

ANALISIS ISOENZIM UNTUK MEMPELAJARI VARIASI GENETIK SAPI BALI DI PROVINSI BALI

Sri Rahayu*, SB Sumitro*, T. Susilawati**, dan Soemarno***

* Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang

** Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang

*** Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

The aim of this research was to know Bali cattle genetic variation according to the band pattern of isoenzyme. Esterase and Malate dehydrogenase Isoenzymes of Bali cattle were studied. Using the native-PAGE method, the analysis has been made of the genetic structure and variation of the Bali cattle population. Isoenzyme isolated from leucocytes cell using homogenation method by adding Phosphat Buffer Saline (PBS). A hundred sample of Bali cattles were taken in Mambang, Slemadeg and Kuwumkeladi. The result of this research indicate that from the 2 different enzyme, 3 loci were detected, and 1 of them was polymorphic (MDH-2). There was null allele phenomom in MDH-2 locus. The loci polymorphic proportion of three population were 0,333. Chi-Square analysis of three population were 1.251–1.560. The heterozygosity value of three population (Mambang, Slemadeg and Kuwumkeladi) were 0.098, 0.111 and 0.118, respectively.

Key words: esterase, malate dehydrogenase, isoenzyme, Bali cattle, genetic variation

PENGANTAR

Sapi bali (*Bos sondaicus*) adalah salah satu kekayaan plasma nutfah yang dimiliki Indonesia, merupakan hasil domestikasi (penjinakan) dari banteng liar (*Bos-Bibos banteng*) sejak beberapa abad yang lalu (Hardjosubroto, 1994). Sapi bali memiliki potensi ekonomi yang tinggi karena memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan sapi dari tempat lain. Keunggulan sapi bali antara lain memiliki tingkat fertilitas tinggi (80–82%), daya adaptasi yang baik terhadap lingkungan baru, dan produksi karkas yang tinggi, daging tanpa lemak, dan heterosis positif tinggi pada persilangan (Pane, 1990; Noor dkk., 2001). Namun, ada juga kekurangannya yaitu peka terhadap penyakit jembrana, penyakit ingusan, dan bali *ziekte* (Hardjosubroto, 1994).

Sejak krisis ekonomi pada tahun 1997, terjadi pengurangan ternak di beberapa daerah (Dwiyanto & Setiadi, 2000). Adanya seleksi negatif di tingkat peternak dan upaya pembibitan yang kurang diperhatikan mengakibatkan sapi bali yang tersisa adalah ternak-ternak yang kualitasnya kurang bagus yang kemudian terpaksa menjadi sapi bibit. Apabila hal ini berlangsung terus menerus dikhawatirkan suatu saat sapi bali akan mengalami kepunahan dan Indonesia akan mengalami kerugian yang sangat besar karena kehilangan plasma nutfah (Mahaputra, 2002; Hardjosubroto, 2002).

Informasi yang diperoleh dari peternak di beberapa desa (Tabanan dan Karangasem) di Provinsi Bali menunjukkan bahwa pada satu desa hanya terdapat beberapa ekor

pejantan yang digunakan sebagai pejantan untuk keperluan perkembangbiakan. Penggunaan pejantan yang sama secara terus menerus dapat menyebabkan terjadinya *inbreeding*. Sariubang dkk. (1998) dan Chamdi (2005) menyatakan bahwa masalah utama yang dihadapi dalam pengembangan ternak sapi bali adalah rendahnya kualitas bibit yang diduga akibat dari faktor *inbreeding* atau tatalaksana pemeliharannya. Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Handiwirawan (2003) pada beberapa populasi sapi bali yang ada di Pulau Bali sebanyak 17% telah mengalami penyimpangan warna.

Inbreeding adalah perkawinan yang terjadi antarindividu yang mempunyai hubungan keluarga yang dekat. Perkawinan semacam ini apabila berlangsung terus-menerus akan meningkatkan jumlah individu homosisogot di dalam populasi tersebut (Klug & Cummings, 2002). Hardjosubroto (1994) menduga telah terjadi *inbreeding* pada populasi sapi bali yang ada di Provinsi Bali, karena ditemukannya beberapa kelainan fenotip sapi bali yang berhubungan dengan pola warnanya. *Inbreeding* sering menyebabkan menurunnya ukuran tubuh, fertilitas, dan daya tahan tubuhnya (Fioretti *et al.*, 2002).

Berdasarkan kondisi di atas, untuk menunjang keberhasilan upaya pembibitan sapi bali, maka sangat perlu segera dilakukan identifikasi variasi genetik pada sapi bali. Variasi genetik merupakan salah satu kunci pengelolaan yang optimal terhadap sumber daya genetik. Untuk mengidentifikasi variasi genetik dapat dilakukan melalui pendekatan dengan pengamatan morfologis dan molekuler. Ciri-ciri morfologi dapat digunakan untuk

mengkarakterisasi pola diversitas genetik namun sifat yang dapat digambarkan hanya dalam proporsi kecil dari karakter genetik dan cenderung dipengaruhi oleh faktor lingkungan, oleh karena itu diperlukan identifikasi genetik secara molekuler untuk melengkapi keterbatasan tersebut. Identifikasi variasi genetik secara molekuler dapat dilakukan melalui pendekatan analisis isoenzim dan DNA. Identifikasi variasi genetik dengan isoenzim mempunyai beberapa kelebihan antara lain menghasilkan data yang lebih akurat karena isoenzim merupakan ekspresi gen akhir, relatif sederhana, memerlukan biaya cukup rendah (ekonomis), dan tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Avisé, 1994). Para peneliti telah banyak menggunakan pendekatan melalui analisis isoenzim untuk mengetahui variasi genetik suatu populasi. *Esterase*, *Malate dehydrogenase*, dan *Aspartat amino transferase* adalah enzim-enzim yang bisa digunakan untuk mempelajari variasi genetik pada suatu populasi hewan (Lieb *et al.*, 1999; Paulauskas & Starodubaitė, 2003).

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel Penelitian

Sampel darah dari 100 ekor sapi bali diambil dari 3 desa di Provinsi Bali, yaitu Mambang, Slemadeg, dan Kuwumkeladi. Sampel darah diambil dari *vena jugularis*, dimasukkan ke dalam *vacutainer* yang telah berisi EDTA steril (Arai *et al.*, 2003). Selanjutnya dilakukan pemisahan limfosit dari darah dengan menggunakan *RBCs Lysis (Red Blood Cells Lysis)* (Sambrook & Russel, 2001). Dalam penelitian ini dipilih dua enzim yaitu *Esterase* dan *Malate Dehydrogenase*. *Esterase* merupakan enzim yang terlibat di dalam metabolisme lemak, sedangkan *Malat Dehydrogenase* merupakan dua enzim yang terlibat di dalam siklus Krebs.

Isolasi Isozim dari Leukosit

Isolasi isozim dari leukosit dilaksanakan sesuai dengan metode Aly *et al.* (2003) yakni metode penggerusan (homogenasi) yang telah dimodifikasi pada penggunaan *buffer*. Populasi sel leukosit yang telah didapatkan dimasukkan dalam *mortar* yang dialasi dengan es padat, kemudian ditambah satu mililiter PBS. Selanjutnya dibekukan dengan menambahkan Nitrogen cair, sampel digerus sampai halus. Homogenat selanjutnya dimasukkan dalam tabung Eppendorf 1500 μ l dan disentrifus pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Lapisan supernatan dipisahkan dalam tabung baru dan disimpan dalam *freezer* untuk proses elektroforesis.

Elektroforesis Isozim Native-PAGE

Elektroforesis isozim dilakukan pada gel poliakrilamid vertikal dengan menggunakan sistem *native-PAGE* dan *discontinuous*. Gel poliakrilamid yang digunakan adalah separating gel 7% dan stacking gel 5%. Elektroforesis dilakukan pada *cold chamber* (4 °C) dengan arus konstan 10 mA selama 3–5 jam atau sampai *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel.

Pewarnaan Isozim

Pewarnaan yang dilakukan bergantung pada jenis enzim yang dianalisis. Dalam penelitian ini telah dilakukan analisis terhadap dua macam enzim yaitu *Esterase* dan *Malate Dehydrogenase*. Gel yang telah di-*running* kemudian dimasukkan ke dalam tempat yang telah berisi larutan pewarnaan sesuai dengan enzim yang dianalisis, kemudian diinkubasi ke dalam inkubator pada suhu 50 °C. Setelah pita yang muncul tampak jelas, inkubasi segera dihentikan dengan membuang larutan pewarna dan menggantinya dengan *acetic acid* sebagai larutan *stopper*.

Preparasi Pewarnaan Isozim Esterase (EST)

Larutan *staining* isozim *Esterase* dibuat dengan cara melarutkan 0,025 g α -*Naphtyl acetate* dan 0,025 g β -*Naphtyl acetate* dalam 250 μ l *acetone* dingin serta 0,05 g *Fast Blue BB salt* dalam 250 μ l *acetone* dingin. Setelah itu, larutan α -*Naphtyl acetate* dan β -*Naphtyl acetate* serta *Fast Blue BB salt* dicampurkan dalam *Na-phosphate* pH 6,0 dalam tempat tanpa cahaya.

Preparasi Pewarnaan Isozim Malate Dehydrogenase (MDH)

Larutan *staining* untuk isozim *Malate Dehydrogenase* dibuat dengan cara melarutkan 10 ml larutan NAD (+) dan 0,1 gram *DL-Malic acid disodium salt* dengan 10 ml *Tris-HCl* 0.2 M pH 8.7, sedangkan larutan *poststaining* dibuat dengan cara melarutkan 25 ml gliserol ke dalam 25 ml *aquades*, kemudian dihomogenkan. Untuk mendapatkan hasil *staining* yang maksimal, proses *staining* sampai *poststaining* dilakukan pada tempat tertutup.

Analisis Data

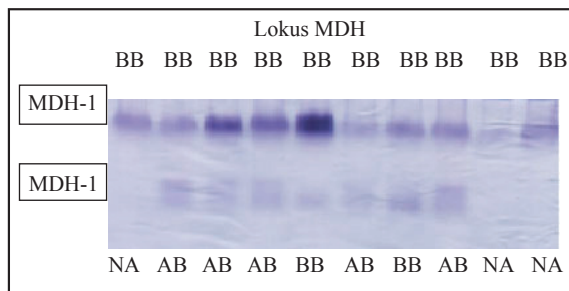
Hasil elektroforesis diinterpretasi berdasarkan pita yang terbentuk. Dalam menginterpretasikan pita hasil analisis isozim, penamaan lokus dan alel mengikuti metode Allendorf dan Utter (1979) dalam Sugama *et al.* (1996). Pita yang muncul selanjutnya digunakan untuk menghitung beberapa parameter variasi genetik yang meliputi frekuensi alel, jumlah alel per lokus, dan heterozigositas. Keseluruhan

parameter tersebut dianalisis dengan *software package* GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995).

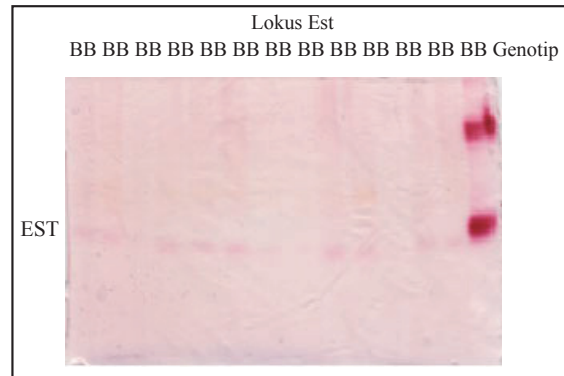
HASIL PENELITIAN

Hasil analisis elektroforesis dengan menggunakan *native-PAGE* pada 2 macam enzim disajikan pada Gambar 1 dan 2. Dari hasil elektroforesis terdeteksi 3 lokus dan 1 loki di antaranya adalah polimorfik yaitu MDH-2 (*Malate Dehydrogenase*) atau dengan proporsi polimorfik lebih kurang 33%, sedangkan 1 lokus EST (*Esterase*) adalah monomorfik (Tabel 1). Dari 100 sampel yang digunakan tidak semuanya mengekspresikan lokus MDH-2 (Gambar 1). Lokus yang tidak terekspresi menunjukkan tidak adanya gen yang mengekspresikan enzim MDH-2 pada individu tersebut. Faktor lain yang dapat menyebabkan tidak terekspresinya enzim adalah adanya fenomena *null allele* (Pasteur & Pasteur, 1988; Soltis & Soltis, 1989). Berdasarkan data elektrogram, tiap lokus dapat dihitung jumlah genotip yang

teramati dan frekuensi alelnya, selanjutnya diuji dengan *Chi-Square* (X^2) untuk menentukan kelayakan proporsi Hardy-Weinberg. Hasil penghitungannya terangkum dalam Tabel 2. Dengan frekuensi alel yang diperoleh dari hasil pembacaan tersebut di atas digunakan untuk menghitung beberapa parameter variasi genetik seperti terangkum dalam Tabel 3.



Gambar 1. Pola pita elektroforesis isozim MDH pada darah sapi bali (*Bos sondaicus*). BB : genotip BB; AB : Genotip AB; NA : *Null Allele*



Gambar 2. Pola pita elektroforesis isozim EST pada darah sapi bali (*B. sondaicus*)

Tabel 1. Enzim, lokus yang terdeteksi, dan polimorfisme pada sapi bali

No	Enzim	Lokus	Polimorfisme
1	<i>Malate Dehydrogenase</i>	MDH-1	M
2	<i>Malate Dehydrogenase</i>	MDH-2	P
3	<i>Esterase</i>	EST	M

Keterangan: M = Monomorfik
P = Polimorfik

Tabel 2. Genotip teramati, genotip harapan dan frekuensi alel dalam kesetimbangan Hardy-Weinberg pada 3 populasi sapi bali untuk lokus polimorfik

Lokasi Sampel	Lokus		Genotip			N	Frekuensi Alel		X^2
			BB	AB	AA		A	B	
Desa Mambang	EST	Obs	44	0		44	0	1	0
		Exp	44	0					
	MDH-1	Obs	44	0		44	0	1	0
		Exp	44	0					
	MDH-2	Obs	31	13		44	0,15	0,85	1,36
		Exp	31,96	11,08					
Desa Slemadeg	EST	Obs	39	0		39	0	1	0
		Exp	39	0					
	MDH-1	Obs	39	0		39	0	1	0
		Exp	39	0					
	MDH-2	Obs	26	13		39	0,17	0,83	1,56
		Exp	27,08	10,83					
Desa Kuwumkeladi	EST	Obs	17	0		17	0	1	0
		Exp	17	0					
	MDH-1	Obs	17	0		17	0	1	0
		Exp	17	0					
	MDH-2	Obs	11	6		17	0,18	0,82	1,25
		Exp	11,53	4,94					

Keterangan: Obs: Observasi; Exp: Expected; X^2 : nilai *chi square*

Tabel 3. Variasi genetik populasi sapi bali dari 3 populasi, heterozigositas dan jumlah alel per lokus dalam 3 lokus

No	Parameter	Populasi			Rata-rata
		Desa Mambang	Desa Slemadeg	Desa Kuwumkeladi	
1	Jumlah Sampel	44	39	17	33,33
2	Jumlah Lokus	3	3	3	3
3	Jumlah Lokus polimorfik	1	1	1	1
4	Proporsi Lokus polimorfik	0,333	0,333	0,333	0,333
5	Jumlah alel per lokus	1,333	1,333	1,333	1,333
6	Heterosigositas teramati (Ho)	0,098	0,111	0,118	0,109
7	Heterosigositas harapan (He)	0,084	0,093	0,097	0,091

PEMBAHASAN

Penggunaan pola pita elektroforesis enzim telah banyak digunakan untuk mendapatkan data variasi genetik. Enzim atau protein dapat digunakan untuk menunjukkan variasi baik secara kualitatif maupun secara kuantitatif. Variasi ini akibat dari peran gen yang mengarahkan pembentukan enzim yang bersangkutan, oleh karenanya variasi enzim dapat menggambarkan variasi gen.

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Esterase* dan *Malate Dehydrogenase*. *Esterase* adalah suatu enzim yang ditemukan di dalam darah dan jaringan, termasuk golongan *hydrolase* karena mempunyai kemampuan untuk menghidrolisa ester (Silveira *et al.*, 2003). Menurut Pasteur *et al.* (1988), untuk mengkarakterisasi isozim *Esterase* sebagai marker variasi genetik diperlukan metode pewarnaan isozim dengan substrat yang spesifik. Substrat spesifik yang digunakan dalam reaksi *Esterase* adalah senyawa *Naphthyl Ester* yang akan dihidrolisis oleh enzim *Esterase* menjadi α -or β -Naphthol, selanjutnya dengan pewarna *Fast Blue RR* akan menghasilkan endapan berwarna merah. *Malate Dehydrogenase* termasuk golongan *oxidoreductase* yang berperan di dalam siklus asam sitrat. *Malate Dehydrogenase* merupakan salah satu enzim yang memerlukan NAD⁺ dan NADP sebagai koenzim. Dengan bantuan PMS (*phenazine methosulfanat*) dan pewarna NBT (garam *nitroblue tetrazolium*) akan menimbulkan warna biru (Pasteur *et al.*, 1988; Silveira *et al.*, 2003).

Hasil elektroforesis 2 isozim tersebut ditemukan 3 lokus, yaitu MDH-1, MDH-2 dan *Esterse*. MDH-1 dan *Esterse* merupakan lokus monomorfik karena hanya ditemukan satu alel, sedangkan MDH-2 merupakan lokus polimorfik karena ditemukan 2 alel. Pola pita enzim ketiga lokus tersebut dapat dilihat pada Gambar 1 dan 4. Dari gambar tersebut tampak adanya perbedaan pola pita enzim. Dari 30 sampel yang digunakan tidak semuanya mengekspresikan

lokus MDH-2. Lokus yang tidak terekspresi menunjukkan tidak adanya gen yang mengekspresikan enzim MDH-2 pada individu tersebut. Faktor lain yang dapat menyebabkan tidak terekspresinya enzim adalah adanya fenomena *null allele* (Pasteur *et al.*, 1988; Soltis and Soltis, 1989). *Null allele* dapat terjadi karena adanya mutasi. Mutasi pada gen dapat menyebabkan suatu individu kehilangan kemampuan untuk mensintesis suatu protein tertentu.

Lokus polimorfik menggambarkan adanya heterozigositas pada suatu individu. Setiap individu heterozigot masing-masing membawa dua macam alel. Pada umumnya mereka akan menunjukkan pola isozim yang lebih kompleks bila dibandingkan dengan individu homozigot. Menurut Soltis and Soltis (1989), suatu enzim bisa dikode oleh beberapa gen sehingga menampilkan fenotip yang kompleks.

Dari pembacaan pita pada hasil elektroforesis dapat dihitung frekuensi alel pada masing-masing lokus dan diuji dengan Hukum Keseimbangan Hardy-Weinberg. Hasil pembacaan frekuensi alel tersebut disajikan pada Tabel 2. Dari Tabel 2 terlihat bahwa nilai X^2 lokus polimorfik pada ketiga populasi berkisar antara 1,251 sampai 1,560. Hal ini berarti sapi Bali yang diamati dari ketiga populasi (Mambang, Slemadeg, dan Kuwumkeladi) tersebut menunjukkan proporsi genotip berada dalam kesetimbangan Hardy-Weinberg dengan uji *Chi-Square* (X^2). Suatu kondisi dikatakan setimbang jika nilai X^2 dari semua lokus lebih kecil dari nilai X^2 tabel (0,05) = 3,84 (Caughley & Gunn, 1996 ; Warwick dkk, 1984).

Nilai heterozigositas teramati (Ho) untuk populasi Desa Mambang, Slemadeg, dan Kuwumkeladi berturut-turut adalah 0,098; 0,111; dan 0,118, dengan nilai heterosigositas rata-rata sebesar 0,109. Handiwirawan (2003), menemukan rerata heterozigositas sebesar 0,3325 pada lokus HEL9 dan INRA035. Adanya perbedaan heterozigositas ini kemungkinan karena lokus yang diamati berbeda.

KEPUSTAKAAN

- Aly IN dan Abdel Satter MA, 2003. Comparison of Multilocus Enzyme and Protein Gel Electrophoresis in The Discrimination of Five *Fusarium* Spesies Isolated From Egyptian Cottons. *African Journal of Biotechnology*. 2(7): 206–210.
- Arai TA, Uemtsu IY, Sako T, and Kimura N, 2003. Activities of Enzymes in The Malate-Aspartate Shuttle and The Isoenzyme Pattern of Lactate Dehydrogenase in Plasma and Peripheral Leukocytes of Lactating Holstein Cows and Riding Horses. *Research in veterinary sciences* 75: 15–19.
- Avise, 1994. *Molecular Analysis of Genetic Variation*. Oxford Forestry Institute Tropical Forestry Paper. No. 40 pp: 1.
- Caughley G and Gunn A, 1996. *Conservation Biology in Theory and Practice*. Blackwell Science, Massachusetts, USA.
- Chamdi AN. 2005. Karakteristik Sumberdaya Genetik Ternak Sapi Bali (Bos-bibos banteng) dan Alternatif Pola Konservasinya. *Biodiversitas* Vol. 6 No 1: 70–75.
- Diwyanto K, Setiadi B, 2000. Perplasmanutfahan (Pertanian) di Indonesia. Studium Generale, Komisi Nasional Plasma Nutfah Bekerjasama dengan Universitas Diponegoro, Semarang, 11 Oktober 2000.
- Fioretti M, Rosati A, Pieramati C, and Van Vleck LD, 2002. Effect of Including Inbreeding Coefficients for Animal and Dam on Estimates of Genetic Parameters and Prediction of Breeding Values for Reproductive and Growth Traits of Piedmontese Cattle. *Livestock Production Science* 74: 137–145.
- Handiwirawan E, 2003. *Penggunaan Mikrosatelit HEL9 dan INRA035 Sebagai penciri khas sapi Bali*. Tesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Hardjosubroto W. 2002. Arah dan Sasaran Penelitian dan Pengembangan Sapi Potong di Indonesia: Tinjauan dari Segi Pemuliaan Ternak. Workshop Sapi Potong. Malang, 11–12 April 2002.
- Hardjosubroto W, 1994. *Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan*. Jakarta: PT. Gramedia Widasarana Indonesia, Jakarta.
- Klug WS and Cummings MR, 2002. *Essentials of Genetics*. Fourth Edition. Prantice Hall, New Jersey.
- Lieb CS, Sites JW, and Archie JW, 1999. The Use of Isozyme Characters in Systematic Studie of Turtles: Preliminary Data for Australian Cheilds. *Biochemical Systematics and Ecology*. 27: 157–183.
- Mahaputra L, 2002. Arah dan Sasaran Penelitian Reproduksi Sapi Potong di Indonesia. Workshop sapi Potong Di Malang, Jawa Timur, 11–12 April 2002.
- Noor RR, Farajallah A, Karmita M, 2001. Pengujian Kemurnian Sapi Bali Dengan Analisis Hemoglobin dengan Metode Isoelectric Focusing. *Hayati* 8(4): 107–111.
- Pane I, 1990. Upaya Peningkatan Mutu Genetik Sapi Bali di P3 Bali. Prosiding Seminar nasional Sapi Bali, 20–22 September 1990.
- Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, and Davidian JB, 1988. *Practical Isozyme Genetics*. John Willey and Sons. New York.
- Paulauskas A and Starodubaite M, 2003. Isoenzyme Analysis of European Mole (*Talpa europaea* Linnaeus) From Lihuania. *Acta Zoologica Lituonica*. 13(3): 299–305.
- Raymond M and Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): Population Genetic Software for Exact Test and Ecumenicism. *J. Heredity* 86: 248–249.
- Sambrook J and Russel DW, 2001. *Molecular Clonning a Laboratory Manual*. Third Ed. Vol 1. Cold Sping Harbor Laboratory Press, New York.
- Sariubang M, Pasambe D, dan Chalidjah, 1998. Pengaruh Kawin Silang terhadap Performans Hasil Turunan Pertama (F1) Pada Sapi Bali di Sulawesi Selatan. Prosiding Seminar nasional Peternakan dan veteriner. Bogor, 1–2 Desember 1998.
- Silveira RMB, Saidman BO, and Wright JE, 2003. *Polyporus s.str.* in Southern South America: isoenzyme analysis. *Mycol. Res.* 107(5): 597–608.
- Soltis DE, Soltis PS, 1989. *Isoozymes in Plant Biology*. Vol. 4. Discorides Press. Portland, Oregon.
- Sugama K, Haryati and Cholik F, 1996. Biochemical Genetic of Tiger Shrimp *Penaeus monodon*, Description of Electrophoretic Detectable Loci. *IFR. J.* II(1): 19–28
- Warwick EJ, Astuti JM, dan Hardjosubroto W, 1984. *Pemuliaan Ternak*. Cetakan ke-2. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Reviewer: **Dr. Bambang Irawan, MSc**