

ANALISIS MOLEKULER GENOTIPE GEN BETA-LAKTOGLOBULIN DAN α 2-Kasein PADA KAMBING PERANAKAN ETAWAH, SAANEN DAN PERSILANGANNYA

Zakiyah Nasution¹, Muladno², Cece Sumantri², Rarah RAMaheswari²

¹Dosen Fakultas Pertanian, Universitas Graha Nusantara

²Departemen IPTP, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Agatis kampus IPB Dermaga, Bogor 16680

ABSTRAK

Kualitas susu kambing dipengaruhi oleh kadar protein susu, keragaman gen α 2-Kasein dan Beta-Laktoglobulin pada kambing perah berhubungan erat dengan kualitas protein susu. Protein susu terdiri dari kasein dan whey, β -laktoglobulin merupakan penyusun terbesar dalam protein whey. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi genotipe gen α 2-Kasein dan Beta-Laktoglobulin pada kambing Peranakan Etawah (PE), Saanen dan persilangannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman gen α 2-Kasein dan β -laktoglobulin terhadap materi berupa DNA ekstrak menerapkan metode Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Lokasi pengambilan sampel darah kambing Peranakan Etawah (PE), Saanen serta persilangan keduanya adalah di peternakan kambing yang berada di wilayah kabupaten Bogor. Analisis identifikasi keragaman gen α 2-kasein dan β -laktoglobulin dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler, bagian pemuliaan dan Genetika Ternak, FAPET IPB. Tahapan kegiatan penelitian meliputi: pengambilan sampel darah, amplifikasi DNA dengan metode PCR dan fragmen gen α 2-kasein dan β -laktoglobulin masing-masing dipotong dengan menggunakan enzim pemotong *NcoI* dan *SmaI*. Berdasarkan hasil pendeteksian keragaman dengan metode PCR-RFLP diketahui bahwa daerah ekson 1 gen beta-laktoglobulin pada kambing perah adalah bersifat polimorfik (beragam), berdasarkan hasil pendeteksian keragaman gen α 2-kasein pada kambing Peranakan Etawah, Saanen dan Persilangan PE-Saanen dengan metode PCR-RFLP dengan enzim *NcoI* diketahui bahwa gen α -kasein pada kambing perah bersifat monomorfik (seragam).

Kata kunci : kambing perah, gen α 2-kasein, gen β -laktoglobulin, PCR-RFLP

PENDAHULUAN

Kambing merupakan salah satu ternak ruminansia kecil yang banyak dipelihara oleh peternak. Berdasarkan data Direktorat Jenderal Peternakan 2009, populasi kambing di Indonesia dari tahun 2005-2009 mengalami peningkatan, pada tahun 2005 populasi kambing di Indonesia sebanyak 13.409.277 ekor, dan pada tahun 2009 meningkat sebanyak 15.655.740 ekor. Kasein merupakan penyusun terbesar protein susu. Kasein berperan dalam pembuatan produk susu diantaranya keju. Protein merupakan salah satu komponen susu kambing yang dapat mempengaruhi kualitas susu. Kualitas susu merupakan salah satu sifat ekonomis yang penting diperhatikan sekaligus berguna meningkatkan gizi masyarakat. Sifat produksi susu

termasuk sifat kuantitatif yang dikendalikan oleh banyak gen, bersifat aditif serta dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Noor 2000). Beberapa gen pengontrol produksi protein susu dari gen kasein adalah α 1-kasein, α 2-kasein, β -kasein dan κ -kasein) dan salah satu gen yang mempengaruhi protein whey adalah β -laktoglobulin.

Perkembangan teknologi dalam bidang biologi molekuler memungkinkan penggunaan penanda molekuler untuk mengukur status keragaman genetik. Penggunaan teknik PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction –Restriction Fragment Length Polymorphism*) memungkinkan analisis polimorfisme dapat dilakukan pada tingkat DNA penyandi protein (gen). Marka gen yang dapat digunakan yaitu gen yang mengontrol protein susu (kasein) dan protein (whey) yang dapat mempengaruhi komposisi susu diantaranya yaitu gen α 2-kasein (CSN1S2) dan β -laktoglobulin.

METODELOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan mulai bulan September 2009 hingga April 2010. Lokasi pengambilan sampel darah kambing Peranakan Etawah (PE), Saanen serta persilangan keduanya adalah di peternakan kambing yang berada di wilayah kabupaten Bogor. Analisis identifikasi keragaman gen α 2-kasein dan β -laktoglobulin dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler, bagian pemuliaan dan Genetika Ternak, FAPET IPB.

Materi

Materi penelitian yang digunakan untuk analisis kualitas susu segar sebanyak 75 sampel kambing, sementara untuk pembuatan keju sebanyak 7000 ml berdasarkan bangsa kambing, dan analisis DNA adalah sampel kambing Peranakan Etawah (PE), Saanen serta persilangan keduanya, pengambilan sampel dilakukan di daerah Ciapus, Cijeruk, Cariuk dan Balitnak-Ciawi. Jumlah setiap sampel kambing disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Jumlah Sampel Kambing Penelitian

Bangsa Kambing	Asal Ternak				Jumlah
	Ciapus	Cijeruk	Cariuk	Balitnak-Ciawi	
Peranakan Etawah (PE)	20	-	28	-	48
Saanen	-	20	31	-	51
Persilangan PE-Saanen	-	7	25	19	51
Jumlah	20	27	84	19	150

Informasi mengenai primer yang digunakan untuk amplifikasi gen α 2-kasein dan β -laktoglobulin disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Informasi Sekuen Pimer yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Sekuen Primer	Gen	Sumber
1.	F 5'-GAC ACA TAG AGA AGA TTC AAT- 3'	α s2- kasein	Ramunno <i>et al.</i> 2001
	R 5'-CGT TGG GAC ATT TTA TCT CTA-3'		
2.	F 5'-GTC ACT TTC CCG TCC TGG GG-3'	β - laktog lobulin	Yahyaoui <i>et al.</i> 2000
	R 5'-GGC CTT TCA TGG TCT GGG TGA CG-3'		

Keterangan: F=Forward, R= Reverse

METODE

Identifikasi gen α s2-kasein dan β -laktoglobulin

Isolasi DNA

Isolasi DNA dari sampel darah kambing Saanen, PE (Peranakan Etawah) dan persilangan Saanen-PE, akan menggunakan kit ekstraksi DNA yang dimodifikasi untuk sampel yang disimpan dalam alkohol.

Amplifikasi Gen dengan Teknik PCR

Reaksi PCR dilakukan dengan volume total 25 μ l dari campuran larutan yang terdiri atas sampel DNA, enzim taq polimerase, 10X buffernya, 10 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, primer *forward-reverse*, *destilated water*.

Kondisi reaksi PCR dalam mesin *thermal cyclor* dengan metode PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen α s2-kasein dan β -laktoglobulin dilakukan dengan tiga tahap, yaitu denaturasi, *annealing*, dan ekstensi.

Penentuan Genotipe dengan Pendekatan PCR-RFLP

Produk PCR yang diperoleh dari hasil amplifikasi teknik PCR-RFLP fragmen gen α s2-kasein dan β -laktoglobulin masing-masing dipotong dengan menggunakan enzim pemotong *NcoI* dan *SmaI*, bahan pereaksi yang digunakan untuk memotong produk PCR adalah 0.3 μ l enzim pemotong, 0.7 μ l buffer, 1 μ l *deionized water*, sampel produk PCR sebanyak 5 μ l. Campuran sampel produk PCR baik fragmen gen α s2-kasein dan β -laktoglobulin serta bahan pereaksi diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37⁰ C dan 30⁰ C selama lebih kurang 16 jam (*over night*).

Sekuensing Dna

Sekuensing DNA dilakukan untuk mengetahui kesamaan gen κ -kasein pada kambing dengan sekuen yang terdapat pada *GenBank* dan mengetahui titik mutasi yang terjadi pada fragmen gen κ -kasein. Hasil sekuensing berupa kromatogram yang diperoleh kemudian diedit secara manual dan dianalisis menggunakan bantuan *software* MEGA 4 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) dan *BioEdit*.

Parameter Penelitian

Frekuensi Alel dan Genotipe

Frekuensi alel dari masing-masing lokus dapat diperkirakan dengan menghitung jumlah gen pada populasi. Jika n_{ii} adalah individu yang bergenotipe A_iA_i , n_{ij} adalah individu yang bergenotipe A_iA_j , dan jumlah total sampel adalah n , maka frekuensi alel A_i (x_i) (Nei 1987) dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$x_i = \frac{\left(2n_{ii} + \sum_{j \neq i} n_{ij} \right)}{2n}$$

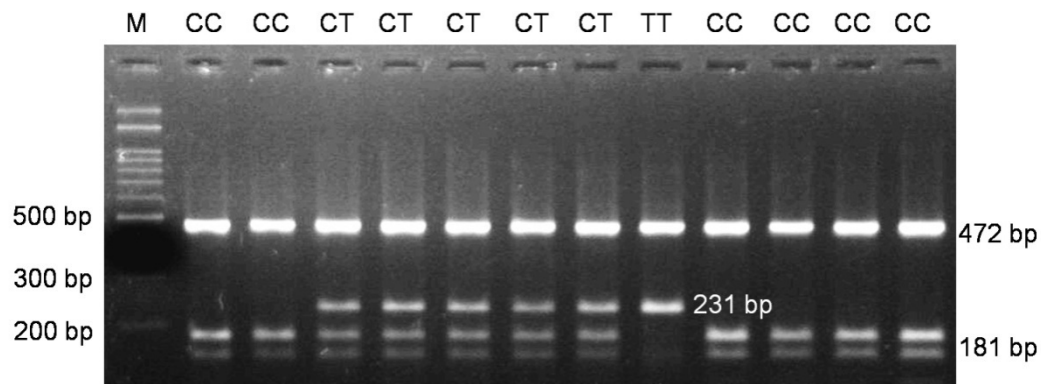
Frekuensi genotipe dapat diperkirakan dengan menghitung perbandingan jumlah genotipe pada populasi. Dengan menggunakan asumsi sebelumnya, maka frekuensi genotipe A_iA_i (x_{ii}) dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$X_{ii} = n_{ii} / n$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pendeteksian keragaman Daerah Promotor dan Ekson 1 Gen Beta-laktoglobulin Kambing Perah dengan Metode PCR-RFLP

Produk PCR Gen beta-laktoglobulin sepanjang 710 pb dipotong dengan enzim restriksi *SmaI* menghasilkan pemotongan dengan pola yang berbeda pada semua sampel yang dianalisis (gambar 1), hal ini sesuai dengan pernyataan (Yahyoui *et al.* 2000) polimorfisme gen β -laktoglobulin pada kambing memiliki panjang amplifikasi produk PCR 710 bp, yang terdiri atas 588 bp pada promotor proximal dan 122 bp pada exon 1.



Gambar 1. Visualisasi pola pita RFLP gen beta-laktoglobulin dengan enzim restriksi *SmaI* pada gel agarose 2%.

Pendeteksian keragaman daerah ekson 1 genotipe gen beta-lactoglobulin dalam penelitian ini dilakukan dengan pendekatan PCR-RFLP dengan *SmaI* sebagai enzim pemotong. Enzim *SmaI* mengenali situs pemotongan CCC GGG. Berdasarkan hasil pendeteksian keragaman dengan metode PCR-RFLP diketahui bahwa daerah ekson 1 gen beta-laktoglobulin pada kambing perah adalah bersifat polimorfik (beragam). Polimorfik gen β -laktoglobulin pada kambing terjadi karena adanya substitusi nukleotida tunggal (C menjadi T) diposisi 60 pada daerah promotor (Folch *et al.* 1994). Ditemukan ada tiga genotipe daerah ekson 1 gen beta-laktoglobulin. Gen beta-laktoglobulin dengan genotipe CC ditunjukkan dengan tiga fragmen (472+181+50+7 bp), genotipe TT juga ditunjukkan dengan tiga fragmen (472+231+7 bp), dan genotipe CT memiliki dua fragmen yaitu (231+181) (Gambar 2).

Frekuensi alel dan frekuensi genotipe untuk gen beta-laktoglobulin pada tiap daerah populasi bangsa kambing perah (Peranakan Etawah, Saanen dan Persilangan PE-Saanen) dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Frekuensi Alel dan Frekuensi Genotipe Gen Beta-laktoglobulin Pada Kambing Peranakan Etawah, Saanen dan Persilangan PE-Saanen.

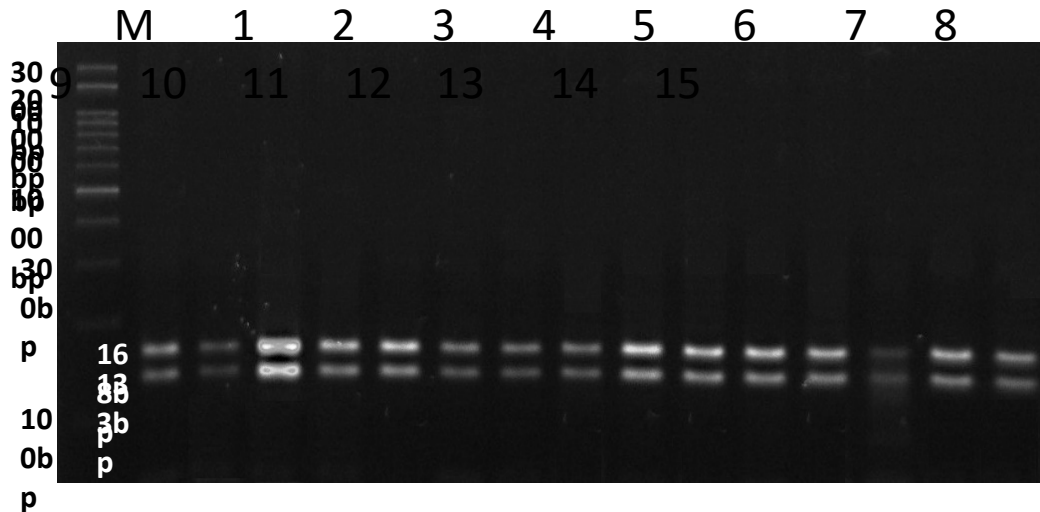
Bangsa	Daerah	Frekuensi Genotipe			Frekuensi Alel	
		CC	TT	CT	C	T
PE	Ciapus	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000
	Cariuk	0,357	0,143	0,500	0,429	0,571
Saanen	Cijeruk	0,700	0,050	0,250	0,825	0,175
	Cariuk	0,484	0,000	0,516	0,7097	0,290
Persilangan	Cariuk	0,440	0,160	0,40	0,640	0,360
PE-Saanen	Ciawi	0,157	0,842	0,000	0,158	0,842

Berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada tabel 4, bangsa kambing Peranakan Etawah, Saanen dan Persilangan PE-Saanen yang berasal dari daerah cariuk memiliki

tiga genotipe yaitu genotipe CC, TT dan CT, ini menunjukkan bahwa ternak kambing perah yang ada didaerah Cariuk lebih beragam dibandingkan dengan kambing perah yang berasal dari daerah Cijeruk, Ciapus dan Ciawi.

Pendeteksian Keragaman Gen α 2-Kasein Dengan Metode PCR-RFLP

Hasil amplifikasi PCR gen α 2-kasein pada kambing Peranakan Etawah, Saanen dan Persilangan PE-Saanen memiliki panjang 301 bp, terdapat pada posisi 58 bp pada daerah intron 10, 58 bp exon 11 dan 121 bp pada daerah intron 11. Ramunno *et al* (2001) melaporkan bahwa hasil amplifikasi PCR gen alpha-kasein (CSN1S2) memiliki panjang fragmen 301 bp, yang terletak pada daerah exon 11 dan sebagian didaerah intron. Hasil amplifikasi PCR dipotong dengan enzim *NcoI* menghasilkan satu alel yaitu alel N dengan panjang fragmen 168 dan 133 bp (gambar 2).



Gambar 2. Visualisasi pola pita RFLP gen α 2-kasein enzim restriksi *NcoI* pada gel agarose 2%.

Frekuensi alel dan frekuensi genotipe untuk gen α 2-kasein pada tiap populasi bangsa kambing perah (Peranakan Etawah, Saanen dan Persilangan PE-Saanen) dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4: Frekuensi Genotipe dan Alel gen α 2-kasein

Bangsa	Jumlah Sampel (ekor)	Genotipe NN	Alel N
PE	48	1,00	1,00
Saanen	51	1,00	1,00
Persilangan PE-Saanen	51	1,00	1,00

Berdasarkan hasil pendeteksian keragaman gen α 2-kasein pada kambing Peranakan Etawah, Saanen dan Pesilangan PE-Saanen dengan metode PCR-RFLP dengan enzim *NcoI* diketahui bahwa gen alpha-kasein pada kambing perah bersifat

monomorfik (seragam). Semua produk PCR yang dipotong menunjukkan pola potongan yang sama.

Pengaruh Keragaman Daerah Promotor dan Ekson 1 Gen Beta-Laktoglobulin Terhadap Kualitas Susu Kambing Perah

Nilai rata-rata parameter kualitas susu yaitu berat jenis, kadar lemak, kadar protein, bahan kering dan bahan kering tanpa lemak pada kambing perah (kambing Peranakan Etawah, Saanen dan Persilangan PE-Saanen) disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5: Nilai Rataan Berat Jenis, Lemak, Protein, Bahan Kering dan Bahan Kering Tanpa Lemak yang diamati berdasarkan genotipe Gen Beta-Laktoglobulin.

Genotipe	Jumlah (n)	BJ	Lemak	Protein	BK	BKTL
CC	31	1,031 ^{ab} ±	4,387±	3,948±	13,601±	9,214±
		0,002	1,635	1,057	2,131	0,750
TT	14	1,032 ^a ±	4,099±	4,215±	13,515±	9,452 ^a
		0,002	1,468	0,971	1,608	± 0,515
CT	30	1,030 ^b ±	4,783±	3,895±	13,818±	9,097 ^b ±
		0,002	1,831	0,592	2,005	0,539

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan, superskrip dengan abjad besar menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0.01$), sedangkan abjad kecil menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$). BJ (berat jenis), BK (bahan kering), BKTL (bahan kering tanpa lemak).

Berdasarkan hasil analisis pengaruh keragaman gen beta-laktoglobulin pada kambing PE, Saanen dan Persilangan PE-Saanen menunjukkan bahwa genotipe CC pada ketiga bangsa kambing tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap berat jenis, kadar lemak, kadar protein, bahan kering dan bahan kering tanpa lemak susu kambing. Genotipe TT berpengaruh sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap berat jenis dan BKTL susu kambing. Kambing Peranakan Etawah yang bergenotipe TT memiliki berat jenis (1,033) dan BKTL (9,635) yang lebih tinggi dibandingkan dengan kambing Persilangan PE-Saanen yang bergenotipe TT, sedangkan genotipe CT berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap berat jenis susu kambing, kambing PE yang bergenotipe CT memiliki berat jenis (1,032) lebih tinggi dibandingkan dengan kambing Saanen dan Persilangan PE-Saanen.

KESIMPULAN

Identifikasi keragaman gen β -laktoglobulin pada daerah promotor dan ekson 1 menggunakan metode PCR-RFLP menghasilkan produk ampikon sepanjang 710 bp,

yang terdiri atas 588 bp pada promotor proximal dan 122 bp pada exon 1. Proses pemotongan gen β -laktoglobulin oleh enzim restriksi *SmaI* memperlihatkan adanya keragaman atau bersifat polimorfik. *Genotyping* gen β -laktoglobulin menghasilkan dua tipe alel, yaitu C dan T, sehingga diperoleh tiga variasi genotipe, yaitu CC, TT dan CT. Nilai berat jenis, kadar lemak, kadar protein, bahan kering dan bahan kering tanpa lemak susu kambing yang bergenotipe CC, TT dan CT telah memenuhi standar SNI 01-3141-1998 dan TAS (Thai Agricultural Standard) 6006-2008. Hasil amplifikasi PCR gen alpha-kasein (CSN1S2) memiliki panjang fragmen 301 bp, yang terletak pada daerah exon 11 dan sebagian didaerah intron. Hasil amplifikasi PCR dipotong dengan enzim *NcoI* menghasilkan satu alel yaitu alel N dengan panjang fragmen 168 dan 133 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- Folch JM, Coll A, Sanchez A. 1994. Complete sequence of the caprine β -lactoglobulin gene. *J Dairy Sci* 77:3493-3497.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Noor RR. 2000. *Genetika Ternak*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Ramunno L. *et al.* 2001b. Characterization of two new alleles at the goat CSN1S2 locus. *Anim Genet* 32:264-268.
- Standard Nasional Indonesia. 1992. *Cara uji susu segar*. Pusat Standardisasi Industri. Departemen Prindustrian.
- Thai Agricultural Standard 6006-2008: Raw Goat Milk. 2008. Vol. 125 Section 139 D. Published in the Royal Gazette.
- Yahyaoui MH, Pena RN, Sa'nchez A, Folch JM. 2000. Rapid communication: polymorphism in the goat β -lactoglobulin proximal promoter region 1. *Anim Sci* 78:1100-1101.