

Polimorfisme 5' untranslated region gen thyroglobulin (TG5) pada sapi Bali (*Bos javanicus*)

The 5' untranslated region of thyroglobulin gene (TG5) polymorphism in Bali cattle (*Bos javanicus*)

SAIFUL ANWAR^{1*}, ADITHYA CHRISDYANTAMA PUTRA², ARI SULISTYO WULANDARI¹, SYAHRUDDIN SAID¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Cibinong Science Center, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel. +62-21-8754587, Fax. +62-21-8754588, *email: saif005@lipi.go.id

² Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjajaran. Jl. Jalan Raya Bandung-Sumedang Km. 21 Jatinangor Sumedang 45363, Jawa Barat

Manuskrip diterima: 30 Agustus 2016. Revisi disetujui: 9 Desember 2016.

Abstrak. Anwar S, Putra AC, Wulandari AS, Said S. 2016. Polimorfisme 5' untranslated region gen thyroglobulin (TG5) pada sapi Bali (*Bos javanicus*). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2*: 159-164. Lemak intramuskuler atau disebut juga lemak 'marbling' merupakan salah satu komponen penting dalam menghasilkan daging sapi yang berkualitas tinggi. Polimorfisme gen thyroglobulin (TG) pada daerah 5' untranslated region lokus 5'UTR|*Bst*YI (TG5) telah banyak digunakan sebagai marker genetik dalam meningkatkan *marbling* dan *eating quality* daging pada beberapa bangsa sapi potong. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman genetik TG5 pada sapi Bali (*Bos javanicus*). Sampel DNA berasal dari 100 ekor sapi Bali di kawasan Maiwa Breeding Center (MBC), Kabupaten Enrekang, Propinsi Sulawesi Selatan. Metode yang digunakan adalah PCR-RFLP menggunakan enzim *Bst*YI. Hasil penelitian ini hanya menemukan dua tipe genotipe yaitu CC dan CT dengan proporsi masing-masing sebesar 99% dan 1%. Frekuensi alel C dan T masing-masing sebesar 0,995 dan 0,005. Uji *chi-square* menunjukkan frekuensi genotipe pada populasi yang diuji berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg (HWE). Nilai heterozigositas pengamatan (H_o) dan harapan (H_e) masing-masing sebesar 0,010 dan 0,009. Tingkat informatif penanda genetik (PIC) termasuk dalam kategori rendah (0,009). Kesimpulan dari penelitian ini adalah marker genetik TG5 tidak informatif dan tidak dapat digunakan sebagai marker genetik pada sapi Bali di kawasan MBC. Penambahan jumlah sampel dari beberapa daerah sumber bibit sapi Bali di luar kawasan MBC akan memberikan informasi yang lebih jelas mengenai keragaman genetik TG5 pada sapi Bali di Indonesia.

Kata kunci: gen thyroglobulin, PCR-RFLP, polimorfisme, sapi Bali, TG5

Singkatan: 5' UTR: 5' untranslated region, DNA: deoxyribonucleic acid, H_e : heterozigositas harapan, H_o : heterozigositas pengamatan, HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium, MBC: Maiwa Breeding Center, pb: pasang basa, PCR: polymerase chain reaction, PIC: polymorphism information content, QTL: quantitative trait loci, RFLP: restriction fragment length polymorphism, T3: *triiodothyronine*, T4: *thyroxine*, TG: thyroglobulin, TG5: lokus 5'UTR|*Bst*YI pada gen TG.

Abstract. Anwar S, Putra AC, Wulandari AS, Said S. 2016. The 5' untranslated region of thyroglobulin gene (TG5) polymorphism in Bali cattle (*Bos javanicus*). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2*: 159-164. Intramuscular fat or also called as 'marbling' is one of the essential components in producing premium meat quality in beef cattle. The polymorphism of 5' untranslated region of thyroglobulin gene (TG) at locus 5'UTR|*Bst*YI (TG5) have been widely used as a genetic marker to improve marbling and to eat quality in some beef cattle breeds. The objective of this study was to identify the genetic polymorphism of TG5 in Bali cattle (*Bos javanicus*). A total of one hundred DNA samples of Bali cattle used in this study were from Maiwa Breeding Center (MBC) area of Enrekang district, South Sulawesi province. The method used in the present study was PCR-RFLP using *Bst*YI restriction enzyme. The result of this study showed that only two types of genotypes were found, including CC and TT with the respective proportions of 99% and 1%. The allelic frequencies of C and T were 0.995 and 0.005, respectively. The chi-square test showed that the genotypic frequencies of TG5 in the population tested were in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity values were 0.010 and 0.009, respectively. The value of polymorphism information content (PIC) was low (0.009). Finally, it could be concluded that the TG5 marker was uninformative and may not be used as a genetic marker in Bali cattle from MBC area. Additional samples from another region as Bali cattle breed resources outside the MBC area are needed to provide clearer information of the TG5 polymorphism on Bali cattle in Indonesia.

Keywords: Bali cattle, PCR-RFLP, polymorphism, TG5, thyroglobulin gene

Abbreviations: 5' UTR: 5' untranslated region, DNA: deoxyribonucleic acid, H_e : expected heterozygosity, H_o : observed heterozygosity, HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium, MBC: Maiwa Breeding Center, pb: base pairs, PCR: polymerase chain reaction, PIC: polymorphism information content, QTL: quantitative trait loci, RFLP: restriction fragment length polymorphism, T3: *triiodothyronine*, T4: *thyroxine*, TG: thyroglobulin, TG5: 5'UTR|*Bst*YI locus of TG gene.

PENDAHULUAN

Lemak intramuskuler atau yang sering disebut sebagai lemak 'marbling' merupakan salah satu komponen kualitas daging yang semakin diperhatikan dalam industri sapi potong karena berpengaruh pada palatabilitas daging (*beef palatability*) dan harga jual yang tinggi (Hudson et al. 2015). Komponen palatabilitas daging seperti citarasa (*flavour*), kesan jus (*juiciness*) dan keempukan (*tenderness*) akan meningkat dengan adanya peningkatan marbling pada daging sapi (Wheeler et al. 1994; Okumura et al. 2007; Hudson et al. 2015).

Beberapa penelitian menyatakan bahwa kromosom 14 mengandung *quantitative trait loci* (QTL) yang berpengaruh terhadap sifat perlemakan pada sapi yaitu pada daerah sentromer BTA14 (Casas et al. 2003; Moore et al. 2003). Gen TG menjadi salah satu gen yang terletak di daerah tersebut (Moore et al. 2003). Gen ini mengkode hormon TG yaitu sebuah hormon glikoprotein yang disintesis oleh sel folikel tiroid dan disimpan di kelenjar tiroid. Hormon TG bertindak sebagai prekursor dari hormon *triiodothyronine* (T3) dan *thyroxine* (T4) yang berperan penting dalam perkembangan dan metabolisme sel-sel lemak (Ailhaud et al. 1992; Barendse 1999; Casas et al. 2005). Barendse (1999), menemukan adanya SNP (C/T) pada gen TG di daerah 5' UTR posisi 422 pb (disebut sebagai TG5) yang berasosiasi dengan sifat marbling pada sapi. Variasi genetik pada TG5 tersebut telah secara luas digunakan sebagai marker genetik dalam meningkatkan marbling dan *eating quality* daging pada beberapa bangsa sapi *Bos taurus* dan *Bos indicus* (Casas et al. 2005; Rincker et al. 2006; Van Eenennaam et al. 2007; Bonilla et al. 2010).

Sapi bali (*Bos javanicus*) dikenal sebagai sapi yang memiliki berbagai keunggulan seperti mampu beradaptasi terhadap lingkungan yang kurang baik, efisien dalam memanfaatkan pakan berkualitas rendah, tingkat fertilitas dan konsepsi yang lebih baik dibanding bangsa sapi lokal lainnya (Purwantara et al. 2012). Akan tetapi, terkait dengan sifat perlemakan daging, sapi Bali bukan merupakan sapi penghasil marbling yang baik seperti halnya sapi Wagyu (Suwiti, 2015). Meskipun demikian, karakter genetik sifat marbling pada sapi Bali penting untuk diketahui sebagai bahan evaluasi dalam peningkatan kualitas daging sapi Bali terutama pada sifat marbling. Variasi genetik pada TG5 yang telah banyak diteliti pada spesies *Bos Taurus* dan *Bos indicus*, belum dilakukan pada sapi Bali (*Bos javanicus*). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme TG5 pada sapi Bali.

BAHAN DAN METODE

Prosedur

Koleksi sampel darah dan isolasi DNA

Penelitian ini menggunakan 100 ekor sapi Bali yang berasal dari kawasan Maiwa Breeding Center (MBC), Kabupaten Enrekang, Propinsi Sulawesi Selatan (17 ekor jantan dan 83 ekor betina). Masing-masing sapi dikoleksi

darahnya sebanyak 5 mL ke dalam tabung vacutainer yang sudah berisi antikoagulan K₃EDTA. Sampel darah kemudian disimpan pada kondisi suhu refrigerator (4-5°C) sampai saatnya dilakukan isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan menggunakan Genomic DNA mini kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) sesuai prosedur yang tercantum dalam kit tersebut. Produk DNA yang diperoleh selanjutnya disimpan pada suhu -20°C sampai saatnya dilakukan PCR.

Amplifikasi fragmen 5' UTR gen TG

Fragmen DNA yang menjadi target untuk diamplifikasi adalah 5' UTR gen TG sepanjang 545 bp (GenBank: X05380). Amplifikasi dilakukan menggunakan sepasang primer yang telah didesain oleh Barendse (1999) (Tabel 1). Reaksi PCR dilakukan pada total volume 10 µL yang terdiri dari 1 µL DNA (10-20 ng/µL), 4 µL PCR kit KAPA2G Fast ReadyMix (Kapa Biosystems Inc, USA), 0,5 µL (1 pmol/µL) untuk masing-masing primer dan 4 µL ddH₂O. Program PCR diatur dengan diawali satu kali siklus denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit dilanjutkan 35 siklus yang meliputi denaturasi pada suhu 94°C selama 35 detik, *annealing* pada suhu 57,1°C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik. Tahap akhir yaitu satu siklus ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Produk PCR (5 µL setiap sampel) selanjutnya dielektroforesis dengan medium gel agarose 1,2%. Visualisasi pita DNA dilakukan dengan merendam gel dalam akuades yang mengandung pewarna GelRed (Biotium, USA) selama 30-60 menit kemudian dilihat pada G-BOX *Gel Documetation System* (Syngene, UK).

Analisis genotipe

Variasi genotipe pada TG5 dideteksi menggunakan metode PCR-RFLP. Enzim restriksi yang digunakan adalah *Bst*YI (New England Biolabs, USA) yang memiliki situs restriksi R↓GATCY untuk mendeteksi adanya mutasi (C/T) pada fragmen 5' UTR gen TG. Sebanyak 5 µL produk PCR didigesti dalam campuran 0,3 µL enzim restriksi, 3,7 µL ddH₂O; 1 µL 10x NE buffer pada suhu 60°C selama satu jam. Elektroforesis dilakukan pada medium gel agarose 3%. Visualisasi pita DNA dilakukan dengan merendam gel dalam larutan aquadest yang mengandung 1x pewarna GelRed (Biotium, USA) selama 30-60 menit kemudian dilihat menggunakan G-BOX *Gel Documetation System* (Syngene, UK). Penentuan tipe genotipe setiap sampel didasarkan pada ukuran dan pola potongan pita. Ukuran pita ditentukan dengan membandingkan posisi pita pada *DNA ladder* berukuran 100 pb (Kapa Biosystems Inc, USA) yang juga disertakan pada proses elektroforesis.

Tabel 1. Sekuen, posisi dan panjang dari sepasang primer yang digunakan dalam amplifikasi fragmen spesifik 5' UTR gen TG

Primer	Sekuen primer	Posisi primer (pb)	Panjang primer (pb)
TG5U2 (Forward)	5'- GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG -3'	52-74	23
TG5D1 (Reverse)	5'- GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG TA -3'	574-596	23

Keterangan: pb = pasang basa

Analisis data

Analisis data meliputi frekuensi genotipe dan alel, keseimbangan Hardy-Weinberg (HWE), heterozigositas pengamatan (H_o), heterozigositas harapan (H_e) dan nilai *Polymorphism Information Content* (PIC). Frekuensi genotipe, frekuensi alel dan HWE (diuji dengan *Chi-square test*) dihitung berdasarkan Nei dan Kumar (2000). Jumlah alel efektif (N_e) dihitung menurut Allendorf dan Luikart (2007). Nilai PIC dihitung dan dianalisis berdasarkan metode Botstein et al. (1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

PCR-RFLP

Fragmen spesifik gen TG di daerah 5' UTR berhasil diperoleh setelah dilakukan amplifikasi pada suhu *annealing* 57,1°C selama 30 detik dengan diperlihatkannya hasil satu pita spesifik yang jelas dan tegas (Gambar 1). Berdasarkan perunutan DNA pada GenBank (nomor akses: X05380), pita tersebut berukuran 545 pb.

Deteksi polimorfisme TG5 dilakukan menggunakan metode PCR-RFLP dengan enzim restriksi *Bst*YI. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya ditemukan dua tipe genotipe yaitu CC dan CT pada 100 ekor sampel sapi Bali yang diteliti. Kedua tipe genotipe yang ditemukan tersebut direpresentasikan oleh dua pola potongan pita dalam visualisasi menggunakan gel agarose 3%. Pola I (genotipe CC) terdiri dari tiga potongan pita berukuran 72, 178, dan 295 pb, sedangkan pola II (genotipe CT) terdiri dari empat potongan pita berukuran 72, 178, 295 dan 473 pb. Kedua genotipe tersebut merupakan gabungan dari dua tipe alel yaitu alel C yang terdiri dari tiga potongan pita berukuran 72, 178, dan 295 pb; dan alel T yang terdiri dari dua potongan pita berukuran 72 dan 473 pb. Visualisasi pola potongan pita genotipe CC dan CT dapat dilihat pada Gambar 1. Oleh karena genotipe TT pada penelitian ini tidak ditemukan, maka tidak dapat divisualisasikan.

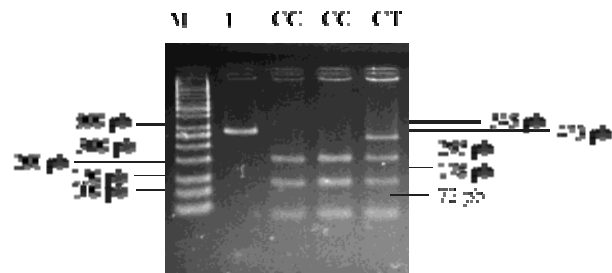
Polimorfisme TG5

Frekuensi genotipe CC dan CT pada penelitian ini sebesar 98% dan 1% dari 100 ekor sapi Bali yang diteliti. Tidak satupun ditemukan individu sapi Bali yang memiliki genotipe TT (0%). Sementara itu, frekuensi alel C dan T masing-masing sebesar 0,995 dan 0,005. Uji *Chi-square* (χ^2_{test}) menunjukkan bahwa frekuensi genotipe dari TG5 pada sapi Bali berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg ($\chi^2_{hit} < \chi^2_{tab}$). Frekuensi genotipe dan alel gen TG5 pada Sapi Bali dapat dilihat pada Tabel 2.

Keragaman genetik TG5 dievaluasi dengan melihat indeks genetik (H_o , H_e , N_e dan PIC). Hasil perhitungan H_o dan H_e pada penelitian ini menunjukkan nilai yang sama berturut-turut 0,010 dan 0,009. Nilai masing-masing indikator polimorfisme TG5 pada Sapi Bali (*Bos javanicus*) di kawasan MBC disajikan pada Tabel 3.

Pembahasan

Pada penelitian ini, polimorfisme gen TG5 pada sapi Bali di kawasan MBC dideteksi menggunakan metode PCR-RFLP. Setelah dilakukan optimasi PCR, kondisi



Gambar 1. Visualisasi produk PCR dan tipe genotipe dari fragmen spesifik 5' UTR gen TG. Lajur M: DNA ladder 100 pb; lajur 1: Produk PCR 5' UTR gen TG (545 pb); Lajur CC, CT: tipe genotipe

Tabel 2. Frekuensi genotipe dan alel TG5 pada Sapi Bali di kawasan MBC

Marker	Bangsa sapi	n	Frekuensi genotipe			Frekuensi alel		HWE	
			%CC (n)	CT (n)	TT (n)	C	T	χ^2_{hit}	χ^2_{tab}
TG5	Bali	100	99 (99)	1 (1)	0 (0)	0,995	0,005	0,003	3,841

Keterangan: n = jumlah sampel; HWE = keseimbangan Hardy-Weinberg; $\chi^2_{hit} < \chi^2_{tab (0,05)}$ berarti frekuensi genotipe populasi dalam kondisi HWE

Tabel 3. Indikator polimorfisme TG5 pada Sapi Bali (*Bos javanicus*) di kawasan MBC

Marker	Bangsa sapi	H_o	H_e	N_e	PIC
TG5	Bali	0,010	0,009	1,010	0,009

Keterangan: H_o = Heterozigositas pengamatan; H_e = Heterozigositas harapan; N_e = jumlah alel efektif; PIC = *Polymorphism Information Content*.

optimal *annealing* pada penelitian ini yaitu pada suhu 57,1°C selama 30 detik. Kondisi ini berbeda dengan yang telah dilakukan oleh Shin dan Chung (2007) dimana suhu *annealing* sebesar 55°C selama 60 detik. Perbedaan ini dapat terjadi karena pada metode penelitian mereka menggunakan bahan pereaksi PCR dan mesin PCR yang berbeda dengan penelitian ini sehingga program PCR akan berbeda termasuk kondisi optimal *annealing* primer.

Lokus yang dideteksi dari gen TG adalah substitusi basa C/T pada posisi 422. Untuk menemukan situs restriksi pada lokus tersebut digunakan enzim *Bst*YI yang mempunyai situs restriksi di 5' R↓GATCY 3'. Kode R dapat berupa basa adenin (A) atau Guanin (G) sedangkan kode Y dapat berupa basa Sitosin (C) atau Timin (T). Pada alel T, basa C diposisi 422 berganti dengan basa T yang menyebabkan enzim *Bst*YI tidak mengenali situs restriksi sehingga pada posisi tersebut DNA tidak terpotong dan hanya menghasilkan dua potongan pita pada gel (72 dan 473 pb) sedangkan pada alel C, basa C diposisi 422 tidak berubah sehingga terpotong dan menghasilkan tiga potongan pita (72, 295 dan 178 pb). Enzim *Bst*YI memiliki situs restriksi yang sama (*isoschizomer*) dengan *Mfl*I, *Mbo*I, *Xho*II, *Psu*I

maupun *BstX21* sehingga untuk memperoleh situs restriksi pada lokus yang sama dengan penelitian ini, dapat menggunakan alternatif enzim tersebut seperti penggunaan enzim restriksi *MfII* oleh Shin dan Chung (2007), *PsuI* oleh Fortes (2009), dan *MboI* oleh Bonilla et al. (2010).

Pada penelitian ini ditemukan dua tipe alel (C dan T) dengan frekuensi alel C sebesar 0,995. Menurut Nei (1987), Frankham et al. (2004) dan Allendorf dan Luikart (2007), sebuah lokus dikatakan polimorfik jika frekuensi alel yang umumnya muncul (*most common allele*) kurang dari 0,99 (99%) sedangkan monomorfik jika diketahui hanya satu alel pada sebuah lokus atau adanya *most common allele* yang memiliki frekuensi tinggi (>95% atau 99%). Ini menunjukkan bahwa TG5 pada penelitian ini bersifat monomorfik.

Frekuensi alel C dan T pada sapi Bali dari penelitian ini masing-masing sebesar 0,995 dan 0,005. Ini berarti alel C merupakan alel yang umum ditemukan pada populasi sapi Bali di kawasan MBC, sedangkan alel T sangat jarang ditemukan. Sebagai perbandingan, pada Tabel 4 disajikan frekuensi genotipe dan alel pada beberapa bangsa sapi dari spesies *Bos taurus*, *Bos indicus* dan sapi Bali (*Bos javanicus*). Berdasarkan Tabel 4, ternyata frekuensi alel C dan T pada sapi Bali hampir sama pada sapi *Bos indicus*. Frekuensi alel T pada *Bos indicus* hanya berkisar antara 0,00 sampai 0,03. Sebaliknya alel T cenderung banyak terdapat pada sapi *Bos taurus* meskipun frekuensinya bervariasi (0,02-0,49). Namun ada beberapa bangsa sapi *Bos taurus* yang membawa alel T dengan frekuensi yang cukup tinggi seperti pada sapi Wagyu (0,31) (Casas et al. 2007), Korean cattle (0,36) (Shin dan Chung 2007) dan Angus (0,49) (Pannier et al. 2010).

Dilihat dari distribusi genotipenya, genotipe CC merupakan genotipe yang paling umum muncul pada sapi Bali (*Bos javanicus*) dengan proporsi mencapai 99%. Kondisi tersebut juga terjadi pada populasi sapi *Bos indicus* dengan proporsi genotipe CC mencapai 94,6% sampai 100% sedangkan pada sapi *Bos taurus* frekuensi alel CC terlihat tidak sebanyak pada *Bos indicus* maupun *Bos javanicus* karena terdistribusi pada genotipe CT dan TT (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa alel C lebih banyak ditemukan pada sapi Bali maupun sapi *Bos indicus* dan bahkan cenderung bersifat tetap (*fixed*) artinya hanya alel C saja yang ada pada populasi sapi tersebut sehingga seluruh sapi bergenotipe homozigot CC. Sebagai contoh yang terjadi pada populasi sapi Nellore (Fortes et al. 2009). Sementara itu, alel T dan genotipe TT terlihat lebih banyak dibawa oleh sapi *Bos taurus*, meskipun ada beberapa bangsa sapi dari *Bos taurus* yang frekuensi genotipe TT-nya sangat rendah bahkan sama sekali tidak ditemukan seperti Limousin (1,6%), Friesian (0%) dan Hereford (0%). Fortes et al. (2009) dan Carvalho et al. (2012) menyatakan bahwa seiring dengan meningkatnya komposisi genetik sapi *Bos taurus* pada sapi hasil persilangan, maka frekuensi alel T akan semakin tinggi.

Hasil analisis *Chi-square* menunjukkan bahwa frekuensi genotipe pada populasi penelitian dalam keseimbangan Hardy-Weinberg (HWE). Menurut Allendorf dan Luikart (2007) jika populasi dalam HWE, maka dapat dikatakan frekuensi genotipe dan alel selalu konstan dari generasi ke

generasi. Keseimbangan gen dalam populasi terjadi jika tidak ada seleksi, mutasi, migrasi dan *genetic drift* (Falconer dan Mackay 1996).

Alel T seringkali dianggap sebagai alel marker TG5 yang menguntungkan (*favourable allele*) karena sapi pembawa alel T cenderung memiliki lemak intramuskular atau skor marbling yang lebih tinggi dibanding sapi pembawa alel C. Oleh karena itu, genotipe TT diberi skor paling tinggi (skor 2) pada marker TG5 yang digunakan sebagai marker genetik komersial seperti pada GeneSTAR MARB (Genetic Solutions/Bovigen Pty. Ltd., Australia) (Rincker et al. 2006). Meskipun pada kenyataannya, dalam analisis asosiasi genetik antara genotipe dan fenotip (sifat marbling) menggunakan marker tersebut masih memberikan hasil yang bervariasi pada beberapa bangsa sapi. Berdasarkan penelitian Barendse (1999), Bonilla et al. (2010) dan Anton et al. (2010), sapi bergenotipe TT dikatakan memiliki kandungan lemak intramuskuler atau skor marbling yang lebih tinggi dibanding sapi bergenotipe CC dan CT. Anton et al. (2013) menambahkan bahwa tingkat marbling cenderung menurun pada sapi bergenotipe CT dan CC. Akan tetapi hasil tersebut berbeda dengan hasil penelitian pada Korean cattle oleh Shin dan Chung (2007) yang memberi hasil sebaliknya bahwa genotipe CC dan CT memiliki marbling yang lebih baik dibanding sapi bergenotipe TT. Beberapa peneliti juga melaporkan tidak adanya asosiasi antara marker tersebut dengan sifat marbling pada beberapa sapi *Bos taurus* maupun *Bos indicus* (Casas et al. 2005; Rincker et al. 2006; Pannier et al. 2010).

Berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan, heterozigositas pengamatan (H_o) dan heterozigositas harapan (H_e) memiliki nilai yang sama, ini dapat diartikan bahwa perkawinan dalam populasi sapi Bali tersebut diperkirakan terjadi secara acak (Frankham et al. 2002). Namun nilainya sangat rendah ($H_o = 0,010$ dan $H_e = 0,009$). Menurut Nei (1987), nilai heterozigositas tergantung pada jumlah sampel, jumlah alel dan frekuensi alel. Diduga penggunaan jumlah sampel sapi dan dalam kawasan yang terbatas menjadi penyebab rendahnya nilai heterozigositas. Nilai heterozigositas yang menurun dapat menyebabkan hilangnya variasi genetik dalam suatu populasi bahkan diperoleh alel yang tetap (*fixed*) (Russel, 2010) atau dikatakan dalam kondisi monomorfik.

Penentuan tingkat informatif suatu marker dapat diketahui dari nilai PIC. Bootstein et al. (1980) membagi nilai PIC menjadi tiga kategori yaitu rendah ($\leq 0,25$), moderat ($0,25 < PIC < 0,5$), dan tinggi ($\geq 0,5$). Nilai PIC pada penelitian ini sebesar 0,009 sehingga tingkat informatif marker TG5 termasuk kategori rendah bahkan sangat rendah. Ini berarti marker TG5 tidak dapat digunakan sebagai marker genetik untuk diasosiasikan dengan sifat marbling pada sapi Bali di kawasan MBC.

Jumlah alel efektif (N_e) menunjukkan nilai 1,010. Jika dibandingkan dengan jumlah alel yang ada (alel C dan T), nilai N_e yang didapatkan tidak sesuai. Hal ini dapat dikatakan hanya ada satu alel yang secara efektif muncul dan memiliki frekuensi yang tinggi yaitu alel C saja. Jumlah alel efektif akan memiliki jumlah yang hampir sama dengan jumlah alel jika frekuensi alel yang ada dalam kondisi seimbang (Frankham et al. 2002).

Table 4. Frekuensi genotipe dan alel TG5 pada beberapa bangsa sapi

Spesies	Bangsa sapi	n	Frekuensi genotipe			Frekuensi alel		Referensi
			%CC (n)	%CT (n)	%TT (n)	C	T	
<i>Bos taurus</i>	Limousin	123	66,7 (82)	31,7 (39)	1,6 (2)	0,83	0,17	Pannier et al (2010)
	Charolais	80	56,3 (45)	35,0 (28)	8,7 (7)	0,74	0,26	Pannier et al (2010)
	Friesian	76	73,7 (56)	26,3 (20)	0,0 (0)	0,87	0,13	Pannier et al (2010)
	Simmental	58	39,6 (23)	55,2 (32)	5,2 (3)	0,67	0,33	Pannier et al (2010)
	Angus	39	20,5 (8)	61,5 (24)	18,0 (7)	0,51	0,49	Pannier et al (2010)
	Hereford	32	96,9 (31)	3,1 (1)	0,0 (0)	0,98	0,02	Pannier et al (2010)
	British	211	56,4 (119)	34,1 (72)	9,5 (20)	0,74	0,26	Casas et al. (2007)
	Norwegian	72	65,3 (47)	30,6 (22)	4,1 (3)	0,80	0,20	Casas et al. (2007)
	Swedish	68	57,3 (39)	32,4 (22)	10,3 (7)	0,74	0,26	Casas et al. (2007)
	Wagyu	153	48,4 (74)	40,5 (62)	11,1 (17)	0,69	0,31	Casas et al. (2007)
Korean cattle	309	41,1 (127)	46,0 (142)	12,9 (40)	0,64	0,36	Shin dan Chung (2007)	
<i>Bos indicus</i>	Brahman	467	94,6 (442)	3,9 (18)	1,5 (7)	0,97	0,03	Casas et al. (2005)
	Nellore	46	100,0 (46)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,00	0,00	Fortes et al. (2009)
<i>Bos javanicus</i>	Bali	100	99,0 (99)	1,0 (2)	0,0 (0)	0,995	0,005	Penelitian ini

Keterangan: n = jumlah sampel

Pada kasus ini, oleh karena alel T sebagai alel minor memiliki frekuensi yang sangat rendah (0,005), maka analisis asosiasi genetik belum dapat dilakukan. Menurut Bennett et al. (2013), perlu diperhatikan bahwa analisis asosiasi genetik tidak dapat diestimasi dengan baik jika dalam suatu populasi terdapat alel minor yang frekuensinya rendah (jauh di bawah 0,5).

Begitu pula jika proporsi satu atau lebih genotipe sangat jauh dengan genotipe yang lain, maka keakuratan estimasi asosiasi genetik akan berkurang. Casas et al. (2005), menyatakan bahwa frekuensi genotipe yang rendah dapat mengganggu hasil analisis asosiasi antara marker genetik dengan sifat fenotip (marbling) terutama jika terdapat pengaruh dominan-resesif atau aditif yang relatif kecil. Untuk itu, pada penelitian yang dilakukan Fortes et al. (2009), genotipe TT tidak diikutkan dalam perhitungan asosiasi genetik karena frekuensinya yang rendah (2,72%).

Cara yang dapat dilakukan untuk melakukan analisis asosiasi genetik jika kondisi tersebut terjadi adalah dengan meningkatkan proporsi alel minor mendekati 0,5 pada populasi sapi yang diteliti. Oleh karena itu, perlu dilakukan program perkawinan yang terarah berdasarkan komposisi genotipe setiap individu sapi. Metode untuk meningkatkan proporsi alel minor dapat dilihat pada studi Bennett et al. (2013). Mereka mampu meningkatkan frekuensi alel minor dari sekitar 0,2 menjadi 0,4 meskipun menghasilkan proporsi sapi bergenotipe TT yang masih rendah (sekitar 14%). Namun jika kondisi tersebut sulit dilakukan atau selalu terjadi *fixation* pada suatu alel (frekuensinya sangat rendah), Fortes et al. (2009) menganjurkan untuk mencari marker genetik yang baru.

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa TG5 pada sapi Bali di kawasan MBC dalam kondisi monomorfik dan tidak dapat digunakan sebagai marker genetik karena tingkat informasi polimorfisme yang sangat

rendah. Untuk penelitian lebih lanjut, penambahan jumlah sampel dari beberapa daerah sumber bibit sapi Bali di luar kawasan MBC penting untuk memberikan gambaran yang lebih jelas mengenai pola keragaman genetik TG5 pada sapi Bali di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor, Jawa Barat atas dukungan pendanaan dari kegiatan Enrekang Technopark. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Universitas Hasanuddin, Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Enrekang serta para peternak atas kerjasamanya dalam penyediaan sampel sapi Bali. Kepada Edy Sophian, Ilham Syarif, Lusiana dan Citra diucapkan terima kasih atas bantuannya dalam koleksi sampel darah dilapangan serta Widya Pintaka Bayu Putra atas bantuan teknis di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12: 207-233.
- Allendorf FW, Luikart GH. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, UK.
- Anton I, Zsolnai A, Holló I, Repa I, Holló G. 2013. Effect of thyroglobulin gene polymorphism on the intramuscular fat content in cattle examined by x-ray computed tomography and Soxhlet methods [brief report]. *Archiv Tierzucht* 56 (59): 593-596.
- Barendse WJ. 1999. Assessing lipid metabolism. International Patent Application WO9923248 US6383751 (PCT/AU98/00882).
- Bennett GL, Shackelford SD, Wheeler TL, King DA, Casas E, Smith TPL. 2013. Selection for genetic markers in beef cattle reveals

- complex associations of thyroglobulin and casein1-S1 with carcass and meat traits. *J Anim Sci* 91: 565-571.
- Bonilla, CA, Rubio MS, Sifuentes AM, Parra-Bracamonte GM, Arellano VW, Méndez MRD, Berruecos JM, Ortiz R. 2010. Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in Mexico. *Genet Mol Res* 9: 2395-2405.
- Botstein, D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in human using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Koohmaraie M, Smith TPL, Stone RT. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J Anim Sci* 81: 2976-2983.
- Casas E, White SN, Riley DG, Smith TPL, Brennehan RA, Olson TA, Johnson DD, Coleman SW, Bennett GL, Chase, Jr. CC. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J Anim Sci* 83: 13-19.
- Casas E, White SN, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M, Bennett GL, Smith TPL. 2007. Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle. *J Anim Sci* 85: 2807-2814.
- Falconer DS, Mackay TF. 1996. *Introduction to Quantitative Genetic*. 4th Ed. Longman Group Ltd., England.
- Fortes MRS, Curi RA, Chardulo LAL, Silveira AC, Assumpção MEOD, Visintin JA, de Oliveira HN. 2009. Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. *Genet Mol Biol* 32 (1): 75-82.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, New York.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2004. *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press, New York.
- Hudson NJ, Reverter A, Greenwood PL, Guo B, Cafe LM, Dalrymple BP. 2015. Longitudinal muscle gene expression patterns associated with differential intramuscular fat in cattle. *Animal* 9 (4): 650-659.
- Moore SS, Li C, Basarab J, Snelling WM, Kneeland J, Murdoch B, Hansen C, Benkel B. 2003. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes. *J Anim Sci* 81: 1919-1925.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei M dan Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Okumura T, Saito K, Nade T, Misumi S, Masuda Y, Sakuma H, Nakayama S, Fujita K, Kawamura T. 2007. Effects of intramuscular fat on the sensory characteristics of *M. longissimus dorsi* in Japanese Black Steers as judged by a trained analytical panel. *Asian-Aust J Anim Sci* 20 (4): 577-581.
- Pannier L, Mullen AM, Hamill RM, Stapleton PC, Sweeney T. 2010. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in DGAT1, TG and FABP4 genes and intramuscular fat in crossbred *Bos taurus* cattle. *Meat Sci* 85: 515-518.
- Purwantara B, Noor RR, Andersson G, Rodriguez-Martinez H. 2012. Banteng and Bali Cattle in Indonesia: Status and Forecasts. *Reprod Dom Anim*. 47 (Suppl. 1): 2-6. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01956.x
- Rincker CB, Pyatt NA, Berger LL, Faulkner DB. 2006. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *J Anim Sci* 84: 686-693.
- Russell PJ. 2010. *iGenetics: A Molecular Approach*. 3rd Ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Shin SC, Chung ER. 2007. Association of SNP marker in the thyroglobulin gene with carcass and meat quality traits in Korean Cattle. *Asian-Aust J Anim Sci* 20 (2): 172-177.
- Suwiti NK, Suastika IP, Swacita IBN, Besung INK. 2015. Studi histologi dan histomorfometri daging sapi Bali dan Wagyu. *Jurnal Veteriner* 16 (3): 432-438.
- Van Eenennaam AL, Li J, Thallman RM, Quaas RL, Dikeman ME, Gill CA, Franke DE, Thomas MG. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J Anim Sci* 85: 891-900.
- Wheeler TL, Cundiff LV, Koch RM. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J Anim Sci* 72: 3145-3151.