

ANALISIS KERAGAMAN GEN PROLAKTIN (PRL) PADA ITIK PITALAH; ITIK LOKAL SUMATERA BARAT

**¹⁾ Riska Amelia, ²⁾ Rusfidra, ²⁾ Kusnadidi Subekti, ²⁾ Firda Arlina, ²⁾ Husmaini,
dan ¹⁾ Stefani Fitri Haryati**

¹⁾ Mahasiswa Program Pascasarjana Ilmu Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas,
Limau Manis, Padang, Sumatera Barat, Telp. (0822)76550183,

²⁾Departemen Teknologi Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas,
Limau Manis, Padang, Sumatera Barat

email: riskaameliaguci@gmail.com / rusfidra@ansci.unand.ac.id

Abstrak

Prolaktin merupakan hormon polipeptida yang disekresikan oleh kelenjar pituitary anterior dan secara spesifik kandidat gen yang mengontrol variasi jumlah produksi telur dengan reduksi biosintesis telur dalam beberapa periode mengeram. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis keragaman gen Prolaktin pada itik Pitalah. Ekstraksi yang dilakukan pada sampel darah 45 ekor itik Pitalah dengan menggunakan protocol G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit dari Intron Biotechnology. Selanjutnya di amplifikasi dengan menggunakan sepasang primer *forward* 5'- CTG CAT CTG TGG ACA TTG CT-3' dan *reverse* 5'GAA GCA GGT TTG GGA GTA CG-3' dengan target fragmen 496 bp dan disekuensing menggunakan jasa 1st Base Singapore. Data hasil sekuensing dianalisis menggunakan Seqmen DNASTAR dan MEGA 11 dan menunjukkan 14 keragaman pada daerah ekson 4 dan parsial intron 3 dan 4 pada titik mutasi INDEL 3703A, INDEL3939A, C3974A, A4030G, A4038C, T4056C, G4061A, T4091G, T4094A, T4098C, G4102A, C4106A, A4107C dan C4154G. Keragaman gen Prolaktin bersifat polimorfik dengan frekuensi genotype tidak dalam keseimbangan Hardy-Weinberg.

Kata Kunci: Prolaktin, Itik Pitalah, Keragaman, Mutasi, Mutasi, Sekuensing

Abstrack

Prolactin is a polypeptide hormone secreted by the anterior pituitary gland and is specifically a gene candidate that controls variations in the amount of egg production by reducing egg biosynthesis during certain periods of incubation. The purpose of this study was to analyze the diversity of the Prolactin gene in Pitalah ducks. Extraction was performed on blood samples from 45 Pitalah ducks using the G-spin protocol™ Total DNA Extraction Mini Kit from Intron Biotechnology. Then amplified using a pair of primers forward 5'- CTG CAT CTG TGG ACA TTG CT-3' and reverse 5'GAA GCA GGT TTG GGA GTA CG-3' with a target fragment of 496 bp and sequenced using services 1st Base Singapore. The sequencing data were analyzed using DNASTAR and MEGA 11 seqmen and showed 14 variations in exon 4 and partial introns 3 and 4 at mutation points INDEL 3703A, INDEL3939A, C3974A, A4030G, A4038C, T4056C, G4061A, T4091G, T4094A, T4098C, G410 2A, C4106A, A4107C and C4154G. Prolactin gene diversity is polymorphic with genotype frequencies not in Hardy- Weinberg equilibrium.

Keywords: Prolactin, Pitalah Ducks, Diversity, Mutations, Sequencing

Amelia dkk, 2023

1. PENDAHULUAN

Sumatera Barat memiliki empat jenis itik lokal yang berkembang sebagai plasma nutfah, salah satunya adalah itik Pitalah. Itik Pitalah berkembang di Nagari Pitalah, Kecamatan Batipuh, Kabupaten Tanah Datar. Itik Pitalah memiliki peran penting pada masyarakat Kabupaten Tanah Datar yaitu untuk peningkatan pendapatan dan memenuhi kebutuhan daging dan telur Sumatera Barat. Itik Pitalah memiliki ciri spesifik yaitu produktivitas yang tinggi. Sehingga berpeluang untuk dikembangkan di seluruh kawasan di Indonesia. Saat ini keaslian itik Pitalah menurun karena terjadi persilangan tidak teratur, kurang perhatian peternak pada itik Pitalah dalam pemeliharaan. Salah satu yang mempengaruhi produktivitas yaitu mutu genetik. Selain lingkungan, gen sangat berperan penting dalam menunjang pertumbuhan.

Dengan perbaikan genetik akan membantu peningkatan produktivitas dan peningkatan populasi itik Pitalah. Peningkatan produksi ternak itik Pitalah dengan cara perbaikan kembali sistem pemeliharaan, kondisi lingkungan ditingkatkan dan dilakukan seleksi yang tepat. Seleksi molekuler yaitu salah satu seleksi yang dapat dilakukan. Seleksi molekuler dilakukan dengan cara mengevaluasi profil sekuen nukleotida dari gen-gen yang ada pada DNA yang mampu berpengaruh pada produktivitas ternak dalam melakukan perbaikan ternak tersebut. Salah satu gen yang memiliki peran pada produksi yaitu gen Prolaktin.

Gen Prolaktin (PRL) adalah secara spesifik kandidat gen yang mengontrol variasi jumlah produksi telur dengan reduksi biosintesis telur dalam beberapa periode mengeram (Chen *et al.*, 2007). Menurut Kansaku *et al.* (2005). Gen Prolaktin yang berhasil diidentifikasi pada itik terdiri dari Lima (5) exon, empat intron dan mengkode 229 asam amino. Wang *et al.* (2011) melaporkan bahwa polimorfisme gen prolaktin itik lokal Cina pada intron 1 yang berhubungan dengan kerabang telur dan ditemukan juga polimorfisme gen prolaktin pada exon 5 terjadi mutasi C5961T dengan bobot telur dan produksi telur tahunan pada itik lokal Cina. Li *et al.* (2009) dan Chang *et al.* (2007) mendapatkan dibagian non-koding teridentifikasi titik mutasi gen prolaktin pada itik *Gaoyou* dan *Tsaiya*.

Pada saat ini data mengenai keragaman gen Prolaktin (PRL) pada itik lokal di Indonesia masih sangat terbatas. Penelitian tentang gen Prolaktin diharapkan dapat memberikan informasi yang akurat untuk proses pemuliaan ternak lokal terutama pada itik Pitalah. Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi keragaman gen Prolaktin pada itik Pitalah Sumatera Barat. Hasil penelitian ini dapat bermanfaat sebagai dasar pengambilan keputusan seleksi itik Pitalah.

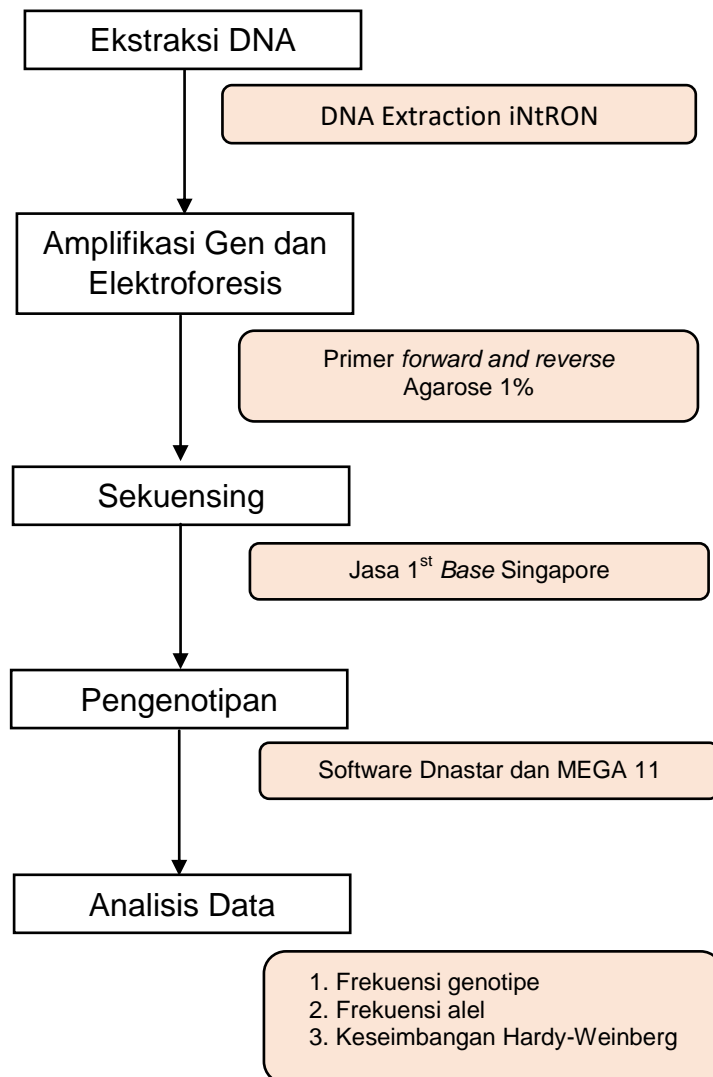
2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

Bahan yang digunakan adalah 45 darah itik Pitalah sebanyak ± 1 ml yang diambil menggunakan suntik (Disposabel Syringe) pada vena brachialis selanjutnya ditampung pada tabung vacutainer berisi EDTA dan disimpan ke freezer -20°C . Bahan untuk ekstraksi menggunakan Kit dari iNtRON Biotechnology. Sepasang primer *forward* dan *reverse*, menggunakan alat mesin PCR dan elektroforesis.

Amelia dkk, 2023

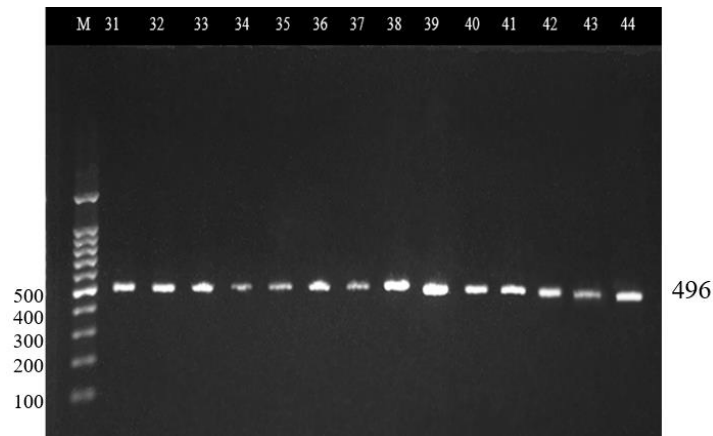
2.2 Metode



Amelia dkk, 2023

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Amplifikasi Gen Prolaktin (PRL)



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen Prolaktin

Hasil visualisasi gen prolaktin ekson 4 menunjukkan bahwa panjang produk hasil amplifikasi sebesar 496 pb. Amplifikasi gen yaitu proses perbanyakan atau penggandaan komponen DNA yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan menggunakan alat PCR. Menurut Viljoen *et al.* (2005) *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu teknik untuk perbanyakan jumlah molekul DNA pada ruas tertentu dan monomer nukleotida secara *in-vitro*. Proses keberhasilan PCR sangat tergantung pada bantuan primer.

Hasil dari proses amplifikasi DNA dilihat dari visualisasi melalui proses elektroforesis dengan menggunakan gel *agarose* 1%. Proses amplifikasi dinyatakan berhasil jika sumur dalam satu slot blok gel hanya terlihat satu pita DNA. Pada Gambar 1 diperoleh pita yang terang pada proses amplifikasi, artinya bahwa pasangan primer yang digunakan pada proses PCR bersifat spesifik dan berhasil mengamplifikasi fragmen gen Prolaktin.

3.2 Deteksi Mutasi dan Keragaman Gen Prolaktin

Produk PCR sebanyak 45 sampel yang berhasil teramplifikasi selanjutnya disekuensing menggunakan jasa 1stBase di Singapore. Hasil sekuensing dalam bentuk data elektroferogram yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan aplikasi MEGA 11 dan seqmen DNASTAR untuk pengurutan basa nukleotida. Sekuen acuan yang digunakan yang berasal dari GeneBank AB158611.1. Berdasarkan hasil analisis pensejajaran (*alignment*) menunjukkan hanya 40 sampel yang dapat terbaca susunan basanya, sedangkan 5 sampel lainnya tidak terbaca (NN). Sampel yang tidak terbaca disebabkan oleh tingkat kemurnian produk PCR yang digunakan pada saat sekuensing dan penanganan saat pengiriman (Rahayu *et al.*, 2006). Analisis data elektroferogram memperlihatkan terjadi mutasi. Mutasi adalah perubahan materi genetik yang bersifat dapat diwariskan. Penyebab

Amelia dkk, 2023

timbulnya mutasi dikarenakan kesalahan apapun yang terjadi pada saat replikasi gen di dalam molekul DNA pada satu atau lebih basa.

Tabel 1. Mutasi gen Prolaktin (PRL) pada Itik Pitalah

No	Mutasi	Posisi Mutasi (pb)	Jenis Mutasi
1.	Del A	3703	Delesi
2.	Ins A	3939	Inseri
3.	C>A	3974	Transversi
4.	A>G	4030	Transisi
5.	A>C	4038	Transversi
6.	T>C	4056	Transisi
7.	G>A	4061	Transisi
8.	T>G	4091	Transversi
9.	T>A	4094	Transversi
10.	T>C	4098	Transisi
11.	G>A	4102	Transisi
12.	C>A	4106	Transversi
13.	A>C	4107	Transversi
14.	C>G	4154	Transversi

Berdasarkan Tabel 1 ditemukannya 14 keragaman di daerah ekson 4 dan parsial intron 3 dan 4 pada sampel itik Pitalah yang terdiri dari 1 titik delesi, 1 titik insersi, 7 titik mutasi transversi dan 5 titik mutasi transisi. Menurut Yunita (2009) mutasi tipe delesi terjadi karena pasangan basa tertentu menghilang sehingga terjadi perubahan susunan basa nukleotida. Mutasi tipe insersi terjadinya karena ada penyisipan basa tertentu (Camphel *et al.*, 2002). Mutasi tipe transversi terjadi karena adanya perubahan antara basa purin menjadi basa pirimidin. Mutasi transisi terjadi karena adanya perubahan antara basa purin (guanin dan adenin) dengan basa purin lainnya atau antara basa pirimidin (sitosin dan timin) dengan basa pirimidin lainnya.

Seluruh mutasi pada penelitian ini terjadi di wilayah intron yaitu intron 3 dan intron 4. Hasil penelitian ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Indriati (2014) bahwa mutasi terjadi di intron 3 dan intron 4. Intron merupakan daerah sekuens DNA yang tidak bertranskripsi menjadi protein tetapi kini telah banyak penelitian yang ditemukan yang menunjukkan fungsi intron khususnya pada sel eukariot. Salah satu fungsi intron pada sel eukariot yaitu meningkatkan kelimpahan protein. Beberapa kasus penelitian menunjukkan bahwa intron memiliki dampak terhadap proses pematangan mRNA termasuk inisiasi proses transkripsi, elongasi transkripsi, terminasi transkripsi, poliadenilasi, ekspor inti sel dan penstabil RNA (Chorev dan Carmel, 2012).

Amelia dkk, 2023

3.3 Frekuensi Genotipe dan Frekuensi Alel Gen Prolaktin

Tabel 2. Frekuensi genotipe dan alel SNP pada gen Prolaktin

No	Posisi SNP	N	Frekuensi Genotipe			Frekuensi Alel	
1.	3703 pb	40	-	-	-	-	-
2.	3939 pb	40	-	-	-	-	-
3.	3974 pb	40	CC 0,8(32)	CA 0,2(8)	AA 0,00(0)	C (0,9)	A (0,1)
4.	4030 pb	40	AA 0,3(12)	AG 0,00(0)	GG 0,7(28)	A (0,3)	G (0,7)
5.	4038 pb	40	AA 0,38(15)	CA 0,62(25)	AA 0,00(0)	A (0,69)	C (0,31)
6.	4056 pb	40	TT 0,62(25)	TC 0,38(15)	CC 0,00(0)	T (0,81)	C (0,19)
7.	4061 pb	40	GG 0,62(25)	AG 0,38(15)	AA 0,00(0)	G (0,81)	A (0,19)
8.	4091 pb	40	TT 0,38(15)	TG 0,62(25)	GG 0,00(0)	T (0,69)	G (0,31)
9.	4094 pb	40	TT 0,42(17)	TA 0,58(23)	AA 0,00(0)	T (0,71)	A (0,29)
10.	4098 pb	40	TT 0,4(16)	TC 0,6(24)	CC 0,00(0)	T (0,7)	C (0,3)
11.	4102 pb	40	GG 0,38(15)	AG 0,62(25)	AA 0,00(0)	G (0,69)	A (0,31)
12.	4106 pb	40	CC 0,38(15)	CA 0,62(25)	CC 0,00(0)	C (0,69)	A (0,31)
13.	4107 pb	40	AA 0,38(15)	CA 0,62(25)	CC 0,00(0)	A (0,69)	C (0,31)
14.	4154 pb	40	CC 0,45(18)	CG 0,55(22)	GG 0,00(0)	C (0,72)	G (0,28)

Keterangan: SNP = *Single Nucleotide Polymorphisme*, N = Jumlah Sampel

Berdasarkan analisis yang telah dilakukan ditemukan keragaman gen Prolaktin secara umum bersifat polimorfik. Menurut Nei (1987) keragaman genetik terjadi apabila terdapat dua alel atau lebih dalam suatu populasi (<99%). Menurut Warwick *et al.* (1990) beberapa faktor yang dapat mempengaruhi frekuensi gen dalam suatu populasi karena adanya mutasi, seleksi, migrasi dan *genetic drift*. Mackay *et al.* (1996) melaporkan ukuran populasi mempengaruhi perubahan frekuensi alel dari generasi ke generasi.

3.4 Keseimbangan Hardy-Weinberg

Berdasarkan data yang telah dianalisis diperoleh delapan posisi mutasi yang berbeda nyata dan empat posisi mutasi yang tidak berbeda nyata. Keragaman pada gen Prolaktin pada itik Pitalah tidak berada dalam keseimbangan Hardy-Weinberg. Menurut Noor (2008) dalam hukum Hardy-Weinberg dinyatakan frekuensi genotipe

Amelia dkk, 2023

suatu populasi yang cukup besar akan selalu dalam keadaan seimbang bila tidak ada seleksi, mutasi, migrasi dan *genetic drift*. Keseimbangan Hardy-Weinberg dinyatakan berlaku dalam suatu populasi jika frekuensi genotip ($p^2, 2pq, q^2 = 1$) dan frekuensi alel (p dan q) konstan dari generasi ke generasi (Vascocellos *et al.*, 2003).

Tabel 3. Uji *chi-square* keseimbangan Hardy Weinberg

No	Posisi Mutasi (pb)	X ² hitung	X ² tabel (0,05)	Keterangan
1	3974	0,49	5,991	Tidak berbeda nyata
2	4030	40	5,991	Berbeda nyata
3	4038	8,34	5,991	Berbeda nyata
4	4056	2,09	5,991	Tidak berbeda nyata
5	4061	2,09	5,991	Tidak berbeda nyata
6	4091	8,34	5,991	Berbeda nyata
7	4094	6,44	5,991	Berbeda nyata
8	4098	7,35	5,991	Berbeda nyata
9	4102	8,34	5,991	Berbeda nyata
10	4106	8,34	5,991	Berbeda nyata
11	4107	8,34	5,991	Berbeda nyata
12	4154	5,74	5,991	Tidak berbeda nyata

Keterangan: $X^2_{hitung} < X^2_{tabel} (0,05) =$ tidak berbeda nyata
 $X^2_{hitung} > X^2_{tabel} (0,05) =$ berbeda nyata

4. KESIMPULAN

Berdasarkan data yang diperoleh dari penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat keragaman gen Prolaktin (PRL) parsial intron 3 dan intron 4. Ditemukan 14 titik mutasi yang menunjukkan adanya 2 alel dan 3 genotipe. Analisis data memberikan informasi bahwa gen Prolaktin bersifat polimorfik dengan frekuensi genotipe tidak dalam keseimbangan Hardy-Weinberg.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada semua pihak yang telah berperan dalam pelaksanaan penelitian. Penelitian ini didanai oleh Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian Masyarakat Ditjen Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi dengan Nomor Kontrak: 086/E5/PG.02.00.PT/2022 tanggal 10 Mei 2022, No. T/77/UN.16.17/PT.01.03/PDKN/Pangan/2022 tanggal 10 Mei 2022, dan Riset Publikasi Terindeks No. T/159/UN.16.17/PT.01.03/PDKN/Pangan-RPT/2022 tanggal 29 September 2022 dari LPPM Universitas Andalas.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Camphel A.N, R.B Jane, M, G Lawrence. 2002. Biology Fifth Edition: England (GB): Benjamin Cummings.
- Chen, C. F., Y. L. Shiue., C. J. Yen., P.C. Tang., H.C. Chang and Y.P. Lee. 2007. Laying traits and underlying transcripts, expressed in the hypothalamus and pituitary gland that were associated with egg production variability in chickens Theriogenol. 68:1305-1315.

Amelia dkk, 2023

- Chorev M, L. Carmel. 2012. The function of itrons. *Bioinformatics and computational Biologi*. Vol 3, 1-15.
- Kansaku, N., T. Ohkubo, H. Okabayashi, D. Guemene, U. Kuhnlein, D. Zadworny and K. Shimada. 2005. Cloning of duck PRL cDNA and genomic DNA. *Gener Compar Endocrinol*, 3A9-47.
- Indriati, M. 2014. Keragaman Gen Prolaktin Ekson Empat Pada Itik Peking Itik Mojosari Putih dan Itik PMP Serta Asosiasinya dengan Sifat Reproduksi. Tesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Li, H. F., W.Q. Zhue, K. W. Chen, T.J. Zhang and W.T. Song. 2009. Association of polymorphisms in the intron 1 of duck prolactin with egg performance. *Tuk J Vet Anim Sci*. 33(3): 193-19.
- Mackay T. F. C., D. S Falconer. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th Ed. New York: Longman.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York (NY). Columbia University Press.
- Noor R.R. 2008. *Genetika Ternak.: Edisi ke-4*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Rahayu, S., S. B. Sumitro, T. Susilawati dan Soemarno. 2006. Identifikasi Polimorfisme Gen GH (Growth Hormone) Sapi Bali dengan Metode PCR-RFLP. *Berkala Penelitian Hayati*: 7-11.
- Vasconcelles, L.P.M.K, D.T. Talhari, A.P Pareira, L.L Countinho, L.C.A Regitano. 2003. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. *Genet and Mol Biol*.26:133-137.
- Viljoen G.J, L.H Nel, J.R Crwther. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Netherland (NT). Springer.
- Wang, C., Z. liang., W. Yu., Feng., X. Peng., Y. Gong and S. Li. 2011. Polymorphism of the prolactin gene and its association with egg production traits in native Chineseducks. *South African Journal of Animal Science*, 41:63-69.
- Warwick, E.J., J.M. Astuti, W. Hardjosoebroto. 1990. *Pemuliaan Ternak, Edisi ke Empat*. UGM Press, Yogyakarta.
- Yunita R. 2009. Pemanfaatan variasi somaklonal dan seleksi in vitro dalam perakitan tanaman toleran cekaman abiotic. *J. Litbang Pertanian*. 28(4).