

EFEKTIFITAS MIKROSATELIT INRA-23 DAN INRA-32 SEBAGAI PENANDA GENETIK KERBAU (*Bubalus bubalis*)

Roisatul Ainiyah

Fakultas Pertanian Universitas Yudharta Pasuruan

Email: ininn_uniquegirl@yahoo.com

ABSTRAK

Penanda molekuler didefinisikan sebagai segmen DNA tertentu yang mewakili perbedaan pada tingkat genom. Mikrosatelit adalah salah satu penanda genetik. Mikrosatelit adalah sekuen DNA yang berulang, dimana satu motif mengandung satu sampai enam pasang basa yang diulang secara tandem dalam sejumlah waktu. Saat ini banyak sekali penelitian yang dalam prosesnya melibatkan Penanda mikrosatelit. Informasi tentang keefektifan dan keinformatifan suatu mikrosatelit sangat dibutuhkan untuk membantu para peneliti dalam menentukan Penanda yang sesuai dengan kebutuhan penelitian mereka. Oleh karena itu penelitian bertujuan untuk mengetahui tingkat efektifitas antara mikrosatelit INRA -23 dengan INRA-32.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah kerbau, terdiri dari 16 sampel dari dua populasi kerbau yang berbeda. Penelitian laboratorium dilakukan dengan pendekatan molekuler analisis DNA, meliputi kegiatan isolasi DNA, elektroforesis agarosa, PCR, dan elektroforesis poliakrilamid menggunakan dua macam primer, yaitu INRA-23, dan INRA-32. Data hasil pengamatan berupa pita (*band*) DNA dianalisis menggunakan *GENEPOP ver3.1d option 3-1 dan 3-3*.

Hasil penelitian menunjukkan frekuensi alel pada lokus INRA-23 populasi 2 lebih tinggi dibanding populasi 1, sedangkan frekuensi alel pada lokus INRA-32 populasi 1 lebih tinggi daripada populasi 2. Rerata nilai heterozigositas populasi 1 yang diharapkan lebih tinggi (60%) dibandingkan dengan nilai heterozigositas yang teramati (50%) (tingkat heterozigositas rendah). Sedangkan, rerata nilai heterozigositas populasi 2 yang teramati lebih tinggi (62,5) dari pada nilai heterozigositas yang diharapkan (56%) (tingkat heterozigositas tinggi). nilai polimorfisme (PIC) pada populasi 1 (0,49%) lebih rendah dari pada populasi 2 (0,51%). Dari sini dapat dikatakan bahwa lokus INRA-23 lebih informatif dibanding lokus INRA-32. Tetapi selisih nilai polimorfisme kedua lokus tersebut tidak terlalu tinggi, sehingga keduanya merupakan lokus yang cukup informatif untuk digunakan.

Kata Kunci: *Mikrosatelit, INRA-23, INRA-32.*

PENDAHULUAN

Penanda molekuler didefinisikan sebagai segmen DNA tertentu yang mewakili perbedaan pada tingkat genom. DNA merupakan sumber informasi genetik yang potensial dan akurat. Penanda molekuler ini memiliki keuntungan dibandingkan dengan penanda

morfologi, yaitu stabil dan dapat dideteksi dalam semua jaringan organisme, serta tidak dipengaruhi oleh lingkungan.

Penanda DNA yang ideal memiliki kriteria sebagai berikut: a) memiliki tingkat polimorfisme yang sedang sampai tinggi, b) terdistribusi merata diseluruh genom, c)

memberikan resolusi perbedaan genetik yang cukup, d) pewarisan bersifat kodominan (dapat membedakan kondisi homozigot dan heterozigot dalam organisme diploid), e) berperilaku netral, f) secara teknik sederhana, cepat dan murah, g) butuh sedikit jaringan dan DNA sampel, h) berkaitan erat dengan fenotipe, i) tidak memerlukan informasi tentang genom organisme. j) data mudah dipertukarkan antar laboratorium. Tidak ada satu jenis penanda yang dapat memenuhi semua kriteria tersebut, bagaimana pun juga kita dapat memilih diantara berbagai penanda yang ada dan saling dikombinasikan untuk mencapai semua kriteria tersebut.

Penanda mikrosatelit memiliki nama lain SSR (*simple sequence repeats*), *short tandem repeat* (STR), *variable number tandem repeat* (VNTR) dan *simple sequence length polymorphism* (SSLP). Mikrosatelit adalah sekuen DNA yang berulang, dimana satu motif mengandung satu sampai enam pasang basa yang diulang secara tandem dalam sejumlah waktu (Navascues dan Emerson dalam Zulfahmi 2013). Jika ulangan

tersebut cukup panjang dan tidak terpotong-potong (*uninterrupted*), mereka sangat baik digunakan sebagai penanda genetik karena tingkat polimorfisme mereka yang tinggi (Hancock dalam Zulfahmi 2013).

Saat ini banyak sekali penelitian yang dalam prosesnya melibatkan Penanda mikrosatelit. Informasi tentang keefektifan dan keinformatifan suatu mikrosatelit sangat dibutuhkan untuk membantu para peneliti dalam menentukan Penanda yang sesuai dengan kebutuhan penelitian mereka. Oleh karena itu penelitian bertujuan untuk mengetahui tingkat efektifitas antara mikrosatelit INRA -23 dengan INRA-32.

METODE PENELITIAN

Darah kerbau diambil melalui vena jugularis di leher dengan menggunakan *venoject* dan tabung *vacum*. Tabung yang sudah berisi darah kemudian diberi EDTA dengan perbandingan antara EDTA dan sampel 1:5 agar darah tidak membeku. Darah yang dicampur dengan EDTA kemudian diberi label yang berisi nomor sampel dan lokasi

pengambilan sampel. Darah kemudian disimpan di dalam termos es pada suhu $\pm 2^{\circ}\text{C}$ dan selanjutnya disimpan pada lemari es untuk dipergunakan dalam penelitian laboratorium. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah kerbau, terdiri dari 16 sampel dari dua populasi kerbau yang berbeda.

Penelitian laboratorium dilakukan dengan pendekatan molekuler analisis DNA, meliputi kegiatan isolasi DNA, elektroforesis agarosa, PCR, dan elektroforesis poliakrilamid menggunakan dua macam primer, yaitu INRA-23, dan INRA-32. Kedua penanda tersebut memiliki karakteristik dijelaskan pada Tabel 1.

Tabel 1 Karakteristik Primer Penanda Mikrosatelit INRA-23 dan INRA-32

| | | |
|---------|--|-------------------|
| INRA023 | F 5'-GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTA-3' R 5'-TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C-3' | 56 ⁰ C |
| INRA032 | F 5'-AAA CTG TAT TCT CTA ATA GCT AC-3' R 5'-GCA AGA CAT ATC TCC ATT CCT TT-3' | 56 ⁰ C |

Data hasil pengamatan berupa pita (*band*) DNA dianalisis menggunakan *GENEPOP ver3.1d option 3-1 dan 3-3*. Selain menggunakan *GENEPOP*, dapat pula dianalisis secara manual dengan menggunakan pita (*band*) DNA

produk PCR dengan primer yang ukurannya ditentukan berdasarkan jumlah pasangan basa (bp) dan dicari nilai rata-rata, kemudian dari hasil rata-rata dideskripsikan bagaimana gambaran pola DNA kerbau.

a. Menghitung Frekuensi Alel

Frekuensi alel setiap lokus, dapat dihitung dengan rumus:

$$f(A) = \frac{A}{2n}$$

dimana :

f(A) = frekuensi alel ke -i

A = jumlah alel ke -i dalam lokus

N = jumlah individu yang diteliti

(Hartl, 1998)

b. Menghitung Nilai Heterozigositas

Nilai heterozigositas dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut.

$$h = \frac{n}{n-1} (1 - \sum_{k=1}^K P_i^2)$$

dimana :

h = heterozigositas lokus

P(i) = frekuensi alel lokus ke - i

n = jumlah individu sampel (Renwick, 2001)

c. Menghitung Nilai Polimorfisme (PIC) dalam setiap lokus

Adapun rumusnya, yaitu:

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

dimana :

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

k = jumlah alel (Meta et al, 2004)

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Analisis data frekuensi alel lokus mikrosatelit INRA-23 dan INRA-32 pada populasi 1 dan populasi 2 dapat dilihat pada Tabel 2 berikut.

1) Frekuensi Alel

Tabel 2. Frekuensi Alel Pada Kerbau Populasi 1 dan Populasi 2

| Lokus | Alel (<i>base pair</i>) | Populasi 1 | Populasi 2 |
|---------|---------------------------|------------|------------|
| INRA-23 | 50 | 0,13 | 0,13 |
| | 60 | 0,13 | 0,31 |
| | 70 | 0,75 | 0,44 |
| | 80 | 0,00 | 0,13 |
| INRA-32 | 50 | 0,00 | 0,81 |
| | 90 | 0,44 | 0,19 |
| | 100 | 0,25 | 0,00 |
| | 120 | 0,31 | 0,00 |

Dari hasil analisis diketahui bahwa lokus INRA-23 dan INRA-32 yang digunakan pada sampel kerbau memiliki 4 alel. Analisis data frekuensi alel menunjukkan pada

lokus INRA-23 populasi 2 lebih tinggi dibanding populasi 1. Sedangkan frekuensi alel pada lokus INRA-32 populasi 1 lebih tinggi daripada populasi 2.

2) Heterozigositas

Perhitungan nilai heterozigositas menggunakan data

frekuensi alel yang ada pada tabel 2. Hasil perhitungan disajikan pada Tabel 3 berikut.

Tabel 3. Nilai Heterozigositas Setiap Populasi Kerbau

| Lokus | Populasi 1 | | Populasi 2 | |
|---------|-----------------------|------------------------|------------|-----------|
| | Obs. Het ¹ | Expc. Het ² | Obs. Het | Expc. Het |
| INRA-23 | 50% | 46% | 87,5% | 77% |
| INRA-32 | 50% | 74% | 37,5% | 35% |
| Rerata | 50% | 60% | 62,5% | 56% |

Keterangan:

¹*Observed Heterozygosity* (Heterozigositas yang Teramati)

²*Expected Heterozygosity* (Heterozigositas yang Diharapkan)

Analisis data nilai heterozigositas pada kerbau populasi 1 memiliki nilai heterozigositas yang teramati masing-masing lokus, yakni 50% dengan nilai rata-rata 50%. Pada kerbau populasi 2 memiliki nilai heterozigositas yang teramati 87,5% dan 37,5% pada setiap lokus dengan nilai rata-rata lebih tinggi dari populasi 1, yaitu 62,5%. Rerata nilai heterozigositas populasi 1 yang diharapkan lebih tinggi dibandingkan dengan nilai heterozigositas yang

teramati (tingkat heterozigositas rendah). Sedangkan, rerata nilai heterozigositas populasi 2 yang teramati lebih tinggi dari pada nilai heterozigositas yang diharapkan (tingkat heterozigositas tinggi).

3) *Polymorphism Information Content (PIC)*

Polimorfisme dapat diketahui dengan menghitung nilai PIC. Hasil perhitungan nilai PIC disajikan pada Tabel 4 berikut.

Tabel 4. Nilai PIC Pada Setiap Populasi Kerbau

| Lokus | Populasi 1 | Populasi 2 | Rerata |
|---------|------------|------------|--------|
| INRA-23 | 0,40 | 0,65 | 0,53 |
| INRA-32 | 0,57 | 0,36 | 0,47 |
| | 0,49 | 0,51 | |

Berdasarkan Tabel 4 diatas nilai PIC berada pada rentangan 0,36 sampai dengan 0,57. Pada populasi 1, nilai PIC tertinggi pada lokus INRA032. Pada populasi 2, nilai PIC

tertinggi diperoleh dari lokus INRA-23. Lokus INRA-23 memiliki nilai PIC lebih tinggi yaitu 0.53 dari pada lokus INRA-32 yaitu sebesar 0,47. Nilai polimorfik (PIC) menunjukkan

baha tingkat polimorfisme lokus INRA-23 (0,53%) lebih tinggi dibandingkan dengan INRA-32 (0,47%). Dari sini dapat dikatakan bahwa lokus INRA-23 lebih informatif dibanding lokus INRA-32. Tetapi selisih nilai polimorfisme kedua lokus tersebut tidak terlalu tinggi, sehingga keduanya merupakan lokus yang cukup informatif untuk digunakan.

Sedangkan, nilai polimorfisme (PIC) pada populasi 1 (0,49%) lebih rendah dari pada populasi 2 (0,51%). Hal ini berbanding lurus dengan perhitungan nilai heterozigositas. Lestari 2013 mengungkapkan bahwa nilai heterozigositas akan selalu berbanding lurus dengan nilai PIC. Nilai informasi polimorfik berbanding lurus dengan jumlah alel dalam setiap lokusnya, semakin tinggi jumlah alel, maka nilai informasi polimorfik juga semakin tinggi. Tingginya polimorfisme dari suatu populasi bisa diartikan bahwa variasi alel serta sifat spesifik dari populasi juga cukup tinggi. Lokus yang polimorfik menggambarkan adanya heterozigositas dalam suatu individu (Riyanto 2010).

KESIMPULAN

1. Ada perbedaan nilai frekuensi alel kerbau pada kedua lokus (INRA-23 dan INRA-32). Variasi genetik kerbau populasi 2 lebih tinggi dibanding populasi 1 pada lokus INRA-23, dan variasi genetik populasi 1 lebih tinggi dibanding populasi 2 pada lokus INRA-32.
2. Ada perbedaan tingkat heterozigositas pada kerbau populasi 1 dan kerbau populasi 2. Kerbau populasi 2 memiliki tingkat heterozigositas lebih tinggi (62,5%) dibanding dengan kerbau populasi 1 (50%).
3. Ada perbedaan tingkat polimorfisme pada lokus INRA-23 dan INRA-31. Tingkat polimorfisme lokus INRA-23 (0,53%) lebih tinggi dibanding dengan INRA-32 (0,47%). Dari sini dapat dikatakan bahwa lokus INRA-23 lebih informatif dibanding lokus INRA-32.

DAFTAR RUJUKAN

- Anantyarta, P. 2013. Identifikasi Variasi Genetik Kerbau (*Bubalus bubalis*) Pacitan dan Tuban Berbasis Mikrosatelit untuk Pengembangan Multimedia pada Matakuliah Teknik Analisis Biologi

- Molekuler di Universitas Negeri Malang. Tesis tidak diterbitkan. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Borghese, A. 2005. Buffalo Production and Research. Roma: Istituto Sperimentale Per La Zootechnia.*
- Dudi, 2007. Peningkatan Produktivitas Kerbau Lumpur (Swamp Buffalo) di Indonesia melalui Kegiatan Pemuliaan Ternak Berkelanjutan (Online), (http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&sqi=2&ved=0CFAQFjAG&url=http%3A%2F%2Fwww.nuffieldbioethics.org%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2FGM%2520crops%2520%2520full%2520report.pdf&ei=7WHjUejpL8TwrQfl_YGoDw&usg=AFQjCNFJ_ezNEIF3D4bL4vIviHQFNmWKew&bvm=bv.48705608,d.bmk), diakses Juli 2013).*
- Fatchiyah. 2011. Biologi Molekular - Prinsip Dasar Analisis. Jakarta: Penerbit Eelangga.
- Hasinah, H., & Handiwirawan, E. 2010. Keragaman Genetik Ternak Kerbau di Indonesia. Makalah disajikan dalam Lokakarya Nasional Usaha Ternak Kerbau Mendukung Program Kecukupan Daging Sapi. Bogor 2006.
- Hardjosubroto, W. 1994. Aplikasi Pemuliaan Ternak di Lapangan. Jakarta: Gramedia.
- Junitia, F. A.N. 2008. Studi Craniometrics Dan Pendugaan Jarak Genetik Kerbau Sungai, Rawa Dan Silangannya Di Sumatera Utara. (online) (<http://www.google.co.id/>), diakses pada 01 Juli 2014.
- Juwita, S.A., & Anggraeni, A. 2008. Karakterisasi Morfologi dan Estimasi Jarak Genetik Kerbau Rawa, Sungai (Murreh) dan Silangannya di Sumatera Utara. Seminar dan Lokakarya Nasional Usaha Ternak Kerbau 2008. (online) (<http://peternakan.litbang.deptan.go.id>), diakses pada 01 Juli 2013.
- Kabar Lumajang. 2013. Budaya Kerapan Kerbau Belum Jadi Perhatian Pemerintah Lumajang. Kabar Lumajang, (online), (www.kabarlumajang.net), diakses pada tanggal 09 Oktober 2013.
- Katalog BPS. 2013. Angka Sementara Hasil Sensus Pertanian 2013. Badan Pusat Statistik Kabupaten Lumajang.
- Leksono, A.S. 2013. Keanekaragaman Hayati. UB Press
- Lestari, F. 2013. Identifikasi Variasi Genetik Kerbau (Bubalus bubalis) Lokal Sumatera Selatan Berbasis Mikrosatelit Sebagai Pengembangan Media Interaktif Untuk Pembelajaran Teknik Analisis Biologi Molekuler Di Universitas Negeri Malang.

- Tesis tidak diterbitkan. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Memo Timur Biro Lumajang. 2013. Populasi Kerbau Lumajang Terbaik se-Jatim. Memo Tiur Biro Lumajang, (online), (memobirolmj.blogspot.com), diakses pada 09 Oktober 2013.
- Mirhabibi, S., Manafiazar, G.H., Qaravisi, S.H. & Mahmoodi, B. 2007. *Inbreeding and its effect on some productive traits in buffaloes of South Iran*. Journal Animal Science, Vol 06 (suppl, 2): 372-374.
- Mufidah, N., Nur, I. M., & Nugroho, H. *Tanpa Tahun. Produktivitas Induk Kerbau Rawa (Bubalus bubalis carabanesis) Ditinjau Dari Aspek Kinerja Reproduksi dan Ukuran Tubuh di Kecamatan Tempursari Kabupaten Lumajang*. Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya.
- Murti, 2002. *Ilmu Ternak Kerbau*. Yogyakarta: Kanisius.
- Navani, N., Jain, P.K., Gupta, S., Sisodia, B.S. & Kumar, S. 2001. *A Set of cattle microsatellite DNA Penandas for genome analysis of riverine buffalo (Bubalus bubalis)*. Animal Genetics, Vol 33: 149-154.
- Puslitbangnak. 2013. *Estimasi Jarak Genetik Kerbau Rawa Lokal Melalui Pendekatan Analisis Morfologi*. (online), (<http://peternakan.litbang.deptan.go.id>), diakses pada 01 Juli 2014.
- Riyanto. 2010. *Identifikasi Variasi Genetik Kerbau Lokal Jawa Timur (Bubalus Bubalis) dari Wilayah yang Berbeda berbasis Mikrosatelit sebagai Pengembangan Bahan Ajar Mata Kuliah Genetika*. Tesis tidak diterbitkan.
- Sadiman A., Rahardjo R., Haryno A., & Rahardjito. 2008. *Media Pembelajaran*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Sensus Pertanian. 2013. *Angka Sementara Hasil Sensus Pertanian 2013*. Badan Pusat Statistik Kabupaten Lumajang.
- Sukri, A. 2011. *Identifikasi Variasi Genetik Kerbau Lokal (Bubalus Bubalis) Lombok Tengah Nusa Tenggara Barat, Berbasis Mikrosatelit sebagai Bahan Ajar Mata Kuliah Genetika*. Tesis tidak diterbitkan. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Sulandari, S. & Zein, M.S.A. 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bogor: Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indoneia.
- Sutanto, Arif Dwi. 2013. *Perancangan Aplikasi Edukasi "Smart Brain Kids" Berbasis Android Sebagai Media Pembelajaran untuk Anak Usia Dini*. Naskah

- Publikasi. Sekolah tinggi manajemen informatika dan komputer Amikom Yogyakarta.
- Thiagarajan, S. Semmel, D. S & Semmel, M. I. 1974. *Instructional Development For Training Teachers Of Exceptional Children*. Indiana: Morana University.
- Tim Penyusun. 2011. *Buku Petunjuk teknis Pelaksanaan Praktikum*. Program Studi S1 Agribisnis FMIPA-UT.
- Triwulaningsih, E. 2008. *Kerbau Sumber Daging dan Susu, Mungkinkah?*, (Online), (<http://www.pustaka-deptan.go.id/publikasi-wr274055.pdf>), diakses 10 Maret 2010).
- Winaya, A. 2008. *Petunjuk Praktikum Bioteknologi Peternakan*. Malang: Pusat Pengembangan Bioteknologi, Universitas Muhammadiyah Malang.
- Zulfahmi. 2013. *Penanda DNA Untuk Analisis Genetik Tanaman*. *Jurnal Agroteknologi*. Vol. 3 No. 2 41-51.