

IDENTIFIKASI KERAGAMAN GENETIK KERBAU LOKAL POPULASI JAWA TIMUR DAN NUSA TENGGARA BARAT BERBASIS MIKROSATELIT SEBAGAI MODEL PENGEMBANGAN KONSERVASI KERBAU SECARA *EX SITU*

Identification Genetic Diversity of Local Buffalo Population East Java and West Nusa Tenggara Based on Microsatellite as Model Development Ex Situ Conservation of Buffalo

Mohamad Amin, Umie Lestari

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang Jalan Semarang 5 Malang

E-mail: rizalamin98@yahoo.co.id

Abstract - In Indonesia, local buffalo (*Bubalus bubalis*) is one type of germplasm that a major contribution in the national meat supply of animal protein. However, this germplasm will be reduced of its number. If this condition continues we will loss the germplasm. One effort to this is conservatuin based on a molecular marker mikrosatellite. Selected marker locus are HEL09, INRA23 and ISLTS05. Sampling area of it research in East Java and West Nusa Tenggara. The results showed that in both are and all loci is polymorphic, allele frequencies ranging from 0.125 to 0.875 and heterozygosity values in the range 35-65%. These results illustrate that the two populations have genetic diversity that is still quite varied genotype.

Key Words: alele frequency, heterozigosity, local buffalo, microsatellite

PENDAHULUAN

Di Indonesia, kerbau (*Bubalus bubalis*) merupakan salah satu jenis ternak yang memberikan kontribusi besar dalam penyediaan daging nasional untuk memenuhi kebutuhan protein hewani masyarakat. Namun, penambahan populasi ternak tidak seimbang dengan kebutuhan nasional (Putu *et al*, 1997). Kerbau memberikan kontribusi terbesar diantara lima jenis ternak besar dalam penyediaan daging secara nasional. Sejak terjadinya krisis pada tahun 1997, terjadi pengurangan ternak di beberapa daerah sehingga populasi kerbau diduga juga menurun secara (Diwyanto, 2003).

Kerbau lokal banyak digunakan masyarakat petani untuk membantu menggarap sawah dan belum sampai pada usaha peternakan. Dengan kenyataan, bibit kerbau lokal saat ini mengalami seleksi negatif karena petani lebih cenderung menjual ternaknya yang berkualitas bagus. Keadaan ini menjadi lebih kompleks karena upaya pembibitan yang kurang diperhatikan sehingga mengakibatkan kerbau lokal yang tersisa adalah ternak-ternak dengan kualitas kurang bagus yang kemudian terpaksa menjadi bibit. Apabila hal ini berlangsung terus menerus dikhawatirkan suatu saat akan mengalami kepunahan dan kita akan

mengalami kerugian yang sangat besar karena kehilangan plasma nutfah (Mahaputra 2002, Hardjosubroto, 2002). Setiadi (1997) menyatakan bahwa program persilangan yang tidak diwaspadai dapat mengancam sumber daya ternak lokal yang tidak dapat diperbarui lagi.

Propinsi Jawa Timur dan Nusa Tenggara Barat adalah salah satu wilayah yang memiliki populasi kerbau terbanyak di Indonesia (Hilmiati, 2008). Jawa Timur merupakan salah satu propinsi dengan jumlah populasi kerbaunya semakin menurun. Berdasarkan data statistik populasi kerbau dari Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Kementerian Pertanian RI (2013), jumlah populasi kerbau tahun 2009 adalah 49.698 ekor, tahun 2010 berjumlah 49.638 ekor, tahun 2011 berjumlah 32.675 ekor, dan tahun 2012 berjumlah 32.675 ekor, sehingga jumlah penurunan populasi kerbau dari tahun 2009 hingga 2012 sebesar 17.023 ekor atau 34,25%. Wilayah di Pulau Lombok yang memiliki populasi kerbau paling banyak adalah Kabupaten Lombok Tengah dengan 18.525 ekor kerbau pada tahun 2008 (Disnak NTB, 2010). Kabupaten Lombok Tengah merupakan daerah pensuplai terbesar ternak kerbau di Propinsi Nusa Tenggara Barat dari wilayah Lombok, selain dari daerah-daerah lain



seperti Kabupaten Sumbawa dan Bima. Besarnya potensi ternak kerbau di wilayah Nusa Tenggara Barat khususnya di Lombok Tengah ini ditunjang dengan sumber daya lahan yang masih memungkinkan untuk pengembangan ternak kerbau serta keunggulan biofisik yang dimiliki oleh kerbau itu sendiri. Kerbau memiliki daya adaptasi yang tinggi sehingga penyebarannya meluas tidak hanya di Kalimantan dan Sumatera, tetapi juga Jawa, Sulawesi, bahkan Nusa Tenggara Timur (Winarto, 2010).

Inbreeding adalah perkawinan antara individu yang berkerabat dekat. Konsep *inbreeding* berdasarkan kemungkinan dua gen pada satu lokus identik pada keturunannya. *Inbreeding* diukur sebagai korelasi diantara induk pada sebuah individu dan disimbolkan dengan huruf F (Thompson *et al*, 2000). *Inbreeding* tidak mengubah frekuensi gen, hewan yang mengalami *inbreeding* menjadi homozygot pada beberapa lokasi kromosom. *Inbreeding* memiliki dampak positif dan negatif. Dampak positif *inbreeding* adalah genotip dari sel sperma dan telur pada hewan inbred lebih bisa diprediksi dibandingkan hewan *noninbreed*. Sedangkan dampak negatif *inbreeding* lebih besar daripada dampak positifnya yaitu mengurangi profitabilitas individu hewan, umur produktif menurun, seluruh sifat dari individu tersebut mengalami penurunan, dan jarak kelahiran semakin panjang (Mirhabibi *et al*, 2007).

Mikrosatelit merupakan bagian DNA dengan 2 sampai 6 pasang basa pendek yang diulang beberapa kali. Mikrosatelit terletak dan ditemukan pada genom seluruh organisme hidup. Memiliki polimorfisme yang tinggi yaitu jumlah pengulangan bervariasi antar individu (Renwick *et al*, 2001). Kestabilan mikrosatelit diterima secara luas sebagai ukuran yang baik untuk genom (Lee *et al*, 2008). Mikrosatelit merupakan marker yang digunakan untuk pemetaan genom,

pemotongan gen dari sifat-sifat yang kompleks dan untuk penyelidikan keragaman genetik karena sifat polimorfisnya yang sangat tinggi, serta memiliki cara kodominan dalam pewarisan sifat dan mudah untuk dicetak (Navani *et al*, 2001). Dalam penelitian ini digunakan penanda mikrosatelit untuk mengidentifikasi variasi genetik kerbau lokal (*Bubalus bubalis*) Lombok Tengah.

METODE PENELITIAN

Sampel darah diambil dari tigapuluh dua individu kerbau lokal Jawa Timur dan Lombok yang diambil dari dua populasi berbeda di setiap lokasi. Penelitian ini menggunakan empat primer mikrosatelit yang dipilih secara acak yaitu HEL09, INRA 023, INRA 032, dan ILSTS 005. Karakteristik dari primer yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1. Proses amplifikasi DNA melalui *Polimerase Chain Reaction* (PCR) terdiri dari campuran reaksi 2,5 µl DNA template, 2,5 µl primer *forward*, 2,5 µl primer *reverse*, 12,5 µl PCR mix, dan 5,0 µl dH₂O. Proses PCR terdiri dari 30 siklus dengan tahapan-tahapan sebagai berikut : predenaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 92°C selama 1 menit, *annealing* atau penempelan pada suhu 56°C selama 45 detik (suhu *annealing* masing-masing primer berbeda), *elongation* atau pemanjangan pertama pada suhu 72°C selama 1 menit, *final elongation* pada suhu 72°C selama 10 menit, dan tahap terakhir pada suhu berkisar 4 derajat celsius.

Tabel 1 Karakteristik Beberapa Jenis Primer Mikrosatelit yang Digunakan

Lokus	Urutan Basa	Suhu <i>Annealing</i>
HEL09	F 5'-CCC ATT CAG TCT TCA GAG GT-3' R 5'-CAC ATC CAT GTT CTC ACC AC-3'	56°C
INRA023	F 5'-GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTA-3' R 5'-TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C-3'	56°C
LSTS005	F 5'-GGA AGC AAT GAA ATC TAT AGC C-3' R 5'-TGT TCT GTG AGT TTG TAA GC-3'	58°C



Proses separasi DNA hasil PCR dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid yang dilanjutkan dengan pewarnaan perak (*silver staining*). Penentuan posisi pita atau alel DNA pada gel poliakrilamid dilakukan secara manual. Ukuran dan jumlah alel yang muncul dihitung menurut Leung *et al*, 1993. Seluruh alel yang muncul dicatat sesuai dengan ukurannya, kemudian berdasarkan ukuran alel tersebut dihitung nilai frekuensi alel, heterozigositas, dan PIC (*Polymorphism Information Content*). Perhitungan nilai frekuensi alel dan nilai heterozigositas dilakukan dengan bantuan *software* Genepop Versi 3.1, sedangkan untuk menghitung nilai PIC digunakan rumus (Meta *et al*, 2004)

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Frekuensi Alel

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah alel dan ukuran alel pada tiap lokus mikrosatelit pada dua populasi kerbau di Lombok Tengah, selanjutnya dilakukan perhitungan nilai frekuensi alel pada tiap lokus mikrosatelit dari masing-masing populasi tersebut. Perhitungan nilai frekuensi alel pada tiap lokus dilakukan dengan menggunakan program Genepop Ver 3.1. Hasil analisis frekuensi alel tiap lokus mikrosatelit pada dua populasi kerbau lokal Jawa Timur dan Lombok, disajikan dalam Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Frekuensi Alel Tiap Lokus Mikrosatelit Pada Dua Populasi Kerbau Lokal Jawa Timur dan Lombok

Lokus	Alel (<i>base pair</i>)	Populasi 1	Populasi 2	Populasi 3	Populasi 4
HEL09	150	0,875	0,500	0,500	0,556
	155	0,125	0,500	0,000	0,000
	160	0,000	0,000	0,500	0,444
INRA023	190	0,000	0,000	0,688	0,722
	200	0,625	0,714	0,000	0,000
	210	0,000	0,000	0,312	0,278
	280	0,375	0,286	0,000	0,000
ILSTS005	190	0,500	0,857	1,000	0,611
	200	0,500	0,143	0,000	0,398

Berdasarkan Tabel 2 diperoleh nilai frekuensi alel keempat lokus mikrosatelit pada populasi pertama berkisar antara 0,125 sampai dengan 0,875, pada populasi kedua nilai frekuensi alel berkisar antara 0,143 sampai dengan 0,857, pada populasi ketiga nilai frekuensi alel berkisar antara 0,13 sampai dengan 1,00, dan pada populasi keempat nilai frekuensi alel berkisar antara 0,278 sampai dengan 0,722. Nilai frekuensi alel selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai *expected heterozygosity*.

Heterozigositas

Perhitungan nilai frekuensi alel tiap lokus mikrosatelit digunakan untuk menghitung nilai *expected heterozygosity*, sedangkan nilai *observed heterozygosity* diperoleh dari hasil pengamatan individu heterozigot. Hasil perhitungan nilai heterozigositas (*observed heterozygosity* dan *expected heterozygosity*) pada masing-masing lokus mikrosatelit dari kedua populasi dapat dilihat pada tabel 3.



Tabel 3. Nilai Heterozigositas Tiap Lokus Mikrosatelit Pada Dua Populasi Kerbau Lokal Lombok Tengah

Lokus	Populasi 1		Populasi 2		Populasi 3		Populasi 4	
	Obs. Het*	Expc. Het**	Obs. Het	Expc. Het	Obs. Het	Expc. Het	Obs. Het	Expc. Het
HEL09	25%	24,5%	14,29%	58,3%	100%	57,1%	88,89%	55,6%
INRA023	75%	53,6%	57,16%	47,6%	62,5%	50%	55,55%	45,22%
ILSTS005	100%	57,1%	28,57%	28,7%	0%	0%	77,78%	53,55%
Rata-rata	67%	45,07%	33,34%	44,87%	54,17%	35,70%	74,07%	51,46%

Berdasarkan Tabel 3 terlihat adanya variasi nilai heterozigositas baik pada populasi pertama maupun kedua. Berdasarkan nilai rata-rata heterozigositas, nilai *observed heterozygosity* tertinggi diperoleh dari populasi keempat yaitu sebesar 74,07%, sedangkan terendah diperoleh dari populasi kedua sebesar 33,34%. Selanjutnya untuk nilai *expected heterozygosity*, nilai tertinggi diperoleh dari populasi keempat yaitu sebesar 51,46%, sedangkan nilai dari populasi ketiga sebesar

35,70%. Secara keseluruhan, nilai heterozigositas (*observed* terendah diperoleh *heterozygosity* dan *expected heterozygosity*) pada populasi keempat lebih tinggi dibandingkan populasi yang lain.

Polymorphism Information Content (PIC)

Untuk mengetahui polimorfisme pada tiap lokus mikrosatelit, maka dilakukan perhitungan nilai PIC. Hasil perhitungan nilai PIC tiap lokus mikrosatelit pada kedua populasi kerbau Lombok tengah, disajikan pada Tabel 4 berikut.

Tabel 4. Nilai PIC Tiap Lokus Mikrosatelit Pada Dua Populasi Kerbau Lokal Jawa Timur dan Lombok

Lokus	Populasi 1	Populasi 2	Populasi 3	Populasi 4	Rata-Rata
HEL09	19%	37,5%	37,5%	37,2%	32,80%
INRA023	35,9%	32,5%	35,3%	32,1%	33,95%
ILSTS005	37,5%	21,6%	0%	36,3%	23,85%

Berdasarkan Tabel 4 diperoleh nilai PIC berada pada rentangan 23,85% sampai dengan 33,95%. Pada populasi pertama, nilai PIC tertinggi pada lokus INRA023 dengan nilai 37,50%, sedangkan nilai terendah diperoleh dari lokus HEL09 dengan nilai 19,00%. Pada populasi kedua, nilai PIC tertinggi diperoleh dari lokus HEL09 sebesar 37,50%, sedangkan nilai terendah pada lokus ILSTS005 sebesar 21,60%. Pada populasi ketiga, nilai PIC tertinggi diperoleh dari lokus HEL09 sebesar 37,50%, sedangkan nilai terendah pada lokus ILSTS005 sebesar 0,00%. Pada populasi keempat, nilai PIC tertinggi diperoleh dari lokus HEL09 sebesar 37,20%, sedangkan nilai terendah pada lokus INRA023 sebesar 32,10%. Dari nilai rata-rata diperoleh lokus INRA023 memiliki nilai PIC yang paling tinggi yaitu 33,95%, diikuti oleh lokus HEL09

sebesar 32,80%, dan lokus ILSTS005 dengan nilai 23,85%. Nilai heterozigositas ini menunjukkan besarnya perbedaan variasi antar individu kerbau. Hal ini berarti ketiga loci dapat dimanfaatkan sebagai pembeda karena memiliki alel lebih banyak dari kedua lokus lainnya. Tingginya polimorfisme dari suatu populasi bisa diartikan bahwa variasi alel serta sifat spesifik dari populasi cukup tinggi. Lokus yang polimorfik menggambarkan adanya heterozigositas dalam suatu individu. Setiap individu heterozigot masing-masing membawa dua macam alel atau lebih. Adanya perbedaan heterozigositas ini kemungkinan karena lokus yang diamati berbeda.

Gambaran heterozigositas pada kerbau mengindikasikan bahwa kerbau diduga mendapatkan aliran alel. Menurut Baker & Manwell dalam Winaya (2000),

bahwa salah satu efek yang dapat dimunculkan dari heterosigositas adalah dihasilkannya *over dominant* dalam suatu bangsa, walaupun kemungkinan tersebut memerlukan proses seleksi yang ketat dan panjang.

Alel mikrosatelit pada kerbau yang diidentifikasi dapat digunakan sebagai penanda genetik, sehingga dapat menunjukkan variasi genetik. Hal ini sesuai dengan Studi yang dilakukan oleh McCouch *et al.*, (1997), bahwa mikrosatelit sangat bermanfaat sebagai penanda genetik karena bersifat kodominan, memiliki polimorfis sangat tinggi serta cukup mudah dalam proses pengujiannya. Pola sidik jari DNA dengan polimorfisme tinggi dihasilkan dari hewan ternak (sapi, domba, dan babi) dan tanaman hias dengan menggunakan klon genom sapi, yang mengandung enam rangkaian poli (GT) (Haberfield *et al.*, 1991).

Diketahuinya variasi alel DNA mikrosatelit yang mengindikasikan keragaman genetik pada kerbau diharapkan dapat dijadikan acuan untuk penentuan mutu genetik kerbau melalui penyediaan bibit untuk program *outbreeding* atau untuk mengurangi efek silang dalam (*inbreeding*), sehingga mutu genetik dapat dipertahankan atau ditingkatkan. Berdasarkan uraian di atas bahwa semua populasi yang diuji menunjukkan keragaman genetik yang masih tinggi.

SIMPULAN SARAN DAN REKOMENDASI

Frekuensi alele dari dua populasi wilayah di Jawa Timur dan Lombok menunjukkan pada rentang 0,125 sampai 0,875. Heterozigositas berada pada rentang nilai 0,25 samai 100 persen. Semua lokus adalah polimorf dengan nilai PIC di atas 15 persen. Semua data ini menunjukkan keragaman genetik populasi yang diamati masih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, M. dan Lestari, U. 2013. *Pemetaan Keragaman Genetik Berbasis Mikrosatellite dan Diversitas Geografis Habitat Kerbau Lokal Indonesia dengan Gen Cytochrome B sebagai Model Pengembangan Konservasi Kerbau Secara Ex Situ dan Upaya Pembibitan Unggul*. Laporan Akhir Tahap I Hibah Penelitian Tim Pascasarjana (HPTP). LP2M UM.
- Ellegren, H. 2004. *Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution*. Genetics, Vol 5: 435-445.
- Haberfeld, A, A. Cahaner, O. Yoffe, Y. Plotsky and J. Hillel. 1991. *Short Communication : DNA Fingerprints of Farm Animal Generated by Microsatellite and Minisatellite DNA Probe*. Animal Genetics. 22 : 299-305.
- Handiwirawan, E. 2003. *Penggunaan Mikrosatellite HEL9 dan INRA035 sebagai Penciri Khas Sapi Bali*. Thesis. Program Pasca Sarjana IPB.
- 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
- Hilmiati, N. 2008. *Potensi Kerbau Sebagai Substitusi Daging Sapi di Nusa Tenggara Barat*, (<http://www.ntb.litbang.deptan.go.id/index.php?> diakses tanggal 10 Maret 2010).
- Lanuzzi, L & Di Meo, G.P. 2009. *Genome Mapping and Genomics in Domestic Animals*. United State of America: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lee, W.S., Soo, G., Shin, H.J., Yun, S.H., Yun, H., Choi, N., Lee, J., Son, D., Cho, J., Kim, J., Cho, Y.B., Chun, H.K. & Lee, W.Y. 2008. *Identification of Differentially Expressed Genes in Microsatellite Stable HNPCC and Sporadic Colon Cancer*. Journal of surgical research, Vol 144: 29-35.
- McCouch, S.R., Xiuli Chen, Olivier Panaud, Svetlana Temnykh, Yunbi Xu, Yong Gu Cho, Ning Huang, Takashige Ishii and Matthew Blair. 1997. *Microsatellite Marker Development, Mapping and Application in Rice Genetics and Breeding*. Plant Molecular Biology. 38 : 89-99.
- Mahaputra, L. 2002. *Arah dan Sasaran Penelitian Reproduksi Sapi Potong di Indonesia*. Workshop Sapi Potong. Malang, 11-12 April 2002.
- Metta, M., Kanginakudru, S., Gudiseva, N. & Nagaraju, J. 2004. *Genetic Characterization of The Indian Cattle*



- Breeds, Ongole and Deoni (Bos indicus) Using Microsatellite*. BioMed Central Genetics, Vol (5): 16.
- Mirhabibi, S., Manafiazar, G.H., Qaravisi, S.H. & Mahmoodi, B. 2007. *Inbreeding and Its Effect on Some Productive Traits in Buffaloes of South Iran*. Journal Animal Science, Vol 06 (suppl, 2): 372-374.
- Navani, N., Jain, P.K., Gupta, S., Sisodia, B.S. & Kumar, S. 2001. *Animal Genetics*, Vol 33: 149-154
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia Press.
- Putu, L.G.; Dewyanto, P. Dan Sitepu, T.D. 1997. *Ketersediaan dan Kebutuhan Teknologi Produksi Sapi Potong*. Proceeding Seminar Nasional dan Veteriner. Bogor, 7-8 Januari 1997: 50-63.
- Renwick, A., Davison, L., Spratt, H., King, J.P. & Kimmel, M. 2001. *DNA Nucleotide Evolution in Humans Fitting Theory to Facts*. Genetics. Vol 159: 737-747.
- Setiadi. 1997. *Plasma Nutfah pada Domba dan Kambing. Modul dan Bimbingan Teknis Manajemen Penelitian pada Pengkajian Bidang Peternakan*. Puslitbang Peternakan dan Balitbang Pertanian. Departemen Pertanian.
- Thompson, J.R., Everett, R.W. & Hammerschmidt, N.L. 2000. *Genetics and Breeding, Effect of Inbreeding on Production and Survival in Holstein*. Journal of Dairy Science, Vol 83 (8): 1856-1864.
- Winarto, D. 2010. *Menguak Potensi Kerbau* (Online), (http://www.mit.undip.ac.id/images/download/artikel/potensi_kerbau.pdf, diakses 10 Maret 2010).
- Winaya, A. 2000. *Penggunaan Penanda Molekuler Mikrosatelit untuk Deteksi Polimorfisme dan Analisis Filogenetik Genom Sapi [tesis]*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Program Pascasarjana. Program Studi Bioteknologi.

