

Aplikasi Penciri Molekuler Uty dan Sry untuk Determinasi Unknown Sex Samples pada Sapi Bali

The Application of UTY and SRY Molecular Markers for Determination of Unknown Sex Samples in Bali Cattle

Indriawati^{*}), Slamet Diah Volkandari, Endang Tri Margawati
Laboratorium Genetika Molekuler Hewan Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI
^{*}E-mail: indr020@lipi.go.id

ABSTRACT

An investigation involving large number of animals is often resulting incomplete or in accurate information such as animal parentage, or misidentify on sex due to unlabeled sex samples. A PCR method by applying Y chromosome markers (UTY and SRY) facilitates in determination of unknown sex problem. This study was intended to determine sex from unlabelled sex of blood samples by applying PCR method using a pooled-DNA template. Twenty five of unknown sex blood samples from Nusa Penida, Bali were used in this study. The samples were plotted into 5 pooled-DNA whith each pool DNA consisted of 5 individuals DNA. Two pairs of sex primers, UTY (58°C) and SRY (60°C) with 35 cycles were applied to amplify the samples. The result showed there was only one pooled-DNA (P4) amplified by UTY (484bp). Whereas re-PCR of the positive pooled-DNA (P4) using SRY primer, only one out of 25 samples determined as male Bali cattle (325bp). This finding suggests that UTY and SRY primers are suitable for sex determination and the pooled-DNA could be used as an efficient PCR method both in consumables and PCR process for sex determination.

Keywords: Determination, sex, unknown sample, pooled DNA, Bali cattle.

PENDAHULUAN

Identifikasi informasi jenis kelamin pada sampel yang dikoleksi sangat penting untuk berbagai aspek. Sebagai contoh, penentuan jenis kelamin dan asal usul ternak pada sampel fosil (Svensson, 2010), hewan yang sulit diketahui jenis kelaminnya secara visual seperti burung (Rodriguez *et al.*, 2005), sampel yang terkontaminasi yaitu sampel jantan diduga tercampur dengan sampel betina dan juga pada kasus kriminal atau forensik (Gill *et al.*, 2001)

Dalam dunia peternakan, determinasi jenis kelamin telah diaplikasikan dalam bidang pemuliaan ternak (Xia-Hua *et al.*, 2014), dalam validitas hasil sexing pada kambing (Phua *et al.*, 2003) dan penentuan jenis kelamin ternak dari sampel maternal plasma yang berasal dari fetal sapi (da Cruz *et al.*, 2012). Dalam industri peternakan, pengontrolan rasio jenis kelamin sangat penting, misalnya untuk perusahaan susu yang berfokus dengan sapi betina dan usaha sapi potong yang cenderung focus pada sapi jantan karena pertumbuhan lebih cepat dan efisiensi pakan lebih bagus (Silversides *et al.*, 2001)

Metode yang pernah digunakan dalam identifikasi jenis kelamin pada sampel penelitian, diantaranya adalah *flow cytometri/Cell sorting* (Tubman *et al.*, 2004)

dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada fragmen DNA spesifik jenis kelamin (Bischoff *et al.*, 2002). Metode PCR diketahui efisien, akurat, sensitif dan cepat dalam mengidentifikasi jenis kelamin pada sampel daging dari berbagai ternak (Appa Rao *et al.*, 1995; Gokulakrishnan *et al.*, 2012)

Determinasi jenis kelamin pada mammalian adalah menggunakan sistem kromosom X-Y, dimana kromosom X untuk jenis kelamin betina (XX) sedangkan Y untuk pejantan (XY). Penanda genetik pada kromosom Y digunakan pada penelitian ini karena mempunyai lebih sedikit variasi yang terjadi didalamnya (Ginja *et al.*, 2009). Terdapat dua penanda genetik yang digunakan yaitu *Ubiquitously Transcribed Y Chromosome Tetratricopeptide* (UTY) digunakan untuk mendeterminasi jenis kelamin dan *Sex determining-Region Y* (SRY) digunakan untuk konfirmasi hasil dari gen UTY. Gen UTY merupakan gen yang penting dalam reproduksi jantan, sedangkan SRY merupakan gen yang bertanggung jawab terhadap pembentukan kelenjar (prostat) dan organ genital eksternal (Chang *et al.*, 2013).

Hal ini mengartikan bahwa apabila pada kromosom Y tidak ditemukan penanda genetik dimaksud pada individu ternak tersebut maka organ reproduksi sepenuhnya berkembang

menjadi betina. Penelitian yang melibatkan sejumlah populasi ternak seringkali menyebabkan ketidak lengkapan data (misal: jenis kelamin), terlewat dalam pendokumentasian yang menyebabkan keakuratan data diragukan. Oleh karena itu, diperlukan determinasi jenis kelamin dalam usaha validasi data, sehingga dapat digunakan sebagai materi dalam penelitian secara akurat.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mendeterminasi jenis kelamin pada sapi Bali yang tidak terlabel jenis kelamin (*unknown sex samples*) pada sampel darah dengan penanda genetik, yang dilakukan lebih efisien dalam proses, waktu dan bahan kimia DNA yang disusun dalam *pooled-DNA template*.

METODE

Koleksi Darah dan Isolasi DNA

Sebanyak 25 sampel darah segar sapi Bali dari Nusa Penida, Bali yang dikoleksi dari *vena jugularis* dan ditampung dalam tabung *Venoject* mengandung antikoagulan (EDTA). DNA dikoleksi dengan metode Garam Pekat (Montgomery and Sise, 1990). Sampel DNA diplot dalam lima *pooled-DNA* yaitu sebagai P1, P2, P3, P4 dan P5, masing-masing plot berisi 5 sampel DNA individu sapi Bali.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplifikasi DNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Total volume pereaksi PCR yang digunakan sebanyak 20 μ l, terdiri dari 2 μ l *pooled-DNA*, 10pmol (Primer F UTY dan Primer UTYR) (Margawati *et al.*, 2015) dan 10pmol Primer SRYF dan SRYR (Margawati *et al.*, 2015) dan 16 μ l *AccuPower* PCR Kit (Bioneer). Program PCR yang digunakan untuk primer UTY, yaitu pre-denaturasi 94°C 5min; 35 siklus (94°C selama 30 detik; 52°C selama 30 detik; 72°C selama 30detik); 72°C selama 1 menit dan pendinginan 10°C. Program PCR primer SRY yang digunakan adalah pre-denaturasi 94°C 5 menit; 35 siklus (92°C selama 60 detik; 60°C

selama 60 detik; 72°C selama 60 detik); 72°C selama 7 menit dan pendinginan 10°C (Hartatik *et al.*, 2014). Proses amplifikasi menggunakan mesin *thermocycler* (Techne TC-Plus).

Analisa Hasil PCR

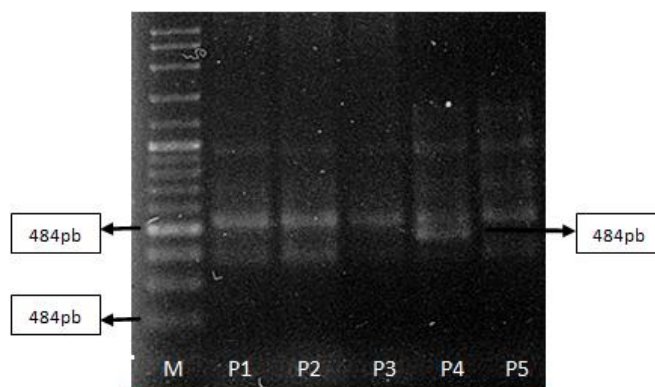
Produk PCR dielektroforesis menggunakan gel agarose 1% dengan 1xTBE buffer dengan aliran listrik 100 V selama 1 jam. *DNA ladder* 100pb (VC 100bp, Vivantis) digunakan sebagai ukuran marker. Gel agarose direndam dalam larutan mengandung 0.5 μ g/ml EtBr (AppliChem, Germany) selama 15 menit dan divisualisasi diatas UV *transilluminator* (MUV21, Major Science, USA). Gambar didokumentasikan dengan kamera digital.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil amplifikasi gen UTY pada kelima *pooled-DNA* sapi Bali, diperoleh satu *pooled-DNA* yang mengidentifikasi sebagai kelamin jantan. Hal tersebut dibuktikan munculnya pita DNA dengan ukuran 484pb yang sesuai dengan ukuran target gen UTY (Gambar 1).

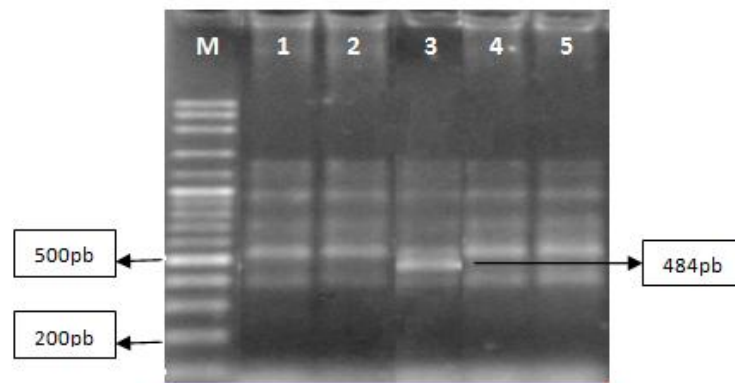
Pada Gambar 1, dapat dilihat bahwa hanya ada satu *pooled-DNA* sampel (P4) yang berukuran sesuai dengan penanda genetik UTY, yaitu 484pb. Ukuran target gen UTY tersebut sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya pada bangsa Sapi (Gotherstorm *et al.*, 2005) dan fossil bangsa Sapi (Svensson, 2010). Ukuran gen UTY pada bangsa Bison dan Kerbau berbeda, yaitu lebih panjang 10 basa, yaitu 494pb (Gotherstorm *et al.*, 2005).

Gen UTY berada pada ekson 19 kromosom Y yang dapat digunakan dalam penelusuran asal usul sapi Bali (Kusdiantoro *et al.*, 2009), sedangkan penanda genetik yang sama digunakan untuk penelusuran kemurnian sapi Bali dari garis keturunan tetua pejantan (Margawati *et al.*, 2015).

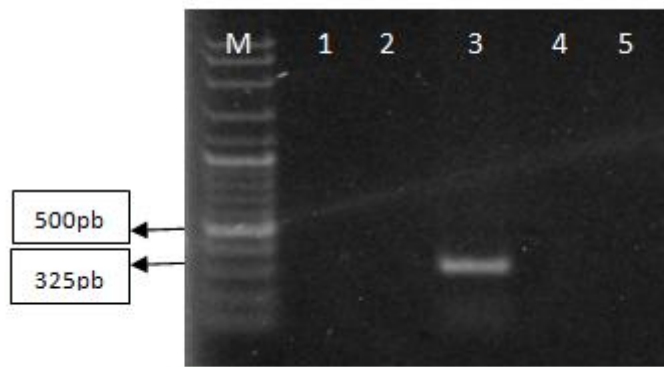


(M)=DNA Ladder 100bp, (P1-P5)=DNA sapi Bali *Unknown sex sample*

Gambar 1. Elektroforesis gen UTY pada lima *pooled-DNA* sapi Bali *unknown sex sample*.



(M)=DNA Ladder 100bp, (1-5)=DNA sapi Bali *Unknown sex samples*
 Gambar 2. Elektroforesis gen UTY hasil re-PCR pada *pooled-DNA* sapi Bali P4.



(M)=DNA Ladder 100bp, (1-5)=DNA sapi Bali *Unknown sex samples*
 Gambar 3. Elektroforesis gen SRY pada *pooled-DNA* sapi Bali P4

Pengulangan PCR (re-PCR) dilakukan pada *pooled-DNA* (no. P4) yang berisi 5 sampel sapi Bali yang positif mendeteksi adanya gen UTY (ukuran 484pb). Hasil re-PCR (1 *pooled-DNA*) tersebut, diantaranya ditemukan satu sampel berjenis kelamin jantan (sampel nomor 3, Gambar 2).

Pada Gambar 2 Lajur 3, pita amplicon gen UTY yang muncul pada DNA sampel P4 menunjukkan hanya satu individu yang diketahui berjenis kelamin jantan. Oleh karena banyak pita UTY muncul (bersifat tidak spesifik), maka pada sampel *pooled-DNA* P4 dikonfirmasi lagi dengan penanda genetik SRY. Penanda genetik SRY secara spesifik dapat digunakan untuk mengidentifikasi sampel yang tidak diketahui jenis kelaminnya (Morikawa *et al.*, 2011; Hua-Xia *et al.*, 2014).

Gen UTY dalam penelitian ini digunakan untuk mendeterminasi jenis kelamin pada *unknown sex samples*, sedangkan SRY digunakan untuk mengkonfirmasi hasil PCR dari gen UTY.

Untuk memastikan keakurasian identifikasi jenis kelamin pada sampel sapi Bali nomor 3, maka dilakukan PCR menggunakan penanda genetik *Sex-determining Region Y* (SRY) yang menyandi jenis kelamin jantan pada kromosom Y. Hasil PCR menunjukkan bahwa sampel nomor 3 menghasilkan pita DNA sebesar 325pb yang sesuai dengan ukuran gen target dari gen SRY (Gambar 3).

Pada Gambar 3 Lajur 3, dapat dilihat pita tunggal gen SRY berukuran 325pb pada sampel yang sama (Gambar 2 Lajur 3).

Menurut Prasant *et al.*, (2008) determinasi jenis kelamin menggunakan SRY memberikan hasil spesifisitas tinggi. Xiu-Hua *et al.*, (2014), telah menggunakan gen SRY dalam mendeterminasi jenis kelamin pada sampel DNA yang berasal dari domba, sapi dan kambing. Gen SRY berkembang kuat dalam identifikasi jenis kelamin. Hubungan yang kuat antara hasil analisis SRY dengan fenotip jantan dapat diartikan bahwa gen SRY sangat akurat sebagai

penanda genetik untuk memprediksikan jenis kelamin jantan (Morikawa *et al.*, 2011; Tozzo *et al.*, 2013).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, metode PCR dengan penanda genetik yang berasal dari kromosom Y (UTY dan SRY) dapat digunakan untuk mendeterminasi jenis kelamin jantan pada sampel yang tidak berlabel jenis kelamin (*unknown sex sample*). Selain itu Metode *pooled*-DNA dalam PCR dapat mengefisienkan penggunaan bahan maupun pada proses PCR dalam mendeterminasi jenis kelamin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini menggunakan sebagian dana penelitian program DIPA-LIPI TEMATIK TA. 2015. Penulis mengucapkan terima kasih kepada teknisi lapang yang telah membantu dalam koleksi darah di lapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Appa Rao KBC, V Kesava Rao, BN Kowale & SM. Totey. 1995. Sex Specific Identification of Raw Meat From Cattle, Buffalo, Sheep and Goat. *Meat Sciences* **39**: 123-126.
- Bischoff FZ, MK Sinacori & DD Dang. 2002. Cell-Free Fetal DNA and Intact Fetal Cells in Maternal Blood Circulation: Implications for First and Second Trimester Non-Invasive Prenatal Diagnosis. *Human Reproduction* **8**: 493-500.
- Chang TC, Yanga Y, EF Retzelc & WS Liu. 2013. Male-Specific Region of The Bovine Y Chromosome is Gene Rich with A High Transcriptomic Activity in Testis Development. *Proceedings of National Academy of Science* **110**: 12373-12378.
- da Cruz AS, D Silva, EOA Costa, P De M-Jr, CC da Silva, DM Silva & AD da Cruza. 2012. Cattle Fetal Sex Determination by Polymerase Chain Reaction Using DNA Isolated from Maternal Plasma. *Animal Reproduction Science* **131**: 49- 53.
- Gill P, C Brenner, B Brinkmann, B Budowle, A Carracedo, MA Jobling, P de Knijff, M Kayser, M Krawczak & WR Mayr. 2001. DNA Commission of The International Society of Forensic Genetics: Recommendations on Forensic Analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sciences International* **124**: 5-10.
- Ginja C, LT da Gama & MC Penedo. 2009. Y chromosome Haplotype Analysis in Portuguese Cattle Breeds using SNPs and STRs. *Journal of Heredity*. **100**: 148-157.
- Gokulakrishnan P, RR Kumar, BD Sharma, SK Mendiratta & D Sharma. 2012. Sex Determination of Cattle Meat by Polymerase Chain Reaction Amplification of the DEAD Box Protein (DDX3X/DDX3Y) Gene. *Asian-Australasian Journal Animal Sciences* **25**(5): 733 - 737.
- Hartatik T, TSM Widi, SD Volkandari, D Maharani & Sumadi. 2014. Analysis of DNA Polymorphism in SRY Gene of Madura Cattle Population. *Procedia Enviromental Science* **20**: 365-369.
- Kusdiantoro M, M Olsson, HTA van Tol, S Mikko, BH Vlamings, G Andersson, HR gues-Martinez, B Purwantara, RW Paling, B Colenbrander & JA Lenstra. 2009. On the Origin of Indonesian Cattle. *PLoS ONE* **4**: e5490.
- Margawati ET, Indriawati, SD Volkandari & M Ridwan. 2015. Identification of Pure Breed Bali Cattle by Using Molecular Approach. *Proceedings of The 6th International Seminar on Tropical Animal Production* October 20-22, 426-431.
- Montgomery GW & JA Sise. 1990. Extraction of DNA from Sheep White Blood Cells. *New Zealand Journal Agricultural Research* **33**: 437-441.
- Morikawa T, Y Yamamoto & S Miyaishi. 2011. A new Method for Sex Determination Based on Detection of SRY, STS and Amelogenin Gene Regions with Simultaneous Amplification of Their Homologous Sequences by a Multiplex PCR. *Acta Medica Okayama*. **65**: 113-122.
- Rodriguez C, J Bustamante, BM Cruz, & J Negro. 2005. Evaluation of Methods for Gender Determination of Lesser Kestrel Nestlings. *Journal of Raptor Research* **3**:127-133.
- Silversides DW, N Pilon, R Behjani, A Boyer, I Daneau & J Lussier. 2001. Genetic Manipulation of Sex Differentiation and Phenotype in Domestic animals. *Theriogenology* **55**: 51-63.
- Svensson, EM. 2010. Detecting Sex and Selection in Ancient Remains Using Single Nucleotide Polymorphisms. *Acta Universitatis Upsaliensis. Digital*

- Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty Science Technology*. [Dissertation].
- Tozzo P, A Giuliadori, S Corato, E Ponzano, D Rodriguez & L Caenazzo. 2013. Deletion of Amelogenin Y-locus in Forensic: Literature Revision and Description of a Novel Method for Sex Confirmation. *Journal of Forensic Legal Medica* **20**: 387-391.
- Tubman LM, Z Brink, TK Suh & GE Seidel Jr. 2004. Characteristics of Calves Produced with Sperm Sexed by Flow Cytometry/Cell Sorting. *Journal of Animal Science* **82**: 1029-1036.
- Xia-Hua Z, F Xue-Hui, Wangjin, & Wu-Dengjun. 2014. Sex Identification in Ruminant using SRY and Microsatellite Markers. *Asian Journal of Animal Biosciences* **8**: 98-105.

