

IDENTIFIKASI POLIMORFISME PADA DOMBA EKOR TIPIS BERDASARKAN TIPE KELAHIRANNYA MENGGUNAKAN ENZIM BFOI

Fauzia Sani^{1*}, Ning Setiati¹

¹Program Studi Biologi, Instansi/Universitas Negeri Semarang, Kota Semarang

*Penulis korespondensi: fauziasani22@gmail.com

ABSTRAK

Domba ekor tipis merupakan komoditas ternak yang banyak dibudidayakan oleh peternak sebagai penghasil daging. Domba ekor tipis juga memiliki beberapa keunggulan seperti mudah beradaptasi dengan lingkungan dan memiliki sifat prolifik atau melahirkan beberapa anakan dalam satu kali kelahiran. Hal ini dapat menunjang kebutuhan pangan daging yang ada di Indonesia. Oleh karena itu, meninjau dari peluang yang dimiliki oleh domba ekor tipis diperlukan adanya seleksi melalui deteksi polimorfisme terhadap induk unggul untuk meningkatkan mutu ternak menggunakan metode PCR-RFLP. Metode ini dipilih karena memiliki akurasi yang tinggi serta kecepatan dan ketepatannya. Sampel berupa darah domba diisolasi dan dilanjutkan ke tahapan amplifikasi yang menghasilkan sekuens DNA dengan panjang 600 pasang basa. Metode dilanjutkan ke RFLP menggunakan enzim restriksi BfoI untuk mendeteksi ada tidaknya polimorfisme. Sampel yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam menghasilkan fragmen DNA yang terpotong menjadi beberapa bagian dan memiliki kenampakan yang berbeda. Secara keseluruhan, penelitian ini telah berhasil menggunakan enzim restriksi BfoI untuk mendeteksi polimorfisme yang ada pada domba ekor tipis tetapi tidak memiliki keterkaitan atau ciri khusus berdasarkan tipe kelahirannya.

Kata kunci: Polimorfisme, domba ekor tipis, PCR-RFLP, enzim restriksi BfoI

1 PENDAHULUAN

Dari tahun ke tahun, permintaan kebutuhan daging semakin meningkat sebab didukung oleh bertambahnya populasi masyarakat, Hal ini memiliki dampak berupa bertambahnya kebutuhan dan permintaan masyarakat, salah satunya adalah kebutuhan pangan berupa daging. Kenaikan jumlah permintaan daging di Indonesia juga dipengaruhi oleh adanya perayaan hari raya maupun kebutuhan keagamaan.

Di Indonesia terdapat beberapa macam hewan ternak yang dibudidayakan guna memenuhi kebutuhan pangan masyarakat, salah satunya adalah domba. Domba cenderung ditanakkan oleh banyak peternak karena beberapa keuntungannya, seperti mudah beradaptasi dengan lingkungan (Najmuddin *et al.*, 2019). Jenis domba lokal yang banyak ditanakkan ialah domba ekor tipis, yang merupakan domba asli Indonesia. Keuntungan dari domba ini adalah toleran terhadap lingkungan, tidak sensitif dan memiliki toleransi luas terhadap pakan yang diberikan, serta dagingnya yang tidak begitu berbau prengus. Selain itu, domba ekor tipis juga memiliki kecenderungan kesuburan yang tinggi serta potensi sifat prolifik, yaitu melahirkan dua anakan sekaligus. Sifat ini sangat menguntungkan peternak dan konsumen, dimana bisa didapatkan anakan lebih dari satu dalam sekali waktu kelahiran.

Penandaan terhadap induk yang memiliki sifat unggul dapat dilakukan secara molekuler, didasari oleh beberapa keuntungannya seperti lebih sensitif, tepat, dan cepat (Khariri *et al.*, 2020). Hal-hal yang dijadikan fokus pemahaman pada pendekatan molekuler umumnya meliputi isolasi DNA, amplifikasi, dan restriksi. Pada proses isolasi DNA, sampel berupa darah

atau jaringan diproses dan dimurnikan agar DNA saja yang didapat. Tahapan isolasi DNA umumnya terdiri dari tahap lisis sel, ekstraksi, dan presipitasi (Buchori *et al.*, 2023). Setelah melalui tahapan isolasi, sudah didapatkan DNA murni yang bisa digunakan untuk berbagai macam analisis, salah satunya yaitu amplifikasi. Amplifikasi merupakan tahapan pemanjangan untai DNA pada situs tertentu menggunakan enzim *taq polymerase* dan diawali dengan penempelan primer dan mengubungkan *deoxyribonucleotide triphosphate* (dNTP) dalam siklus dan suhu tertentu (Yustinadewi *et al.*, 2018). Setelah diamplifikasi, DNA kemudian dipotong menggunakan enzim restriksi untuk diamati ada tidaknya polimorfisme. Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah BfoI, yang mana telah banyak digunakan para peneliti dalam menganalisis gen IGF-1, seperti pada penelitian Malewa & Awaluddin (2018), Bakhtiar *et al.* (2017), serta He *et al.* (2012). Situs pemotongan dari enzim ini adalah 5' R G C G C ↓ Y 3' dan memiliki suhu optimum pada 37° Celcius.

Gen yang bisa menjadi kandidat terhadap kualitas dan mutu reproduksi ialah gen IGF-1. Bakhtiar *et al.* (2017) menyatakan bahwa gen tersebut termasuk dalam kategori faktor pertumbuhan yang penting dan berperan dalam berbagai proses fisiologis, termasuk reproduksi, perkembangan janin, dan pertumbuhan. Polimorfisme adalah variasi genetik yang terjadi pada seorang individu. Variasi ini dapat menyebabkan adanya perbedaan di antara individu-individu dalam spesies yang sama. Polimorfisme dari gen IGF-1 telah dilaporkan memiliki pengaruh baik pada pertumbuhan dan sifat reproduksi (Li *et al.*, 2021). Berdasarkan penelitian oleh Bakhtiar *et al.* (2017), He *et al.* (2012), dan Malewa&Awaluddin (2018), digunakan enzim BfoI untuk memotong pita DNA yang telah ditargetkan pada gen IGF-1. Hal ini menandakan bahwa enzim BfoI sudah dipakai secara luas pada penelitian yang membahas terkait polimorfisme pada gen IGF-1. Sampai saat ini belum ada penelitian secara molekuler terhadap domba ekor tipis, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme dari domba ekor tipis berdasarkan tipe kelahirannya melalui pendekatan molekuler menggunakan enzim BfoI.

2 METODE

2.1 Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah diambil dari 12 domba peternakan Subuh Jaya Farm, Gunung Pati, Kota Semarang. Pengambilan sampel didasarkan pada tipe kelahiran domba beserta anaknya. Sampel dinamai dengan kode D1, D2, D3, untuk indukan yang melahirkan kembar dan D1_A, D2_A, D3_A untuk anakan dari indukan tadi. Pada sampel indukan yang melahirkan kembar diberi kode D4 dan D5 serta D4_A, D4_B, D5_A, dan D5_B untuk anaknya. Sebanyak 3ml sampel diambil dari vena jugularis menggunakan spuit dan disimpan dalam tabung *vacutainer* EDTA serta didinginkan untuk mencegah kerusakan sampel.

2.2 Isolasi DNA

Sebanyak 200µL sampel darah yang telah disimpan dalam tabung *vacutainer* diisolasi menggunakan TIANamp Genomic DNA Kit. Isolat DNA kemudian dielektroforesis dalam agarosa 0,8%.

2.3 Amplifikasi

Isolat DNA diambil sebanyak 5 µL dan dicampurkan dengan *cocktail* PCR sebanyak 20 µL yang terdiri dari 1 µL primer forward, 1 µL primer reverse, 10 µL PCR mix, dan 8 µL ddH₂O. Primer yang digunakan merujuk kepada penelitian oleh Bakhtiar *et al.* (2017), Sebastiano *et al.* (2020) dan He *et al.* (2012) dengan sekuens primer forward 5'-TGA GGG GAG CCA ATT ACA AAG C-3' dan primer reverse 5'-CCG GGC ATG AAG ACA CAC ACA T-3'. Proses PCR dilaksanakan menggunakan Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler dengan tahapan PCR

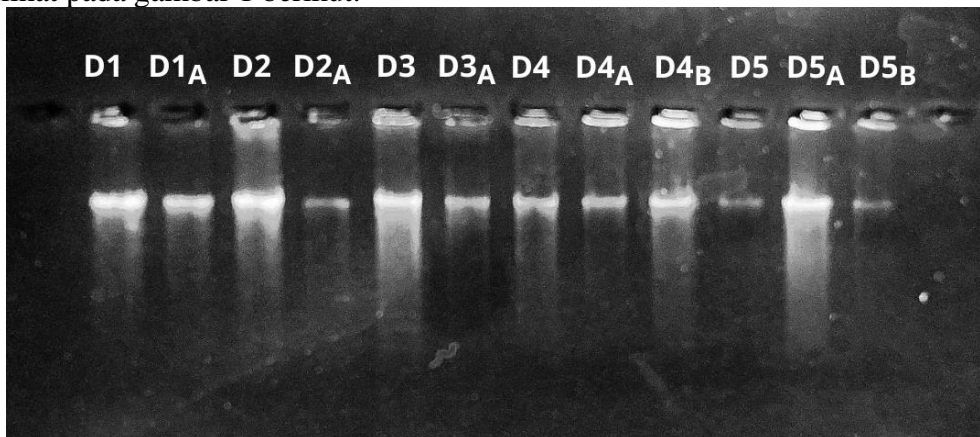
berupa pre-denaturasi suhu 95°C selama 5 menit, siklus PCR diulang sebanyak 30 kali yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 1 menit, annealing 59°C selama 1 menit, dan ekstensi 72°C. Terakhir, final extension dilakukan pada suhu 75°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dielektroforesis pada agarose 2%.

2.4 RFLP

Sebanyak 5,5 µL amplicon DNA hasil PCR dicampurkan dengan *cocktail* RFLP yang terdiri dari 0,8 µL enzim restriksi BfoI, 0,8 µL buffer, dan 8 µL ddH₂O. Hasil pencampuran ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Hasil inkubasi kemudian divisualisasikan dalam agarose 2% dan dilihat di bawah sinar ultraviolet menggunakan UV illuminator.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel darah yang diambil dari vena jugularis sebanyak 3ml dilatarbelakangi oleh beberapa kemudahan seperti lebarnya ukuran vena sehingga memudahkan untuk pengambilan darah, memperhatikan keselamatan dan kenyamanan hewan, serta rendahnya kontaminasi baik dari kulit maupun bulu dari sampel domba tersebut. Sampel darah yang sudah didapat kemudian diisolasi untuk mendapatkan DNA yang murni dan bebas kontaminasi baik dari protein maupun komponen sel lainnya. Hasil pemurnian DNA menggunakan TIANamp genomic kit dapat dilihat pada gambar 1 berikut.

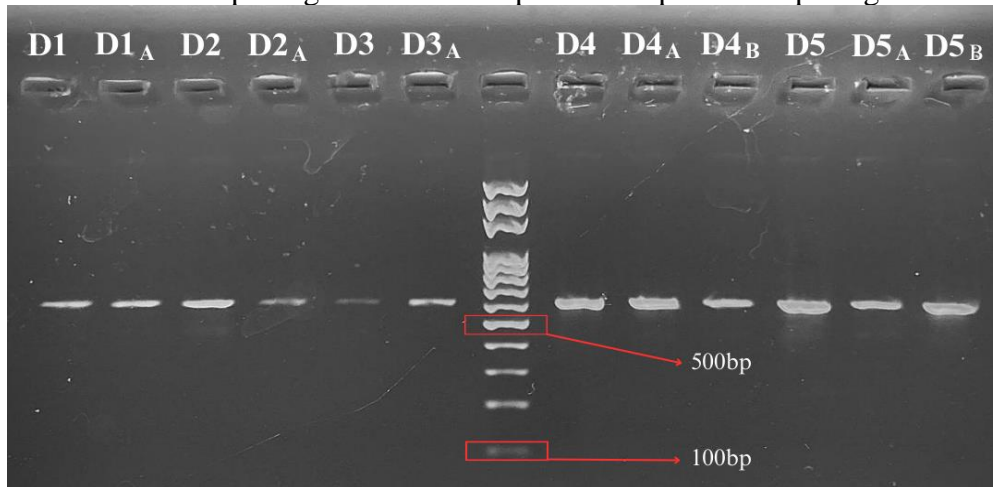


Gambar 1. Hasil isolasi DNA

Pada hasil dari isolasi DNA, dapat dilihat bahwa seluruh sampel berhasil diisolasi, namun terdapat *smear* pada seluruh sampel. *Smear* adalah hasil elektroforesis yang terlihat kabur dan tidak terlihat pita-pita yang jelas. Menurut Panda *et al.* (2019), *smear* dapat terjadi karena penyimpanan darah yang terlalu lama di suhu ruang dan tidak disimpan pada suhu rendah sesaat setelah pengambilan darah. Selain itu, *smear* juga bisa disebabkan oleh pemanasan yang menyebabkan terjadinya denaturasi DNA dari *double strand* menjadi *single strand*. Kejelasan dan ketajaman pita juga menjadi indikator bahwa sampel telah diisolasi dengan baik. Semakin redup dan tidak jelas pitanya mengindikasikan bahwa konsentrasi DNA dari sampel tersebut tergolong rendah (Maliza *et al.*, 2021). Sampel yang memiliki kenampakan kurang tajam atau redup ialah sampel D2_A, D5, dan D5_B, dimana hal tersebut mengindikasikan bahwa ketiga sampel tersebut memiliki konsentrasi DNA yang rendah atau kemungkinan tidak terisolasi dengan baik.

Hasil isolat DNA yang sudah dimurnikan selanjutnya diamplifikasi menggunakan primer forward 5'-TGA GGG GAG CCA ATT ACA AAG C-3' dan primer reverse 5'-CCG GGC ATG AAG ACA CAC ACA T-3' dengan suhu annealing 59°C. Primer pada proses amplifikasi haruslah spesifik dan membatasi area tertentu yang ingin dianalisis, apabila tidak maka dapat

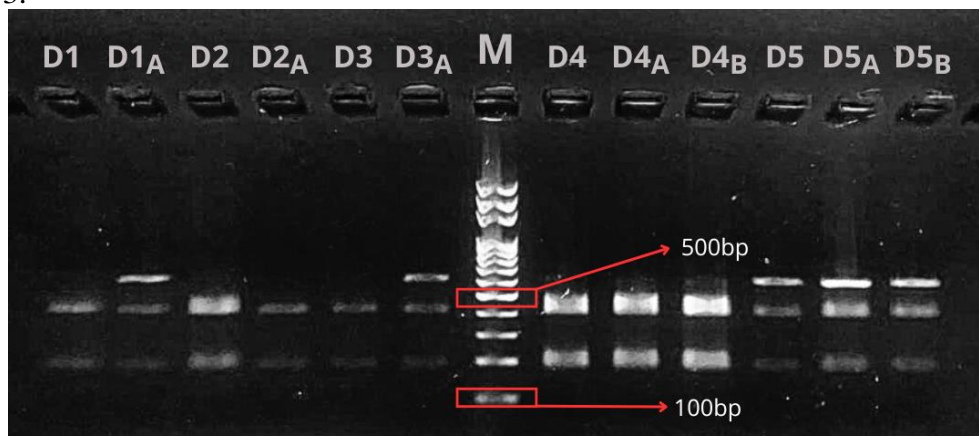
terjadi *mispriming* bahkan hingga isolat DNA tidak bisa teramplifikasi (Adriansyah *et al.*, 2018). Berdasarkan proses PCR, didapatkan hasil amplifikasi dari duabelas sampel berupa pita DNA berukuran 600 pasang basa. Hasil amplifikasi dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 2. Penampakan visual hasil amplifikasi. DNA marker diletakkan di bagian tengah gel

Dapat dilihat bahwa hanya terjadi sedikit *smear*. Hasil amplifikasi juga terhitung baik, dilihat dari ketebalan dan kejelasan pita. Ukuran panjang pita DNA didapatkan dari acuan menggunakan DNA *marker* atau *ladder*. Pada hasil amplifikasi, ditemukan adanya *smile effect* pada DNA *marker*, yaitu pita *marker* yang melengkung dan tidak lurus (Tilawah *et al.*, 2020). Terdapatnya *smile effect* bisa terjadi akibat tegangan listrik yang tinggi, konsentrasi *marker* yang tidak sesuai, hingga terjadinya kontaminasi. Dari keseluruhan sampel, dapat dilihat bahwa rata-rata sampel memiliki kenampakan pita yang jelas dan tajam. Untuk sampel D2_A, D5, dan D5_B yang memiliki hasil kurang baik berdasarkan isolasi dapat juga teramplifikasi dengan baik sehingga memunculkan pita yang jelas dan tajam. Selanjutnya, amplicon hasil PCR dipotong menggunakan enzim restriksi BfoI.

Sebanyak 5,5 μ L amplicon DNA dengan panjang 600bp yang dicampurkan dengan *cocktail* RFLP dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam menghasilkan potongan seperti pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil pemotongan amplicon oleh enzim BfoI

Berdasarkan hasil di atas, dapat dilihat bahwa enzim BfoI dengan situs pemotongan 5' R G C G C \downarrow Y 3' berhasil memotong amplicon sepanjang 600 pasang basa menjadi beberapa fragmen. Terdapat dua pola fragmen, yaitu yang terpotong menjadi dua bagian dan terpotong

menjadi 3 bagian. Sampel yang terpotong menjadi 2 bagian ialah D1, D2, D2_A, D3, D4, D4_A, dan D4_B, sedangkan sampel yang terpotong menjadi 3 bagian adalah D1_A, D3_A, D5, D5_A, dan D5_B. Tabel data hasil pemotongan disajikan dalam table 1 di bawah.

Tabel 1. Hasil pemotongan fragmen DNA

Kode sampel	Tipe kelahiran	Pita hasil pemotongan
D1	Indukan melahirkan tidak kembar	400 bp dan 200bp
D1 _A	Anakan kelahiran tidak kembar	600bp, 400 bp, 200bp
D2	Indukan melahirkan tidak kembar	400 bp dan 200bp
D2 _A	Anakan kelahiran tidak kembar	400 bp dan 200bp
D3	Indukan melahirkan tidak kembar	400 bp dan 200bp
D3 _A	Anakan kelahiran tidak kembar	600bp, 400 bp, 200bp
D4	Indukan melahirkan kembar	400 bp dan 200bp
D4 _A	Anakan kelahiran kembar	400 bp dan 200bp
D4 _B	Anakan kelahiran kembar	400 bp dan 200bp
D5	Indukan melahirkan kembar	600bp, 400 bp, 200bp
D5 _A	Anakan kelahiran kembar	600bp, 400 bp, 200bp
D5 _B	Anakan kelahiran kembar	600bp, 400 bp, 200bp

Dari hasil pemotongan yang menunjukkan panjang basa berbeda-beda, dapat diidentifikasi bahwa pemotongan oleh enzim BfoI tidak hanya berhasil namun juga menunjukkan sifat polimorfisme, ditinjau dari kemunculan pita yang memiliki variasi panjang berbeda. Polimorfisme yang terjadi dapat disebabkan oleh variasi urutan basa pada tiap-tiap sampel. Hasil dari identifikasi polimorfisme pada duabelas sampel domba ekor tipis tidak menghasilkan kenampakan khusus berdasarkan dengan tipe kelahirannya. Pada sampel D4 dan D5 beserta anaknya yang merupakan indukan melahirkan kembar tidak memiliki kenampakan yang sama yang bisa dijadikan sebagai penciri sifat polimorfisme untuk domba dengan sifat kembar. Begitu pula pada anak kelahiran tunggal yaitu D1_A dan D3_A justru memiliki kenampakan fragmen yang berbeda dari indukannya. Kedua sampel tersebut memiliki kenampakan fragmen yang sama dengan domba kembar berkode D5 beserta anaknya.

4 KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa enzim BfoI dapat digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya polimorfisme pada domba ekor tipis. Meski begitu, pola polimorfismenya tidak memiliki ciri khusus berdasarkan tipe kelahirannya. Diperlukan analisis selanjutnya seperti sekuensing untuk mengetahui *single nucleotide polymorphism* atau SNP pada sampel yang diuji serta penambahan jumlah sampel agar hasil yang didapatkan semakin mendetail.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Dr. Ning Setiati, M. Si selaku pembimbing dalam pembuatan artikel ini serta Badan Riset dan Inovasi Nasional.

DAFTAR PUSTAKA

Khariiri., Amalia, N., Nursofiah, S., Muna, F., Rukminiati, Y., Mursinah. (2020). Akankah Perkembangan Metode Deteksi Biomolekuler Era 4.0 Mampu Menggantikan Pemeriksaan Laboratorium Bakteri Secara Konvensional? *Seminar Nasional Riset*

- Kedokteran (SENSORIK)*, 2020. www.ncbi.nlm.nih.gov/BLA
- Bakhtiar, R., Abdolmohammadi, A., Hajarian, H., Nikousefat, Z., & Kalantar-Neyestanaki, D. (2017). Investigation of the 5' flanking region and exon 3 polymorphisms of IGF-1 gene showed moderate association with semen quality in Sanjabi breed rams. *Theriogenology*, *104*, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.023>
- Buchori, A., Firmansah, H., Anika, M., Ratnawati, S., Ulfa, U. T., & Zendrato, Y. (2023). Komparasi Metode Ekstraksi DNA Menggunakan Daun Padi: Review. *Agriculture and Biological Technology*, *1*(1), 40–50. <https://doi.org/10.61761/agiotech.1.1.40-50>
- Luridiana, S., Mura, M. C., Di Stefano, M. V., Pulinas, L., Cosso, G., Nehme, M., & Carcangiu, V. (2020). Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene and its relationship with reproductive performances and milk yield in Sarda dairy sheep. *Veterinary and Animal Science* *9*, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100084>
- Najmuddin, M., & Nasich, M. (2019). Produktivitas Induk Domba Ekor Tipis di Desa Sedan Kecamatan Sedan Kabupaten Rembang. *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production*, *20*(1), 76–83. <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2019.020.01.10>
- Septiana, Y., Nurmeidiansyah, A., Hilmia, N. (2020). Sebaran Runpun dan Pola Warna Bulu Domba Lokal Betina Pada Beberapa Pasar Hewan di Wilayah III Cirebon (Ciayumajakuning). *Jurnal Produksi Ternak Terapan (JPPT)*, *1*(2), 51. <https://doi.org/10.24198/jppt.v1i2.31678>
- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). Mdr-1 Gene 1199 Variant Primer Design Techniques in Pediatric Patient Buffy Coat Samples With Lla. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, *5*(1), 105. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16>
- Hikmah, R. U., Retnoningsih, A., & Habibah, N. A. (2016). Keragaman Durian Berdasarkan Fragmen Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA Ribosomal Melalui Analisis PCR-RFLP. *Jurnal MIPA*, *39*(1), 11–18. <http://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/JM>
- Panda, B. B., Meher, A. S., & Hazra, R. K. (2019). Comparison between different methods of DNA isolation from dried blood spots for determination of malaria to determine specificity and cost effectiveness. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*, *43*(3), 337–342. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01136-0>
- Maliza, R., Pratiwi, L. S., & Perwitasari, D. A. (2021). Uji Kualitas DNA Darah Pada Kertas Whatman Yang Diisolasi Dengan CHELEX-100 Serta Variasi Waktu Penyimpanan. *The Journal of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologist*, *4*(2), 113. <https://doi.org/10.30651/jmlt.v4i2.7936>
- Adriansyah, F., Hanum, L., Muharni, M., & Windusari, Y. (2019). Pendekatan PCR-RAPD dalam Menentukan Kekekabatan dan Konservasi Padi Varietas Lokal Sumatera Selatan. *Jurnal Lahan Suboptimal*, *7*(1), 50–58. <https://doi.org/10.33230/jlso.7.1.2018.347>
- Li, S., Zhou, H., Zhao, F., Fang, Q., Wang, J., Liu, X., Luo, Y., & Hickford, J. G. H. (2021). Nucleotide sequence variation in the insulin-like growth factor 1 gene affects growth and carcass traits in new zealand romney sheep. *DNA and Cell Biology*, *40*(2), 265–271. <https://doi.org/10.1089/dna.2020.6166>