

AMPLIFIKASI DNA KANDIDAT GEN KUDA PACU SUMBA

(DNA Amplifications of Candidate Gene Sumba' Racing Horses)

Cynthia Dewi Gaina^{1*}, Frits B.H. Francis²

¹Departemen Klinik Reproduksi Patologi dan Nutrisi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Nusa Cendana Kupang

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Nusa Cendana Kupang

*Korespondensi e-mail: cynthia.gaina@staf.undana.ac.id

ABSTRACT

The Sumba horse is one of the local horses in Indonesia which is known as racing horse. Several candidate genes are known to influence the outward characteristics of the Sumba racehorse, which play main role in the development of the horse's muscles from embryo to adulthood. This research aims to identify candidate genes for the Sumba racehorse in stallion and mares. Blood samples from 5 stallions and 5 mares were collected and analyzed. The method used in this research was by using polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis and DNA sequencing. The results of DNA amplification fragments at a temperature of 60⁰c showed a fragment size of 463 bp. A total of 10 samples were sequenced on the PCR machine. The forward primer was 5'-TATTCTTCTGGGAGGGAGGACTACT-3' and reverse primer was 5'-GCAAGTAATTAGCACAAAAATTTGAATG-3'. The obtained data was analyzed using the Basic Local Alignment Sealing Tool (BLAST). Result of this study could be used as an initial identification of candidate genes for racing activity in stallion and mares that can complement the selection of racing horses.

Keywords: Amplification; Gene; Horse; Racing; Sumba

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki berbagai ras kuda lokal, termasuk kuda sumba, kuda gayo, kuda sumbawa, kuda flores, kuda timor dan beberapa jenis kuda lainnya. Adapun sebagian besar kategori kuda-kuda lokal Indonesia adalah untuk kuda pacuan (Gaina dan Nancy, 2018). Selama ini, pemilihan karakteristik kuda pacu hanya berdasarkan tampilan morfometriknya saja, sedangkan aspek genotip sangat menentukan kualitas

kuda pacuan tersebut (Rooney *et al* 2018). Jenis-jenis kuda pacu ini sangat potensial untuk dikembangkan (Gaina dkk, 2020). Akan tetapi, sampai saat ini upaya seleksi dan pengembangan yang efisien tersebut belum sampai pada pemanfaatan teknologi molekular (Aiello *et al*, 2018; Cothran *et al*, 2005).

Teknologi bertujuan untuk melakukan seleksi dini kategori kuda pacu sumba berdasarkan marka mo-

lecular kandidat gen kuda pacu (Kim *et al*, 2013; Kumar, 2015). Seleksi yang berdasarkan pada genotip kuda bersamaan dengan seleksi fenotipnya akan menghasilkan kuda pacu yang berkualitas. Pengujian variabilitas genetik serta karakteristik kandidat gen kuda pacu dapat dilakukan melalui penggunaan marka molekular (Castejón, 1994; Hill *et al*, 2019). Teknologi ini membantu mengeksplorasi informasi yang terdapat dalam setiap region dari genom, tanpa mempertimbangkan ekspresi gennya (McGivney *et al*, 2012).

Adanya polimorfisme dalam gen merupakan bentuk marka molekular yang bertujuan memperlihatkan adanya munculnya kandidat gen dengan sifat-sifat tertentu yang diharapkan (Viluma, 2012; Petersen, 2014; Pereira, 2016). Hasil identifi-

kasi genotip kandidat gen kuda pacu, dalam hal ini gen myostatin telah dilaporkan pada beberapa jenis hewan (Batubara, 2017; Martinez, 2016; Haruna *et al*, 2020; Węglarz *et al*, 2020). Akan tetapi, belum ada data yang melaporkan tentang kandidat gen kuda pacu sumba. Penggunaan marka molekular kandidat gen untuk membantu seleksi kuda pacu dilapangan akan membantu proses seleksi penampilan fisiknya. Berdasarkan latar belakang diatas, permasalahan penelitian ini adalah tentang profil hasil amplifikasi dna untuk mengetahui kandidatgen kuda pacu sumba terkait dengan kecepatannya. Hasil amplifikasi DNA kandidat gen kuda pacu dapat dijadikan tahapan awal untuk menganalisis kandidat gen pada kuda pacu sumba.

MATERI DAN METODE

Koleksi sampel

Sampel darah diambil secara acak dari 5 ekor kuda jantan dan 5 ekor kuda sandelwood yang dipelihara secara liar di padang pulau Sumba, NTT dan disimpan pada suhu -20°C untuk dianalisis lebih lanjut. DNA genom diisolasi dengan kit mini darah DNA (Geneaid). Pengujian kemurnian DNA dilakukan melalui penambahan isolate DNA dengan TE sampai 20 ml dan dimasukkan dalam cuvet quart. Kualitas dan kuantitas DNA yang diisolasi diukur dengan metode spektrofotometer dan elektroforesis gel agarosa. Adapun penelitian ini

telah mendapat persetujuan dari Panitia Etik Penelitian Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Nusa Cendana dengan nomor _____urut KEH/FKH/NEPH/014/2019.

Amplifikasi DNA

Pengambilan sampel yang telah dirancang sebelumnya bertujuan untuk memiliki marka kandidat gen kuda pacu sumba diantara kelompok kuda. Untuk melacak gen ini digunakan polymerase chain reaction (PCR). Dengan menggunakan urutan primer. Fragmen DNA dari kandidat gen kuda pacu diamplifikasi dari

DNA genom yang diperoleh dari 10 ekor kuda jantan dan betina secara random dari peternakan kuda di sumba, NTT. Primer untuk gen kuda pacu, dalam hal ini gen miostation yang digunakan berturut-turut sebanyak 2 buah primer. Urutan primer adalah *forward primer*, 5'-TATTCTTCTTGGGAGGGAGGACTACT-3' dan *reverse primer*, 5'-GCAAGTAATTAGCACAAAATTTGAATG-3'. Dengan menggunakan primer ini, ukuran produk PCR yang diharapkan adalah sekitar 463 pasang basa (bp). PCR dilakukan dalam 25µl larutan, yang mengandung 10 pmol pada setiap primer dengan sampel sebanyak 10gDNA, dengan campuran master

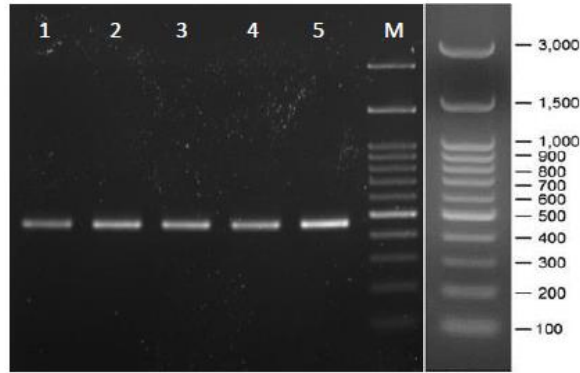
12,5 PCR (Geneaid). Kondisi siklus PCR adalah langkah denaturasi awal 95⁰C (3 menit); diikuti oleh 35 siklus 98⁰C (15 detik), 55⁰C (30 detik) dan ekstensi akhir pada 68⁰C (45 detik). Elektroforesis produk PCR dilakukan dalam gel agarosa 1% TBE dan divisualisasikan dengan transiluminator UV. Analisis sekuensing digunakan untuk mengidentifikasi variasi gen miostation pada semua sampel, baik pada kuda jantan maupun kuda betina. Hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan Mega versi 6.0 (Tamura *et al*, 2013). Data yang diperoleh dianalisis dengan *Basic Alignment Local Search Tool* (BLAST).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel darah sebagai sumber DNA dikoleksi dari vena jugularis dengan menggunakan tabung venoject yang mengandung bahan antikoagulan sebanyak 3 ml dari setiap ekor kuda. Untuk mengetahui keberhasilan isolasi DNA dilakukan pengamatan secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer dan pengamatan secara kualitatif dengan menggunakan elektroforesis agarose. Kemurnian DNA yang diketahui dari rasio A260/A280 diperoleh nilai sekitar 1.86-1.93. DNA yang diperoleh dikatakan murni jika memenuhi rasio lebih dari 1.8, se-

baliknya jika nilainya lebih kecil dari 1.8 maka diduga terjadi kontaminasi protein pada saat isolasi DNA (Saunders and Parkes, 1999).

Pada penelitian ini, semua hasil isolasi DNA yang diperoleh dielektroforesis pada gel agarose 1% (Gambar 1). DNA total kuda pacu sumba yang dielektroforesis memperlihatkan band terang didekat lubang sumuran. Band terang tersebut menunjukkan DNA hasil isolasi (Lee, 2017). Semakin tebal dan terang maka menunjukkan semakin banyak DNA yang diperoleh.



Gambar 1. DNA total sapi yang dielektrofores pada gel agarose 1%



Gambar 2. Gambaran elektroforesis amplifikasi DNA hasil PCR 1% dalam gel agarose. (M:1kb DNA ladder; 1-10: fragmen dengan Panjang 463 bp).

Upaya melacak kandidat gen kuda pacu pada DNA yang telah diperoleh digunakan 2 macam primer yaitu: primer gen myostatin (*forward primer* :5'-TATTCTTCTTGGGAGGGAGGAC

TACT-3' dan *reverse primer*: 5'-GCAAGTAATTAGCACAAAAATTTGAATG-3') yang terlihat pada gambar 2. Panjang fragmen DNA hasil amplifikasi terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil amplifikasi panjang fragmen DNA

No	Nama Primer	Sekuen Primer DNA	Panjang Fragmen
1.	Myostatin	<p><i>forward primer</i> :5'-TATTCTTCTTGGGAGGGAGGACTACT-3'dan <i>Reverse primer</i>: 5'GCAAGTAATTAGCACAAAAATTTGAATG-3'</p>	463 bp

Hasil amplifikasi pada gen kuda pacu, dalam hal ini gen myostatin menghasilkan satu pita yang berukuran 463 bp. Munculnya satu pita ini menunjukkan bahwa primer DNA yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesifik untuk kuda pacu dalam mendeteksi potensi kekuatan otot pada saat pacuan. Hasil PCR yang baik dipengaruhi oleh faktor-faktor sebagai berikut kemurnian DNA hasil isolasi dan ekstraksi, ketepatan pemilihan primer dan ketepatan kondisi siklus PCR. Primer merupakan bagian penting dalam PCR karena primer berguna dalam menginisiasi pembentukan target DNA (Ye *et al*, 2012), dimana untuk Menyusun suatu primer harus terdiri dari 18-20 basa dengan perbandingan G/C adalah 50% (Apte and Daniel,

2009). Selain itu, ketepatan kondisi PCR juga mempengaruhi hasil reaksi PCR yang didasarkan pada ketepatan pencampuran reaksi dan ketepatan kondisi suhu pada masing-masing siklus (Beuzen *et al*, 2000). Produk PCR spesifik yang terbentuk dengan adanya satu pita DNA yang tampak menunjukkan adanya ketepatan reaksi PCR beriringan dengan ketepatan primer yang digunakan sesuai dengan prediksi optimum kecepatan kuda pacu (Hill *et al*, 2010). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan merupakan primer yang sesuai untuk mengamplifikasi gen kuda pacu sumba dalam hal ini gen myostatin karena hasil amplifikasi menunjukkan satu pita.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, data disimpulkan hasil amplifikasi DNA dengan ukuran 463 bp dapat dijadikan penanda genetika untuk

melengkapi proses seleksi kuda pacuan yang selama ini hanya berdasarkan morfometrik tubuh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada Dinas Peternakan Kabupaten Sumba

Timur dan peternak yang sudah membantu jalannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Aiello, D., Patel, K., & Lasagna, E. (2018). The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Animal genetics*, 49(6), 505-519.

Apte, A., & Daniel, S. (2009). PCR primer design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(3), pdb-ip65.

Batubara, A. (2017). Ekspresi gen myostatin dan aplikasinya

- pada program pemuliaan kambing. *Jurnal Wartazoa*, 27, 89-94.
- Beuzen, N. D., Stear, M. J., & Chang, K. C. (2000). Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*, 160(1), 42-52.
- Castejón, F., Rubio, D., Tovar, P., Vinuesa, M., & Riber, C. (1994). A comparative study of aerobic capacity and fitness in three different horse breeds (Andalusian, Arabian and Anglo-Arabian). *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 41(1-10), 645-652.
- Cothran, E., Juras, R., & Macijauskiene, V. (2005). Mitochondrial DNA D-loop sequence variation among 5 maternal lines of the Zemaitukai horse breed. *Genetics and Molecular Biology*, 28(4), 677-681.
- Gaina, C. D., & Foeh, N. D. (2018). Studi Performa Umum Tubuh dan Status Fisiologis Kuda Sumba. *Jurnal Kajian Veteriner*, 6(2), 38-44.
- Gaina, C. D., Widi, A. Y., & Saputra, A. (2020). Age-Sex Related in Hematological Values of Sandalwood Pony Horses (*Equus caballus*) in East Sumba, NTT. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 3(2).
- Haruna, I. L., Ekegbu, U. J., Ullah, F., Amirpour-Najafabadi, H., Zhou, H., & Hickford, J. G. (2020). Genetic variations and haplotypic diversity in the Myostatin gene of New Zealand cattle breeds. *Gene*, 740, 144400.
- Hill, E. W., McGivney, B. A., Gu, J., Whiston, R., & MacHugh, D. E. (2010). A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g. 66493737C> T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC genomics*, 11(1), 1-10.
- Hill, E. W., McGivney, B. A., Rooney, M. F., Katz, L. M., Parnell, A., & MacHugh, D. E. (2019). The contribution of myostatin (MSTN) and additional modifying genetic loci to race distance aptitude in Thoroughbred horses racing in different geographic regions. *Equine veterinary journal*, 51(5), 625-633.
- Kim, H., Lee, T., Park, W., Lee, J. W., Kim, J., Lee, B. Y., & Kim, H. (2013). Peeling back the evolutionary layers of molecular mechanisms responsive to exercise-stress in the skeletal muscle of the racing horse. *DNA research*, 20(3), 287-298.
- Kumar, V. (2015). Physiological responses and molecular signatures of exercise in hors

- es. *Sci Works Ser C Vet Med*, 61, 201-210.
- Lee, P. L. (2017). DNA amplification in the field: move over PCR, here comes LAMP.
- Martinez, R., Rocha, J. F., Bejarano, D., Gomez, Y., Abuabara, Y., & Gallego, J. (2016). Identification of SNPs in growth-related genes in Colombian creole cattle. *Genet. Mol. Res*, 15(3), gmr15038762.
- McGivney, B. A., Browne, J. A., Fonseca, R. G., Katz, L. M., MacHugh, D. E., Whiston, R., & Hill, E. W. (2012). MSTN genotypes in Thoroughbred horses influence skeletal muscle gene expression and racetrack performance. *Animal genetics*, 43(6), 810-812.
- Othman, O. E., Mahrous, K. F., & Shafey, H. I. (2017). Mitochondrial DNA genetic variations among four horse populations in Egypt. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 469-474.
- Petersen, J. L., Valberg, S. J., Mickelson, J. R., & McCue, M. E. (2014). Haplotype diversity in the equine myostatin gene with focus on variants associated with race distance propensity and muscle fiber type proportions. *Animal genetics*, 45(6), 827-835.
- Pereira, G. L., de Matteis, R., Regitano, L. C., Chardulo, L. A. L., & Curi, R. A. (2016). MSTN, CKM, and DMRT3 gene variants in different lines of Quarter Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 39, 33-37.
- Rooney, M. F., Hill, E. W., Kelly, V. P., & Porter, R. K. (2018). The “speed gene” effect of myostatin arises in Thoroughbred horses due to a promoter proximal SINE insertion. *PLoS One*, 13(10), e0205664.
- Saunders, G. C., & Parkes, H. C. (1999). Quality in the analytical molecular biology laboratory. *Analytical Molecular Biology: quality and validation*, 9-28.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Węglarz, A., Balakowska, A., Kułaj, D., & Makulska, J. (2020). Associations of CAST, CAPN1 and MSTN genes polymorphism with slaughter value and beef quality. *Annals of Animal Science*, 1(ahead-of-print).
- Viluma, A. (2012). *Polymorphism in myostatin gene and athletic performance in Nordic horse breeds* (Master's the

sis, Norwegian University of Life Sciences, Ås).

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Pri-

mer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, *13*(1), 1-11.