

## PROFIL SEKUEN GEN LEPTIN DI BAGIAN 3'FLANKING REGION PADA SAPI SUMBA ONGOLE (SO)

### PROFILE OF 3'FLANKING REGION OF LEPTIN GENE IN SUMBA ONGOLE (SO) CATTLE

Widya Pintaka Bayu Putra\*, Paskah Partogi Agung, dan Ari Sulisty Wulandari

Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Kultur Sel Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu  
Pengetahuan Indonesia, Bogor, 16911

Submitted: 21 June 2017, Accepted: 11 October 2017

#### INTISARI

Leptin adalah suatu protein yang berpengaruh terhadap konsumsi pakan, metabolisme lemak, pengaturan energi dan pembentukan sel darah merah (*hematopoiesis*) pada sapi. Polimorfisme gen *Leptin* (*LEP*) pada sapi lokal Indonesia dapat digunakan sebagai seleksi ternak secara molekuler untuk meningkatkan produktivitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* (*SNP*) di bagian *3'flanking region* pada gen *LEP* dari 31 ekor sapi Sumba Ongole (*Bos indicus*). Terdapat 17 *SNP* di daerah *3'flanking region* (3506 - 4019 pb) berdasarkan GenBank: U50365. Lima *SNP* (g.C3558T; g.G3566T; g.A3567C; g.G3574A; g.C3575A) ditemukan pada semua sampel yang diamati. Nilai *Polymorphic Informative Content* (*PIC*) kategori *moderate* ( $0,25 < PIC < 0,50$ ) ditemukan pada sembilan *SNP* yaitu g.3565insG (0,35); g.C3576A (0,29); g.C3577T (0,28); g.A3578C/G (0,45); g.C3579T (0,27); g.C3580T/A (0,47); g.C3581T (0,37); g.A3582G (0,38) dan g.A3873G (0,35). Nilai *PIC* kategori rendah ( $PIC < 0,25$ ) ditemukan pada tiga *SNP* yaitu g.G3573C (0,21); g.G3661A (0,22) dan g.T3868C (0,17). Selain itu, terdapat mutasi insersi di posisi g.3565insG dengan frekuensi 0,66. Studi lebih lanjut terhadap polimorfisme pada bagian *3'flanking region* gen *LEP* melalui penambahan jumlah sampel beserta data catatan produksi perlu dilakukan agar diperoleh *Marker Assisted Selection* (*MAS*) pada sifat produksi.

(Kata kunci: *3'flanking region*, Gen *LEP*, *PIC*, *SNP*, Sumba Ongole)

#### ABSTRACT

*Leptin is a protein involved in the regulation of feed intake, fat metabolism, whole body energy balance and hematopoiesis in cattle. The diversity of the Leptin (LEP) gene in Indonesian indigenous cattle can be used as molecular livestock selection to improve productivity. The objective of this study was to identify Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in the 3'flanking region of LEP gene from 31 heads of Sumba Ongole (Bos indicus) cattle. A total of 17 SNP's in the 3'flanking region (3506 - 4019 bp) of the LEP gene were identified according to GenBank: U50365. Five SNP's (g.C3558T; g.G3566T; g.A3567C; g.G3574A; g.C3575A) were found in all samples. The moderate Polymorphic Informative Content (PIC) values ( $0,25 < PIC < 0,50$ ) were found on nine SNP's g.3565insG g.C3576A (0.29); g.C3577T (0.28); g.A3578C/G (0.45); g.C3579T (0.27); g.C3580T/A (0.47); g.C3581T (0.37); g.A3582G (0.38) and g.A3873G (0.35). The low PIC values ( $PIC < 0,25$ ) were found on three SNP's g.G3573C (0.21); g.G3661A (0.22) dan g.T3868C (0.17). Hence, a insertion mutation was found in position g.3565insG with frequency of 0.66. The next study of polymorphism in 3'flanking region trough more sample addition and production record are important to find the Marker Assisted Selection (MAS) for production traits.*

(Key words: *3'flanking region*, *LEP* gene, *PIC*, *SNP*, Sumba Ongole)

\* Korespondensi (corresponding author):

Telp. +62 878 3819 7243

E-mail: widya.putra.lipi@gmail.com

## Pendahuluan

Karakterisasi genetik pada sapi lokal sangat penting dilakukan sebagai salah satu upaya untuk mendapatkan bibit sapi yang baik melalui proses seleksi menggunakan bantuan informasi molekuler. Sapi Sumba Ongole (SO) termasuk bangsa sapi *Bos indicus* dan merupakan salah satu rumpun sapi lokal Indonesia yang memiliki potensi untuk dikembangkan mutu genetiknya. Beberapa penelitian melaporkan bahwa sapi SO memiliki produktivitas yang baik. Agung et al. (2015) melaporkan bahwa rata-rata berat karkas segar (*hot carcass*) pada sapi SO jantan dapat mencapai  $358,06 \pm 15,35$  kg. Said et al. (2016) melaporkan bahwa rata-rata berat badan sapi SO setelah uji performa (umur  $\pm$  700 hari) sebesar  $343,05 \pm 51,35$  kg (jantan) dan  $317,33 \pm 50,23$  kg (betina).

Salah satu gen yang berpengaruh terhadap berat badan ternak adalah gen *Leptin/LEP* (Hernandez et al., 2016). Gen *LEP* terletak di kromosom 4 dengan massa sekitar 16 kDa yang disekresikan dari jaringan adipose (Geary et al., 2003) dan berfungsi untuk mengatur pertumbuhan dan metabolisme serta berperan penting dalam regulasi konsumsi pakan, keseimbangan energi, kesuburan, produksi susu dan fungsi kekebalan tubuh (Liefers et al., 2002). Corva et al. (2009) menyatakan bahwa gen *LEP* pada GenBank: U50365 memiliki panjang 4067 pasang basa (pb) dan terdiri dari 3 ekson dan 2 intron. Ekson 1 memiliki ukuran yang sangat pendek (34 pb) sedangkan ekson 2 dan ekson 3 masing-masing memiliki panjang 465 pb dan 495 pb.

Identifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada bagian selain ekson dan intron gen *LEP* penting dilakukan sebagai salah satu upaya eksplorasi genetik untuk menemukan marker genetik untuk sifat produksi yang dapat digunakan dalam program *Marker Assisted Selection* (MAS). Informasi polimorfisme pada daerah *5'flanking region* (promotor) gen *LEP* telah dilaporkan pada sapi Hanwoo (Cheong et al., 2006), Sahiwal (Dubey et al., 2008), Hanwoo (Yoon et al., 2005), Brangus (Corva et al., 2009) dan Fries Holstein (Matteis et al., 2012).

Informasi keragaman SNP pada bagian *3'flanking region* gen *LEP* pada sapi

masih sangat terbatas dan sejauh ini baru dilaporkan pada sapi Hanwoo (Yoon et al., 2005). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi SNP pada bagian *3'flanking region* gen *LEP* pada sapi SO yang dapat berguna sebagai data awal untuk analisa lanjutan dalam upaya pencarian marker genetik untuk produktivitas ternak.

## Materi dan Metode

### Sampel darah dan isolasi DNA

Penelitian ini menggunakan 31 ekor sapi SO yang berasal dari Pulau Sumba, Provinsi Nusa Tenggara Timur. Masing-masing sapi dikoleksi sampel darahnya dari *coccygeal vein* sebanyak 5 ml ke dalam tabung *vacutainer* yang sudah berisi  $K_3EDTA$ . Sampel darah kemudian disimpan pada kondisi suhu refrigerator ( $4-5^{\circ}C$ ) sampai saatnya dilakukan isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Genomic DNA mini kit* (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) sesuai prosedur yang tersedia dari produsen. Produk DNA yang diperoleh selanjutnya disimpan pada suhu  $-20^{\circ}C$  sampai saatnya dilakukan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

### Amplifikasi fragmen gen Leptin

Fragmen DNA yang menjadi target untuk di amplifikasi adalah gen *LEP* (GenBank: U50365) sepanjang 514 pb (Gambar 2). Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan sepasang primer yaitu: *Forward*: 5'-AAGGCAGAAAACACTGCGAGGC-3' dan *Reverse*: 5'-CAGAGCAATGCCATTGCAAACAC-3'.

Primer tersebut didesain menggunakan *software online* Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Posisi primer pada gen *LEP* dapat dilihat pada Gambar 1. Reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dengan total volume 12  $\mu$ L akhir yang terdiri dari 1,0  $\mu$ L DNA; 4,50  $\mu$ L *PCR kit KAPA2G HotStart ReadyMix* (Kapa Biosystem Inc., USA); primer *forward* dan *reverse* masing-masing sebanyak 0,90  $\mu$ L (konsentrasi: 200 ng/  $\mu$ L) dan 4,70  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Campuran tersebut kemudian diinkubasi dalam mesin *Mastercycler® gradient* (Eppendorf, Germany) dengan kondisi sebagai berikut: tahap denaturasi awal selama 5 menit pada

suhu 94°C; tahap kedua yang terdiri dari 35 siklus yang masing-masing siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) primer pada suhu 55°C selama 45 detik, dan pembuatan pasangan (komplemen) untai DNA (*extension*) pada suhu 72°C selama 45 detik; tahap terakhir yaitu *extension* pada suhu 72°C selama 5 menit. Produk PCR (3 µL setiap sampel) selanjutnya dielektroforesis pada tegangan 110 volt selama 30 menit menggunakan medium gel agarose 2% (Vivantis Inc., USA) yang telah direndam dalam larutan buffer 1 x TBE (*Tris borate EDTA*). Medium agarose 2% yang telah dielektroforesis selanjutnya direndam dalam larutan SyBr® (10 µl / 100 µl pelarut) selama 60 menit kemudian divisualisasikan dalam G-BOX *Gel Documentation System* (Syngene, UK).

### Sekuensing DNA

Produk PCR yang telah diamplifikasi selanjutnya disekuensing menggunakan mesin sequencer (ABI Prims 3100 - Avant Genetic Analyzer) di 1st BASE *laboratory* Malaysia. Fragmen sekuen *forward* dan

*reverse* gen Leptin selanjutnya dianalisis menggunakan program komputer MEGA 6.0 dan BioEdit. Identifikasi SNP dilakukan berdasarkan pola grafik kromatogram pada hasil sekuensing. Sekuen nukleotida gen *LEP* dari hasil sekuensing selanjutnya dibandingkan dengan sekuen gen *LEP* dari GenBank.

### Analisis statistik

Analisis data meliputi frekuensi alel, heterozigositas harapan ( $H_e$ ), heterozigositas observasi ( $H_o$ ), *polymorphism informative content* (*PIC*), jumlah alel efektif ( $N_e$ ) dan keseimbangan pertautan ( $r^2$ ) dihitung menurut Nei dan Kumar (2000) sebagai berikut:

$$\text{Frekuensi alel } (x_i) = \frac{n_i}{N}$$

$$\text{Heterozigositas observasi } (H_o) = \frac{2N(H_e)}{2N-1}$$

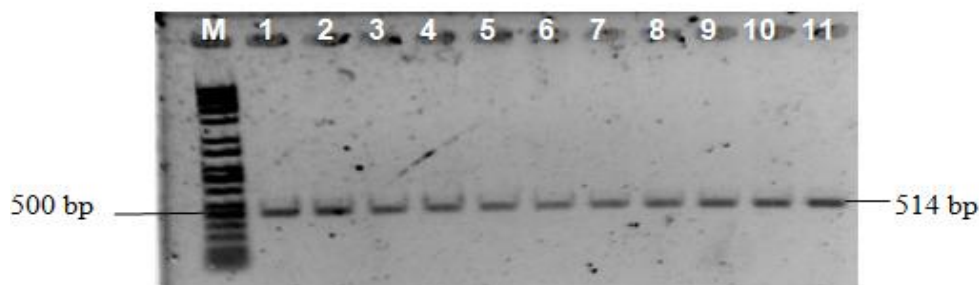
*Polymorphism Informative Content*

$$(PIC) = 1 - \sum_{i=1}^n x_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2x_i^2 x_j^2$$

```

Forward >>>
3506          aaggc agaaaactgc gaggcaggaa accaaagata
3541 taaatacaga ttccacgccc accgggaagg ggggcccac cagcaaacac tagaccggag
3601 ctgggatttt cacagcagtc ttctccctg ttccagctcc ctctcactgc atgcttcagc
3661 gtgacctggg gtgatttcag agcctttgga ccatcaagca agattccctc tgagaatcca
3721 gggagcatca tgaaggctac agcacatata gctggatatt cccacacaac atacgatgga
3781 agcatttatt tatttattat gcattttatt ctgaatgaat ttgaagcaaa acaccagctt
3841 ttccaggetc tttgggggtca gctgggggtga ggaacgctcc tgggggtgccc atcgacagggc
3901 ctcaactgagg caaacccatt ttgagtgact tgaggcctct caagtttggt ctccaggggac
3961 tggctttggt tctactgtga ctgactttaa attacagtgt ttgcaatggc attgctctg
<<< Reverse
    
```

Gambar 1. Posisi primer (garis bawah) pada gen *LEP* berdasarkan GenBank: U50365 (*primer position (underlined) of LEP gene according to GenBank: U50365*).



Gambar 2. Produk PCR (514 pb) gen *LEP* yang dideteksi dengan gel agarose 2% (*PCR product of LEP gene (514 bp) detected by gel agarose 2%*) M: marker (100 bp); baris (line) 1-11: jumlah sampel (*sample number*).

$$\text{Jumlah allel efektif } (n_e) = \frac{1}{\sum_{i=1}^n x_i^2}$$

$$\text{Keseimbangan pertautan } (r^2) = \frac{D^2}{p_1 p_2 q_1 q_2}$$

$$\text{dimana } D = (x_{11}x_{22}) - (x_{12}x_{21})$$

Keterangan:

- N = jumlah sampel  
 p,q = frekuensi allel  
 x<sub>ij</sub> = frekuensi haplotipe

### Hasil dan Pembahasan

Hasil sekuensing gen *LEP* di bagian 3'flanking region pada sapi SO menunjukkan bahwa terdapat 17 SNP seperti pada Tabel 1. Mutasi pada g.C3558T, g.G3566T, g.A3567C, g.G3574A dan g.C3575A terjadi pada semua sampel. Nilai *PIC* pada beberapa *SNP* yang ditemukan berkisar antara 0,00 (rendah) sampai 0,47 (*moderate*) seperti pada Tabel 2. Nilai *PIC* kategori rendah (*PIC*<0,25) ditemukan pada delapan *SNP* yaitu: g.C3558T (0,00); g.G3566T (0,00); g.A3567C (0,00); g.G3573C (0,21);

g.G3574A (0,00); g.G3661A (0,22); g.C3575A (0,00) dan g.T3868C (0,17). Nilai *PIC* kategori *moderate* (0,25<*PIC*<0,50) ditemukan pada delapan *SNP* yaitu: g.C3576A (0,36); g.C3577T (0,28); g.A3578C/G (0,45); g.T3579C (0,27); g.C3580T/A (0,47); g.C3581T (0,37); g.A3582G (0,38) dan g.A3873G (0,35). Nilai *PIC* berguna untuk menggambarkan tingkat keragaman alel dalam populasi. Nei dan Kumar (2000) menyatakan bahwa nilai *PIC* terbagi menjadi tiga kategori yaitu rendah (*PIC*<0,25), *moderate* (0,25<*PIC*<0,50) dan tinggi (*PIC*>0,50).

Dari Tabel 2 dapat disimpulkan bahwa nilai *n<sub>e</sub>* berkorelasi positif dengan nilai *PIC*. Semakin banyak jumlah alel yang muncul dalam suatu lokus maka nilai *PIC* pada lokus tersebut akan semakin tinggi. Tiga *SNP* yaitu: g.A3578C/G; g.C3580A/T dan g.A3582G memiliki nilai *n<sub>e</sub>* sebesar 2,00 yang berarti bahwa terdapat dua alel yang umumnya terdapat di ketiga *SNP* tersebut. Tipe mutasi yang paling banyak dijumpai adalah mutasi transisi (58%) dan diikuti oleh tranversi (37%) dan insersi (5%).

Hasil perhitungan keseimbangan pertautan atau *linkage equilibrium* (*r*<sup>2</sup>) terlihat

Tabel 1. Deteksi *SNP* pada beberapa lokus gen *LEP* sapi SO berdasarkan sekuen nukleotida dari GenBank: U50365

(*detection of SNP in some loci of LEP gene in SO cattle according to the nucleotide position on sequence obtained from GeneBank: U50365*)

No.	Posisi (position)	Perubahan nukleotida (nuclotidechange)	Tipe mutasi (mutation type)	N <sub>Ind.</sub>	N <sub>Pop.</sub>	Frek. (freq.)
1	3558	C → T	Transisi ( <i>transition</i> )	15	15	1,00
2	3565 - 3566	Ins-G	Insersi ( <i>insertion</i> )	10	15	0,66
3	3566	G → T	Tranversi ( <i>tranversion</i> )	15	15	1,00
4	3567	A → C	Tranversi ( <i>tranversion</i> )	15	15	1,00
5	3573	G → C	Tranversi ( <i>tranversion</i> )	2	15	0,13
6	3574	G → A	Transisi ( <i>transition</i> )	17	17	1,00
7	3575	C → A	Tranversi ( <i>tranversion</i> )	17	17	1,00
8	3576	C → A	Tranversi ( <i>tranversion</i> )	7	17	0,41
9	3577	C → T	Transisi ( <i>transition</i> )	4	17	0,24
10	3578	A → C	Tranversi ( <i>tranversion</i> )	13	20	0,65
		A → G	Transisi ( <i>transition</i> )	2	20	0,10
11	3579	T → C	Transisi ( <i>transition</i> )	4	20	0,20
12	3580	C → A	Tranversi ( <i>tranversion</i> )	6	20	0,30
		C → T	Transisi ( <i>transition</i> )	12	20	0,60
13	3581	C → T	Transisi ( <i>transition</i> )	8	20	0,40
14	3582	A → G	Transisi ( <i>transition</i> )	11	20	0,55
15	3661	G → A	Transisi ( <i>transition</i> )	4	27	0,15
16	3868	T → C	Transisi ( <i>transition</i> )	3	31	0,10
17	3873	A → G	Transisi ( <i>transition</i> )	2	31	0,06

N<sub>Ind.</sub>: jumlah individu yang bermutasi (*number of mutated individu*); N<sub>Pop.</sub>: jumlah sampel (*number of sample*); Freq.(freq.): frekuensi (*frequency*).

Tabel 2. Hasil analisis statistik pada beberapa titik mutasi pada bagian 3'flanking region gen LEP sapi SO (result of statistical analysis in the some mutation point at the 3'flanking region of LEP gene in SO cattle)

SNP	Frekuensi alel (frequency allele)			N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	PIC	n <sub>e</sub>
g.C3558T	T (1,00)	C (0,00)	-	15	0,00	0,00	0,00	1,00
g.3565insG	G <sup>+</sup> (0,66)	G <sup>-</sup> (0,34)	-	15	0,45	0,47	0,35	1,82
g.G3566T	G (0,00)	T (1,00)	-	15	0,00	0,00	0,00	1,00
g.A3567C	A (0,00)	C (1,00)	-	15	0,00	0,00	0,00	1,00
g.G3573C	G (0,87)	C (0,13)	-	15	0,23	0,24	0,21	1,30
g.G3574A	G (0,00)	A (1,00)	-	17	0,00	0,00	0,00	1,00
g.C3575A	C (0,00)	A (1,00)	-	17	0,00	0,00	0,00	1,00
g.C3576A	C (0,59)	A (0,41)	-	17	0,48	0,49	0,36	1,92
g.C3577T	C (0,76)	T (0,24)	-	17	0,36	0,37	0,28	1,56
g.A3578C/G	A (0,25)	C (0,65)	G (0,10)	20	0,50	0,51	0,45	2,00
g.T3579C	T (0,80)	C (0,20)	-	20	0,32	0,33	0,27	1,47
g.C3580T/A	C (0,10)	A (0,30)	T (0,60)	20	0,54	0,55	0,47	2,17
g.C3581T	C (0,60)	T (0,40)	-	20	0,48	0,49	0,37	1,92
g.A3582G	A (0,45)	G (0,55)	-	20	0,50	0,51	0,38	2,00
g.G3661A	G (0,85)	A (0,15)	-	27	0,26	0,26	0,22	1,33
g.T3868C	T (0,90)	C (0,10)	-	31	0,18	0,18	0,17	1,22
g.A3873G	A (0,69)	G (0,31)	-	31	0,43	0,44	0,35	1,75

SNP: single nucleotide protein; H<sub>e</sub>: heterozigositas harapan (expected heterozigosity); H<sub>o</sub>: heterozigositas observasi (observed heterozigosity); PIC: polymorphic informative content; n<sub>e</sub>: jumlah alel efektif (number of effective allele).

bahwa pasangan SNP g.C3576A dan g.C3577T memiliki tingkat perputatan yang paling tinggi dibandingkan dengan pasangan SNP lainnya seperti pada Tabel 3. Kombinasi pasangan SNP g.T3579C; g.C3581T dan g.A3582G menunjukkan adanya keseimbangan pertautan yang ditandai dengan terdapatnya individu pada setiap kombinasi alel (haplotipe) yang terbentuk dari kedua pasangan SNP. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa alel-alel yang dihasilkan dari ketiga SNP (g.T3579C; g.C3581T dan g.A3582G) tersebar di seluruh sampel individu yang diamati. Nei dan Kumar (2000) menyatakan bahwa nilai r<sup>2</sup> berkisar antara 0,00 sampai 1,00. Nilai r<sup>2</sup> = 0,00 berarti bahwa terjadi keseimbangan pertautan yang sempurna antara dua SNP yang berbeda. Nilai r<sup>2</sup>=1,00 maka terjadi ketidak-seimbangan pertautan (linkage disequilibrium) yang sempurna antara dua SNP yang berbeda.

Ketidak-seimbangan pertautan gen pada populasi antara lain disebabkan oleh

rekombinasi, penghanyutan genetik (genetic drift), silang dalam (inbreeding), mutasi dan adanya aliran genetik (gene flow) dari populasi lain (Banos *et al.*, 2008). Keseimbangan pertautan gen akan meningkatkan keragaman genetik antar individu dalam populasi. Hal itu disebabkan karena adanya proses rekombinasi alel dari individu berbeda saat terjadi perkawinan sehingga akan melahirkan generasi baru yang memiliki kombinasi alel yang beragam.

Informasi keragaman SNP di bagian 3'flanking region gen LEP pada sapi masih sangat terbatas. Tercatat terdapat delapan SNP dengan frekuensi yang berbeda pada gen LEP sapi Hanwoo di bagian 3'flanking region menurut Yoon *et al.* (2005) antara lain: g.A3465G (0,37); g.A3493C/T (0,34); g.T3518A/G (0,39); g.A3548C/T (0,48); g.A3698G (0,17); g.A3771C/T (0,39); g.C3832T (0,07) dan g.G3865C/T (0,44). Informasi tentang pengaruh polimorfisme pada bagian 3'flanking region gen LEP pada sapi terhadap performa produksi saat ini

Tabel 3. Perbedaan tingkat pertautan pada beberapa pasang SNP pada bagian 3'flanking region gen LEP sapi SO (the difference of linkage level in some pairs of SNP at the 3'flanking region of LEP gene in SO cattle)

Pasangan (pairs) SNP	N	Frek. Haplotipe (freq. haplotype)				D	r <sup>2</sup>
g.C3576A & g.C3577T	17	CC (0,59)	CT (0,00)	AC (0,18)	AT (0,23)	0,14	0,50
g.T3579C & g.C3581T	20	TC (0,55)	TT (0,30)	CC (0,05)	CT (0,10)	0,04	0,04
g.T3579C & g.A3582G	20	TA (0,35)	TG (0,50)	CA (0,10)	CG (0,05)	-0,03	0,02
g.C3581T & g.A3582G	20	CA (0,35)	CG (0,25)	TA (0,10)	TG (0,30)	0,08	0,01

Note: ketidak-seimbangan pertautan terjadi jika r<sup>2</sup> = 1,00 (linkage disequilibrium was occurred when r<sup>2</sup> = 1.00).

belum diketahui. Sebagai informasi, polimorfisme pada 3'flanking region gen *LEP* manusia berpengaruh terhadap hipertensi, kadar glukosa darah dan kadar insulin dalam darah (Shintani et al., 2011).

Informasi keragaman *SNP* di bagian 3'flanking region gen lain pada sapi telah banyak dilaporkan. Beberapa diantaranya telah melaporkan adanya polimorfisme di bagian 3'flanking region pada gen *Growth Hormone Receptor / GHR* (Moisio et al., 1998), gen *Solute Carrier Family II / Slc11a1* (Ranjan et al., 2011), gen *Prion Protein / PRPN* (Zhao et al., 2017), gen *Natural Resistances Macrophage Protein 1 / NRAMP1* (Ranjan et al., 2015) dan gen *Tumor Necrosis Factor Receptor Type II / TNF-RII* (Stachura et al., 2013), gen *Heat Shock Protein / HSP70* (Oner et al., 2017) dan gen *Thyroglobulin / TG* (Gan et al., 2008).

Identifikasi *SNP* melalui teknik *PCR-RFLP* pada beberapa bagian gen *LEP* sapi berdasarkan GenBank: U50365 telah dilaporkan pada beberapa bangsa sapi di dunia. Shin dan Chung (2007) melaporkan bahwa terdapat mutasi pada bagian ekson 2 di posisi g.A1127T dan g.C1180T pada sapi Hanwoo (*Bos taurus*). Kaygisiz et al. (2011) melaporkan terdapat mutasi di posisi g.C1233T pada bagian *coding sequence (CDS)* gen *LEP* pada sapi *Bos taurus* (East Anatolian Red, Anatolian Black dan Brown Swiss). Bagian ekson 3 gen *LEP* terdapat mutasi di posisi g.A2270G pada sapi Pinzgau, Slovak Spotted (Moravcikova et al. 2012), Bali (Mappanganro et al., 2014), Fries Holstein (Oner et al., 2017), Iranan Sistani, Brown Swiss (Nobari et al., 2010), Criollo (Rasor et al., 2002) dan Iranian Sarabi (Javanmard et al., 2008). Selain itu, Jhala et al. (2009) melaporkan terdapat mutasi lain di posisi g.A2961G pada ekson 3 gen *LEP* sapi Gir (*Bos indicus*).

Keragaman *SNP* pada bagian 3'flanking region gen *LEP* sapi SO berpotensi untuk digunakan sebagai *MAS* untuk penciri produktivitas ternak yang baik melalui kajian yang lebih dalam. Validasi pada beberapa *SNP* menggunakan enzim restriksi, sekuensing maupun teknik lainnya perlu dilakukan untuk memperkuat hasil penelitian ini.

## Kesimpulan

Sekuen gen *LEP* sapi SO pada bagian 3'flanking memiliki keragaman yang tinggi dengan ditemukannya 17 titik mutasi. Tipe mutasi yang terjadi pada sekuen tersebut terdiri dari transisi (58%), tranversi (37%) dan insersi (5%).

## Ucapan Terima Kasih

Riset ini terlaksana berkat pendanaan program kegiatan DIPA Unggulan LIPI tahun 2016. Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada seluruh staf PT. Karya Anugerah Rumpin (KAR) yang telah membantu dalam pengambilan sampel darah sapi SO.

## Daftar Pustaka

- Agung, P. P., S. Anwar, A. S. Wulandari, A. Sudiro, S. Said and B. Tappa. 2015. The potency of Sumba Ongole (SO) cattle: A study of genetic characterization and carcass productivity. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 40: 71-78.
- Banos, G., J. A. Woolliam, B. W. Woodward, A. B. Forbes and M. P. Coffey. 2008. Impact of single nucleotide polymorphism in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed and body energy traits of UK Dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 3190-3200.
- Cheong, H. S., D. H. Yoon, L. H. Kim, B. L. Park, E. R. Chung, H. J. Lee, I. C. Cheong, S. J. Oh and H. D. Shin. 2006. Leptin polymorphisms associated with carcass traits of meat in Korean cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19: 1529-1535.
- Corva, P. M., G. V. F. Macedo, L. A. Soria, J. P. Mazzucco, M. Motter, E. L. Villarreal, A. Schor, C. A. Mezzadra, L. M. Melucci and M. C. Miquel. 2009. Effect of Leptin gene polymorphism on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. *Genet. Mol. Res.* 8: 105-116.
- Dubey, P. P., A. Sharma, D. S. Gour, Prashant, A. Jain, C. S. Mukhopadhyay, A. Singh, B. K. Joshi

- and D. Kumar. 2008. Leptin gene polymorphism in Indian Sahiwal cattle by single strand conformation polymorphism (SSCP). *South Afr. J. Anim. Sci.* 38: 131-135.
- Gan, Q. F., L. P. Zhang, J. Y. Li, G. Y. Hou, H. D. Li, X. Gao, H. Y. Ren, J. B. Chen and S. Z. Xu. 2008. Association analysis of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. *J. Appl. Genet.* 49: 251-255.
- Geary, T. W., E. L. McFadin, D. M. MacNeil, E. E. Grings, R. E. Short, R. E. Funston and D. H. Heisler. 2003. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 1-8.
- Hernandez, N., J. C. M. Gonzalez, G. M. P. Bracamonte, A. M. S. Rincon, N. L. Villalobos, S. T. Morris, F. B. Encinia, E. O. Rivas, V. I. P. Contreras and L. A. M. Garcia. 2016. Association of polymorphisms in growth hormone and leptin candidate genes with live weight traits of Brahman cattle. *Genet. Mol. Res.* 15: 1-9.
- Javanmard, A., M. R. Mohammadabadi, G. E. Zarrigabayi, A. A. Gharahedaghi, M. R. Nassiry, A. Javadmansh and Asadzadeh. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). *Rus. J. Genet.* 44: 495-497.
- Jhala, N. B., D. N. Rank, P. H. Vataliya, C. G. Joshi, C. D. Bhong, H. H. Mehta and A. V. Patil. 2009. Cloning and sequencing of the leptin gene in Gir cattle and Mehsana Buffalo. *Buffalo Bulletin.* 28: 29-33.
- Kaygisiz, A., C. Bengi and S. Cilek. 2011. Investigation of leptin gene polymorphism in East Anatolian Red and Anatolian Black cattle and determination of genetic distance from Brown Swiss cattle. *J. Anim. Plant. Sci.* 21: 121-125.
- Liefers, S. C., M. F. W. te Pas, R. F. Veerkamp and T. van der Lende. 2002. Association between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein Heifers. *J. Dairy Sci.* 85: 1633-1638.
- Mappanganro, R., D. P. Rahardja, dan H. Sonjaya. 2014. Hubungan antara gen leptin dengan skor kondisi tubuh induk sapi Bali dan persilangannya. *J. Sains Teknologi.* 14: 232-240.
- Matteis, G. D., M. C. Scata, F. Grandoni, F. Petrera, F. Abeni, G. Catillo, F. Napolitano and B. Moiola. 2012. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the leptin and leptin receptor genes on milk and morphological traits in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 2: 174-182.
- Moisio, S., K. Elo, J. Kantanen and J. Vilkki. 1998. Polymorphism within the 3'flanking region of the bovine growth hormone receptor gene. *Anim. Genet.* 29: 55-57.
- Moravcikova, N., A. Trakovicka, E. Hazuchova, J. Bujko and R. Kasarda. 2012. Associations between polymorphisms in the leptin gene and milk production traits in Pinzgau and Slovak Spotted cattle. *Acta. Agric. Slovenica.* 3: 259-263.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press, New York.
- Nobari, K., S. Ghazanfari, M. R. Nassiry, M. Tahmoorespur and E. Jorjani. 2010. Relationship between leptin gene polymorphism with economical traits in Iranian Sistani and Brown Swiss cows. *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 2807-2810.
- Oner, Y., A. Keskin, H. Ustuner, D. Soysal and V. Karakas. 2017. Genetic diversity of 3' and 5' untranslated region of the HSP70.1 gene between native Turkish and Holstein Friesian cattle breeds. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 47: 424-439.
- Ranjan, R., C. D. Bhong, K. N. Chavan, S. N. S. Parmar and C. G. Joshi. 2011. Polymorphism in 3'UTR region of Slc11a1 gene in Indian breeds of cattle. *Veterinarski Archiv.* 81: 349-357.
- Ranjan, R., C. D. Bhong, S. N. S. Parmar and C. G. Joshi. 2015. Molecular characterization of 3'UTR of Nrampl gene in Gaolao breed of cattle. *Indian J. Anim. Res.* 49: 31-35.
- Rasor, C. C., M. G. Thomas, P. R. M. Enns, H. C. Salazar, H. M. Zhang, G. L. Williams, P. R. L. Stanko, R. D. Randel and J. Rios. 2002. Allelic and

- genotypic frequencies of the leptin gene SauAI-Restriction fragment length polymorphism and evaluation of its association with age at puberty in cattle in the Southwestern United State and Northern Mexico. *The Professional Animal Scientist*. 18: 141-146.
- Said, S., P.P. Agung, W. P. B. Putra, S. Anwar, A. S. Wulandari and A. Sudiro. 2016. Selection of Sumba Ongole (SO) cattle based on breeding value and performance test. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 41: 175-187.
- Shin, S. C. and E. R. Chung. 2007. Association of SNP marker in the leptin gene with carcass and meat quality traits in Korean cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20: 1-6.
- Shintani, M., H. Ikegami, T. Fujisawa, Y. Kawaguchi, M. Ohishi, T. Katsuya, J. Higaki, K. Shimamoto, and T. Ogihara. 2011. Leptin gene polymorphisms is associated with hypertension independent of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2909-2912.
- Stachura, A., E. Kaczmarczyk and B. B. Nosowicz. 2013. Sequence analysis of the regulatory region of the TNF-RII gene in Polish Holstein-Friesian cows. *Genet. Mol. Res.* 12: 1028-1034.
- Yoon, D. H., B. H. Cho, B. L. Park, Y. H. Choi, H. S. Cheong, H. K. Lee, E. R. Chung, I. C. Cheong and H. D. Shin. 2005. Highly polymorphic bovine leptin gene. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18: 1548-1551.
- Zhao, H., S. Wang, L. Guo, Y. Du, L. Liu, T. Ma, N. O. Otecko, C. Li and Y. Zhang. 2017. Fixed differences in the 3'UTR of buffalo PRPN gene provide binding sites for miRNAs post-transcriptional regulation. *Oncotarget.* 1-14.