

POLIMORFISME GEN GH PADA DOMBA DONGGALA
Growth Hormone Gene Polymorphism of Donggala Sheep

Amirudin Dg. Malewa¹, Lukman Hakim², dan Sucik Maylinda²

¹Peternakan, Fakultas Peternakan dan Perikanan, Universitas Tadulako, Palu.

²Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.

E-mail: amri1969@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme gen Hormon Pertumbuhan (GH) domba Donggala sebagai gen kandidat potensial yang mengendalikan sifat pertumbuhan. Penelitian menggunakan 50 ekor domba dari lokasi peternakan rakyat (Kota Palu Sulteng) dengan menggunakan metode analisis laboratorium di BIOMOL FMIPA UB melalui PCR-RFLP dengan enzim *HinfI*. Hasil analisis data diperoleh frekuensi genotipe domba donggala untuk penciri PCR-RFLP *HinfI* dengan genotipe AA, AB, BC adalah 0,933, 0,044 dan 0,022. Adapun frekuensi alel A, B dan C untuk domba Donggala adalah 0,967, 0,022 dan 0,011. Nilai PIC (*Polymorphic Information Content*) domba Donggala sebesar 6,5%. Meskipun nilai PIC rendah, penciri PCR-RFLP *HinfI* masih memiliki keragaman alel yang polimorfik. Sekuensing terhadap 3 sampel hasil PCR juga ditemukan polimorfisme pada tingkat basa nukleotida setelah membandingkannya dengan sekuen domba *breed* Lohi. Hasil perbandingan sekuensing tersebut memiliki similaritas sebesar 97%. Mutasi terjadi sebanyak 16 titik pada sampel Donggala (20) dan 26 titik pada sampel Donggala (57). Titik mutasi pada basa nukleotida tersebut merupakan penyebab terjadinya polimorfisme.

Kata kunci: Domba Donggala, Gen GH, PCR-RFLP, *HinfI*.

ABSTRACT

*The study aimed to know the gene polymorphism of growth hormone (GH) of Donggala sheep as potential candidate gene that control the growth characteristics. A total of 50 sheeps from farm community localities (Palu, Central Sulawesi) were analyzed laboratory in BIOMOL FMIPA UB through PCR-RFLP with *HinfI* enzyme. Results obtained the genotypes of Donggala sheep for PCR-RFLP *HinfI* with genotype AA, AB, BC are 0,933, 0,044 and 0,022. The frequency of A, B and C alleles for Donggala sheep are 0.967, 0.022 and 0.011. PIC value (*Polymorphic Information Content*) of Donggala sheep is 6.5%. Although PIC value is low, PCR-RFLP *HinfI* finders still have a polymorphic allele variety. Sequence of the three PCR samples also found polymorphisms at the nucleotide base level after comparing them with Lohi breed sheep sequences. Sequence comparisons have a similarity of 97%. Mutations for Donggala sample (20) occurred 16 points while those for Donggala sample (57) occurred for 26 points. The point of mutation in the nucleotide base is the cause of polymorphism.*

*Keyword: Donggala sheep, GH genes, PCR-RFLP, *HinfI*.*

PENDAHULUAN

Ternak domba merupakan ternak ruminansia kecil yang memiliki kontribusi besar terhadap masyarakat peternak kecil di Indonesia. Hal ini dikarenakan ternak ini sangat mudah dipelihara, tidak memerlukan ruang pemeliharaan yang luas dan mampu memanfaatkan pakan bermutu rendah untuk keperluan hidupnya. Ternak domba banyak dipelihara di pedesaan maupun pinggiran kota. Ternak domba di Indonesia umumnya dipelihara untuk tujuan produksi daging dan sebagian sebagai tabungan.

Domba ekor gemuk yang dipelihara secara turun temurun di lembah Palu Sulawesi Tengah dikenal sebagai domba Donggala (Mason 1980; Williamson and Payne, 1993). Program Banpres tahun 1986 domba Donggala disilangkan dengan domba (Merbas) persilangan domba merino dengan domba ekor gemuk (gibas). Domba Donggala, baik jantan maupun betina merupakan domba tipe penghasil daging sehingga sangat potensial untuk dikembangkan sebagai salah satu ternak penyuplai daging bagi masyarakat.

Karakter nilai ekonomis pada domba seperti pertumbuhan, ukuran tubuh, ketahanan penyakit dan karakteristik wol merupakan hasil kontrol multigenik (Zaid *et al.* 1999). Selama ini seleksi untuk berbagai sifat kuantitatif (bobot badan dan kualitas karkas) pada ternak masih dilakukan secara konvensional, yaitu melalui program seleksi sifat-sifat fenotipik yang pada umumnya kurang efektif karena memerlukan jumlah ternak yang banyak dan memerlukan waktu yang lama untuk menghasilkan pejantan unggul. Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi yang cepat dalam bidang genetika molekuler melengkapi hasil kajian pada domba (Maddox *et al.*, 2002) sehingga diharapkan dapat memberikan kontribusi signifikan pada kemajuan dan perkembangan dunia peternakan khususnya pada program pemuliaan domba Donggala.

Keragaman genotipe yang terdeteksi dari penelitian analisis DNA dapat dijadikan sebagai dasar seleksi berbasis molekuler. Penelitian polimorfisme gen GH pada domba ekor gemuk menggunakan PCR-RFLP dengan enzim *HaeIII* memiliki derajat heterozigositas yang tinggi dengan frekuensi alel 50,3% untuk domba Donggala dan 49,3% untuk domba Jawa Timur (Malewa *et al.* 2014). Penggunaan enzim restriksi *HinfI* dalam penelitian ini juga diharapkan memberikan heterozigositas yang tinggi sebagai informasi awal seleksi pada pengembangan iptek khususnya pemuliaan ternak, sekaligus membantu proses pembuatan kebijakan terkait seleksi dengan pemanfaatan hormon pertumbuhan (GH) guna meningkatkan kualitas genetik domba Donggala menjadi domba unggul.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik gen GH domba Donggala melalui PCR-RFLP/*HinfI* dan sekuensing sebagai gen kandidat potensial yang mengendalikan sifat pertumbuhan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian menggunakan sebanyak 50 ekor domba, dilaksanakan pada wilayah peternakan domba rakyat di lembah Palu (Kelurahan Kawatuna, Poboya, Taipa dan Petobo) Sulawesi Tengah. Pengambilan sampel darah dilakukan pada domba yang telah dikumpulkan data bobot dan ukuran tubuhnya berdasarkan tingkat umur. Pengambilan sampel darah dilakukan pagi hari pukul 7.00 - 9.00 sebelum penimbangan bobot tubuh dan sebelum makan. Sampel darah diambil melalui pembuluh darah balik (*vena jugularis*) di bagian leher dengan jarum vacutainer sebanyak 6 ml darah, dimasukkan ke dalam tabung vacutainer yang sudah berisi 1 ml EDTA 10%. Selanjutnya disimpan dalam ice-box yang telah disiapkan dan di isi ice jelly pack (selama di lapangan). Sampel darah dari 50 ekor ini

dimasukkan ke dalam freezer sebelum isolasi. Prosedur analisis laboratorium dilakukan langkah sebagai berikut:

1. Isolasi DNA Total

Isolasi DNA meliputi ekstraksi dan pemurnian DNA yang dilakukan dengan materi darah total (*whole blood*). Isolasi DNA total dilakukan dengan menggunakan metode fenol yang dimodifikasi (Sambrook *et al.* 1989). Isolasi DNA, PCR dan RFLP dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya, Malang. Sampel darah yang telah diawetkan diambil sebanyak 200 µl ditempatkan dalam tabung *ependorf* 1,5 ml, kemudian ditambah 300 µl cell lysis buffer, ditambahkan 20 µl SDS 10%, vorteks dan inkubasi *water bath* pada suhu 55°C dalam waktu 1 jam. Setelah inkubasi, campuran diekstraksi dengan penambahan PCI sebanyak 300 µl. masing-masing divorteks kemudian disentrifus kembali 12000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit.

Larutan bagian atas (*Upper phase*) masing-masing sampel dipindah ke tabung baru (*mikrotube*) ditambahkan 300 µl Clorofom, Di Vortex dan di sentrifus 12000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. *Upper phase* dipindah lagi ke tabung baru (*mikrotube*) Di tambahkan etanol absolute 700 µl ditambahkan 20 µl Na asetat 3 M (mikrotube di bolak balik) kemudian di inkubasi pada suhu - 20°C selama 1 jam. Setelah diinkubasi, selanjutnya sampel disentrifus 12000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Pelet yang tertinggal dalam mikrotube ditambahkan 200 µl etanol 70% kemudian disentrifus 12000 rpm, 10 menit, suhu 4° C. Selanjutnya Pelet dikeringkan pd suhu 55° C (sampai bau etanol hilang) sekitar 15-20 menit. Setelah kering, pelet (DNA) kemudian ditambahkan 30 µl ddH₂O di panaskan di oven 55° C sekitar 10 menit dan sampel DNA total disimpan di *freezer* (-20o C). Hasil isolasi DNA Total tersebut dimigrasikan pada gel *Agarose 1%* yang diberi *Ethidium Bromide* dengan *buffer* 1xTBE (1 M tris, 0,9 M asam borat, 0,01 M EDTA pH 8.0) dengan piranti *submarine electrophoresis* (Hoeffer USA). Hasil elektroforesis diamati dengan bantuan sinar UV 200-400 nm kemudian di foto untuk dokumentasi dan DNA yang keluar menjadi bahan untuk analisis selanjutnya.

2. Amplifikasi DNA Dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Analisis DNA dilakukan dengan metode PCR-RFLP dan elektroforesis berdasarkan petunjuk (Fatchiyah *et al.*, 2009). Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid dengan ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan. Primer yang digunakan untuk PCR di desain dari sekuen gen GH pada domba breed Lohi dengan nomor akses GenBank GQ452268 (Gu, *et al.*, 2009) F = 5'-GGAGGCAGGAAGGGATGAA-3'',R= 5'-CCAAGGGAGGGAGAGACAGA-3'. Adapun komposisi larutan untuk PCR adalah sebagai berikut: DdH₂O 2 µl, Primer F 1 µl, Primer R 1 µl, PCR mic (Promega) 5 µl dan Whole Genome 1 µl. Program PCR untuk Mengamplifikasi Fragmen GH disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Program PCR untuk Mengamplifikasi Fragmen GH

Tahapan	Temperatur (o C)	Lama
- Predenaturasi	95	5 menit
- Denaturasi	95	45 detik }
- Annealing	60,3	45 detik }
- Ekstension	72	45 detik }
- Pos Ekstension	72	10 menit
- Siklus		33 kali

3. Uji Polimorfisme Dengan Teknik RFLP

Deteksi Keragaman gen GH dengan enzim *Hinf*1 (G↓AnTC) dilakukan pada 50 sampel DNA berdasarkan informasi sekuen gen GH pada domba dengan nomor akses GenBank GQ452268 (Gu, *et al.*, 2009). Adapun komposisi RFLP adalah: DDH₂O 4 µl, Diggest buffer 5 µl 1 µl, Enzim restriksi *Hinf*1) 1 µl, DNA hasil PCR 4 µl. Produk PCR sebelum dan setelah pencampuran enzim restriksi dilakukan spindown. Di Inkubasi pada *water batch* dgn suhu 37 °C selama 4 jam Selanjutnya dipindahkan ke oven pd suhu 70 °C selama 15 menit.

4. Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui Polimorfisme baik jumlah fragmen maupun panjang fragmen hasil pemotongan oleh enzim restriksi *Hinf*1 terhadap untaian DNA pada lokus tertentu. Prinsip dari elektroforesis adalah proses migrasi dari fragmen DNA di dalam gel yang direndam dalam larutan penyangga, dalam hal mana fragmen yang berukuran kecil bermigrasi lebih cepat daripada fragmen yang berukuran besar (Fatchiyah *et al.*, 2009). Elektroforesis juga dilakukan pada gel Poliakrilamida 6% dengan tegangan konstan 100 V,20 mAmpere selama 100 menit dan pewarnaan perak.

5. Sekuensing

Untuk mengetahui adanya polimorfisme lebih lanjut dilakukan sekuensing terhadap hasil PCR. Sekitar 3 Sampel hasil PCR yang mewakili fragmen hasil RFLP yang polimorfis saja dikirim ke First Base Malaysia. Sekuensing dilakukan untuk mengetahui kesamaan gen GH pada domba Ekor Gemuk dengan sekuen yang terdapat pada *GenBank* dan mengetahui titik mutasi yang terjadi pada fragmen gen GH. Hasil sekuensing berupa kromatogram yang diperoleh kemudian diedit secara manual dan dianalisis menggunakan bantuan *software* MEGA 5.03 (*Moleculer Evolutionary Genetic Analysis*) dan BioEdit Sequence Alignment.

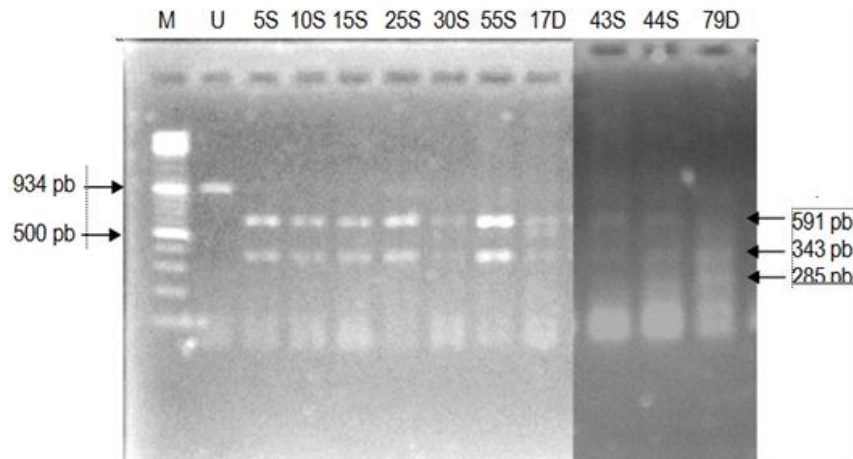
6. Interpretasi Hasil Elektroforesis

Pembacaan pita hasil elektroforesis dengan memperhatikan fragmen (ukuran pita) yang terpotong dan jumlah pemotongan oleh *enzim Hinf* 1, dilakukan interpretasi dengan membandingkannya dengan *size marker* 100 bp kemudian dilakukan perhitungan berdasarkan jumlah sampel terhadap frekuensi Genotipe (AA, AB, AC, BB dan BC), frekuensi alel atau gen (A, B dan C), polimorfisme dengan nilai PIC (*polymorphic information content*) domba Donggala serta analisis statistik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi Polimorfisme Gen Hormon Pertumbuhan dengan Enzim Restriksi *Hinf*I

Hasil elektroforesis produk PCR-RFLP gen Hormon Pertumbuhan dengan enzim restriksi *Hinf*I menggunakan gel agarose polimorfisme terlihat sebagaimana disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforesis produk PCR-RFLP gen hormon pertumbuhan (GH) menggunakan enzim pemotong *Hinf*I.

Keterangan : M = Marker 10 kb (Fermentas)
U = sampel PCR tanpa enzim restriksi
S = domba Sapudi
D = domba Donggala

Produk PCR dari genom DNA domba Donggala sepanjang 934 pasang basa (pb), berada pada sekuen gen hormon pertumbuhan (GH) *breed* Lohi Pakistan yang terletak pada ekson tiga dan ekson empat dengan posisi (756-1062) dari gen GH *GenBank* GQ452268 (Gul, *et al.*, 2009). Persentase keberhasilan amplifikasi sangat baik mencapai 81%, dan hal ini disebabkan sekuen gen hormon pertumbuhan (GH) dari domba Donggala mempunyai kemiripan dengan domba Lohi Pakistan (Gul, *et al.*, 2009).

Penentuan alel A, B dan C ditunjukkan dengan jumlah dan ukuran besarnya fragmen yang terpotong. Pada penelitian ini semua sampel hasil PCR terpotong dengan enzim restriksi *Hinf*I. Alel A dengan dua fragmen yang masing-masing panjangnya 591 dan 343 pasang basa (pb.), alel B dengan tiga fragmen masing-masing 591, 444, dan 343 (pb), sedangkan alel C dengan tiga fragmen masing-masing 591, 343 dan 285 (pb). Adanya pemotongan fragmen hasil RFLP pada 3 sampel yaitu 30S 17D dan 79D posisi di bawah dekat 591 bp menimbulkan polimorfisme genotipe pada DEG sehingga menjadikan pemotongan baru tersebut menjadi dasar penentuan alel B atau genotipe AB. Dengan kata lain perbedaan fragmen antara alel A dan B akibat adanya 3 sampel yaitu 30S 17D dan 79D, yang memiliki posisi dibawah dekat titik potong 591 bp dari produk PCR (Gambar 1), walaupun dari sekuen Genbank, sekuen tersebut tidak ditemukan adanya titik potong. Perbedaan fragmen antara alel B dan C akibat adanya 5 sampel yaitu 13D, 2S, 34S, 43S dan 44S yang memiliki posisi satu titik potong dari hasil PCR yang terletak di bawah 343pb sekitar 285bp. Adanya titik potong tersebut menyebabkan enzim *Hinf*I ($G\downarrow A nTC$) mengenali daerah tersebut sebagai situs potong yang baru.

Pola pita genotipe AA, AB, dan AC disajikan pada Gambar 1. Ternak domba

bergenotipe AA apabila teridentifikasi memiliki dua fragmen DNA dengan panjang 591, 343 pb dan ternak bergenotipe AB ditunjukkan dengan tiga fragmen DNA yaitu 591, 444, 343 pb, sedangkan ternak bergenotipe AC ditunjukkan dengan tiga fragmen DNA yaitu 591, 343 dan 285 pb. Sebanyak 50 sampel diperoleh dari hasil analisis laboratorium menggunakan PCR-RFLP *HinfI*.

Hasil tabulasi data genotipe dan alel diperoleh frekuensi genotipe dan frekuensi alel domba Donggala. Frekuensi genotipe domba donggala untuk penciri PCR-RFLP *HinfI* dengan genotipe AA, AB, BC adalah 0,933, 0,044 dan 0,022. Adapun frekuensi alel A, B dan C domba Donggala masing-masing adalah 0,967, 0,022 dan 0,011. Nilai PIC domba Donggala sebesar 6,5%. Meskipun nilai PIC rendah, penciri PCR-RFLP *HinfI* masih memiliki keragaman alel yang polimorfik.

Nei (1987) menyatakan bahwa suatu alel dikatakan polimorfik jika memiliki frekuensi alel sama dengan atau kurang 0,99 (99%) atau dengan kata lain suatu alel dikatakan monomorfik jika frekuensi alel sama dengan atau kurang dari 0,01 (misalnya alel A > 99%). Dengan demikian domba Donggala bersifat polimorfik sesuai dengan pendapat Nei dan Kumar (2000) yang menyatakan bahwa keragaman genetik terjadi apabila terdapat dua alel atau lebih dalam suatu populasi (biasanya lebih dari 1%). Perbedaan frekuensi genotipe dan frekuensi alel pada populasi penelitian menunjukkan masih tingginya polimorfisme pada domba DEG. Hal ini sejalan dengan penelitian Sumantri (2008) yang mengamati gen Calpastatin domba Lokal. Tinggi rendahnya frekuensi alel gen GH *HinfI* terkait dengan nilai PIC (*polymorphic information conten*). Botstein *et al.* (1980) menyatakan bahwa PIC merupakan salah satu parameter yang menunjukkan tingkat informasi polimorfisme suatu penciri (*marker*). Penggunaan enzim *HinfI* dalam penelitian ini, diperoleh polimorfisme gen hormon pertumbuhan (GH) yang rendah yaitu 6,5% domba Donggala. PIC dikatakan mempunyai informasi tinggi jika nilai PIC > 0,5, mempunyai informasi cukup jika nilai PIC 0,25-0,5, dan rendah jika nilai PIC < 0,25 (Botstein *et al.* 1980). Penelitian ini disimpulkan bahwa gen hormon pertumbuhan (GH) dengan enzim restriksi *HinfI* bersifat polimorfik dan dapat digunakan untuk studi keragaman populasi domba lokal di Indonesia.

Sekuensing

Sekuensing DNA atau pengurutan DNA adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui (Rogers, K. 2011).

Sekuensing lengkap gen hormon pertumbuhan (GH) *Ovis aries breed Lohi* no akses GQ452268 (Gul, *et al.*, 2009) menunjukkan adanya 5 exon dan 4 intron. Hasil sekuensing sampel penelitian yang *dialignment* berukuran 810 bp. Pada Gambar 2, menunjukkan bahwa hasil sekuens sampel penelitian, nukleotida berada di daerah intron 2 sampai intron 4 domba Lohi. Sekuensing terhadap 3 sampel memiliki similaritas (kemiripan) 97% dengan domba breed Lohi. Sebanyak 16 titik mutasi terjadi pada sampel Donggala (20) sedangkan 26 titik mutasi pada sampel Donggala (57). Adanya titik mutasi pada basa nukleotida tersebut juga merupakan penyebab terjadinya polimorfisme.

Pada Gambar 2, gambar titik-titik menunjukkan nukleotida yang sama dengan sekuens *breed Lohi*, sedangkan basa yang berbeda menunjukkan adanya mutasi pada sampel yang disebabkan insersi. Perbedaan nukleotida tersebut merupakan penyebab terjadinya

polimorfisme. Polimorfisme atau keragaman DNA adalah salah satu akibat dari mutasi (Toland, 2008). Perubahan yang terjadi di daerah exon, menyebabkan perbedaan asam amino yang di hasilkan. Perubahan asam amino ini tentunya akan merubah protein yang akan dibentuk oleh gen GH domba Ekor Gemuk ke dua lokasi. Hasil sekuensing dan mutasi nukleotida dapat dilihat pada Gambar 2.

	500	510	520	530	540	
Breed Lohi	A	CTGAGGACCT	CAGTGGTATT	TTATCCAAGT	AAGGATGTGG	TCAGGGGAG
Sapudi (24)
Donggala (20)
Donggala (57)
	550	560	570	580	590	
Breed Lohi	T	AGAAGTGGGG	GTGTGTGGGG	TGGGGAGGGT	-CCGANTA-G	GCAGTGAGG
Sapudi (24)A.....	T.....A..A.
Donggala (20)A.....	T.....A..A.
Donggala (57)A.....	T.....A..A.
	600	610	620	630	640	
Breed Lohi	G	GAACCCCGCA	CCAGTTGAGA	CCTGTGTGGG	TGTGTCTCTC	CCCCAGGAG
Sapudi (24)C.....G.....T.....
Donggala (20)C.....G.....T.....
Donggala (57)C.....G.....T.....
	650	660	670	680	690	
Breed Lohi	C	GCACTACTT	CCCGGAGGGA	CAGAGATACT	CCATCCAGAA	CAOCCAGGT
Sapudi (24)A.....
Donggala (20)A.....
Donggala (57)A.....
	700	710	720	730	740	
Breed Lohi	T	GCCCTCTGCT	TCTCCGAAAC	CATCCCAGCC	CCCACGGGCA	AGAATGAGG
Sapudi (24)T.....G.....A.....
Donggala (20)T.....G.....A.....
Donggala (57)T.....G.....A.....
	750	760	770	780	790	
Breed Lohi	C	CCAGCAGAAA	TCAGTGAGTG	GCCACCTAGG	ACCGAGGAGC	AGGGGACCT
Sapudi (24)A.....
Donggala (20)A.....
Donggala (57)A.....
	800	810	820	830	840	
Breed Lohi	C	CTTCATCCTA	AGTAGGCTGC	CCCAGCTCTC	TGCACCGGGC	CTGGGGCGT
Sapudi (24)
Donggala (20)
Donggala (57)
	850	860	870	880	890	
Breed Lohi	C	CTTCTCCCCG	AGGTGGCAGA	GGGTGTTGGA	TGGCAGTGGA	GGATGATGG
Sapudi (24)
Donggala (20)
Donggala (57)
	900	910	920	930	940	
Breed Lohi	T	TGGTGGTGGT	GGCAGGAGGT	CCTCGGGCAG	AGGCCGACCT	TGCAGGGCT
Sapudi (24)
Donggala (20)
Donggala (57)

Gambar 2. Hasil sekuensing dan mutasi nukleotida

Ket : A (Adenin) hijau; G (Guanin) hitam, C (Citosin) biru, T (Timin) merah
 (.....): sekuen yang sama dengan breed Lohi

```

          950          960          970          980          990
Breed Lohi | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Sapudi (24) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (20) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (57) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
          1000         1010         1020         1030         1040
Breed Lohi | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Sapudi (24) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (20) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (57) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
          1050         1060         1070         1080         1090
Breed Lohi | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Sapudi (24) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (20) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (57) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
          1100         1110         1120         1130         1140
Breed Lohi | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Sapudi (24) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (20) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (57) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
          1150         1160         1170         1180         1190
Breed Lohi | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Sapudi (24) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (20) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (57) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
          1200         1210         1220         1230         1240
Breed Lohi | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Sapudi (24) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (20) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (57) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
          1250         1260         1270         1280         1290
Breed Lohi | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Sapudi (24) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (20) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (57) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
          1300         1310
Breed Lohi | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Sapudi (24) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (20) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
Donggala (57) | .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....

```

Gambar 2 (Lanjutan). Hasil sekuensing dan mutasi nukleotida

Ket : A (Adenin) hijau; G (Guanin) hitam, C (Citosin) biru, T (Timin) merah
 (.....): sekuen yang sama dengan breed Lohi

Perubahan nukleotida juga terjadi di daerah intron. Perubahan basa nukleotida pada intron diduga akan berpengaruh pada mRNA splicing dan kemungkinan besar akan berdampak pada sekuen asam amino (Ansary *et al*, 2011). Kejadian mutasi yg berada di daerah exon adalah 8 titik atau sebesar 30,77%. Perubahan nukleotida hasil sekuensing berdasarkan sekuen gen GH *Ovis Aries breed Lohi* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Perubahan nukleotida hasil sekuensing sampel penelitian berdasarkan sekuen gen GH *Ovis aries* breed Lohi.

Ovis aries	555	581	586	589	615	625	636	659	715
Breed Lohi	G	–	N	–	T	T	C	T	C
Donggala(20)	A	T	A	A	C	G	T	A	T
Donggala(57)	A	T	A	A	C	G	T	A	T

Ovis aries	727	737	780	958	963	969	1099	1105	1122
Breed Lohi	A	G	G	C	A	G	A	G	A
Donggala(20)	G	A	A	C	G	C	G	G	G
Donggala(57)	G	A	A	A	G	C	G	A	G

Ovis aries	1150	1175	1176	1209	1211	1227	1282	1290
Breed Lohi	G	G	–	C	G	G	G	T
Donggala(20)	G	G	–	C	G	G	G	T
Donggala(57)	A	A	A	T	C	C	C	A

Variasi pada fragmen gen hormon pertumbuhan (GH) bisa disebabkan karena mutasi, seleksi alam atau juga disebabkan oleh sistem perkawinan pada populasi tersebut. Mutasi gen juga merupakan faktor penentu timbulnya variasi genetik. Mutasi dapat terjadi pada level DNA akibat adanya perubahan basa-basa DNA (A = Adenin, T = Timin, G = Guanin, S = Sitosin) dalam bentuk (tipe) substitusi (transisi atau transversasi), delesi, insersi dan inversi (Nei, 1987). Adapun kejadian mutasi pada sampel penelitian yang disebabkan karena transisi, transversasi dan insersi disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Jenis dan posisi mutasi hasil sekuensing sampel dan *breed* Lohi dari GenBank.

No	Transisi	Posisi mutasi	Tranversi	Posisi mutasi	Insersi	Posisi mutasi
	Lohi→Sampel		Lohi→Sampel		Lohi→Sampel	
1	G→A	555	T→A	659	(-)→T	581
2	T→C	615	C→A(D57)	958	N →A	586
3	C→T	636	G→C	969	(-)→A	589
4	C→T	715	G→C(D57)	1211	T →G	625
5	A→G	727	G→C(D57)	1227	(-)→A (D57)	1176
6	G→A	737	G→C(D57)	1282		
7	G→A	780				
8	A→G	963				
9	G→A(D57)	1105				
10	A→G	1122				
11	G→A(D57)	1150				
12	G→A(D57)	1175				
13	C→T(D57)	1209				
14	G→A(D57)	1230				

Berdasarkan adanya variasi fragmen DNA, variasi panjang basa dan hasil sekuensing, dapat disimpulkan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian dalam keadaan polimorfis. Variasi pada fragmen gen hormon pertumbuhan (GH) bisa disebabkan karena mutasi, seleksi alam atau juga disebabkan oleh sistem perkawinan pada populasi tersebut. Mutasi gen juga merupakan faktor penentu timbulnya variasi genetik. Mutasi dapat terjadi pada level DNA akibat adanya perubahan basa-basa DNA (A = Adenin, T = Timin, G = Guanin, S = Sitosin) dalam bentuk (tipe) substitusi (transisi atau transversi), delesi, insersi dan inversi (Nei, 1987).

PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat diambil kesimpulan bahwa: Frekuensi genotipe dan frekuensi alel domba Donggala menunjukkan bahwa penciri GH|*Hinf*I dengan genotipe AA, AB, BC adalah 0,933, 0,044 dan 0,022. Adapun frekuensi alel A, B dan C untuk domba Donggala masing-masing adalah 0,967, 0,022 dan 0,011. Nilai PIC domba Donggala sebesar 6,5%. Meskipun nilai PIC rendah, penciri GH|*Hinf*I masih memiliki keragaman alel yang polimorfik. Polimorfisme pada tingkat basa nukleotida juga ditemukan pada hasil sekuensing. Sekuensing terhadap 3 sampel memiliki similaritas 97% setelah dibandingkan dengan domba breed Lohi. Sebanyak 16 titik mutasi terjadi pada sampel domba Donggala (20) dan 26 titik mutasi pada sampel Donggala (57).

DAFTAR PUSTAKA

- Austin, B., Austin, D.A. 2007. Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish. Fourth Edition. Springer and Praxis Publishing, Chicester.
- Chopra, A.K., Xu, X., Ribardo, D., Gonzales, M., M., Kuhl, K., Peterson, J., and Houston, C.W. 2000. The xytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophage. *J. Infection and Immunity*, 68 (5): 2808-2818
- Egusa, S. 1976. Some bacterial diseases of freshwater fishes in Japan. *Fish Pathology*, 10: 103-114
- Esteve, C., Biosca, E.G., Amaro, C. 1993. Virulence of *Edwardsiella tarda* and some other bacteria isolated from European Eels *Anguilla Anguilla* reared in Fresh Water. *Journal Disease of Aquatic Organisms*, 16: 15-20.
- Evans, J.J., Klesius, P.H. Plumb, J.A., Shoemaker, C.A. 2011. *Edwardsiella* septicemia. Dalam Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds.). *Fish Diseases & Disorders*. Vol 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections (2 edition). CAB International, Wallingford.
- Nadirah, M., Najiah, M.,Teng, S.Y. 2012. Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from Asian Seabass, Lates calcarifer. *International Food Research Journal*, 19(3): 1247-1252.
- Narwiyani, S. 2010. *Lethal Concentration 50% (LC-50) Empat Isolat Edwardsiella tarda pada Ikan Air Tawar Di Indonesia*. *Jurnal Sains Veteriner*, 28(2): 51-54.
- Park, S.B., T. Aoki, dan Tae, S.J. 2012. Pathogenesis and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Vet Res*, 43: 67.
- Parvez, N., Mudarris, M.S.A. 2014. Investigation on the Bacterial Haemorrhagic Septicemia Disease of *Cyprinus carpio* and *Channa striatus*. *Journal of Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*, 2(2): 1-5.

- Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., Lewbart, G.A., Daniels, H.V., Jacob, M. 2014. *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) are virulent to channel catfish and Nile tilapia. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2 (5): 337-343.
- Sakazaki R. 2005. Genus XI. *Edwardsiella*. Ewing and McWhorter 1965, 37AL. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, Vol 2. Springer, New York: 657–661
- Tan, Y.P., Lin, Q., Wang, X.H., Joshi, S., Hew, C.L., Leung, K.Y. 2002. Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Proteins of *Edwardsiella tarda*. *Journal of Infection and Immunity*, 70(11): 6475–6480.