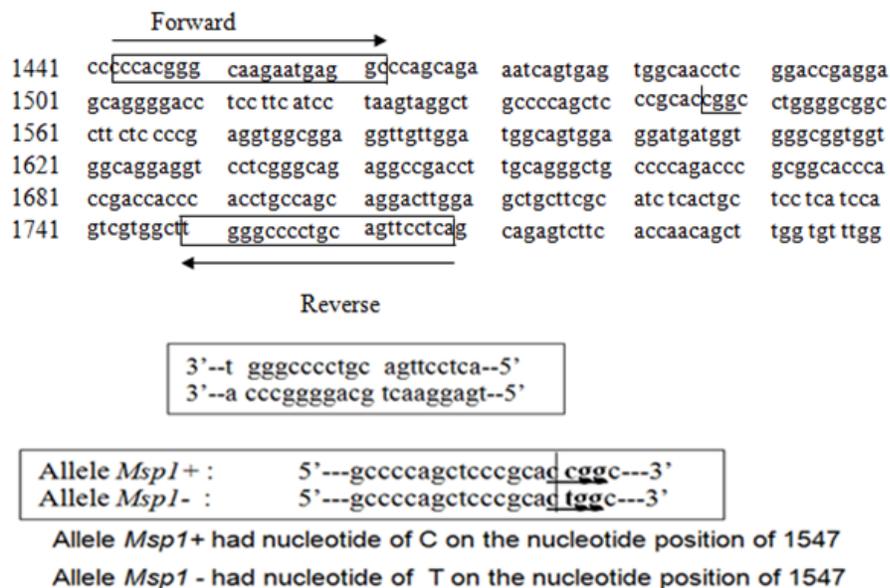
Gambar 5.3. Mesin PCR Type “Biometra T Personal” Digunakan Pada Amplifikasi DNA Sapi PO. Produk PCR Gen GH Didigesti Pada Suhu 37° C Selama 3 jam Dengan Enzim *MspI*. Reaksi Enzim *MspI* Terdiri Dari 2 µl Buffer V2 10X, 7.5 µl H₂O, 0.5 µl Enzim *MspI* (20 U/µl), dan 10 µl Produk PCR

Produk digesti dipisahkan melalui proses elektroforesis horizontal (100 volts, 30 menit) dalam 1.2% gel agarose dalam 1x buffer TBE (*Tris, Boric acid, EDTA*). Gel agarose dibuat dengan menimbang 1,2 gram bubuk agarose dan mencampurkan kedalam 100 ml Buffer TBE (*Tris-Boric-EDTA*) 1x. Larutan agarose dipanaskan sampai mendidih pada “plate” pemanas. Agarose yang telah hangat ditumpahkkan ke dalam alat sisir cetakan dan membentuk beberapa sumur. Gel agarose yang padat ditempatkan ke dalam alat elektroforesis dan direndam dengan Buffer TBE 1x. Pengisian sampel dilakukan dengan meneteskan 9 µl produk digesti PCR yang dicampur dengan 1 µl *ethidium bromide* (*loading dye*) ke dalam setiap sumur gel agarose, sedangkan sumur control diisikan DNA ladder 100 bp (*loading dye* dimasukkan dalam *master mix Firepol*). Produk elektroforesis kemudian dimasukkan ke dalam larutan 10% “*ethidium bromide*” selama 20 menit untuk mengidentifikasi alel polimorfisme berdasarkan panjang pita yang terbentuk. Gambar foto pita produk DNA divisualisasi pada “*UV-Transiluminator*” dengan memakai kamera untuk identifikasi alel dan genotip (Gambar 5.4). Enzim *MspI* hanya dapat mengenal letak restriksi dari empat nucleotida untuk C↓CGG. GenotipGH_ *MspI*^{+/+} memiliki 2 pita (104 bp, 223



bp), genotip *GH_MspI*^{+/+} memiliki tiga pita (104 bp, 223 bp dan 327 bp), dan genotip *GH_MspI*^{-/-} hanya memiliki satu pita (327 bp).

Perbedaan dua fragmen alel *GH_MspI*⁺ dan *GH_MspI*⁻ dapat disebabkan oleh mutasi Cytosine (C) menjadi Thymine (T) (Rifa 'i, 2010). Variasi gen dari lokus hormon pertumbuhan (GH) untuk *MspI* pada sapi dapat dideteksi pada posisi intron 3 dengan posisi sekuensing



Gambar 5.5. Pembedaa Fragmen Gen GH dan Letak Restriksi Enzim *MspI* Berdasarkan Sekuen Gen GH Pada Sapi, Diakses Dari *Bank Gen*, number: M57764.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1547 (Gambar 5.5.) berdasarkan sekuensing nucleotida dari GenBank ternak sapi, *accession number*: M57764.1 yang bersumber dalam Gordon *et al.* (1983), diakses pada tanggal 26 Maret 2011 melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Mutasi terjadi pada level DNA disebabkan oleh perubahan nukleotida, baik bentuk transisi ataupun insersi (Cambell and Reece, 2008). Berdasarkan perbedaan letak restriksi nukleotida dari setiap alel, maka mutasi Cytosine (C) menjadi Thymine (T) dapat terjadi disebabkan transisi (Gambar 5.5). Transisi C menjadi T dapat

menyebabkan perubahan letak restriksi enzim *MspI* (Rifa'i, 2010). Perbedaan sekuen nukleotida gen hormon pertumbuhan (*GH_MspI*) disebabkan substitusi basa C menjadi T. Alel *GH_MspI*⁺ memiliki nukleotida C pada posisi basa ke 1547.

Tabel 5.1. Pita Fragmen Sesudah Digesti Enzim *MspI*

Panjang pita DNA (bp)	Alel teridentifikasi	Genotip GH
223	Alel normal (<i>MspI</i> ⁺) *	<i>MspI</i> ^{+/+}
104		
327	<i>MspI</i> ⁺ dan <i>MspI</i> ⁻	<i>MspI</i> ^{+/-}
223		
104		
327	Alel mutan (<i>MspI</i> ⁻) **	<i>MspI</i> ^{-/-}

*) Terpotong oleh enzim *MspI*; **) Tidak terpotong oleh enzim *MspI*.

Genotip *GH_MspI*^{+/+} memiliki dua pita (104 bp, 223 bp), genotip *GH_MspI*^{+/-} memiliki tiga pita (104 bp, 223 bp, 327 bp), dan genotip *GH_MspI*^{-/-} hanya memiliki satu pita (327 bp) seperti terlihat pada Tabel 5.1. Alel-alel ini adalah sama dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Zhou et al. (2005) dengan memakai enzim restriksi *MspI* pada sapi Holstein Beijing dan Maylinda (2011) dengan memakai enzim restriksi *MspI* pada induk sapi perah Grati.

D. Analisis Genotip GH (Restriksi Enzim *MspI*)

Hasil tabulasi ternak yang memiliki genotip GH seperti pada Tabel 5.1, telah diperoleh jumlah ternak dengan frekuensi genotip dan alel seperti terlihat pada Tabel 5.2. Data PCR-RFLP dianalisis melalui frekuensi alel (Sumantri, dkk., 2008). Frekuensi alel dihitung dengan metode penghitungan melalui rumus:

$$x_i = \frac{(2n_{ii} + \sum n_{ij})}{2N}$$

Dimana, x_i adalah frekuensi alel $MspI^+$,

n_{ii} adalah jumlah ternak sapi dengan genotip of $MspI^{+/+}$,

n_{ij} adalah jumlah ternak sapi dengan genotip of $MspI^{+/-}$,

N adalah jumlah total ternak sapi yang diuji.

Perhitungan frekuensi alel (Tabel 5.2) adalah sebagai berikut:

Untuk fenotip BB superior:

$$\text{Frekuensi alel } MspI^+ = \frac{[2(2)+14]}{2(20)} = 0,45;$$

$$\text{Frekuensi alel } MspI^- = 1 - 0,45 = 0,55$$

Untuk fenotip BB inferior:

$$\text{Frekuensi alel } MspI^+ = \frac{[2(3)+0]}{2(17)} = 0,18;$$

$$\text{Frekuensi alel } MspI^- = 1 - 0,18 = 0,82$$

Tabel 5.2. Frekuensi Genotip dan Alel $Msp1^+$ dan $Msp1^-$ Pada Lokus Hormon Pertumbuhan Induk Sapi PO Di Sulawesi Utara

Fenotip induk	n	Jumlah genotip dan frekuensi			Frekuensi alel	
		+/+	+/-	-/-	+	-
Berat badan superior (BB) ¹⁾	20	2	14	4	18	22
					0,45	0,55
Berat badan inferior (BB) ¹⁾	17	3	0	14	6	28
					0,18	0,82

¹⁾ Superior BB adalah induk dengan berat badan melebihi 450 kg per ekor;

²⁾ Inferior BB adalah induk dengan berat badan kurang dari 350 kg per ekor

E. Pewarisan Mendel Untuk Gen GH (Restriksi Enzim $Msp1$)

Uji kesesuaian teori Mendel yang diharapkan (*expeted*) dari hasil observasi (*actual*) frekuensi genotip $Msp1^{+/+}$, $Msp1^{+/-}$ dan $Msp1^{-/-}$ dapat dihitung secara manual dengan memakai *Chi-square test* (χ^2) (Byrkit, 1987) sebagai berikut:

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e} = \sum \frac{f_o^2}{f_e} - N$$

Dimana, χ^2 adalah distribusi *Chi-square*,

f_o adalah frekuensi observasi dari sel ke ijk , dan

f_e adalah frekuensi harapan pada sel ke ijk .

$$f_e = \frac{(\sum f_{o-i}) \times (\sum f_{o-j})}{\sum f_o}$$

$\sum f_{o-i}$ adalah total frekuensi observasi dari baris ke i ;

$\sum f_{o-j}$ adalah total frekuensi observasi dari kolom ke j .

Perhitungan frekuensi genotip harapan (*expected*) anak G1 (f_e):

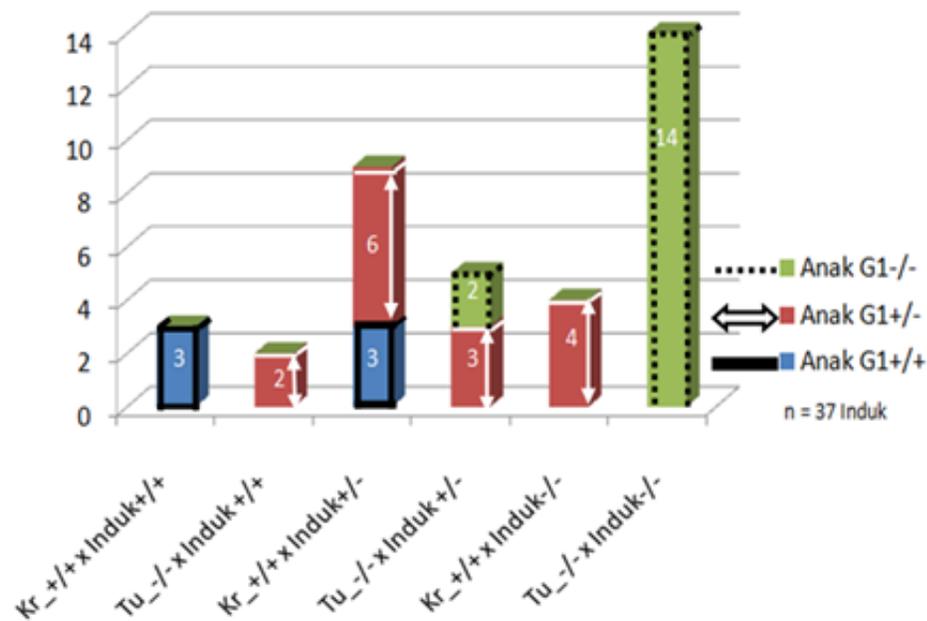
$$f_e = \frac{(\sum f_{o-i}) \times (\sum f_{o-j})}{\sum f_o} = \frac{(14) \times (14)}{14} = 14$$

Genotip induk sapi	n	Genotip pejantan di pakai dalam teknik IB	Genotip anak (G1)		
			-/-		
			Obs	Exp	Total
<i>MspI</i> ^{-/-}	14	Tu_ <i>MspI</i> ^{-/-}	14	14	14
	4	Kr_ <i>MspI</i> ^{+/+}	0	0	0
		Total	14		14

Dalam kajian ini, data dianalisis menggunakan perangkat lunak (*software*) dari fungsi program statistik (*CHITEST*) pada Microsoft Excel XP 2007 dalam kelompok pejantan, ternak induk superior dan inferior (G0), serta anak (G1). Berdasarkan uji Chi square, telah diperoleh bahwa distribusi genotip anak dalam kajian pewarisan gen hormon pertumbuhan ini berada dalam sistem pewarisan melalui teori Mendel yang ditunjukkan oleh nilai observasi $X^2 = 1.15 < X_{.05}^2 \{2\} = 5.991$ (Tabel 5.2). Secara teori, dasar pewarisan Mendel pada persilangan antara semua individu bergenotip homosigot menghasilkan semua anak bergenotip homosigot yang sama dengan kedua tetua mereka, sedangkan persilangan antara individu bergenotip homosigot resesif dengan individu bergenotip homosigot dominan menghasilkan semua anak bergenotip heterosigot (Rifa'i, 2010).

Dalam kajian ini, perkawinan pejantan bernama “Tunggul” (Tu_ ^{-/-}) yang memiliki genotip homosigot *MspI*^{-/-} dengan 14 induk yang memiliki genotip homosigot *MspI*^{-/-} telah menghasilkan 14 anak yang

semuanya memiliki genotip $MspI^{-/-}$ (Tabel 5.2). Demikian juga, perkawinan pejantan bernama “Krista” ($Kr_{-^{+/+}}$) yang memiliki genotip $MspI^{+/+}$ dengan 4 induk bergenotip $MspI^{-/-}$ telah menghasilkan 4 anak yang semuanya bergenotip heterosigot $MspI^{+/-}$ (Gambar 5.6).



Gambar 5.6. Frekuensi Genotipe Perkawinan Pejantan Dan Induk (G0) Serta Genotipe Anak (G1) Untuk Gen Hormon Pertumbuhan (Restriksi Enzim $MspI$) Yang Terdeteksi Melalui PCR-RFLP Pada Sapi PO Di Sulawesi Utara

Tabel 5.2. Distribusi Genotip Perkawinan Pejantan Dan Induk (G0) Serta Genotip Anak (G1) Untuk Gen GH (Restriksi Enzim *MspI*) Terdeteksi Melalui PCR-RFLP Pada Sapi PO Di Sulut

Genotip induk sapi	n	Genotip pejantan di pakai dalam teknik IB	Genotip anak (G1)						Total
			-/-		+/-		+/+		
			Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp	
<i>MspI</i> ^{-/-}	14	Tu_ <i>MspI</i> ^{-/-}	14	14	0	0	0	0	
	4	Kr_ <i>MspI</i> ^{+/+}	0	0	4	4	0	0	
Sub total			14 ^{NS}	14	4 ^{NS}	4	0 ^{NS}	0	18 ^{NS}
<i>MspI</i> ^{+/-}	5	Tu_ <i>MspI</i> ^{-/-}	2	2	3	3	0	0	
	9	Kr_ <i>MspI</i> ^{+/+}	0	0	6	6	3	3	
Sub total			2 ^{NS}	2	9 ^{NS}	9	3 ^{NS}	3	14 ^{NS}
<i>MspI</i> ^{+/+}	2	Tu_ <i>MspI</i> ^{-/-}	0	0	2	2	0	0	
	3	Kr_ <i>MspI</i> ^{+/+}	0	0	0	0	3	3	
Sub total			0 ^{NS}	0	2 ^{NS}	2	3 ^{NS}	3	5 ^{NS}
Total			16 ^{NS}	16	15 ^{NS}	15	6 ^{NS}	6	37 ^{NS}

n = jumlah induk dikawinkan pejantan memakai teknik inseminasi buatan (IB). Tu = Tunggul (nama pejantan Ongole), Kr = Krista (nama pejantan Ongole). Obs = Observasi; Exp = *Expected* (diharapkan). ^{NS}) Hasil perhitungan statistik **Chi-test** Calculation (0,97906) > **Chi-square** Critical value(0,05) menunjukkan frekuensi genotip pengamatan (*actual*) berbeda tidak nyata dengan frekuensi genotip harapan (*expected*) sehingga distribusi genotip anak dapat mengindikasikan pewarisan melalui teori Mendel

Perkawinan pejantan “Tunggul” (Tu^{-/-}) yang memiliki genotip homosigot *MspI*^{-/-} dengan 5 ekor induk yang memiliki genotip heterosigot *MspI*^{+/-} telah menghasilkan anak (G1) yang terdiri dari 3 ekor bergenotip heterosigot *MspI*^{+/-} dan 2 ekor bergenotip homosigot *MspI*^{-/-}. Sedangkan perkawinan pejantan “Krista” (Kr^{+/+}) yang memiliki

genotip homosisgot $MspI^{+/+}$ dengan 9 ekor induk yang memiliki genotip heterosisgot $MspI^{+/-}$ telah menghasilkan anak (G1) yang terdiri dari 6 ekor bergenotip heterosisgot $MspI^{+/-}$ dan 3 ekor bergenotip homosisgot $MspI^{+/+}$ (Gambar 5.6).

Pola yang sama ditemukan pula bahwa perkawinan pejantan “Krista” ($Kr_{-}^{+/+}$) bergenotip $MspI^{+/+}$ dengan 3 induk bergenotip homosisgot $MspI^{+/+}$ telah menghasilkan 3 anak yang semuanya bergenotip $MspI^{+/+}$. Pengamatan serupa diperoleh pula pada perkawinan pejantan “Tunggul” ($Tu_{-}^{-/-}$) bergenotip $MspI^{-/-}$ dengan 2 induk bergenotip homosisgot $MspI^{+/+}$ yang telah menghasilkan 2 anak yang semuanya bergenotip heterosisgot $MspI^{+/-}$ seperti terlihat pada Gambar 5.6.

Dalam kajian ini, dasar pewarisan Mendel (Rifa’i, 2010) telah nampak terlihat pada persilangan pejantan bernama “Tunggul” ($Tu_{-}^{-/-}$) yang bergenotip homosisgot $MspI^{-/-}$ dengan 14 induk bergenotip homosisgot $MspI^{-/-}$ dan telah menghasilkan 14 anak yang semuanya bergenotip $MspI^{-/-}$. Demikian juga, persilangan pejantan “Krista” ($Kr_{-}^{+/+}$) bergenotip $MspI^{+/+}$ dengan 3 induk bergenotip homosisgot $MspI^{+/+}$ telah menghasilkan 3 anak yang semuanya bergenotip $MspI^{+/+}$.

Pada perkawinan pejantan “Tunggul” ($Tu_{-}^{-/-}$) bergenotip $MspI^{-/-}$ dengan 2 induk bergenotip homosisgot $MspI^{+/+}$ telah menghasilkan 2 anak yang semuanya bergenotip heterosisgot $MspI^{+/-}$. Demikian juga terlihat bahwa perkawinan pejantan bernama “Krista” ($Kr_{-}^{+/+}$) yang bergenotip $MspI^{+/+}$ dengan 4 induk bergenotip $MspI^{-/-}$ telah menghasilkan 4 anak yang semuanya bergenotip heterosisgot $MspI^{+/-}$. Sebaran genotip anak (G1) dari hasil perkawinan induk dan pejantan (G0) dengan genotip yang berbeda-beda di atas menunjukkan bahwa pewarisan gen pertumbuhan (restriksi enzim $MspI$) telah mengikuti tipe pewarisan melalui teori Mendel (Rifa’i, 2010).

F. Frekuensi Genotip *GHD* Dalam Populasi Sapi PO Kawin IB

Uji keseimbangan genetic (*genetic equilibrium*) dari hasil observasi (*actual*) frekuensi genotip $MspI^{+/+}$, $MspI^{+/-}$ dan $MspI^{-/-}$ yang dibandingkan dengan frekuensi genotip $MspI^{+/+}$, $MspI^{+/-}$ dan $MspI^{-/-}$ sebagai harapan (*expected*) dapat dihitung secara manual dengan memakai *Chi-square test* (χ^2) (Byrkit, 1987) sebagai berikut:

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e} = \sum \frac{f_o^2}{f_e} - N$$

Dimana, χ^2 adalah distribusi *Chi-square*,

f_o adalah frekuensi observasi dari sel ke ijk , dan

f_e adalah frekuensi harapan pada sel ke ijk .

$$f_e = \frac{(\sum f_{o-i}) \times (\sum f_{o-j})}{\sum f_o}$$

$\sum f_{o-i}$ adalah total frekuensi observasi dari baris ke i ;

$\sum f_{o-j}$ adalah total frekuensi observasi dari kolom ke j .

Perhitungan frekuensi genotip harapan (*expected*) pada sel ke ijk (f_e):

1. Untuk $MspI^{-/-}$ induk betina (G0) yang dikawinkan dengan pejantan Krista ($Kr^{+/+}$) adalah sebagai berikut:

$$f_e = \frac{(\sum f_{o-i}) \times (\sum f_{o-j})}{\sum f_o} = \frac{(16) \times (18)}{37} = 8$$

2. Untuk $MspI^{+/-}$ induk betina (G0) yang dikawinkan dengan pejantan Krista ($Kr^{+/+}$) adalah sebagai berikut:

$$f_e = \frac{(\sum f_{o-i}) \times (\sum f_{o-j})}{\sum f_o} = \frac{(16) \times (14)}{37} = 6$$

3. Untuk $MspI^{+/+}$ induk betina (G0) yang dikawinkan dengan pejantan Krista ($Kr^{+/+}$) adalah sebagai berikut:

$$f_e = \frac{(\sum f_{o-i}) \times (\sum f_{o-j})}{\sum f_o} = \frac{(16) \times (5)}{37} = 2$$

4. Untuk $MspI^{-/-}$ induk betina (G0) yang dikawinkan dengan pejantan Tunggul ($Tu^{-/-}$) adalah sebagai berikut:

$$f_e = \frac{(\sum f_{o-i}) \times (\sum f_{o-j})}{\sum f_o} = \frac{(21) \times (18)}{37} = 10$$

5. Untuk $Msp^{+/-}$ induk betina (G0) yang dikawinkan dengan pejantan Tunggul ($Tu^{-/-}$) adalah sebagai berikut:

$$f_e = \frac{(\sum f_{o-i}) \times (\sum f_{o-j})}{\sum f_o} = \frac{(21) \times (14)}{37} = 8$$

6. Untuk $Msp^{+/+}$ induk betina (G0) yang dikawinkan dengan pejantan Tunggul ($Tu^{-/-}$) adalah sebagai berikut:

$$f_e = \frac{(\sum f_{o-i}) \times (\sum f_{o-j})}{\sum f_o} = \frac{(21) \times (5)}{37} = 3$$

Genotip $MspI$ pejantan (G0)	n	Data	Frekuensi genotip $MspI$ induk betina (G0)			Total Obs.
			+/+	+/-	-/-	
Krista ($Kr^{+/+}$)		Obs	3	9	4	16
	16	Exp	2	6	8	
Tunggul ($Tu^{-/-}$)		Obs	2	5	14	21
	21	Exp	3	8	10	
Total Obs.			5	14	18	37

Dalam kajian ini, data dianalisis menggunakan perangkat lunak (*software*) dari fungsi program statistik (*CHITEST*) pada Microsoft Excel XP 2007 dalam kelompok pejantan, ternak induk superior dan inferior (G0), serta anak (G1). Nilai Chi test telah diperoleh seperti terlihat dalam

Tabel 5.3. Aplikasi Program MS Excel XP 2007, pada *fx* ketik= **CHITEST(A2:A7, B2:B7)**, tekan enter, hasilnya = **0,216338016** (seperti terlihat pada kopian monitor komputer).

	A	B	C	D	E
1	Actual	Expected		Actual	Expected
2	3	2		6	3
3	9	6		10	7
4	4	8		0	6
5	2	3		0	3
6	5	8		5	8
7	14	10		16	10
8					
9	Chi_test value =	0.216338			0.002933

Hasil perhitungan statistic untuk induk G0, **Chi-test**_{calculation} (0,216338016) > **Chi-square**_{critical value(0,05)} menunjukkan frekuensi genotip pengamatan (*actual*) berbeda tidak nyata dengan frekuensi genotip harapan (*expected*). Demikian juga data frekuensi genotip anak G1 pada Tabel 5.3. Berdasarkan uji Chi Square (Tabel 5.3), diperoleh bahwa frekuensi genotip *Msp1* hormon pertumbuhan adalah tidak berada dalam keseimbangan genetic (G1). Kondisi ini dapat terjadi disebabkan jumlah sampel ternak induk (G0) yang dikawinkan kedua pejantan berada dalam jumlah terbatas.

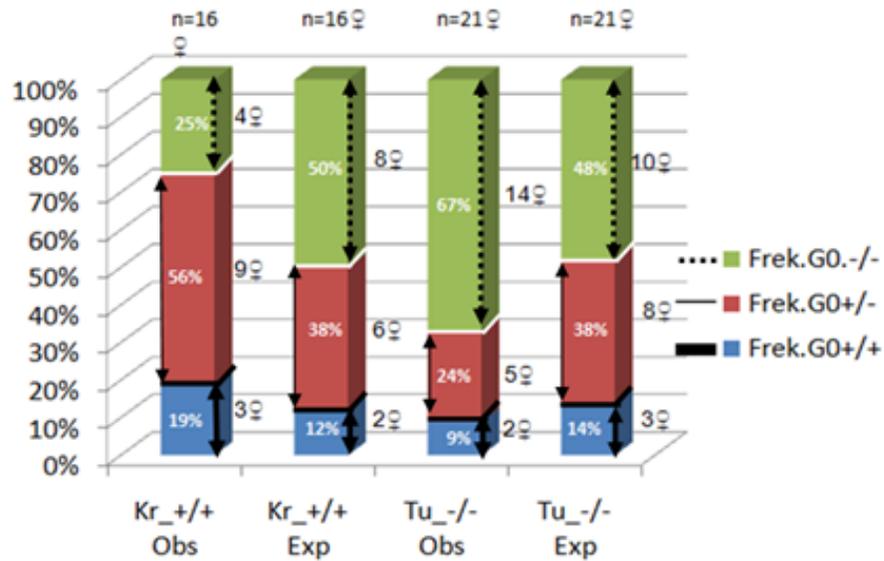
Tabel 5.3. Frekuensi Genotip $MspI^{+/+}$ and $MspI^{-/-}$ Pada Lokus Hormon Pertumbuhan Dari Induk Sapi (G0) PO dan Anak (G1)

Genotip $MspI$ pejantan (G0)	n	Data	Frekuensi genotip $MspI$ induk betina (G0)			Chi-test Value	Frekuensi genotip $MspI$ anak (G1)			Chi-test Value
			+/+	+/-	-/-		+/+	+/-	-/-	
Krista ($Kr^{+/+}$)	16	Obs	3	9	4	0,216	6	10	0	0,0029
		Exp	2	6	8		3	7	6	
Tunggul ($Tu^{-/-}$)	21	Obs	2	5	14		0	5	16	
		Exp	3	8	10		3	8	10	

Obs = Observasi; **Exp** = Expected. **n** = jumlah induk betina dikawinkan dengan teknik inseminasi buatan. **Chi-test**_{value} (0,216) > **Chi-square**_{Critical Value} (0,05); menunjukkan frekuensi genotip sampel induk betina yang dikawinkan IB dengan semen kedua pejantan berada dalam keseimbangan genetik; sedangkan **Chi-test**_{value} (0,0029) < **Chi-square**_{Critical Value} (0,01); menunjukkan frekuensi genotip anak hasil perkawinan IB dari semen kedua pejantan tidak berada dalam keseimbangan genetik ($P < 0,01$) berdasarkan Chi-test

Jumlah sampel induk yang dikawinkan melalui IB dengan pejantan “Krista” ($Kr^{+/+}$) hasil observasi adalah 16 ekor, terdiri dari 3 ekor bergenotip $MspI^{+/+}$ (19 persen), 9 ekor bergenotip $MspI^{+/-}$ (56 persen) dan 4 ekor bergenotip $MspI^{-/-}$ (25 persen). Jumlah sampel sebanyak 16 ekor induk yang dikawinkan melalui IB dengan pejantan “Krista” ($Kr^{+/+}$), untuk diharapkan agar berada dalam keseimbangan genetik adalah terdiri 2 ekor bergenotip $MspI^{+/+}$ (12 persen), 6 ekor

bergenotip $MspI^{+/-}$ (38 persen) dan 8 ekor bergenotip $MspI^{-/-}$ (50 persen) (Gambar 5.7).

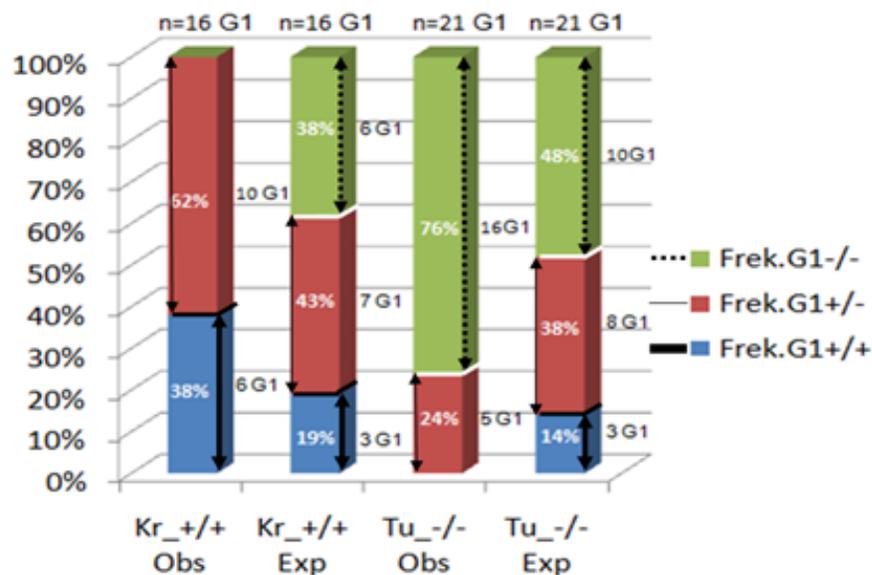


Gambar 5.7. Frekuensi Sampel Genotipe Induk Dan Genotipe Pejantan (G0) Sapi PO Dikawinkan Melalui IB Di Sulawesi Utara

Demikian juga jumlah sampel induk yang dikawinkan melalui IB dengan pejantan “Tunggul” ($Tu_{-/-}$) hasil observasi sebanyak 21 ekor, terdiri dari 2 ekor bergenotip $MspI^{+/+}$ (9 persen), 5 ekor bergenotip $MspI^{+/-}$ (24 persen) dan 14 ekor bergenotip $MspI^{-/-}$ (67 persen). Jumlah sampel sebanyak 21 ekor induk untuk dikawinkan melalui IB dengan pejantan “Tunggul” ($Tu_{-/-}$), diharapkan agar berada dalam keseimbangan genetik adalah terdiri 3 ekor bergenotip $MspI^{+/+}$ (14 persen), 8 ekor bergenotip $MspI^{+/-}$ (38 persen) dan 10 ekor bergenotip $MspI^{-/-}$ (48 persen) (Gambar 5.7). Dengan demikian, jumlah sampel yang diamati ini disertai sistem perkawinan melalui IB dengan tetua pejantan terseleksi disertai variasi genotip yang berbeda, dapat merupakan faktor penyebab

frekuensi genotip dan alel *MspI* hormon pertumbuhan berada dalam keseimbangan genetik dalam kajian populasi induk (G0) sapi PO di Sulawesi Utara. Berdasarkan hukum keseimbangan genetik Hardy-Weinberg secara alamiah bahwa dalam suatu populasi individu dalam jumlah besar dan berlangsung perkawinan antara individu dengan variasi genetik, maka populasi individu ini tetap berada dalam keseimbangan genetik (genetic equilibrium) dari satu generasi ke generasi berikutnya (Rifa'i, 2010).

Jumlah sampel anak (G1) yang dihasilkan melalui IB dengan pejantan “Krista” ($Kr_{+/+}$) hasil observasi terlihat 16 ekor anak, yang terdiri dari 6 ekor bergenotip $MspI^{+/+}$ (38 persen) dan 10 ekor bergenotip $MspI^{+/-}$ (62 persen). Jumlah sampel sebanyak 16 ekor anak (G1) yang dihasilkan melalui IB dengan pejantan “Krista” ($Kr_{+/+}$), yang diharapkan agar berada dalam keseimbangan genetik adalah terdiri 3 ekor anak (G1) bergenotip $MspI^{+/+}$ (19 persen), 7 ekor anak (G1) bergenotip $MspI^{+/-}$ (43 persen) dan 6 ekor anak (G1) bergenotip $MspI^{-/-}$



Gambar 5.8. Frekuensi Sampel Genotipe Anak (G1) Hasil Perkawinan IB Dari Genotipe Pejantan (G0) Sapi PO Di Sulawesi Utara

(38 persen) (Gambar 5.8).

Demikian juga jumlah sampel anak (G1) yang dihasilkan melalui IB dengan pejantan “Tunggul” (Tu^{-/-}) hasil observasi adalah 21 ekor anak, yang terdiri dari 5 ekor bergenotip *MspI*^{+/-} (24 persen) dan 16 ekor bergenotip *MspI*^{-/-} (76 persen). Jumlah sampel sebanyak 21 ekor anak (G1) yang dihasilkan melalui IB dengan pejantan “Tunggul” (Tu^{-/-}), seharusnya diharapkan agar berada dalam keseimbangan genetik adalah terdiri 3 ekor anak (G1) bergenotip *MspI*^{+/+} (14 persen), 8 ekor anak (G1) bergenotip *MspI*^{+/-} (38 persen) dan 10 ekor anak (G1) bergenotip *MspI*^{-/-} (48 persen) (Gambar 5.8). Jumlah sampel genotip pejantan yang memiliki genotip homosigot *MspI*^{+/+} atau homosigot *MspI*^{-/-} dapat merupakan faktor penyebab frekuensi genotip dan alel *MspI* hormon pertumbuhan tidak berada dalam keseimbangan genetik dalam kajian populasi anak (G1) sapi PO di Sulawesi Utara.

Dalam kajian ilmiah yang lain, Maylinda (2011) melaporkan bahwa populasi induk sapi perah Grati berada dalam keseimbangan genetik dalam jumlah sampel yang lebih banyak. Hal ini didukung oleh kenyataan bahwa sifat populasi dari gene pool untuk GH-*MspI* yang berada dalam pola keseimbangan Hardy-Weinberg adalah merupakan fungsi dari kedua frekuensi alel dan interaksi biologis antara gen-gen (Carter *et al.*, 2005). Ketidak-seimbangan frekuensi genotip dari gen hormon pertumbuhan *MspI* dari kajian ini menyebabkan ketidak stabilan frekuensi genotip *MspI* dari generasi G0 ke generasi berikutnya (G1). Pengembangan pejantan genotip terseleksi dengan induk tanpa melalui sistem perkawinan acak dalam populasi ternak dapat menyebabkan ketidak-seimbangan frekuensi genotip dan alel hormon pertumbuhan dalam populasi ternak (Cambell and Reece, 2008; Rifa'i, 2010). Faktor

yang mempengaruhi keseimbangan genetik adalah program seleksi dengan sistem perkawinan tidak acak, seperti sistem perkawinan inseminasi buatan (Rifa'i., 2010). Jawasreh *et al.* (2012) melaporkan bahwa program pemuliaan harus diteruskan sebagai langkah pertama meningkatkan frekuensi alel yang diinginkan dalam pusat-pusat pemuliaan. Di provinsi Sulawesi Utara, pusat pelayanan inseminasi buatan menerapkan straw semen yang mengandung plasma spermatozoa pejantan Ongole yang disebut “Krista” dan “Tunggul” dari Balai Besar Inseminasi Buatan) Singosari, provinsi Jawa Timur. Carter *et al.* (2005) melaporkan analisis interaksi gen dan menemukan bahwa hal itu bisa ada dua atau lebih gen dapat berinteraksi untuk mengekspresikan fenotip yang khusus. Dalam penelitian ini, perlu melibatkan genotip yang bersifat heterosigot dari pejantan untuk lebih meningkatkan dan menjaga keseimbangan genetik dalam populasi ternak.

G. Rangkuman

1. Locus hormon pertumbuhan dapat terseleksi dengan memakai alel restriksi enzim *MspI*⁺ dan *MspI*⁻ pada induk dan pejantan sapi PO (sebagai G₀) dan generasi anak (G₁) melalui kawin IB.
2. Alel restriksi enzim *MspI*⁺ dan *MspI*⁻ dari induk dan pejantan (G₀) dapat diwariskan pada anak generasi keturunan (G₁) mengikuti pewarisan sifat melalui teori Mendel.
3. Pewarisan sifat gen hormon pertumbuhan (restriksi enzim *MspI*⁺ dan *MspI*⁻) sesuai teori Mendel yang dikembangkan melalui perkawinan teknik IB pada kelompok induk dan pejantan tua generasi awal (G₀) dalam kajian ini berada dalam keseimbangan genetik untuk frekuensi genotip *MspI*.
4. Frekuensi genotip hormon pertumbuhan dalam kelompok anak generasi 1 (G₁) hasil perkawinan melalui teknik IB tidak berada dalam keseimbangan genetik, disebabkan persilangan terjadi secara tidak acak. Program perkawinan ternak yang memakai genotip hormone pertumbuhan pada pejantan dan induk (G₀) untuk pewarisan genotip GH restriksi enzim *MspI* melalui teknik IB hendaknya terus dikembangkan guna peningkatan sebaran variasi alel-alel ini dengan mempertimbangkan keseimbangan genetik GH pada populasi sapi PO.