

Analisis Genetik Gen KiSS1 pada Kambing Berdasarkan Sekuen DNA *GenBank*

Latifah^a, Hanum Muarifah^b, Yusup Sopian^a dan Achmad Guntur^a

^aProdi Peternakan, Universitas Pendidikan Muhammadiyah Sorong

^bFakultas Peternakan, Universitas Brawijaya

^aJl. Kh. Ahmad Dahlan No.01, Mariyat Pantai, Aimas, Kabupaten Sorong, Papua Barat

^bJl. Pringgodani, Mrican, Mojoroto, Mrican, Kec. Mojoroto, Kediri, Jawa Timur 64111

*Corresponding author: latifah@unimudasorong.ac.id

ABSTRAK

Gen KiSS1 merupakan kandidat gen yang berpengaruh pada sifat reproduksi kambing. Tujuan penelitian ini untuk identifikasi SNP, perubahan asam amino dan *phylogenetic tree* kambing berdasarkan data sekuen DNA gen KiSS1 *GenBank*. Dua puluh sekuen DNA gen KiSS1 yang terdiri dari 17 kambing dan 3 domba yang diambil dari data *GenBank* NCBI. Data sekuen DNA KiSS1 disejajarkan menggunakan BioEdit untuk mengetahui lokasi SNP dan perubahan asam amino. *Phylogenetic tree* dibuat menggunakan fitur di NCBI. Berdasarkan hasil penjajaran sekuen DNA gen KiSS1 pada 2 kelompok daerah sekuen, terdapat 22 SNP yang terdiri dari 7 SNP di 5'UTR, 13 SNP di Intron 1 dan 2 SNP di ekson 2. Dua SNP yang ditemukan pada ekson bersifat *silent mutation*. *Phylogenetic tree* menunjukkan bahwa gen KiSS1 kambing berkumpul pada satu *branch* kemudian diikuti dengan gen KiSS1 domba pada *branch* yang berbeda. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi dasar untuk melakukan studi lanjutan yaitu studi asosiasi SNP gen KiSS1 dengan sifat reproduksi pada kambing.

Kata kunci: Gen KiSS1, kambing, identifikasi SNP, perubahan asam amino, *Phylogenetic tree*.

ABSTRACT

The KiSS1 gene is a candidate gene for reproduction traits in goats. This study aimed to identify SNP, analysis of amino acid change, and phylogenetic tree based on DNA sequences of the KiSS1 gene GenBank. Twenty KiSS1 gene sequences that include 17 goats and 3 sheep were used in this study. The KiSS1 sequences were aligned using BioEdit to discover SNP location and amino change. The phylogenetic tree was constructed using the features in NCBI. There were 22 SNPs were detected (7 SNPs in 5'UTR, 13 SNPs in Intron 1, and 2 SNPs in exon 2) based on the alignment result of the KiSS1 gene in two groups of sequences region. Two SNPs in exon was a silent mutation. The phylogenetic tree showed goats KiSS1 gene in the same branch than follow sheep KiSS1 gene in other branches. This study's results can be used

for the necessary information for future studies such as the association SNP KiSS1 with reproduction traits in goats.

Keywords: *KiSS1 gene, Goat, SNP identification, amino acid change, Phylogenetic tree.*

PENDAHULUAN

Gen KiSS1 diekspresikan dalam jaringan hewan, termasuk sistem reproduksi pusat dan perifer, sistem kardiovaskular, jaringan adiposa dan jaringan lainnya. Peran KiSS1 pada reproduksi dikenal sejak 'Kiss' diidentifikasi sebagai inisiator perkembangan pubertas (Li et al., 2009). Telah banyak penelitian yang menyebutkan bahwa SNP gen KiSS1 pada kambing dapat dijadikan marker gen untuk sifat reproduksi pada kambing (Cao et al., 2010; Hou et al., 2011; An et al., 2013b; a; Maitra et al., 2014; El-Tarabany et al., 2017; Mekuriaw et al., 2017; Sahoo et al., 2019; Sankhyan et al., 2019; Han et al., 2020).

Gen KiSS1 pada kambing ditemukan pada kromosom ke 16 dengan jumlah ekson 2 (NCBI, 2020a). Berdasarkan *GenBank* Acc. No. NC_030823.1, jumlah sekuen gen KiSS1 adalah 2999 bp dengan lokasi ekson 1 di 279 sampai 381 dan ekson 2 di 2593 sampai 2897 bp (NCBI, 2020b). Analisis pada gen KiSS1 di beberapa spesies dapat menggunakan *bioinformatic tools* seperti penjajaran, pencarian gen, analisis genom dan pencarian pola gen (Raza, 2012). BioEdit (*offline*) dan NCBI (*online*) sering digunakan dalam analisis sekuen DNA. BioEdit merupakan salah satu program paling umum digunakan dalam studi biologi molekuler. Hal ini berawal dari penjajaran/*alignment* sekuen yang digunakan khusus untuk *Windows*. Program ini berisi banyak fitur untuk penjajaran sekuen yang mudah digunakan, *window view* terpisah, warna yang ditentukan oleh pengguna, dan integrasi otomatis dengan program lain seperti *ClustalW* dan *BLAST* (Hall et al., 2011). Banyak penelitian tentang kandidat gen pada kambing menggunakan BioEdit sebagai analisis genetik yang meliputi penjajaran sekuen DNA, deteksi *single nucleotide polymorfism* (SNP), analisis enzim restriksi dan analisis perubahan asam amino (Latifah et al., 2017, 2019; Hartatik et al., 2020).

Penjajaran sekuen DNA dan deteksi SNP juga dapat menggunakan fitur *BLAST* pada NCBI. Tidak hanya itu, NCBI memiliki *database* dan *software (analysis tool)* yang sering digunakan untuk analisis genetik seperti *DNA-RNA Tool* yang meliputi *GenBank*, *BioSystem*, *Database of Expressed Sequence Tags (dbEST)*, *Database of Genome Survey Sequences (dbGSS)*, dan *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* (Jenuth, 2000; Maglott et al., 2005; Pruitt et al., 2007; UGM, 2010; Barrett et al., 2012; Widodo and Miftahhunnafisah, 2012). Studi analisis genetik pada gen KiSS1 kambing bertujuan untuk identifikasi SNP, perubahan asam amino dan *phylogenetic tree* pada kambing. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan (*preliminary*) yang akan digunakan untuk penelitian lanjutan yaitu studi asosiasi SNP gen KiSS1 dan sifat-sifat reproduksi pada kambing.

MATERI DAN METODE

Koleksi sampel

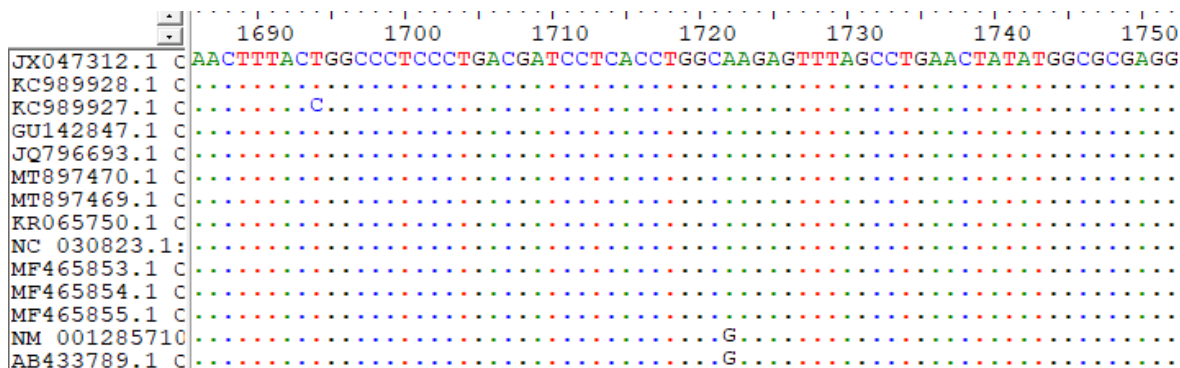
Dua puluh sekuen DNA gen KiSS1 yang terdiri dari 17 kambing dan 3 domba yang diambil dari data *GenBank* NCBI. Sekuen DNA *Capra hircus* yang digunakan antara lain *GenBank Acc. No.* MF465853.1, MF465854.1, MF465855.1, MF465855.1, NC_030823.1, KC989928.1, JQ796693.1, KC989927.1, KX586353.1, KX586354.1, JX643984.1, NM_001285710.2, AB433789.1, MT897470.1, GU142847.1, MT897469.1, JX047312.1 dan KR065750.1, sedangkan 3 sekuen DNA *Ovis aries* yang digunakan antara lain *GenBank Acc. No.* MN737104.1, KY356393.1 dan MN737103.1.

Analisis genetik

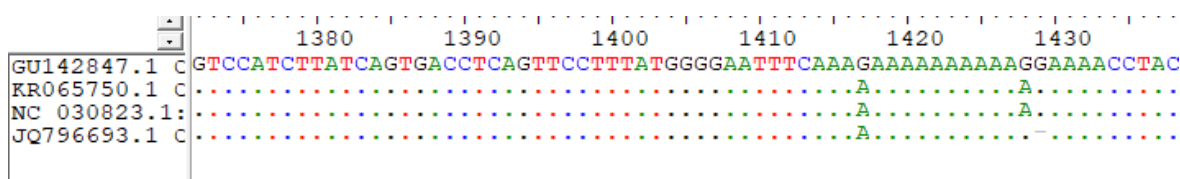
Sekuen DNA gen KiSS1 diujarkan menggunakan program BioEdit ver 7.0.0. untuk menentukan SNP pada gen KiSS1 kambing. Penjajaran sekuen DNA gen KiSS1 dilakukan pada 2 kelompok lokasi gen KiSS1. Kelompok lokasi sekuen DNA KiSS1 pertama yaitu sekuen yang berada pada bagian promotor, 5'UTR dan ekson 1, sedangkan kelompok lokasi sekuen DNA KiSS1 yang kedua adalah kelompok sekuen DNA yang berlokasi di intron 1 dan ekson 2. Penamaan SNP pada kelompok pertama berdasarkan *GenBank Acc. No.* JX047312.1, sedangkan kelompok kedua berdasarkan *GenBank Acc. No.* GU142847.1. Analisis perubahan asam amino juga menggunakan program BioEdit ver. 7.0.0. *BLAST* dan *phylogenetic tree* dianalisis berdasarkan gen KiSS1 kambing dan domba. Analisis *BLAST* dan *phylogenetic tree* menggunakan fitur dari NCBI. Konstruksi *phylogenetic tree* menggunakan sekuen DNA gen KiSS1 domba sebagai *outgroup*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sekuen DNA gen KiSS1 pada kambing dengan bangsa yang berbeda diujarkan berdasarkan 2 kelompok lokasi menggunakan program BioEdit ver. 7.0.0 (Gambar 1 dan Gambar 2). Berdasarkan hasil penjajaran, dua puluh dua SNP ditemukan pada gen KiSS1 kambing. Tujuh SNP ditemukan di daerah 5'UTR, 13 SNP ditemukan di intron 1 dan 2 SNP terdeteksi di Ekson 2 (Tabel 1.). Deteksi SNP pada kambing Black Bengal ditemukan SNP pada lokasi g.1122C/T (Ahlawat et al., 2015). Studi gen KiSS1 pada kambing Xinong Saanen, Guanzhong, dan Boer terdeteksi 2 SNP (g.2124T/A dan g.2270C/T) yang berlokasi di intron (An et al., 2013b). Sebelas SNP (g.384G/A, g.1147T/C, g.1417G/A, g.1428_1429delG, g.2124C/T, g.2270C/T, g.2489T/C, g.2510G/A, g.2540C/T, g.3864_3865delCA dan g.3885_3886insACCCC) ditemukan juga pada kambing Xinong Saanen and Guanzhong pada penelitian yang berbeda (An et al., 2013a). Pada studi Sankhyan et al. (2019), polimorfisme g.125T/A gen KiSS1 ditemukan pada kambing Gaddi. Studi komparasi sekuen pada gen KiSS1 kambing menunjukkan adanya SNP pada posisi g.121T/A yang ditemukan di daerah intron (El-Tarabany et al., 2017). Sahoo et al. (2019) melaporkan SNP g.231G/C di daerah promotor gen KiSS1 pada kambing.



Gambar 1. Penjajaran kelompok sekuen KiSS1 pertama

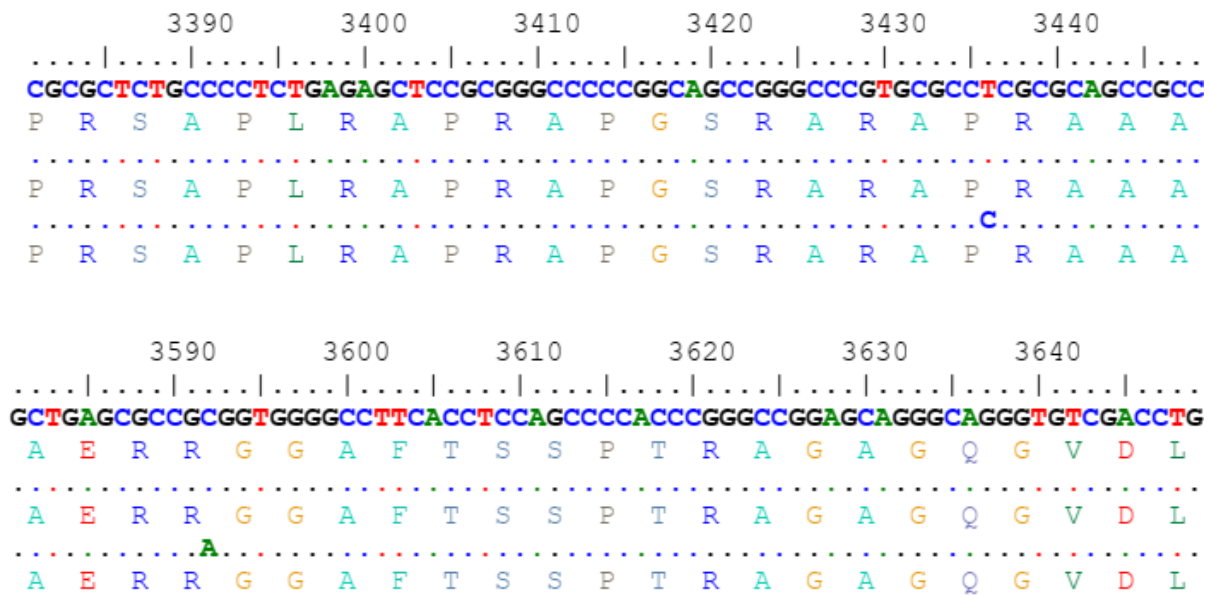


Gambar 2. Penjajaran kelompok sekuen KiSS1 kedua

Tabel 1. Dua puluh dua SNP gen KiSS1 pada kambing berdasarkan *GenBank*

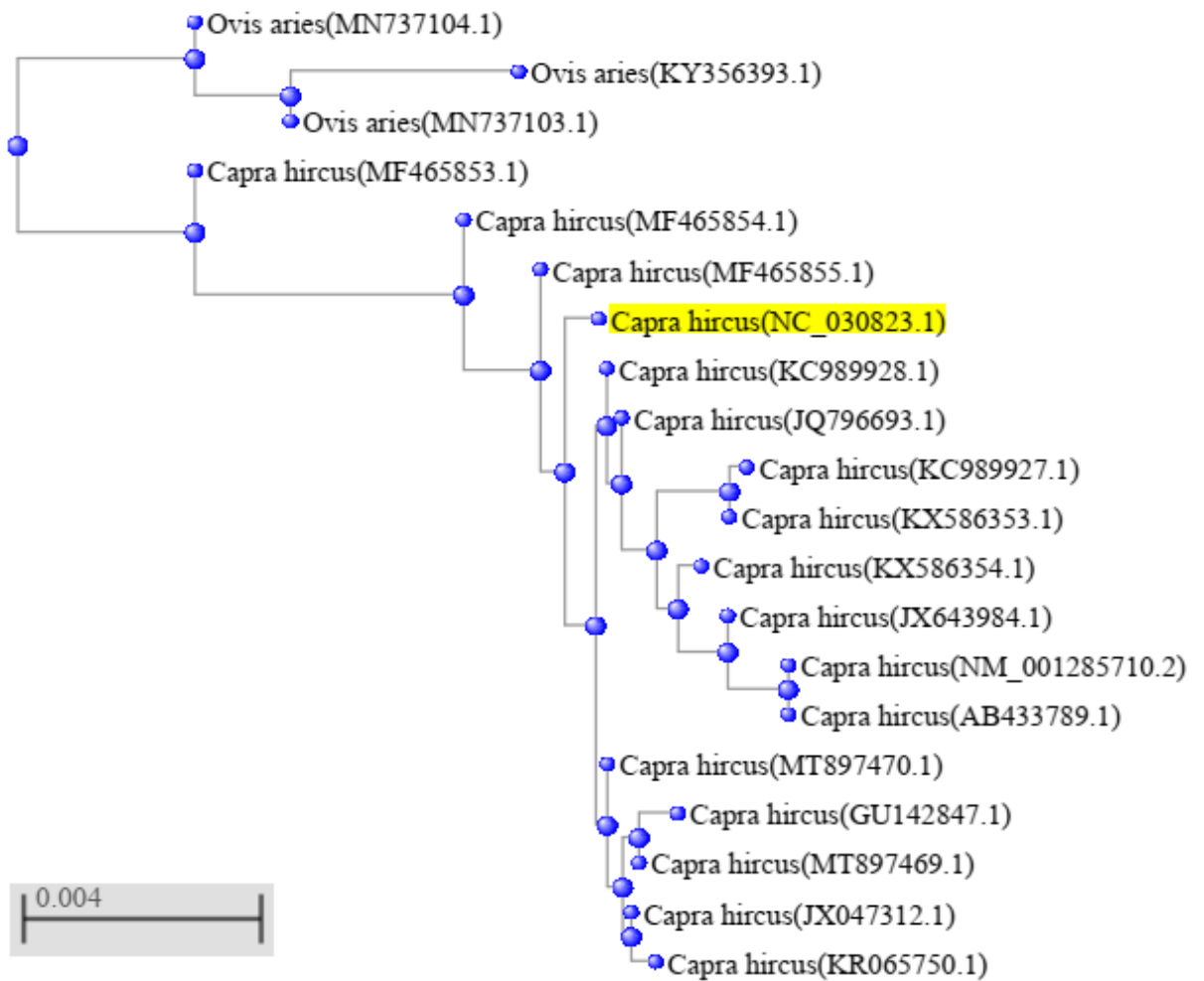
| Kelompok sekuen DNA | SNP | Lokasi | Referensi sekuen DNA |
|---------------------|-----------|----------|----------------------|
| 1 | g.1455T/G | 5'UTR | JX047312.1 |
| | g.1474A/G | | |
| | g.1506T/G | | |
| | g.1544C/A | | |
| | g.1693T/C | | |
| | g.1721A/G | | |
| 2 | g.1895G/C | Intron 2 | GU142847.1 |
| | g.1417G/A | | |
| | g.1428G/A | | |
| | g.1609C/A | | |
| | g.2055A/C | | |
| | g.2270C/T | | |
| | g.2311C/T | | |
| | g.2510G/A | | |
| | g.2546C/T | | |
| | g.2891C/T | | |
| g.2967C/G | | | |
| | g.2981G/A | Ekson 2 | |
| | g.3039A/C | | |
| | g.3202G/A | | |
| | g.3436T/C | | |
| | g.3436C/A | | |

Dua SNP terletak di ekson 2 (g.3436T/C dan g.3592C/A) bersifat *silent mutation*. Pada SNP g.3436T/C mengkode asam amino yang sama yaitu prolin (CCT/CCC) dan SNP g.3592C/A juga hanya mengkode kodon yang berbeda (CGC/CGA) dan asam amino arginin (Gambar 3). Perubahan asam amino 5 SNP pada ekson yang diamati pada sekuen populasi kambing yaitu serin ke prolin pada SNP g.3436T/C, isoleusin menjadi leusin pada SNP g.3688A/C, histidin ke prolin di SNP g.3878A/ C dan glutamin ke histidin. Namun, tidak ada asam amino perubahan diamati pada SNP g.945C/T, g.3354A/G, g.3592C/A, g.3696C/T, g.3783T/A dan g.3963T/C (Mekuriaw et al., 2017)



Gambar 3. Perubahan asam amino SNP g.3436T/C dan g.3592C/A

Pembentukan *Phylogenetic tree* pada kandidat gen telah banyak dilakukan pada kambing (Latifah et al., 2017; Hartatik et al., 2020). Pada gen KiSS1 juga telah dilakukan analisis *Phylogenetic tree* (Maitra et al., 2014). Penelitian ini telah dilakukan analisis *Phylogenetic tree* sekuen DNA gen KiSS1 pada berbagai bangsa kambing yang sudah teregistrasi di NCBI. Pada pembentukan *phylogenetic tree*, sekuen DNA gen KiSS1 domba digunakan sebagai *outgroup*. Berdasarkan Gambar 4, *Capra hircus* berada dalam satu *branch* dan *Ovis aries* berada pada *branch* lainnya.



Gambar 4. *Phylogenetic tree* gen KiSS1 pada kambing

Penelitian *Phylogenetic tree* gen KiSS1 pada hewan domestik dan tikus (NC 000067) membentuk kelompok yang berbeda dan ruminansia kecil (kambing) lebih dekat dengan ruminansia besar (sapi) dibandingkan dengan babi (NC 010451), kuda (NC 009148) dan manusia (NC 00001) (Maitra et al., 2014). *Phylogenetic tree* berdasarkan gen KiSS1 pada beberapa *breed* kambing dengan *outgroup* sapi dan kerbau di India juga telah dilakukan (Sahoo et al., 2019). Pada penelitian ini juga dilakukan *BLAST* pada 17 sekuen DNA gen KiSS1 kambing dan 3 sekuen DNA gen KiSS1 pada domba. Hasil analisis *BLAST* disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Analisis BLAST *GenBank* Acc. No. NC_030823.1 dengan 19 *GenBank* pembanding.

| <i>GenBank</i> | Spesies | <i>Quary</i> cover (%) | Kesamaan (%) |
|----------------|-----------------------------------------|---------------------------|-----------------|
| MF465853.1 | <i>Capra hircus</i> breed Black Bengal | 9 | 99,65 |
| MF465854.1 | <i>Capra hircus</i> breed Ganjam | 9 | 100,00 |
| MF465855.1 | <i>Capra hircus</i> breed Raighar | 9 | 100,00 |
| KC989928.1 | <i>Capra hircus</i> | 12 | 100,00 |
| JQ796693.1 | <i>Capra hircus</i> | 29 | 99,66 |
| KC989927.1 | <i>Capra hircus</i> | 12 | 98,70 |
| KX586353.1 | <i>Capra hircus</i> breed Jintang black | 13 | 99,35 |
| KX586354.1 | <i>Capra hircus</i> breed Tibetan | 13 | 99,35 |
| JX643984.1 | <i>Capra hircus</i> | 12 | 99,70 |
| NM_001285710.2 | <i>Capra hircus</i> | 26 | 99,76 |
| AB433789.1 | <i>Capra hircus</i> | 26 | 99,76 |
| MT897470.1 | <i>Capra hircus</i> | 10 | 100,00 |
| GU142847.1 | <i>Capra hircus</i> breed Jining Grey | 100 | 99,33 |
| MT897469.1 | <i>Capra hircus</i> | 10 | 100,00 |
| JX047312.1 | <i>Capra hircus</i> | 12 | 100,00 |
| KR065750.1 | <i>Capra hircus</i> | 100 | 98,74 |
| MN737104.1 | <i>Ovis aries</i> | 13 | 99,22 |
| KY356393.1 | <i>Ovis aries</i> | 26 | 98,77 |
| MN737103.1 | <i>Ovis aries</i> | 15 | 98,77 |

KESIMPULAN

Terdapat 22 SNP yang ditemukan pada gen KiSS1 kambing berdasarkan data *GenBank* NCBI. Polimorfisme gen KiSS1 pada penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya tentang marker gen KiSS1 yang potensial.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Universitas Pendidikan Muhammadiyah Sorong yang telah memberikan dukungan dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahlawat, S., R. Sharma, A. Maitra, M.S. Tantia & V. Prakash.** 2015. Association analysis of a novel SNP in GPR54 gene with reproductive traits in Indian goats. *Indian J. Dairy Sci* 68:39–44.
- An, X., T. Ma, J. Hou, F. Fang, P. Han, Y. Yan, H. Zhao, Y. Song, J. Wang & B. Cao.** 2013a. Association analysis between variants in KISS1 gene and litter size in goats. *BMC Genet.* 14:63.
- An, X.P., P. Han, J.X. Hou, H.B. Zhao, Y. Yan, T. Ma, F. Fang, F.X. Meng, Y.X. Song & J.G. Wang.** 2013b. Molecular cloning and characterization of KISS1 promoter and effect of KISS1 gene mutations on litter size in the goat. *Genet. Mol. Res* 12:4308–4316.
- Barrett, T., S.E. Wilhite, P. Ledoux, C. Evangelista, I.F. Kim, M. Tomashevsky, K.A. Marshall, K.H. Phillippy, P.M. Sherman & M. Holko.** 2012. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res.* 41:D991–D995.
- Cao, G.L., M.X. Chu, L. Fang, R. Di, T. Feng & N. Li.** 2010. Analysis on DNA sequence of KiSS-1 gene and its association with litter size in goats. *Mol. Biol. Rep.* 37:3921–3929.
- El-Tarabany, M.S., A.W. Zaglool, A.A. El-Tarabany & A. Awad.** 2017. Association analysis of polymorphism in KiSS1 gene with reproductive traits in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 180:92–99.
- Hall, T., I. Biosciences & C. Carlsbad.** 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci* 2:60–61.
- Han, Y., X. Peng, W. Si, G. Liu, Y. Han, X. Jiang, R. Na, L. Yang, J. Wu & E. Guangxin.** 2020. Local expressions and function of Kiss1/GPR54 in goats' testes. *Gene* 738:144488.
- Hartatik, T., Latifah, R. Yuliana & A. Kustantinah.** 2020. Genotyping and Chi-Square Analysis of 967 bp Leptin Gene in Bligon Goat. Page 12019 in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing.
- Hou, J.X., X.P. An, J.G. Wang, Y.X. Song, Y.H. Cui, Y.F. Wang, Q.J. Chen & B.Y. Cao.** 2011. New genetic polymorphisms of KiSS-1 gene and their association with litter size in goats. *Small Rumin. Res.* 96:106–110.
- Jenuth, J.P.** 2000. *The NCBI*. Springer.

- Latifah, D. Maharani, Kustantinah & T. Hartatik.** 2019. Comparison Study of Melanocortin 4 Receptor in Cattle, Buffalo, Sheep and Goat Based on Genbank Data. Page in Proceedings - 2018 1st International Conference on Bioinformatics, Biotechnology, and Biomedical Engineering, BioMIC 2018.
- Latifah, D.A. Priyadi, D. Maharani, Kustantinah & T. Hartatik.** 2017. Genetic analysis using partial sequencing of melanocortin 4 receptor (MC4R) gene in Bligon goat. *Media Peternak*. 40:71–77. doi:10.5398/medpet.2017.40.2.71.
- Li, D., W. Yu & M. Liu.** 2009. Regulation of KiSS1 gene expression. *Peptides* 30:130–138.
- Maglott, D., J. Ostell, K.D. Pruitt & T. Tatusova.** 2005. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 33:D54–D58.
- Maitra, A., R. Sharma, S. Ahlawat, M.S. Tantia, M. Roy & V. Prakash.** 2014. Association analysis of polymorphisms in caprine KiSS1 gene with reproductive traits. *Anim. Reprod. Sci.* 151:71–77.
- Mekuriaw, G., J.M. Mwacharo, T. Dessie, O. Mwai, A. Djikeng, S. Osama, G. Gebreyesus, A. Kidane, S. Abegaz & K. Tesfaye.** 2017. Polymorphism analysis of kisspeptin (KISS1) gene and its association with litter size in Ethiopian indigenous goat populations. *African J. Biotechnol.* 16:1254–1264.
- NCBI.** 2020a. KiSS-1 Metastasis Suppressor [*Capra Hircus* (Goat)]. Accessed. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100860861>.
- NCBI.** 2020b. *Capra Hircus* Breed San Clemente Chromosome 16, ASM170441v1, Whole Genome Shotgun Sequence. Accessed. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_030823.1?report=genbank&from=1340188&to=1343186&strand=true.
- Pruitt, K.D., T. Tatusova & D.R. Maglott.** 2007. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* 35:D61–D65.
- Raza, K.** 2012. Application of data mining in bioinformatics. *arXiv Prepr. arXiv1205.1125*.
- Sahoo, S.S., C. Mishra, R. Kaushik, P.K. Rout, M.K. Singh, S. Bhusan & M.S. Dige.** 2019. Association of a SNP in KISS 1 gene with reproductive traits in goats. *Biol. Rhythm Res.* 1–12.
- Sankhyan, V., Y.P. Thakur & P.K. Dogra.** 2019. Association of kisspeptin gene (KISS1) with litter size in migratory Gaddi goats in western Himalayan state of Himachal Pradesh. *Indian J. Anim. Sci.* 89:1352–1355.
- UGM.** 2010. Pengenalan National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Accessed. <http://dhiantika.staff.ugm.ac.id/files/2010/11/BUKU-PETUNJUK-DRYLAB-BIOSEL-2010.pdf>.
- Widodo & Miftahhunnafisah.** 2012. Pengenalan NCBI untuk analisis DNA, protein dan senyawa kimia.
- Williams, R.J.** 1981. Restriction Endonucleases. *Gene Amplif. Anal.* 1:157.