

DETEKSI GENOTIPE κ -KASEIN DENGAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION-SINGLE STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM* DAN EFEK GENETIKNYA TERHADAP KADAR PROTEIN DAN LEMAK SUSU KAMBING PERANAKAN ETAWAH

Maria Astuti¹, Wayan Tunas Artama², Muladno³, dan Yustina Yuni Suranindyah¹

INTISARI

Teknik *Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformational Poly-morphism* (PCR-SSCP) dipergunakan dengan tujuan untuk mendeteksi genotipe κ -kasein pada kambing Peranakan Etawah (PE), disamping itu juga untuk mempelajari efek genetiknya terhadap kadar protein dan lemak susu. DNA genom, diisolasi dari 20 sampel darah kambing PE yang dikelola oleh *Agricultural Technical Mission-Republic of China* (ATM-ROC) Singosari, Malang, dipergunakan dalam analisis PCR-SSCP. Analisis dilakukan dengan mengamplifikasi target DNA sebesar 170 bps dengan sepasang primer P1 5'ATT TAT ggC CAT TCT ACC AA 3' dan P2 5' TCT CAg ATg CAC TCg CAA TC 3'. Produk PCR yang didapat dielektroforesis dengan gel *Polyacrylamide* dan setelahnya dilakukan pewarnaan *silver*. Hasil analisis SSCP menunjukkan adanya pita-pita dengan mobilitas yang berbeda, yaitu alel A mobilitasnya lebih cepat dari alel B. Homosigot ditunjukkan oleh satu atau dua pita, heterosigot oleh tiga atau empat pita. Tiga genotipe yaitu AA (1), AB (15) dan BB (4) dapat dideteksi. Frekuensi alel A dan B berturut-turut sebesar 42,5% dan 57,5%. Perbedaan efek genotipe κ -kasein pada kadar protein dan kadar lemak belum dapat ditunjukkan. Pada penelitian ini data kuantitatif menunjukkan rata-rata kadar protein genotipe BB sedikit lebih tinggi dari genotipe yang lain. Teknik PCR-SSCP berhasil dipergunakan untuk mendeteksi alel polimorfik κ -kasein serta efek genetik dapat dievaluasi. Hal ini dapat merupakan bantuan dalam seleksi kambing PE.

(Kata kunci : PCR-SSCP, κ -kasein, Protein, Lemak, Kambing PE).

Buletin Peternakan 28 (1) : 26 - 31, 2004

¹ Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

² Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

³ Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

DETECTION OF κ -CASEIN GENOTYPES WITH POLYMERASE CHAIN REACTION-SINGLE STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM AND THE GENETIC EFFECT ON MILK PROTEIN AND FAT IN ETAWAH GRADE GOAT

ABSTRACT

The Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformational Polymorphism (PCR-SSCP) technique was used to detect the κ -casein genotypes on Etawah Grade goat and the genetic effect on milk protein and fat. DNA genome from blood sample of Etawah Grade goat managed by the Agricultural Technical Mission-Republic of China (ATM-ROC) Singosari, Malang was used in PCR-SSCP analysis. The analysis was done by amplification of 170 bps DNA target with two primers, P1 5' ATT TAT ggC CAT TCT ACC AA 3' and P2 5' TCT CAg ATg CAC TCg CAA TC 3'. The PCR products were electrophorized on Polyacrylamide gel, and followed by silver staining. The results of the SSCP analysis indicated bands with different mobility and allele A was migrating more faster than allele B. The homozygote genotype was indicated by one or two bands and the heterozygote genotype by three or four bands. Three different genotypes AA, AB and BB were detected. The frequencies of A and B allele were 42,5% and 57,5% respectively. The different effect of κ -casein genotypes on milk protein and fat percent was not detected yet. The quantitative data indicated that BB genotypes showed a bit higher of milk protein percent than the two other genotypes. The PCR-SSCP technique was successful in detecting the polymorphic allele of κ -casein and the genetic effect could be evaluated. This could be used as an aid to selection in Etawah Grade goat.

(Key words : PCR-SSCP, κ -casein, Protein, Fat, Etawah Grade goat).

Pendahuluan

Sifat polimorfik gen κ -kasein pada kambing telah dilaporkan oleh beberapa peneliti (Coll *et al.*, 1993; Caroli *et al.*, 2001; dan Feligini *et al.*, 2002). Sifat polimorfik dapat diidentifikasi pada level protein maupun pada level DNA. Berkembangnya bidang biologi molekuler dan teknologi DNA menunjukkan identifikasi pada level DNA lebih cepat dan efisien serta tidak terbatas pada umur dan jenis kelamin.

Pada sapi perah dua alel polimorfik κ -kasein yang umum yaitu alel A dan B dilaporkan mempunyai efek terhadap sifat-sifat produksi susu. Efek alel B sangat menguntungkan dengan meningkatkan produksi susu dan persen protein dibanding alel A. Alel A menunjukkan efek sedikit meningkatkan persen lemak susu (Mao *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 1995, dan Maruoka *et al.*, 2000).

Keberadaan alel polimorfik κ -kasein A dan B serta frekuensi alel tersebut pada beberapa bangsa kambing Eropa juga dilaporkan meskipun demikian efeknya terhadap sifat produksi susu pada kambing belum dilaporkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi alel polimorfik κ -kasein pada kambing PE dengan teknik PCR-SSCP, disamping itu juga untuk mengetahui efek genetiknya terhadap kadar protein dan lemak susu.

Materi dan Metode

DNA genom diisolasi dari sampel darah kambing PE yang dikelola oleh ATM-ROC di Singosari. Sampel darah diperoleh dari induk laktasi yang beranak pada waktu yang hampir sama dan baru beranak sekali sebanyak 20 ekor. Sampel susu sebanyak 75 ml diambil dari induk-induk yang disampel

darahnya untuk keperluan analisis kadar protein dan lemak susu. DNA genom sebesar 170 bps pada exon IV diamplifikasi dengan sepasang primer yaitu P1 5' ATT TAT ggC CAT TCT ACC AA3' dan P2 TCT CAg ATg CAC TCg CAA TC 3'. Pada segmen DNA yang diamplifikasi ini akan dideteksi dua alel yang berbeda yaitu alel A dan alel B kappa-kasein karena terjadi mutasi akibat substitusi satu basa yaitu G → A pada posisi asam amino ke 119. Program PCR untuk amplifikasi adalah denaturasi awal pada temperatur 94°C selama 2 menit, denaturasi siklus pada temperatur 95°C selama 45 detik, *annealing* dengan suhu 60°C selama satu menit, polimerisasi dengan suhu 72°C selama satu menit, dilakukan sebanyak 31 siklus. Selanjutnya polimerisasi akhir pada temperatur 72°C selama 5 menit, dan kemudian suhu dipertahankan 4°C selama 5 menit. Total volume untuk reaksi PCR adalah 25 µl terdiri dari *puReTaq Ready To Go bead*, DNA *template* 2 µl primer P1 dan P2 masing-masing 1 µl, dan dH₂O 21 µl. Produk PCR dielektroforesis pada gel *polyacrylamide* 10%. Sebelumnya produk PCR didenaturasi untuk memperoleh DNA untai tunggal dengan menambah 10 µl *formamide dye* pada 5 µl produk PCR, dipanaskan 95°C selama 10 menit dan kemudian segera masuk dalam es selama 5 menit. Elektroforesis dilakukan selama 2 jam pada 150 volt.

Setelah elektroforesis selesai gel dilepas dan difiksasi dengan asam asetat glasial 10% selama 5 menit dengan digoyang. Kemudian dicuci dengan akuabides, selanjutnya dilakukan pengecatan *silver* selama 3 menit. Setelahnya dilakukan *developing*, larutan *developing* 50 µl (3 gr sodium karbonat, 0,05% formaldehid, 40 µl sodium tiosulfat dari stok 0,135 gr) dituangkan pada gel, digoyang selama 10 menit sehingga muncul pita. Proses dihentikan dan gel dibilas

dengan akuabides selama 10 menit, selanjutnya ditambahkan 10% asam asetat glasial. Gel diawetkan dengan dikeringkan di antara dua lembar kertas kaca dan diangin-anginkan.

Pembacaan pita hasil elektroforesis didasarkan pada mobilitas, alel A menunjukkan mobilitas yang lebih cepat dibanding alel B. Keadaan homosigot ditunjukkan oleh satu atau 2 pita sedang heterosigot oleh 3 atau 4 pita. Analisis kadar protein dilakukan dengan metode Kjeldahl dan analisis kadar lemak dengan metode Babcock (Sudarmadji *et al.*, 1984).

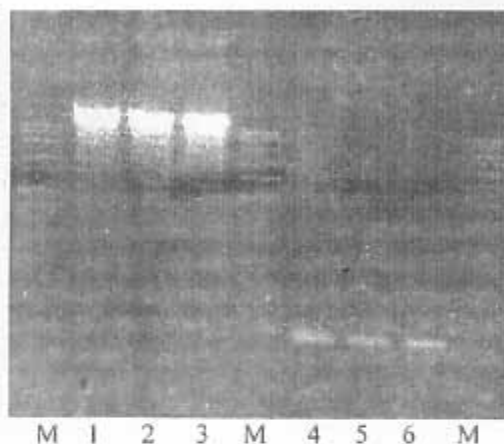
Untuk mengetahui efek genotipe κ-kasein dilakukan analisis variansi untuk model $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + E_{ij}$. Y_{ij} adalah kadar protein atau kadar lemak, α_i adalah efek genotipe kappa-kasein dan E_{ij} adalah random error.

Hasil dan Pembahasan

Hasil amplifikasi berupa PCR produk setelah dielektroforesis dilakukan pemotretan. Gambar elektroforesis hasil isolasi DNA genom dan PCR produk berupa fragmen DNA 170 bps disajikan pada Gambar 1 sebagai contoh.

Hasil analisis SSCP dengan elektroforesis pada gel *polyacrilamide* disajikan pada Gambar 2 sebagai contoh. Berdasar hasil analisis SSCP dilakukan *genotyping* induk-induk. Penentuan genotipe didasarkan pada mobilitas alel A dan B yang berbeda. Alel A menunjukkan mobilitas yang lebih cepat dibanding dengan alel B.

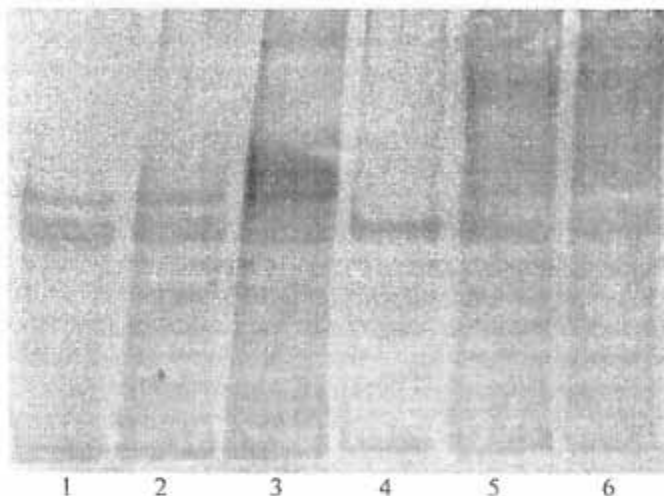
Hasil *genotyping* induk-induk dan hasil analisis kadar protein dan kadar lemak susu disajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 tampak bahwa hanya satu ekor induk (5%) menunjukkan genotipe AA, 15 ekor induk (75%) genotipe AB dan 4 ekor (20%) dengan genotipe BB.



Gambar 1. Elektroforesis DNA genom hasil amplifikasi target DNA 170 bps untuk SSCP. M = marker DNA, 1, 2, 3 = DNA genom, 4, 5, 6 = hasil amplifikasi). (*Electrophoregram of DNA Genome ad 170 bps DNA target for SSCP (M = DNA marker, 1, 2, 3 = DNA genome, 4, 5, 6 = DNA target).*)

Tabel 1. Genotipe induk, kadar protein dan kadar lemak sampel susu masing-masing induk (*Ewes genotype, protein and fat percent of milk sample*)

| Kode induk (<i>Ewes code</i>) | Genotipe (<i>Genotype</i>) | Kadar (<i>Level</i>) | |
|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | | Protein (<i>Protein</i>) (%) | Lemak (<i>Fat</i>) (%) |
| 1 | AA | 4,93 | 5,70 |
| 2 | BB | 4,71 | 5,90 |
| 3 | BB | 6,74 | 6,70 |
| 4 | BB | 5,36 | 7,05 |
| 5 | BB | 3,15 | 6,00 |
| 6 | AB | 3,46 | 6,55 |
| 7 | AB | 5,62 | 6,00 |
| 8 | AB | 4,53 | 6,85 |
| 9 | AB | 4,47 | 6,65 |
| 10 | AB | 4,49 | 7,05 |
| 11 | AB | 4,05 | 4,65 |
| 12 | AB | 3,83 | 6,00 |
| 13 | AB | 3,61 | 5,85 |
| 14 | AB | 5,21 | 6,55 |
| 15 | AB | 3,58 | 5,45 |
| 16 | AB | 4,17 | 5,80 |
| 17 | AB | 4,41 | 6,95 |
| 18 | AB | 3,48 | 7,95 |
| 19 | AB | 5,02 | 5,80 |
| 20 | AB | 6,09 | 6,50 |



Gambar 2. Hasil SSCP dengan elektroforesis pada gel polyacrilamide. (1, 2, 3, 5, 6 = genotipe AB, 4 = genotipe AA). (SSCP results on polyacrylamide gel electrophoresis. (1,2,3,5,6 = AB genotype, 4 = AA genotype).

Frekuensi alel A dan B dihitung menurut Warwick *et al.* (1994) dan didapat frekuensi alel A sebesar 42,5% dan alel B sebesar 57,5%. Frekuensi alel B yang didapat lebih tinggi dibanding yang dilaporkan oleh Caroli *et al.* (2001), dan Feligini *et al.* (2002) yang melaporkan frekuensi alel B pada kambing Italia yaitu Orabica, Ionica, Alpine dan Maltese berturut-turut sebesar 0,37; 0,01; 0,3 dan 0,5, dan pada kambing Jerman Bunte Deutsche Edelzeige sebesar 0,11.

Rata-rata kadar protein genotipe AA, BB dan AB beserta salah satunya berturut-turut adalah 4,93 ($n = 1$); $4,99 \pm 0,74$ dan $4,40 \pm 0,21$, sedang untuk kadar lemak berturut-turut adalah 5,70 ($n = 1$); $6,4 \pm 0,28$ dan $6,31 \pm 0,20$. Rata-rata kadar protein dan kadar lemak yang didapat jauh lebih tinggi dari yang dilaporkan oleh Manfredi *et al.* (1999) pada kambing Alpine dan Saanen serta persilangannya berturut-turut adalah 3,07%; 2,97% dan 2,98% untuk kadar protein dan 3,48%; 3,24% dan 3,38% untuk kadar lemak. Nilai yang lebih rendah yaitu 3,56% dan 4,14% untuk kadar protein dan lemak juga dilaporkan oleh Haenlein (2002). Hal ini dapat

disebabkan oleh perbedaan bangsa dan stadium laktasi.

Analisis untuk mengetahui efek genotipe kappa-kasein terhadap kadar protein dan lemak susu hanya menyertakan genotipe BB dan AB karena genotipe AA hanya ada 1 data. Hasil analisis variansi belum menunjukkan bahwa efek genotipe kappa-kasein pada kadar protein dan lemak berbeda, tetapi data kuantitatif menunjukkan rata-rata kadar protein genotipe BB sedikit lebih tinggi dibanding dengan genotipe AB. Hal ini kemungkinan disebabkan jumlah data relatif sedikit dan pengaruh faktor lingkungan.

Kesimpulan

Teknik PCR-SSCP berhasil dipergunakan untuk deteksi genotipe κ -kasein pada kambing PE, berdasar kecepatan mobilitas alel A dan B yang dapat dibedakan.

Efek genotipe kappa-kasein terhadap kadar protein dan lemak susu belum dapat ditunjukkan berbeda secara statistik, namun data secara kuantitatif mengindikasikan rata-rata kadar protein genotipe BB sedikit lebih tinggi. Identifikasi genotipe kappa-kasein

dengan teknik PCR-SSCP dapat merupakan bantuan dalam seleksi kambing PE.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada Direktur Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Ditjen Dikti, yang telah membiayai penelitian ini dengan dana penelitian Hibah Bersaing IX/1-3. Terima kasih juga ditujukan kepada Ketua Lembaga Penelitian UGM; Dekan Fakultas Peternakan UGM; Kepala BPT-HMJ dan ATM-ROC Singosari, Malang; dan Ketua Pusat Studi Bioteknologi UGM atas segala kemudahan dan fasilitas yang diberikan.

Daftar Pustaka

- Caroli, A., C. Jann, E. Budelli, P. Bolla, S. Jager, and G. Erhardt. 2001. Genetic Polymorphism of Goat κ -casein (CSN3) in Different Breeds and Characterization at DNA level. *Animal Genetics*. 32: 22620.
- Coll, A., J. M. Folch, and A. Sanchez. 1993. Nucleotide Sequence of the Goat κ -casein cDNA. *J. Anim. Sci.* 71: 2833.
- Feligini, M., V. Cubic-Curik, P. Parma, I. Curik, G.F. Greppi, and G. Erne. 2002. Polymorphism of Kappa-casein in Italian Goat Breeds: A New ACRS-PCR Designed DNA Test for Discrimination of A and B alleles. *Food Technol. Biotechnol.* 40: 293-298 (Summary).
- Haenlein, G. 2002. Nutritional Value of Dairy Products of ewe and Goat Milk. Available at <http://goatconnection.com/articles/publish/breeds.html>.
- Manfredi, E., A. Piacere, and J. T. Poivey. 1999. Genetics and Breeding of Dairy Goats in France. *Sumposium INRA /COA on Scientific Cooperation in Agriculture*. Toulouse (France), 1999 April 19-20.
- Mao, I. L., L. G. Buttazzoni and R. Aleandri. 1992. Effects of Polymorphic Milk Protein Genes on Milk Yield and Composition Traits in Holstein Cattle. *Acta Agric. Scand Sect A. Anim. Sci.* 42: 1-7.
- Maruoka, S., Y. Shioya, M. Yonai, M. Geshi, M. Astuti, and M. Kosugiyama. 2000. Effect of κ -casein Genotype on Milk Performance of Japanese Black and Japanese Shorthorn Cows. *Tohoku J. Anim. Sci. Technol.* 50(1): 1-4.
- Nakayama, O., M. Onodera, K. Nakabayashi, K. Nakamura, T. Yamamoto, K. Arai, Kikkawa and M. Kosugiyama. 1995. Effect of κ -casein Genotype on Milk erformance in Japanese Shorthorn Cows. *Anim. Sci. Technol. (Japan)* 66(19): 693-697.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi. 1984. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Penerbit Liberty. Yogyakarta.
- Warwick, J. E., J. M. Astuti, dan W. Hardjosubroto. 1994. *Pemuliaan Ternak*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Yamamoto, T., K. Shimada, M. Kakkawa, M. Takahashi, T. Tabata, N. Takenouchi, K. Oshima, A. Kakkawa, O. Nakayama, and M. Kosugiyama. 1994. Genotype Effect of κ -casein on Milk Performance in Japanese Black Cows. *Anim. Sci. Technol. (Japan)* 65(12): 1119-1121.