

# Keragaman Genetik Gen Penyandi Protein ( $\kappa$ -Cn) pada Sapi Friesian Holstein Menggunakan Teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism*

(Genetic Diversity of  $\kappa$ -Casein Gene of Friesian-Holstein Dairy Cattle using Restriction Fragment Length Polymorphism Technique)

Rini Widayanti<sup>1\*</sup>, Wayan Tunas Artama<sup>1</sup>, Slamet Subagyo<sup>1</sup> dan Djoko Winarso<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta*

<sup>2</sup> *Sekolah Tinggi Penyuluh Pertanian, Magelang*

**ABSTRACT:** The objective of the research was to evaluate the genetic varieties of  $\kappa$ -casein gene of Holstein Friesian (HF) in *Koperasi Unit Desa* (KUD) Karangploso, Dau, Ngantang and Pujon, Malang, East Java by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (PCR-RFLP) used Pst-I. The research used Holstein Friesian dairy cows raised by farmers of KUD Karangploso, Dau, Ngantang and Pujon, Malang, East Java. The blood samples were collected from 29 cows. The research activities were carried out by collecting cow's blood, DNA extraction, and DNA amplification with PCR. PCR products were digested with Pst-I enzyme restrictions, then allele gene of  $\kappa$ -casein were identified. The frequency of allele and genotype of  $\kappa$ -casein gene were calculated by Hardy-Weinberg. The results showed that cows raised by farmers of KUD Karangploso, Dau, Ngantang and Pujon, Malang, East Java had two alleles  $\kappa$ -casein polymorphism, i.e. allele A (0.74) and B (0.26); therefore, two genotypes existed including AA (0.55) and AB (0.38). It can be concluded that genetic diversity  $\kappa$ -casein gene existed in Holstein-Friesian dairy cows raised by farmers of KUD Ngantang, Pujon, Dau and Karangploso, Malang, East Java.

**Key Words:** Pst-I,  $\kappa$ -casein gene, PCR-RFLP

## Pendahuluan

Gen  $\kappa$ -casein sudah banyak diteliti pada sapi-sapi perah di luar negeri untuk tujuan mengetahui kandungan protein casein dalam susu. Sampai saat ini, sudah ditemukan 6 varian gen  $\kappa$ -casein, yaitu A, B, C, E, F dan G (Kaminski, 1996). Banyak penelitian menunjukkan bahwa adanya variasi genetik gene  $\kappa$ -casein sangat dirasakan pengaruhnya oleh pabrik-pabrik pengolahan susu, terutama untuk pabrik yang memproduksi keju. Menurut Rahali dan Menard (1991) dan Tsiasar *et al.* (2005), susu dari sapi yang memiliki varian B terlihat memiliki kandungan dan jumlah protein yang lebih tinggi daripada sapi dengan varian A.

Varian yang ada pada gen  $\kappa$ -casein disebabkan oleh adanya *point mutation* (mutasi titik) sehingga bisa dikembangkan uji diagnostik diantara varian yang ada, salah satunya yaitu dengan teknik *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) (Denicourt *et al.*, 1990; Schlee dan Rotman, 1992).

Enzim restriksi yang dapat digunakan untuk evaluasi menggunakan teknik PCR-RFLP antara lain Hind-III, Hinf-I, Hae-III, Mae-II dan Pst-I (Barroso *et al.*, 1998).

Berdasarkan penemuan-penemuan tersebut, perlu dilakukan penelitian mengenai berbagai polimorfisme genetik pada sapi perah rakyat. Hasil penelitian diharapkan bermanfaat sebagai dasar seleksi atau perbaikan mutu genetik, secara lebih efisien dan efektif dalam meningkatkan kinerja sapi perah rakyat melalui pemilihan genotip yang sesuai. Tujuan penelitian adalah mengkaji keragaman genetik gen penyandi protein susu kappa-Cn sapi perah FH di KUD Ngantang, Pujon, Dau dan Karang Ploso Malang - Jawa Timur dengan teknik *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP).

## Metode Penelitian

Pada penelitian ini digunakan 29 sampel darah sapi perah berasal dari peternakan rakyat milik KUD Ngantang, KUD Pujon, KUD Dau, KUD Karang Ploso Malang-Jawa Timur.

\* Korespondensi penulis : e-mail [riniwida@yahoo.co.uk](mailto:riniwida@yahoo.co.uk)

Primer untuk amplifikasi gen  $\kappa$ -casein yaitu kappaf0 (5' CGCTGTGAGAAAGATGAAAGAT TC 3') dan kappare (5' AGATTCAAGGAGTA TACCAATTGTTG 3') (Chikuni *et al.*, 1991). Enzim restriksi untuk digesti menggunakan Pst-I.

### Ekstraksi DNA

Preparasi sampel darah mengikuti metode Duryadi (1993). Darah sebanyak 500-750  $\mu$ l ditambah 1X volume larutan lisis {0,32M Sucrose, 1% (V/V) Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub> dan 10 mM Tris-HCl, pH 7,4}. Organel sel dalam larutan diendapkan dengan sentrifugasi 6500 rpm selama 1 menit. Endapan ditambah dengan 1X volume larutan pencuci (75 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Darah selanjutnya ditambah dengan *digestion buffer* (larutan STES + 0,5 mg/ml Proteinase K), kemudian diinkubasi pada penangas air suhu 55°C selama  $\pm$ 16 jam atau semalam. Purifikasi DNA Total mengikuti Sambrook *et al.* (1989) dimodifikasi Duryadi (1993), yaitu dengan penambahan fenol; kloroform/isoamil alkohol (24:1). Setelah itu DNA dipresipitasi dengan etanol absolut dan dicuci menggunakan alkohol 70%. DNA dilarutkan dalam larutan TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0), kemudian disimpan pada suhu -20°C.

### Amplifikasi Fragmen DNA dengan PCR.

Komposisi 50  $\mu$ l campuran pereaksi PCR terdiri dari 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 100-300 ng DNA cetakan, 20-100 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq polimerase* (Generay) beserta bufernya. Amplifikasi fragmen DNA pada penelitian ini menggunakan mesin GeneAmp<sup>R</sup>PCR system 2400 (*Perkin Elmer*). Amplifikasi PCR gen  $\kappa$ -casein dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 2 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik untuk denaturasi, 56°C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72°C selama 1 menit untuk pemanjangan (*elongation*) sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri dengan penambahan pemanjangan (*extension*) selama 5 menit pada 72°C.

### Digesti Produk PCR.

Produk PCR didigesti dengan enzim restriksi Pst-I (Chikuni *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1994). Penentuan genotip sampel DNA dilakukan dengan menganalisis fragmen DNA hasil digesti yaitu dengan metode elektroforesis gel agarose 1,5% yang mengandung etidium bromide dengan bantuan sinar UV.

### Analisis Data.

Hasil elektroforesis dianalisis secara manual dan alel-alel yang diperoleh kemudian dihitung frekuensi alel dan genotipnya, dengan metode Hardy-Weinberg (Dorak, 2007)) sebagai berikut:

#### Frekuensi Alel

$$\text{Frekuensi alel A} = p = f(\text{AA}) + \frac{1}{2} f(\text{AB})$$

$$\text{Frekuensi alel B} = q = f(\text{BB}) + \frac{1}{2} f(\text{AB})$$

#### Frekuensi Genotip

$$\text{Frekuensi AA} = f(\text{AA}) = p^2$$

$$\text{Frekuensi AB} = f(\text{AB}) = 2pq$$

$$\text{Frekuensi BB} = f(\text{BB}) = q^2$$

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

## Hasil dan Pembahasan

### Amplifikasi Gen $\kappa$ -Casein

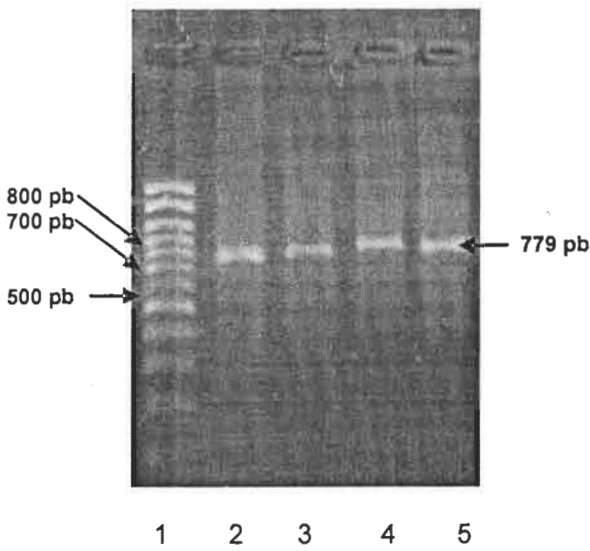
Amplifikasi daerah gen  $\kappa$ -casein pada sapi perah menggunakan primer Kappare dan Kappaf0 menghasilkan fragmen DNA berukuran sekitar 779 pb pada semua sampel DNA. Profil DNA hasil amplifikasi primer tersebut disajikan pada Gambar 1. Ukuran fragmen DNA yang diperoleh sesuai dengan data sekuen DNA sapi *Friesian Holstein* (*GenBank*, AY380228).

### Digesti Gen $\kappa$ -Cn dengan Pst-1

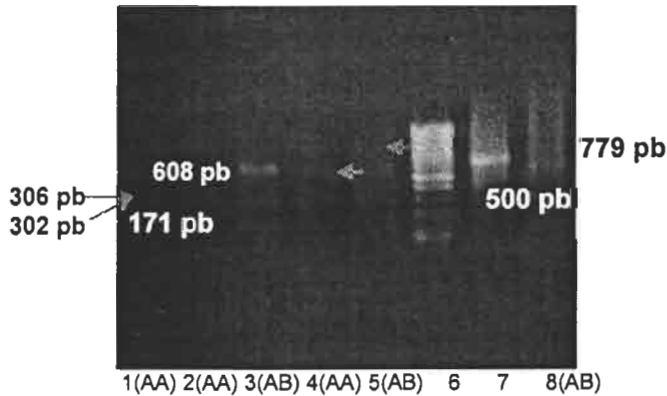
DNA hasil amplifikasi (Gen  $\kappa$ -Cn) selanjutnya didigesti menggunakan enzim restriksi Pst-1. Profil DNA hasil digesti menggunakan enzim restriksi Pst-1 disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan sekuen DNA sapi *Friesian Holstein* (*GenBank*, AY380228) enzim Pst-1 akan memotong fragmen DNA menjadi 171 pb dan 608 pb untuk sapi yang memiliki alel B, dan terpotong menjadi 171 pb, 302 pb dan 306 pb untuk sapi dengan alel A. Skema letak pemotongan enzim restriksi Pst-1 disajikan pada Gambar 3.

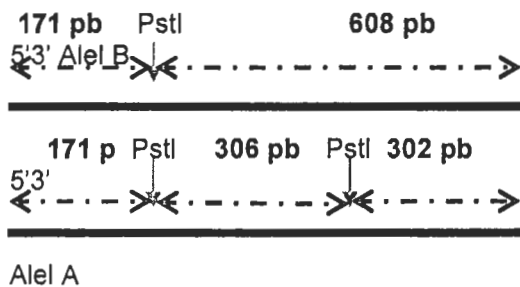
Hasil PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi Pst-1 ditemukan alel A dan B. Hal ini terlihat dari hasil elektroforesis pada gel agarose seperti terlihat pada Gambar 2. Alel A pada PCR-RFLP yang menggunakan enzim Pst-1 (sama dengan genotip AA) DNA terpotong menjadi fragmen berukuran 306 pb, 302 pb dan 171 pb, alel B DNA terpotong menjadi 608 pb dan 171 pb. Genotip AB, DNA terpotong menjadi 608 pb, 306 pb, 302 pb dan 171 pb.



Gambar 1. Profil DNA sapi perah PFH hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer Kappafo dan Kappare  
Keterangan: Lajur 1. DNA penanda 100 pb (*Generay*), lajur 2-5 DNA hasil amplifikasi menggunakan primer Kappafo dan Kappare



Gambar 2. Hasil PCR-RFLP DNA sapi perah PFH menggunakan enzim restriksi *Pst*-I pada gel agarose 1,5%  
Keterangan: Lajur 1-2,3,4,8. Hasil PCR-RFLP dengan *Pst*-I, Lajur 6. DNA penanda 100 pb (*Generay*), Lajur 7. Hasil PCR



Gambar 3. Skema letak pemotongan enzim restriksi *Pst*-I pada fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan sepasang primer Kappafo dan Kappare

Pada penelitian ini, dari masing-masing KUD terdapat keragaman genetik pada sampel sapi PFH yang digunakan. Adapun polimorfisme genotip dan jumlah alel yang ditemukan dapat dilihat berturut-turut pada Tabel 1 dan Tabel 2. Hasil PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *Pst*-I pada semua sampel penelitian ini terlihat adanya polimorfisme pola pemotongan, hal ini menunjukkan bahwa terdapat polimorfisme alel pada sapi tersebut. Alel A dan B yang diperoleh sesuai dengan yang telah dilakukan Schellander *et al.* (1993). Frekuensi dari masing-masing alel A dan B dan frekuensi harapan genotip AA, AB dan BB pada sapi di KUD Karangploso, Dau, Pujon dan Ngantang disajikan pada Tabel 3.

Tabel 1. Polimorfisme genotip yang ditemukan

KUD	Genotip ( <i>Pst</i> -1)			Jml	Total
	AA	BB	AB		
Karang Ploso	0,80	0	0,20	1	10
Dau	0,33	0	0,67	1	6
Ngantang	0,50	0	0,50	1	6
Pujon	0,14	0	0,86	1	7
Total	14	0	15		29

Tabel 2. Jumlah alel yang ditemukan

KUD	Alel ( <i>Pst</i> -1)		Total
	A	B	
Karang Ploso	18	2	20
Dau	8	4	12
Ngantang	9	3	12
Pujon	8	6	14
Total	43	15	58

Tabel 3. Frekuensi alel A dan B; Frekuensi harapan genotip AA, AB dan BB

KUD	Frekuensi Alel		Frekuensi harapan genotip			Jml	Jml*
	A	B	AA	AB	BB		
Karang Ploso	0,90	0,10	0,81	0,18	0,01	1	0,99
Dau	0,67	0,33	0,32	0,49	0,18	1	0,81
Ngantang	0,57	0,43	0,56	0,38	0,06	1	0,94
Pujon	0,75	0,25	0,45	0,44	0,11	1	0,89

\* jumlah frekuensi genotip AA + AB + BB yang sebenarnya pada masing-masing KUD karena pada penelitian ini tidak ditemukan adanya genotip BB.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa frekuensi alel A lebih besar daripada frekuensi alel B, berarti bahwa kebanyakan induk maupun pejantan PFH memiliki alel A. Data yang disajikan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa semua sapi betina PFH dari keempat KUD tersebut tidak ada yang bergenotip BB dan hanya bergenotip AA dan AB. Secara keseluruhan dari ke empat KUD tersebut frekuensi alel A sebesar 0,74 dan frekuensi alel B sebesar 0,26, sedangkan frekuensi genotip AA sebesar 0,55, genotip AB sebesar 0,38 dan frekuensi genotip BB sebesar 0,00. Menurut perhitungan hukum Hardy-Weinberg frekuensi genotip BB adalah sebesar 0,07, tetapi pada penelitian ini tidak ditemukan sapi yang bergenotip BB. Hal ini kemungkinan disebabkan jumlah data yang sedikit atau mungkin disebabkan karena asal-usul sapi yang dipelihara di ke empat KUD tersebut bukan merupakan perkawinan di dalam populasi sehingga tidak ditemukan genotip BB di dalam populasi.

Menurut Hukum Hardy-Weinberg jumlah frekuensi genotip AA + AB + BB adalah 1, tetapi pada penelitian ini untuk masing-masing KUD adalah < 1 (Tabel 3.). Hal ini diduga karena tidak ditemukan adanya genotip BB, meskipun hasil yang diperoleh masih mendekati hukum Hardy-Weinberg.

Menurut Rahali dan Menard (1991) serta Tsiaras *et al.* (2005), susu dari sapi yang bervariasi B memiliki kandungan dan jumlah protein yang lebih tinggi daripada sapi dengan varian A. Oleh karena itu, upaya untuk memperbaiki kualitas protein susu pada peternakan sapi rakyat di KUD Malang - Jawa Timur perlu dipertimbangkan melakukan seleksi terhadap induk betina maupun pejantan yang memiliki alel B atau memiliki genotip BB.

## Kesimpulan

Terdapat keragaman genetik pada sapi PFH di empat KUD dengan frekuensi alel A sebesar 0,74 dan frekuensi alel B sebesar 0,26. Frekuensi genotip AA sebesar 0,55; AB sebesar 0,38 dan frekuensi genotip BB sebesar 0,00. Teknik PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi Pst-I dapat digunakan untuk mendeteksi adanya alel A dan B pada gen  $\kappa$ -casein sapi perah.

## Daftar Pustaka

Barroso, A., S. Dunner and J. Canon, 1998. Technical note: Detection of bovine kappa-casein variants A,

B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Journal of Animal Science* 76: 1535-1538.

Chikuni, K., S. Kageyama, T. Koishikawa, S. Kao and K. Ozutsumi, 1991. Identification of bovine  $\kappa$ -casein genotype using polymerase chain reaction method. *Animal Science and Technology (Jpn)* 62: 654-659.

Denicourt, G., M.P. Sabour and A.J. McAllister, 1990. Detection of bovine  $\kappa$ -casein genomic variants by the polymerase chain reaction method. *Animal Genetic* 21: 215-216.

Dorak, M.T, 2007. Basic Population Genetics. <http://www.dorakmt.tripod.com/evolution/popgen.html> (Diakses tanggal 19 Juli 2007).

Duryadi, D., 1993. Rôle Possible du Comportement dans l'évolution de Deux Souris *Mus macedonicus* et *Mus spicilequs* en Europe Centrale. [Thèse Doctorat]. Univ. Montpellier II, France.

Kaminski, S., 1996. Bovine kappa-casein (CASK) gene-molecular nature and application in dairy cattle breeding. *Journal of Applied Genetic* 37: 179-196.

Rahali, V. and J.L. Menard, 1991. Influence of genetic variants of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein on milk composition and cheesemaking properties. *Lait* 71: 275-297.

Sambrook, F.J. and T. Maniatis, 1989. Molecular Cloning. *A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory.

Schlee, P. and O. Rotmann, 1992. Identification of bovine kappa-casein C by using the polymerase chain reaction. *Journal of Animal Breeding & Genetics* 109: 153-155.

Schellander, K., B. Mayr, K. Ertl and J. Peli, 1993. Simultaneous genotyping of sex and kappa-casein of bovine in vitro fertilized embryos by the PCR technique. *Zentralbl Veterinarmed A.40(4)*: 307-309.

Tsiaras, A.M., G.G. Bargouli, G. Banos and C.M. Boscos, 2005. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of holstein cows. *Journal of Dairy Science* 88: 327-334.

Yamamoto, T., K. Shimada, M. Takahashi, and M. Kosugiyama, 1994. Genotype effect of  $\kappa$ -Casein on milk performance in Japanese Black Cows. *Journal of Animal Science of Technology (Jpn)* 65(12): 1119-1121.