



Association of Myostatine (MSTN) Gene in Exon 3 With Growth Trait in Bali Cattle

Asosiasi Gen Myostatin Ekson 3 dengan Sifat Pertumbuhan pada Sapi Bali

Wenny Ladhunka Nur Aliyya ^{a*}, Jakaria ^b

^aProgram Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Islam Lamongan

^bAnimal Production and Technology, Faculty of Animal Science, IPB University Indonesia

email: wenny@unisla.ac.id,

INFO ARTIKEL

Sejarah artikel:

Diterima 10 Mei 2021
Direvisi 15 Agustus 2021
Diterima 25 Des 2021
Tersedia online 21 Jan 2022

Kata kunci:

Gen MSTN,
Sapi Bali,
Sifat Pertumbuhan,
SNP

Keywords:

MSTN Gene,
Bali cattle,
Growth traits,
SNP

APA style in citing this article:

Aliyya, W. L. N., & Jakaria, (2022). "Asosiasi Gen Myostatin Ekson 3 dengan Sifat Pertumbuhan pada Sapi Bali," International Journal of Animal Science Universitas Islam Lamongan, vol. 5, no. 1, 2022 Halaman 195-201.

ABSTRAK

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2020. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi keragaman SNP (Single Nucleotide Polymorphism) gen myostatin di daerah ekson 3 dan asosiasinya dengan sifat pertumbuhan pada sapi Bali. Materi penelitian menggunakan sampel darah diambil dari 52 ekor sapi bali jantan berasal dari BPTU-HPT Denpasar. Analisis DNA dilakukan secara bertahap yaitu mulai dari mengekstraksi DNA, mengamplifikasi gen MSTN dengan metode PCR dan melakukan sekuensing. Data hasil sekuensing selanjutnya dianalisis dengan menggunakan FinchTV, BioEdit dan MEGA7. Amplifikasi gen MSTN di daerah ekson 3 pada sapi bali berhasil dilakukan pada suhu 60 °C dengan panjang produk 451 pb. Dalam penelitian ini ditemukan 13 SNP dengan Frekuensi alel SNP yang ditemukan berada dalam keadaan equilibrium. Hasil asosiasi SNP Terdapat 3 SNP yaitu c.4900 T>G, c.4905 C>G dan c.4907 C>G yang berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap bobot lahir pada sapi bali. Hasil penelitian yang mengungkap hubungan antara beberapa SNP gen MSTN yang berasosiasi dengan bobot lahir diharapkan dapat dijadikan sebagai kandidat penanda genetik bobot lahir sapi bali.

ABSTRACT

The study was conducted in Januari 2020. This study aims to identify the diversity of SNP myostatin gene in the exon 3 region and its association with growth traits in Bali cattle. The material used in this study was blood samples taken from 52 male Bali cattle. DNA analysis was carried out in stages, starting from extracting DNA, amplifying the MSTN gene using the PCR method and performing sequencing. The data from the sequences were then analyzed using FinchTV, BioEdit and MEGA7. MSTN gene amplification in the exon 3 region of Bali cattle was successfully carried out at a temperature of 60 °C with a product length of 451 bp. In this study, 13 SNPs were found with the allele frequencies of the SNPs found to be in a state of equilibrium. SNP association results There were 3 SNPs, namely c.4900 T>G, c.4905 C>G and c.4907 C>G which had a significant effect ($P < 0.05$) on birth weight in bali cattle. The results of the study that reveal the relationship between several MSTN gene SNPs associated with birth weight are expected to be used as candidates for genetic markers of birth weight in Bali cattle.

1. Pendahuluan

Sapi bali (*Bos javanicus*) merupakan sapi tipe pedaging asli Indonesia hasil domestikasi dari banteng (*Bibos banteng*) dan salah satu plasma nutfah yang berasal dari pulau Bali (Thalib 2002). Sapi bali diakui oleh FAO sebagai bangsa sapi Indonesia (DGLS 2003) melalui Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 325/Kpts/OT.140/1/2010 dengan penyebaran populasi di seluruh wilayah Indonesia (BSN sapi bali 2017). Kegiatan pemuliaan sapi bali hingga saat ini masih dilakukan, agar dapat tetap terjaga kelestariannya karena memiliki berbagai keunggulan. Sapi bali unggul dalam produksi dan reproduksi, memiliki daya adaptasi cukup baik pada lingkungan buruk (Zulharnaim *et al.* 2010) dan persentase karkas mencapai 52.72-57.59% (Hafid dan Rugayah 2009).

Tahun 2020 populasi sapi bali mencapai 588 552 ekor dan terus mengalami peningkatan dari tahun 2018 (BPS 2021). Populasi sapi bali yang tinggi menjadi bukti bahwa sapi bali dapat tersebar dan beradaptasi di seluruh wilayah Indonesia. Penyebaran populasi sapi bali di Indonesia yang terus mengalami peningkatan perlu adanya kajian lanjutan untuk memperoleh informasi lengkap dalam pelestariannya. Salah satu kajian dalam mempertahankan sifat- sifat khas sapi bali diharapkan dapat dimanfaatkan di masa mendatang dalam mengatasi penurunan mutu genetik sapi bali.

Gen Myostatin (MSTN) adalah anggota dari TGF- β yang memegang peranan penting dalam mengatur pertumbuhan otot dan kualitas daging (Zhang *et al.* 2011). Gen MSTN terletak di kromosom 2 terdiri dari 3 ekson dan 2 intron serta memiliki 375 asam amino (Taylor *et al.* 2001). Mutasi dan ketidakberadaan peran gen MSTN di dalam sel akan mempengaruhi massa jaringan adiposa di samping tulang massa otot (Dominic dan Gerard 2006) dan menyebabkan pembesaran jaringan otot melebihi normal baik hipertrofi maupun hiperplasia, kondisi tersebut ditemukan pada kasus double muscling atau otot ganda sapi Belgian Blue (Oldham *et al.* 2001) yang terletak pada daerah ekson 3. Otot ganda terjadi akibat delesi 11 basa di gen MSTN yang menyebabkan peningkatan massa otot sekitar 20-25% (Cieslak *et al.* 2003). Rata- rata mutasi gen MSTN terjadi pada daerah coding terutama pada daerah ekson 3.

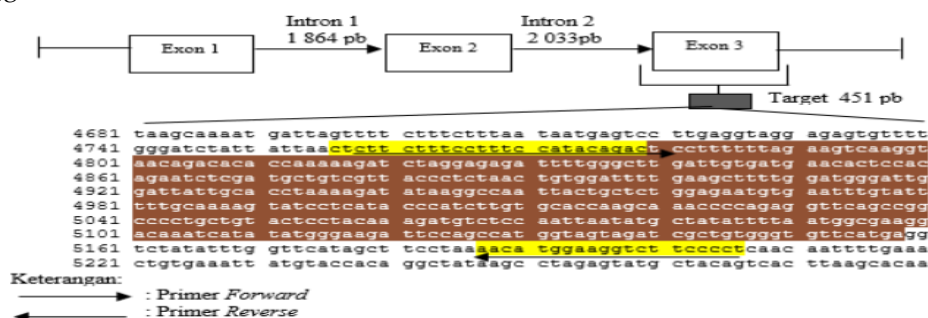
SNP (single nucleotide polymorphism) merupakan salah satu bentuk variasi genetik yang ditunjukkan oleh perbedaan nukleotida tunggal di dalam susunan rangkaian basa DNA yang dapat ditemukan pada daerah coding maupun non-coding (Lonetti *et al.* 2016). Mutasi atau perubahan SNP yang terletak pada daerah coding memiliki peluang untuk mempengaruhi fungsi gen karena dapat mengubah urutan asam amino dan mempengaruhi struktur protein terutama pada daerah ekson 3. Sehingga penelitian ini diharapkan bahwa gen MSTN dapat diangkat sebagai salah satu kandidat penanda genetik untuk sifat pertumbuhan dan topik tentang kajian gen MSTN masih sangat terbatas terutama pada sapi bali.

2. Metode

Materi

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2020 dengan materi penelitian yang digunakan adalah sampel DNA dari darah sapi bali jantan sebanyak 52 sampel dengan umur 1-2 tahun di BPTU-HPT Denpasar. Sampel darah diambil dibagian vena jugularis kurang lebih ± 5 mL kemudian disimpan dalam suhu ± 4 °C. Ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium genetika Fakultas peternakan Institut Pertanian Bogor menggunakan prosedur ekstraksi DNA Kit GeneAid. Pemilihan kandidat primer dilakukan dengan program Primer 3 (Elsalam 2003). Primer yang sudah ditentukan kemudian dianalisis pada program Primer Stat. Panjang sekuen target adalah 451 pb (pasangan basa) dengan *Forward* 5'-CTCTTCTTCCATACAC GAC-3' dan *Reverse* 5'-AGGGGAAGACCTTCCATGTT-3'. Sekuen gen MSTN ekson 3 dapat dilihat pada Gambar 1. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR (Applied Biosystem 9700) dengan total volume reaksi PCR adalah 25 μ L terdiri atas 2 μ L DNA hasil ekstraksi, 9.9 μ L NFW, 12.5 μ L Green Master Mix, 0.3 μ L primer reverse, 0.3 μ L primer forward. Hasil amplifikasi Produk DNA PCR divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan *Agarose Gel* (Lee *et al.* 2012), larutan 0.5xTBE, 100 bp ladder, dan flourosafe. Setelah itu metode skuensing dilakukan di laboratorium 1st base

Selangor Malaysia pada posisi forward dan reverse. Selanjutnya identifikasi SNP dianalisis menggunakan BioEdit dan MEGA7.



Gambar 1. Sekuen ekson 3 dan primer gen MSTN

Frekuensi genotipe, Frekuensi Alel dan Keseimbangan Hardy-Weinberg

Keragaman SNP yang ditemukan di hitung frekuensi genotipe dan frekuensi alel berdasarkan metode Nei dan Kumar (2000):

$$X_{ii} = \frac{n_{ii}}{N}$$

Frekuensi alel:

$$X_i = \frac{(2n_{ii} + \sum_{i \neq j} n_{ij})}{2N}$$

Keterangan:

X_{ii} = frekuensi genotipe

X_i = frekuensi alel

n_{ij} = jumlah individu bergenotipe i

n_{ii} = jumlah individu bergenotipe j

N = jumlah total sampel

Penyimpangan genotipe yang muncul dari keseimbangan Hardy-Weinberg di analisis menggunakan rumus Nei dan Kumar (2000).

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(O - E)^2}{E}$$

Keterangan:

χ^2 = nilai Chi Square

O = frekuensi genotipe sampel yang diamati

E = frekuensi genotipe harapan

Asosiasi Gen MSTN

Asosiasi keragaman gen MSTN dengan sifat pertumbuhan sapi bali dianalisis menggunakan uji-t yang sebelumnya data bobot hidup dan pemeliharaan telah dikoreksi menurut Harjosubroto (1994). Model matematis uji-t sebagai berikut:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Dimana ;} \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{X}_i - \bar{X}_1)^2 + \sum_{i=1}^n (\bar{X}_i - \bar{X}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Keterangan:

\bar{X}_1 dan \bar{X}_2 = rata-rata sifat genotif 1 dan genotif 2

n_1 dan n_2 = jumlah individu genotip 1 dan genotip 2

S = ragam gabungan

3. Hasil dan Diskusi

Amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR berhasil dilakukan menggunakan menggunakan mesin PCR Applied Biosystem 9700 pada suhu *annealing* 60 °C dengan panjang produk 541 pb (Gambar 2). Pewarnaan hasil amplifikasi menggunakan gel agarosa 1.5% dengan 1 x TBE (M = marker DNA 100 pb).



Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR ekson 3 gen MSTN

Keragaman gen MSTN

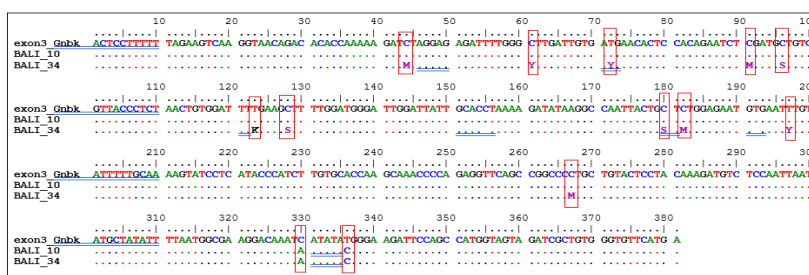
Keragaman gen MSTN di ekson 3 pada sapi bali ditemukan 13 SNP dengan 4 tipe mutasi transisi dan 9 tipe mutasi transversi (Tabel 1).

Tabel 1 Frekuensi genotipe, frekuensi alel dan nilai chi-square (χ^2) ekson 3 gen MSTN pada sapi bali

SNP	Tipe mutasi	Posisi asam amino	Frekuensi genotipe			Frekuensi alel		χ^2
			BB	BC	CC	B	C	
c.4821 C>A	Transversi	Ser264Tyr	0.94	0.06	-	0.97	0.03	0.05 ^{tn}
c.4838 C>T	Transisi	Leu270Phe	0.94	0.06	-	0.97	0.03	0.05 ^{tn}
c.4849 T>C	Transisi	Asp273Asp	0.94	0.06	-	0.97	0.03	0.05 ^{tn}
c.4868 C>A	Transversi	Arg280Arg	0.85	0.15	-	0.92	0.08	0.31 ^{tn}
c.4873 C>G	Transversi	Cys281Trp	0.96	0.04	-	0.98	0.02	0.02 ^{tn}
c.4900 T>G	Transversi	Phe290Leu	0.92	0.08	-	0.96	0.04	0.08 ^{tn}
c.4905 C>G	Transversi	Ala292Gly	0.92	0.08	-	0.96	0.04	0.08 ^{tn}
c.4957 C>G	Transversi	Cys309Try	0.88	0.12	-	0.94	0.06	0.20 ^{tn}
c.4959 C>A	Transversi	Ser310Tyr	0.92	0.08	-	0.96	0.04	0.08 ^{tn}
c.4974 T>C	Transisi	Phe315Ser	0.96	0.04	-	0.98	0.02	0.02 ^{tn}
c.5044 C>A	Transversi	Pro338Pro	0.94	0.06	-	0.97	0.03	0.05 ^{tn}
c.5107 C>A	Transversi	Iso359Iso	-	-	1.00	-	1.00	0.00 ^{tn}
c.5113 T>C	Transisi	Try361Try	-	-	1.00	-	1.00	0.00 ^{tn}

BB = genotipe referensi (Genbank), BC = genotipe heterozigot, CC = genotipe mutan, B = alel referensi (Genbank), C = alel mutan, χ^2 = Hardy-Weinberg equilibrium, (*) = significant pada α 5% (≥ 3.84), tn = tidak nyata, χ^2 dengan nilai 0.00 tidak dapat dihitung karena alel bersifat monomorfik.

Keragaman gen MSTN pada sapi bali pada ekson 3 dapat dicerminkan oleh adanya mutasi pada SNP yang diperoleh. Pada sapi bali terdapat 11 SNP bersifat polimorfik dan 2 SNP monomorfik. Keragaman gen juga dapat digunakan sebagai acuan dalam menentukan program pemuliaan. Menurut Noor (2010), program pemuliaan dapat dilakukan dengan metode seleksi apabila populasi beragam dan dilakukan persilangan apabila populasi seragam. Keragaman dalam populasi dapat terjadi apabila terdapat dua alel atau lebih dengan nilai frekuensi lebih dari 0.01 (1%) (Nei dan Kumar 2000). Analisis Uji *chi-square* (χ^2) dilakukan untuk mengetahui suatu populasi berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg. Hasil uji *chi-square* (χ^2) pada sapi bali berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg. Noor (2010) menyatakan bahwa keseimbangan gen dalam suatu populasi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain adalah seleksi, migrasi, *non-random mating*, *genetic drift*, dan mutasi. Dengan demikian secara umum frekuensi gen MSTN pada ekson 3 sapi pada bali di BPTU-HPT Denpasar, Provinsi Bali dalam keadaan seimbang dan frekuensi gen ini relatif stabil.



Gambar 3. SNP Parsial gen MSTN pada sapi bali

Asosiasi SNP gen MSTN pada ekson 3

Asosiasi gen MSTN sapi bali berdasarkan SNP yang diperoleh pada daerah ekson 3 dengan sifat pertumbuhan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 Asosiasi genotipe SNP gen MSTN di daerah ekson 3 dengan sifat pertumbuhan sapi bali

SNP	Genotipe (n)	Bobot lahir	Bobot badan		Pertambahan bobot harian
			205 hari	1 tahun	
c.4821 C>A	CC (49)	19.69± 02.21	91.84± 19.00	124.50± 36.18	0.35± 0.10
	CA (03)	17.33± 00.58	90.60± 16.34	112.60± 03.09	0.32± 0.06
c.4838 C>T	CC (49)	19.59± 02.17	91.22± 18.37	123.20± 35.49	0.35± 0.10
	CT (03)	19.00± 03.46	100.6± 26.71	133.40± 34.71	0.33± 0.08
c.4849 T>C	TT (49)	19.69± 02.21	91.81± 18.31	123.90± 35.95	0.34± 0.10
	TC (03)	17.33± 00.58	91.07± 29.79	121.20± 24.35	0.37± 0.09
c.4868 C>A	CC (44)	19.84± 02.15	91.33± 18.75	123.90± 36.53	0.34± 0.09
	CA (08)	18.00± 02.07	94.18± 19.61	123.30± 27.51	0.38± 0.17
c.4873 C>G	CC (50)	19.66± 02.20	91.91± 18.81	124.20± 35.85	0.35± 0.10
	CG (02)	17.00± 00.00	88.20± 22.34	113.50± 03.75	0.29± 0.08
c.4900 T>G	TT (48)	19.75± 02.20 ^a	92.22± 19.01	125.20± 36.26	0.35± 0.10
	TG (04)	17.25± 00.50 ^b	86.35± 15.82	107.60± 10.19	0.28± 0.09
c.4905 C>G	CC (48)	19.78± 02.22 ^a	91.41± 18.98	124.00± 36.41	0.34± 0.10
	CG (04)	17.50± 00.58 ^b	96.00± 17.16	121.40± 17.74	0.36± 0.09
c.4957 C>G	CC (46)	19.85± 02.11 ^a	91.71± 19.19	125.00± 36.60	0.35± 0.10
	CG (06)	17.33± 00.52 ^b	92.23± 16.13	114.90± 17.95	0.32± 0.10
c.4959 C>A	CC (48)	19.63± 02.18	91.14± 18.55	123.40± 35.86	0.35± 0.11
	CA (04)	18.75± 02.87	99.33± 21.96	127.80± 30.52	0.34± 0.07
c.4974 T>C	TT (50)	19.66± 02.20	91.91± 18.81	124.20± 35.85	0.35± 0.10
	TC (02)	17.00± 00.00	88.20± 22.34	113.50± 03.75	0.29± 0.08
c.5044 C>A	CC (49)	19.69± 02.21	91.84± 19.00	124.50± 36.18	0.35± 0.11
	CA (03)	17.33± 00.58	90.60± 16.34	112.60± 03.06	0.32± 0.07

n = jumlah, angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%.

Hasil analisis menunjukkan 3 SNP berasosiasi nyata ($P < 0.05$) dengan bobot lahir. Genotipe TT pada mutasi c.4900 T>G berbeda nyata dengan genotipe TG. Genotipe CC pada mutasi c.4905 C>G dan c.4957 C>G berbeda nyata dengan genotipe CG. Pada breed sapi lain, Zhang *et al.* (2007) melaporkan hasil penelitian yang berbeda dengan SNP yang berbeda, dimana genotipe AA dan AB pada sapi nanyang tidak berbeda nyata dengan bobot lahir. Asosiasi daerah promotor gen MSTN pada sapi bali yang dilaporkan oleh Khasanah *et al.* (2016) bahwa genotipe AA, AB dan BB yang diperoleh juga tidak berbeda nyata pada bobot lahir. Namun pada spesies lain seperti pada kambing boer ditemukan pengaruh terhadap bobot lahir dimana genotipe AB berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan BB di daerah 5' UTR dan genotipe AB berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan AA di daerah ekson 1 (Zhang *et al.* 2011).

4. Kesimpulan

Gen MSTN di daerah ekson 3 pada sapi bali ditemukan 13 SNP yang bersifat beragam (polimorfik) dan frekuensi alelnya berada dalam *equilibrium*. Tiga SNP yang ditemukan pada sapi bali berasosiasi nyata ($P < 0.05$) dengan bobot lahir dan diharapkan dapat dijadikan sebagai kandidat penanda genetik untuk meningkatkan bobot lahir.

5. References

- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2021. *Provinsi Bali dalam Angka 2019*. Bali (ID): BPS Provinsi Bali.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2017. *Bibit Sapi Potong bagian 4: Bali*. Jakarta (ID): SNI 7651-4:2017.
- Cieslak D, Blicharski T, Kapelaski W, Pherzchala M. 2003. Investigation of polymorphisms in the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. *Czech J Anim Sci.* 48(2):69-75.
- [DGLS] Directorate Generale of Livestock Services. 2003. *National Report on Animal Genetic Resources in Indonesia*. Directorate of Livestock Breeding (ID): Directorate Generale of Livestock Services.
- Dominic JE, Gerard C. 2006. Myostatin regulation of muscle development: molecular basic, natural mutation, physiopathological aspects. *Experimental cell research.* 312(13):2401-2414.
- Elsalam KAA. 2003. Bioinformatic tools and guideline for pcr primer design. *African Journal of Biotechnology.* 2(5):91-95.
- Hafid H, Rugayah N. 2009. Persentase karkas sapi bali pada berbagai berat badan dan lama pemusaan sebelum pemotongan. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.* 2009, 1(1):77-85.
- Hardjosubroto. 1994. *Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan*. Jakarta (ID): Gramedia Widiasarana Indonesia.
- Khasanah H, Gunawan A, Priyanto R, Ulum MF, Jakaria. 2016. Polymorphism of myostatin (MSTN) promoter gene and its association with growth and muscling traits in bali cattle. *Media Peternakan.* 39(2):95-103.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separatin of DNA fragments. *J. Vis Exp.* 62:3923.
- Lonetti A, Fontana MC, Martinelli G, Lacobucci I. 2016. Single nucleotide polimorphisms as genomic markers for high-throughput pharmacogenomic studies. *Methods Molecular Biology.* 1368:143-159.
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York (USA): Oxford Univ Pr.
- Noor RR. 2010. *Genetika Ternak*. Edisi ke-6. Jakarta (ID): Penebar Swadaya.

- Oldham JM, Martyn JAK, Sharma M, Jaenplong F, Kambadur R, Bass JJ. 2001. Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscled than normal-muscled cattle fetuses. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 280: R1488-R1493.
- Talib Chalid. 2002. Sapi bali di daerah sumber bibit dan peluang pengembangannya. *Wartazoa.* 12(3):100-107.
- Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Jr Willard DH, Jr Cull FC, Gonzalez CN. 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endo Metab.* 280(2): E221– E228.
- Zhang C, Liu Y, Xu D, Wen Q, Li X, Zhang W, Yang L. 2011. Polymorphisms of myostatin gene (MSTN) in four goat breeds and their effects on boer goat growth performance. *Mol Biol Rep.* 39(3):3081-3087.
- Zhang C, Liu Y, Xu D, Wen Q, Li X, Zhang W, Yang L. 2011. Polymorphisms of myostatin gene (MSTN) in four goat breeds and their effects on boer goat growth performance. *Mol Biol Rep.* 39(3):3081-3087.
- Zhang RF, Chen H, Lei1 CZ, Zhang CL, Lan XY, Zhang YD, Zhang HJ, Bao B. Niu H, Wang XZ. 2007. Association between polymorphisms of mstn and myf5 genes and growth traits in three chinese cattle breeds. *AJAS.* 20(12):1798-1804.
- Zulkharnaim, Jakaria, Noor RR. 2010. Identification of genetic diversity of growth hormone receptor (GHR| Alu I) gene in bali cattle. *Media Peternakan.* 33:81-87.