

## Identifikasi Polimorfisme pada Fragmen ND-5 DNA Mitokondria Sapi Benggala dan Madura dengan Teknik PCR-RFLP

### *Identification of polymorphism on ND-5 mitochondrial DNA fragment of Benggala and Madura cattle with PCR-RFLP technique*

NEO ENDRA LELANA, SUTARNO, NITA ETIKAWATI

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126

Diterima: 19 Nopember 2002. Disetujui: 1 Januari 2003

#### ABSTRACT

The objectives of the research were to detect genetic variations on ND-5 region of mtDNA of Benggala and Madura cattles, and to compare the genetic diversity within or between Madura and Benggala cattle. Genetic variations and its effects on phenotype characters have been studied largely in dairy cattles, but not for beef cattles, especially for Indonesian local cattles. PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) was used to detect polymorphism on ND-5 region of mitochondrial DNA. Polymorphisms were found on ND-5 mitochondrial DNA fragment using *HindIII* restriction enzyme. This variation were likely due to lost of *HindIII* restriction site on ND-5 mitochondrial DNA fragment.

© 2003 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** ND-5 mitochondrial DNA, genetic variation, PCR-RFLP.

#### PENDAHULUAN

Sapi merupakan hewan ternak dengan keanekaragaman jenis tinggi dan ditemukan hampir di semua negara termasuk Indonesia. Sapi Benggala dan Madura merupakan contoh ras domestik Indonesia. Keduanya telah mengalami seleksi alam secara ketat sehingga mampu beradaptasi dengan baik pada kondisi lingkungan tropis. Banyak sifat ternak yang secara ekonomi bernilai penting menunjukkan variasi morfologi (fenotip). Variasi fenotip ini dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Pada tingkat genetik, sifat-sifat tersebut tidak hanya dipengaruhi oleh sebuah lokus gen tetapi oleh banyak lokus gen (Soller, 1994).

Diversitas genetik dapat terjadi karena adanya variasi genetik, baik inter maupun antar spesies pada suatu populasi (Sutarno, 1999). Adanya polimorfisme pada suatu spesies akan sangat bermanfaat dalam bidang genetika maupun untuk kepentingan seleksi. Variasi ini dapat digunakan untuk identifikasi dan mencari asal-usul suatu jenis hewan, mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies sampai pada penyusunan peta gen. Informasi variasi genetik dapat dijadikan dasar perkawinan silang (Soller, 1994) dan seleksi untuk meningkatkan produksi ternak, serta tujuan konservasi (Hall dan Bradley, 1995).

Sejak ditemukan suatu metode pelipatgandaan DNA secara *in vitro* yang dikenal dengan *polymerase chain reaction* (PCR), maka banyak berkembang

teknik molekuler berdasarkan PCR, misalnya: *arbitrarily primed polymerase chain reaction* (AP-PCR), *polymerase chain reaction-single stranded conformation polymorphism* (PCR-SSCP), *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). Penemuan teknik molekuler tersebut sangat membantu perkembangan dalam bidang biologi molekuler sehingga variasi makhluk hidup dapat langsung dideteksi pada tingkat gen, bukan hanya tingkat morfologi.

Selama dekade terakhir terjadi peningkatan aplikasi genetika molekuler untuk mengungkapkan variasi genetik. DNA mitokondria banyak digunakan untuk mengungkap variasi genetik (Loftus *et al.*, 1994), karena ukurannya yang relatif kecil, terlibat dalam sintesis energi dan mempunyai kecepatan mutasi 5-10 kali lebih tinggi daripada DNA inti (Lindberg, 1989). Mitokondria merupakan pusat sintesis energi dan ketersediaan energi yang ada akan berpengaruh terhadap reaksi metabolisme. Berbagai macam enzim terlibat dalam sintesis energi dan sebagian dari enzim tersebut dikodekan oleh DNA mitokondria. Salah satu gen pada DNA mitokondria yang mengkodekan enzim yang terlibat dalam sintesis energi adalah ND-5.

Polimorfisme pada DNA mitokondria mempengaruhi fenotip, seperti keterlibatannya dalam beberapa penyakit degeneratif (Wallace, 1992), proses penuaan (Miquel, 1991) dan sifat-sifat produksi

(Lindberg, 1989). Variasi genetik pada DNA mitokondria banyak dilaporkan terjadi pada sapi perah (Hauswirth dan Laipis., 1982; Bhat *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1993; Ishida *et al.*, 1994; Loftus *et al.* 1994; Bradley *et al.*, 1996). Penelitian tentang variasi genetik pada sapi perah telah banyak dilakukan, tetapi penelitian-penelitian tentang variasi genetik terhadap sapi pedaging terutama sapi lokal Indonesia masih sangat jarang.

Tujuan dari penelitian ini adalah: (i) mendeteksi adanya variasi genetik pada fragmen ND-5 DNA mitokondria pada sapi Benggala dan Madura, (ii) membandingkan diversitas genetik DNA mitokondria pada kedua jenis sapi tersebut.

## BAHAN DAN METODE

### *Waktu dan tempat penelitian*

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2000 s.d. Februari 2002 di Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.

### *Bahan dan alat*

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel darah sapi Benggala sebanyak 50 individu dan sapi Madura sebanyak 49 individu, *Wizard Genomic DNA Purification Kit* dari Promega (*cell lysis solution, nuclei lysis solution, protein precipitation solution, RNAase, DNA rehydration solution*), isopropanol, 70 % etanol, PCR Core System I dari Promega (*MgCl<sub>2</sub>, 10 X buffer reaction Taq DNA polymerase, PCR nucleotida mix, Taq DNA polymerase*), enzim restriksi *Hind III* dari GibcoBRL, agarosa dari Promega, 1X *tris acetic acid* EDTA (TAE), *ethidium bromida*, aquades steril, primer ND-5 yang terdiri dari primer ND-L: 5'-ATCCGTTGGTCTTAGGAACC-3' dan primer ND-R: 5'-TTGCGTTACAAGGATGAGC-3', *blue loading dye*, kertas tisu, parafilm, kristal es, *ultra pure water* dari Biotech, 50-2000 bp *marker* dari Bio Rad.

Alat yang digunakan meliputi sentrifuge (Hettich), mikropipet (ukuran 20 µl, 200 µl, 1000 µl), *tips* 20µl, 200 µl dan 1000 µl, tabung mikro 1.5 ml (Axygen), tabung PCR 0,6 ml, satu set alat elektroforesis horisontal dan *power supply* (Consort), *microwave*, inkubator, *GeneAmp PCR System 2400 Thermo Cycler* (Perkin Elmer), Gel Doc 2000 (Bio Rad), *autoclave* (Ogawa Saiki Co), gelas ukur, erlenmeyer, tabung *venoject*, *vortex mixer* (Gemmy Industrial Corp), sarung tangan, penangas air (Haake), lemari pendingin suhu 4°C, *freezer* suhu -20°C, alat pembuat kristal es (Cornelius), timbangan elektrik (Denver Instrument).

### *Cara kerja*

**Pengambilan sampel darah.** Sampel darah sebanyak 5 ml diambil dari individu-individu sapi Benggala dan Madura secara *venepuncture*, menggunakan 10 ml tabung *venoject* yang berisi LH

(*lithium heparin*). Darah yang diambil ini digunakan langsung dan sebagian disimpan pada suhu -20°C untuk referensi.

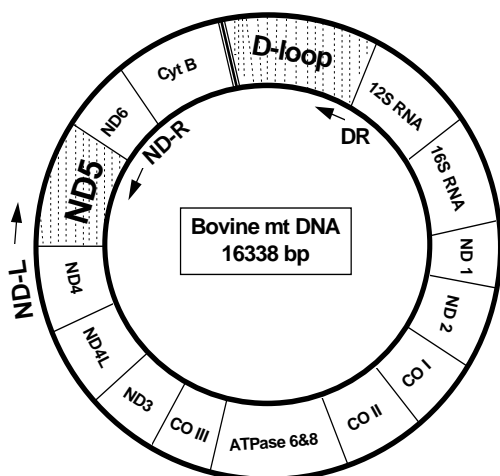
**Ekstraksi DNA mitokondria.** DNA diekstrak dari total darah menggunakan teknik *Wizard Genomic Purification System*. Total darah sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam 1.5 ml tabung mikrosentrifus yang telah diisi 450 µl larutan pelisis sel (*cell lysis solution*), dicampur dengan membolak-balikkan tabung sebanyak 5-6 kali kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 10 menit untuk melisis sel darah merah. Jika pelet masih berwarna merah, langkah tersebut diulang sampai didapatkan pelet berwarna putih bersih (2-3 kali). Setelah itu tabung disentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 20 detik pada suhu kamar untuk memperoleh pelet sel darah putih. Supernatan dibuang dan pelet sel darah putih dibuat agar tidak menggumpal dengan vortex selama ± 20 detik. Larutan pelisis inti (*nuclei lysis solution*) sebanyak 150 µl ditambahkan ke dalam tabung yang berisi pelet sel darah putih tersebut kemudian dicampur dengan cara membolak-balikkan tabung untuk melisiskannya. Setelah itu 1 µl RNAase ditambahkan ke dalam larutan inti dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 15-20 menit. Setelah itu sampel didinginkan pada suhu kamar selama ± 3 menit dan kemudian ditambah 60 µl *protein precipitation solution*, dicampur sampai homogen dengan vortex selama 10-20 detik dan kemudian disentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 3 menit untuk membentuk pelet protein.

Supernatan diambil dengan pipet dan dimasukkan ke dalam 1.5 ml tabung mikrosentrifus yang sebelumnya telah diisi dengan 150 µl isopropanol. Tabung tersebut kemudian dibolak-balik sampai terbentuk materi seperti benang berwarna putih dari DNA yang terlihat. DNA kemudian disentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 1 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang kemudian ke dalam pelet ditambahkan 300 µl 70% etanol pada suhu kamar dan tabung berisi DNA dan etanol dibolak-balikkan untuk mencuci pelet DNA. DNA didapatkan dengan sentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 1 menit pada suhu kamar. Etanol dibuang pelan-pelan, tabung mikrosentrifus kemudian dibalik di atas kertas saring dan dibiarkan terbuka pada suhu kamar selama 15-20 menit. Setelah kering, ditambahkan larutan rehidrasi DNA (*DNA rehydration solution*) sebanyak 100 µl dan DNA direhidrasi dengan cara diinkubasi semalam pada suhu kamar. DNA yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu 2-8°C sampai penggunaan berikutnya. Setelah itu DNA dicek dengan gel elektroforesis untuk mengetahui ada tidaknya DNA hasil ekstraksi. Konsentrasi DNA diukur dengan cara dibandingkan dengan DNA plasmid yang sudah diketahui konsentrasinya dalam gel elektroforesis.

**Reaksi PCR.** Hasil ekstraksi DNA kemudian digunakan untuk reaksi PCR yang dilakukan dalam mesin PCR (*thermocycler*). Reaksi ini untuk meng-

amplifikasi DNA mitokondria pada daerah ND-5. Reaksi dilakukan dalam suatu volume campuran sebanyak 25  $\mu$ l yang berisi 200  $\mu$ M dari masing-masing dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, DNA *template*, primer ND-L dan ND-R masing-masing 0,15  $\mu$ M, 10 kali bufer reaksi *Taq* DNA *polymerase* dan 1,5 unit *Taq* DNA *Polymerase* dalam 0,6 ml tabung PCR.

**Amplifikasi ND-5.** Daerah ND-5 dari DNA mitokondria diamplifikasi dengan PCR. Amplifikasi ND-5 dengan PCR menggunakan primer berturut-turut ND-L / ND-R. Skema letak primer ND-L, ND-R ditunjukkan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Diagram yang menunjukkan letak primer (ND-R, ND-L) yang digunakan untuk menghasilkan ND-5 dari DNA mitokondria sapi (Sutarno, 1999).

Primer yang digunakan dalam reaksi amplifikasi ND-5 dari DNA mitokondria adalah sebagai berikut:

ND-5 primer:

ND-L: 5'- ATCCGTTGGTCT TAGGAACC-3'

ND-R: 5'- TTGCGTTACAAGGATGAGC-3'

Kondisi reaksi amplifikasi PCR untuk ND-5 adalah: satu tahap reaksi denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti dengan 30 siklus amplifikasi yang masing-masing terdiri: *denaturasi* pada suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 58°C selama 45 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit, diikuti dengan satu tahap polimerisasi akhir pada suhu 72°C selama 6 menit

**Analisis RFLP.** Fragmen yang merupakan hasil amplifikasi PCR langsung digunakan dalam reaksi digesti dengan menggunakan enzim restriksi. Daerah ND-5 dari DNA mitokondria hasil amplifikasi dengan PCR di digesti dengan menggunakan enzim *HindIII*

*Aliquot* yang terdiri dari  $\pm$  100 ng DNA (hasil amplifikasi ND-5 dari DNA mitokondria) dimasukkan ke dalam tabung *effendorf* yang steril. *Master mix* dibuat dari campuran enzim restriksi *HindIII*, 10 X REact 2 bufer dan *ultra pure water*. *Master mix* sebanyak 8  $\mu$ l (1 unit enzim *HindIII*, 3  $\mu$ l 10X React 2

bufer dan sisanya *ultra pure water*) ditambahkan ke dalam masing-masing tabung yang berisi DNA hasil amplifikasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam.

**Elektroforesis.** Visualisasi DNA dilakukan dengan elektroforesis pada bak elektroforesis horisontal dengan menggunakan 1% gel agarosa. Gel agarosa dibuat dengan melarutkan agarosa dalam bufer 1X TAE dan dipanaskan dalam *microwave* selama  $\pm$  30 detik sampai tercampur homogen. Setelah itu larutan agarosa ditunggu sampai suhunya  $\pm$  60°C dan kemudian ke dalam larutan agarosa ditambahkan *ethidium bromida* dengan konsentrasi 0,12  $\mu$ g/ml agar DNA dapat divisualisasi dibawah sinar ultraviolet. Larutan agarosa kemudian dituang ke dalam bak elektroforesis yang sebelumnya telah dipasang sisir cetakan dan ditunggu sampai menjadi keras (15-20 menit).

Elektroforesis dilakukan selama 90 menit pada tegangan 55 volt (lama waktu *running* tergantung pada konsentrasi gel dan voltase). Setelah elektroforesis, DNA divisualisasi di bawah sinar ultraviolet dalam ruang gelap dan diambil gambarnya dengan menggunakan Gel Doc 2000 yang menggunakan filter merah.

#### Analisis Data

Diversitas genetik pada lokus-lokus DNA mitokondria dianalisis menggunakan penghitungan menurut (Nei 1973, 1975 dalam Baker dan Manwell, 1991) dengan rumus:

$$H = 1 - J, \text{ dan } J = (A^2 + B^2)$$

H = diversitas haplotipic

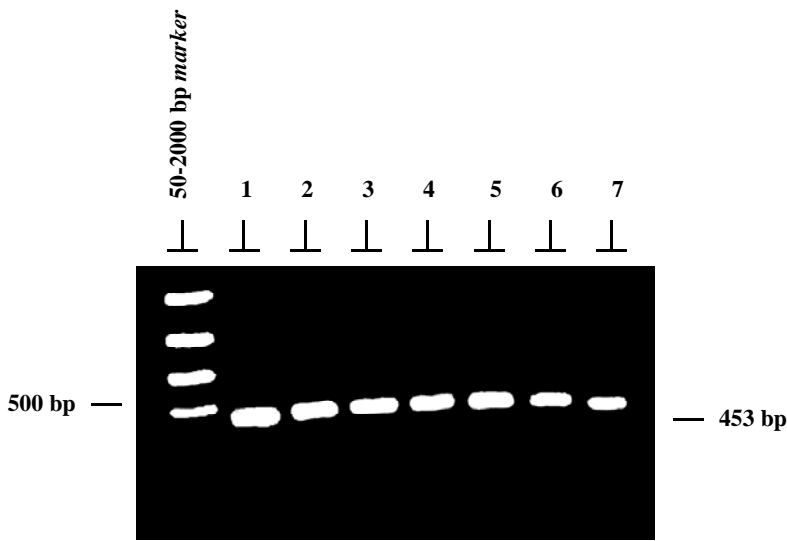
A = frekuensi haplotip A

B = frekuensi haplotip B

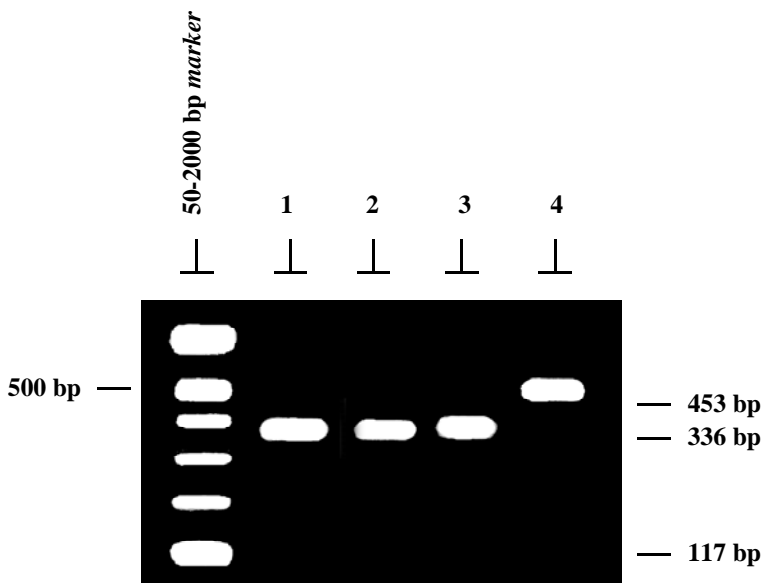
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Fragmen ND-5 DNA mitokondria yang terdiri dari 453 bp diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer ND-L dan ND-R. Produk PCR yang dihasilkan menunjukkan spesifikasi yang tinggi dengan hanya terbentuknya satu *band* DNA sesuai yang diharapkan. Spesifikasi hasil PCR ini dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain kemurnian DNA hasil ekstraksi, ketepatan pemilihan primer ND-L dan ND-R serta ketepatan kondisi reaksi PCR. Hasil amplifikasi fragmen ND-5 DNA mitokondria dengan PCR diperlihatkan pada Gambar 2.

Hasil amplifikasi dengan PCR pada fragmen ND-5 DNA mitokondria digunakan untuk reaksi digesti dengan enzim restriksi *HindIII*. Analisis pola pemotongan oleh enzim restriksi dilakukan terhadap sapi Benggala dan Madura. Pada kedua jenis sapi tersebut ditemukan adanya variasi pada fragmen ND-5 DNA mitokondria. Gambar 3 memperlihatkan adanya polimorfisme DNA mitokondria pada fragmen ND-5 dengan menggunakan enzim restriksi *HindIII*.



**Gambar 2.** Fotograf gel agarosa menunjukkan hasil PCR fragmen ND-5 DNA mitokondria yang terdiri dari 453 bp. Baris 1-3: sapi Batak, 4-7: sapi Madura, 50-2000 bp marker dari BioRad.



**Gambar 3.** Fotograf gel agarosa menunjukkan adanya variasi pada fragmen ND-5 DNA mitokondria yang dideteksi dengan menggunakan teknik PCR-RFLP menggunakan enzim *HindIII*. Baris 1, 2, 3: fragmen ND-5 yang terpotong dengan enzim restriksi *HindIII*, Baris 4: fragmen ND-5 yang tidak terpotong oleh enzim restriksi *HindIII*, 50-2000 bp marker dari BioRad.

Reaksi digesti hasil amplifikasi fragmen ND-5 DNA mitokondria dengan menggunakan enzim restriksi *HindIII* dilakukan dengan cara diinkubasi pada suhu 37°C. Situs restriksi yang dihasilkan dari reaksi digesti dengan enzim restriksi *HindIII* diperlihatkan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Situs restriksi yang dihasilkan dari reaksi digesti dengan menggunakan enzim restriksi *HindIII* terhadap 453 bp fragmen ND-5 DNA mitokondria

Enzim	Allel (Hapl-otip)	Jumlah situs Restriksi	Ukuran Fragmen (Kb)
<i>HindIII</i>	A	1	0,33, 0,13
	B	0	0,46

Pengukuran diversitas haplotipic standar pada ND-5 DNA mitokondria pada sapi Batak dan Madura diperlihatkan pada Tabel 2, sedangkan frekuensi haplotipic diperlihatkan pada Tabel 3.

**Tabel 2.** Diversitas genetik dari sapi Batak dan Madura

Jenis	Diversitas haplotipe (d)
Batak	0,2112
Madura	0,4118

Keterangan: d adalah diversitas haplotipic sapi Batak dan Madura.

**Tabel 3.** Frekuensi haplotip dari sapi Batak dan Madura

Jenis	Haplotype	
	A	B
Batak	0,88	0,12
Madura	0,71	0,29

Keterangan: A adalah haplotip umum.

B adalah haplotip yang jarang ditemukan. Hasil amplifikasi fragmen ND-5 DNA mitokondria (453 bp) dengan PCR yang diwarnai dengan *ethidium bromida* diperlihatkan pada Gambar 2. Fragmen ND-5 yang dihasilkan sebagai produk PCR menunjukkan spesifitas yang tinggi dengan hanya terbentuknya satu *band* saja. Hasil yang baik ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemurnian DNA hasil ekstraksi, ketepatan pemilihan primer ND-L dan ND-R yang digunakan serta ketepatan kondisi reaksi PCR. DNA yang digunakan untuk reaksi amplifikasi fragmen ND-5 DNA

mitokondria diekstrak dengan menggunakan *Wizard Genomic Purification System* yang sudah dalam bentuk kit sehingga DNA yang dihasilkan mempunyai kemurnian yang tinggi. Kontaminasi DNA hasil ekstraksi oleh protein maupun oleh zat-zat kimia lainnya bisa menyebabkan gagalnya reaksi PCR. Primer ND-L dan ND-R yang digunakan didesain

dengan menggunakan program *primer designer*. Primer tersebut telah memenuhi syarat-syarat dalam seleksi primer, seperti terdiri dari 20 basa, kandungan G/C nya 50%, kemungkinan terbentuknya struktur sekunder dalam primer adalah kecil dan 2 basa pada 3 basa terakhir terdiri dari G/C. Primer merupakan bagian penting dalam reaksi amplifikasi DNA karena merupakan inisiator pada sintesis DNA. Ketepatan kondisi PCR merupakan faktor yang sangat penting dalam menentukan keberhasilan suatu reaksi PCR. Ketepatan kondisi reaksi ditentukan oleh ketepatan campuran reaksi dan ketepatan kondisi suhu pada masing-masing siklus. Untuk itu diperlukan adanya optimalisasi kondisi reaksi PCR sehingga dihasilkan produk PCR yang spesifik sesuai dengan yang diharapkan.

Perkembangan-perkembangan yang terjadi pada teknik molekuler telah banyak membantu dalam menghasilkan data tentang variasi genetik pada tingkat DNA. PCR-RFLP yang merupakan teknik RFLP yang memanfaatkan amplifikasi DNA dengan PCR yang mampu mendeteksi adanya variasi genetik dalam waktu yang relatif singkat. Keuntungan menggunakan PCR dalam mengamplifikasi DNA adalah dapat menghasilkan DNA dalam jumlah yang banyak meskipun hanya dari beberapa atau bahkan satu molekul DNA saja dalam waktu yang relatif singkat (White, 1996). RFLP merupakan teknik yang banyak digunakan dalam mempelajari variasi inter maupun antar spesies dengan memanfaatkan enzim restriksi. Teknik ini dapat mendeteksi adanya variasi genetik dengan akurat. Posisi dan besarnya variasi dapat diperkirakan dengan tepat (Sutarno, 1999). Jadi, PCR-RFLP sangat efektif dan efisien dalam mendeteksi adanya variasi genetik.

Variasi genetik diketemukan pada fragmen ND-5 DNA mitokondria dengan menggunakan enzim restriksi *HindIII*. Penemuan ini mengacu pada penemuan sebelumnya (Sutarno dan Limbery, 1997; Sutarno, 1999; Suzuki *et al.*, 1993). Pada sekuens DNA mitokondria yang telah dipublikasikan sebelumnya (Anderson *et al.*, 1982) menunjukkan bahwa fragmen ND-5 terletak pada posisi antara basa 12058 dan 12510 serta mempunyai situs restriksi *HindIII* pada posisi basa 12174. Apabila dilakukan digesti dengan menggunakan enzim restriksi *HindIII* pada fragmen ND-5 maka akan dihasilkan 2 fragmen yang terdiri dari 117 dan 336 bp. Variasi yang terjadi pada fragmen ND-5 DNA mitokondria disebabkan karena hilangnya situs restriksi *HindIII* sehingga fragmen ND-5 tidak terpotong oleh enzim restriksi *HindIII*. Variasi yang ada pada fragmen ND-5 DNA mitokondria tersebut diketemukan baik pada sapi Benggala maupun Madura.

Pada studi tentang variasi genetik dari fragmen ND-5 DNA mitokondria diketemukan adanya dua jenis haplotip yaitu haplotip A yang merupakan haplotip umum dan haplotip B yang merupakan haplotip yang jarang diketemukan. Pada sapi Benggala frekuensi haplotip A adalah 0,88 dan haplotip B adalah 0,12

sedangkan pada sapi Madura frekuensi haplotip A adalah 0,71 dan haplotip B adalah 0,29. Pada penelitian ini diversitas haplotipic sapi Madura sebesar 0,4118 dan lebih tinggi dari sapi Benggala yaitu 0,2112. Sapi Madura mempunyai diversitas genetik paling tinggi di antara sapi-sapi lokal Indonesia (Baker dan Manwell, 1991). Pengukuran terhadap diversitas pada tingkat haplotipic cukup untuk digunakan dalam mempelajari polimorfisme pada tingkat DNA. Studi tentang variasi genetik pada tingkat DNA lebih akurat dibandingkan dengan studi variasi genetik pada protein. Mutasi yang menyebabkan perubahan basa-basa pada DNA belum tentu merubah produk protein yang dihasilkan sebagai ekspresi dari gen-gen DNA sehingga variasi yang ada pada DNA belum tentu ditunjukkan oleh adanya variasi protein.

Studi tentang variasi genetik pada suatu organisme terutama pada hewan ternak baik inter maupun antar jenis organisme adalah sangat penting karena berhubungan dengan variasi pada fenotip. Menurut Mittler dan Greeg (1969) variasi fenotip yang terjadi bisa disebabkan karena adanya variasi genetik atau variasi lingkungan atau karena variasi lingkungan dan genetik. Pengetahuan tentang variasi genetik mempunyai sejumlah aplikasi yang bermanfaat. Aplikasi dari variasi genetik ini misalnya untuk mengidentifikasi hewan dan mencari asal-usulnya, mengetahui hubungan kekerabatan dan pemetaan gen (Archibald, 1983). Menurut Soller (1994) informasi tentang variasi genetik dapat dijadikan dasar dalam seleksi hewan melalui teknik yang dikenal dengan *marker assisted selection* (MAS) atau seleksi berdasarkan penanda gen. Variasi genetik juga dapat dijadikan dasar untuk konservasi jenis. Suatu jenis tertentu mungkin dihasilkan dari suatu proses adaptasi terhadap keadaan lingkungan yang mengarahkan pada terbentuknya kombinasi alel yang unik. Keadaan semacam ini akan sangat jarang ditemukan (Hall dan Bradley, 1995). Pelestarian terhadap jenis-jenis hewan sangat penting dilakukan karena banyak jenis-jenis hewan yang sekarang ini terancam kepunahan dan gen-gen yang mereka bawa mungkin bermanfaat di waktu mendatang.

Sapi Benggala dan Madura merupakan contoh ras domestik di Indonesia. Populasi sapi Benggala dan Madura tersebar hampir disemua daerah di Indonesia. Populasi sapi Benggala banyak terdapat di Jawa Timur, Jawa Tengah, Nusa Tenggara, Sulawesi dan Sumatera sedangkan populasi sapi Madura banyak terdapat di Jawa Timur, Kalimantan dan Sulawesi. Besar populasi sapi Benggala adalah 10% dan sapi Madura adalah 11.5% dari total populasi sapi di Indonesia (Wiryosuhanto, 1996).

Diversitas genetik pada sapi maupun hewan ternak lainnya mengalami penurunan yang sangat cepat (Baker dan Manwell, 1991). Pemilihan jenis-jenis tertentu karena pertimbangan-pertimbangan ekonomis dan seleksi untuk peningkatan sifat-sifat produksi ternak secara genetik telah mengarah pada

terjadinya penurunan diversitas genetik (Sutarno, 1999). Untuk itu perlu adanya pencatatan data genetik terhadap jenis-jenis sapi maupun hewan ternak lainnya.

Akhir-akhir ini banyak dilakukan penelitian variasi genetik menggunakan DNA mitokondria, karena DNA mitokondria mempunyai kecepatan mutasi yang diperkirakan 5-10 kali lebih tinggi daripada DNA inti, mempunyai ukuran yang relatif kecil, mengkode sebagian enzim yang terlibat dalam fosforilasi oksidasi dan merupakan DNA non inti yang membawa pengaruh genetik. Variasi pada DNA mitokondria cukup untuk penanda genetik terhadap sifat-sifat produksi seperti daging dan susu. Variasi pada DNA mitokondria dapat bersifat merusak dan menyebabkan penyakit (Wallace, 1993) serta berhubungan dengan proses penuaan pada manusia dan hewan (Miquel, 1991). Studi DNA mitokondria juga dapat digunakan untuk mencari hubungan kekerabatan pada suatu spesies dan menggambarkan sejarah dan evolusi suatu spesies (Lindberg, 1989).

### KESIMPULAN

Polimorfisme ditemukan pada fragmen ND-5 DNA mitokondria dengan menggunakan enzim restriksi *HindIII*. Analisis diversitas genetik menunjukkan adanya variasi baik inter maupun antar jenis dari sapi Benggala dan Madura. Diversitas haplotipic sapi Benggala sebesar 0,2112 dan sapi Madura sebesar 0,4118.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, S., M.H.L. Debruijn, A.R. Coulson, I.C. Eperon, F. Sanger, and I.G. Young. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA: conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology* 156: 863-717.
- Archibald, A.L. 1983. Genetic variation – the raw material of animal breeding. *ABRO report*: 28-32.
- Baker, C.M.A. and C. Manwell. 1991. Populations genetics, molecular markers and gene conservation of bovine breeds. In Hickman C.G. (ed.) *Cattle Genetic Resources*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V.
- Bhat, P.P., B.P. Mishra, and P.N. Bhat. 1990. Polymorphism of mitochondrial DNA (mt DNA) in cattle and buffaloes. *Biochemical Genetic* 28: 311-318.
- Bradley D.G., D.E. Machaugh, P. Cunningham, and R.T. Loftus. 1996. Mitochondrial diversity and origine of Africa and European cattle. *Proceeding of National Academy Science USA* 43: 5131-5135.
- Hall, S.J.G. and D.G. Bradley. 1995. Conserving livestock breed biodiversity (review). *Trends in Ecology and Evolution* 10: 267-270.
- Hauswirth, W.W. and P.S. Laipis. 1982. Mitochondrial DNA polymorphism in maternal lineage of Holstein cows. *Proceeding of the National Academic of Science USA* 79: 4868-4690.
- Ishida, N., T. Hasegawa, K. Takeda, M. Sakagami, A. Onishi, S. Inameru, M. Komatsu, and H. Mukoyama. 1994. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics* 25: 215-221.
- Lindberg, G.L. 1989. *Sequence heterogeneity of bovine mitochondria DNA*. Iowa: Iowa State University.
- Loftus, R.T., D.E. Machaugh, L.O. Ngere, D.S. Balain, A.M. Badi, D.G. Bradley, and E.P. Tunningham. 1994. Mitochondrial genetic variation in European, Africa and Indian cattle population. *Animal Genetics* 25: 265-271.
- Miquel, J. 1991. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 12: 99-177.
- Mittler, L.E. and T.G. Gregg. 1969. *Population Genetics and Evolution*. Englewood Cliffe: Prentice Hall Inc.
- Soller, P. 1994. The future role of molecular genetic in the control of meat production and meat quality. *Meat Science* 36: 29-44.
- Sutarno, and A.J. Lybery. 1997. New RFLPs in the mitochondrial genome of cattle. *International Journal of Animal Genetics* 28: 240-241
- Sutarno, 1999. *Polimorfisme DNA Mitokondria dari Berbagai Jenis Sapi Pedaging di Western Australia dan Bali*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Suzuki, R., S.J. Kemp, and A.J. Teale. 1993. Polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA polymorphism in N'Dama and Zebu cattle. *Animal Genetics* 24: 339-343.
- Wallace, D. G. 1992. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases. *Science* 256: 628-632.
- Wallace, D. G. 1993. Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *Trends in Genetics* 9: 128-133.
- White, T.J. 1996. The future of PCR technology: diversification of technologies and applications. *TIBTECH* 14: 478-483.
- Wiryosuhanto, S. 1996. Bali cattle – their economic important in Indonesia. *ACIAR Proceedings* 75: 34-42.