Gen *Melanocortin-4 Receptor* (MC4R) sebagai Gen Utama untuk Seleksi Pertumbuhan Cepat pada Sapi Potong

(*Melanocortin-4 Receptor* (MC4R) Gene as the Main Gene for Rapid Growth Selection in Beef Cattle)

Peni Wahyu Prihandini, D. Maharani

Loka Penelitian Sapi Potong, Grati
Kontributor utama: syahada01@yahoo.com

(Diterima 11 Maret 2019 – Direvisi 5 Mei 2019 – Disetujui 7 Juni 2019)

ABSTRACT

Genetic improvement for economic traits such as growth is important in beef cattle selection program. This paper discusses melanocortin-4 receptor (MC4R) gene as a candidate gene for rapid growth based on its function, location and pathway, as well as its polymorphism and identified genotypes associated with economic traits, and its application as a marker-assisted selection. MC4R is a prominent gene encoding growth traits and has a critical role in mediating the effect of leptin in regulating food consumption and energy balance. Many identified MC4R gene polymorphisms are associated with growth traits. The MC4R gene, therefore, is considered as a functional candidate gene for growth traits and can be used as a marker in selection program based on molecular genetics. The use of molecular markers such as MC4R gene, therefore, can be applied in genetic improvement program for growth traits in cattle. By using MC4R gene, the efforts to build breeding system in small populations can be proposed. For instance, with an effective population size (N_e) of about 40 heads, the first generation (G1) will be obtained with a composition of GG 61.1%, CG 33.3% and CC 5.6% and male and female ratio of 178:11 and generates ideal N_e of 41 heads. In the third generation, therefore, GG composition will be 100%. The results of molecular analysis can be further used as a guideline in the development and genetic improvement strategies of beef cattle.

Key words: MC4R gene, weaning weight, *Bos javanicus*, beef cattle, selection

ABSTRAK

Perbaikan sifat genetik yang berasosiasi dengan sifat pertumbuhan yang bernilai ekonomis sangat dibutuhkan dalam seleksi pada sapi potong. Makalah ini membahas fungsi gen *melanocortin receptor* tipe 4 (MC4R), lokasi dan *pathway* gen MC4R, identifikasi polimorfisme gen MC4R dengan sifat ekonomis pertumbuhan dan aplikasinya dalam seleksi. Gen *melanocortin receptor* tipe 4 adalah gen utama yang bertugas mengatur berbagai sifat pertumbuhan dan pendukung pertumbuhan melalui interaksi dengan gen leptin untuk konsumsi pakan dan keseimbangan energi. Polimorfisme sudah banyak teridentifikasi pada gen ini dan berasosiasi dengan banyak sifat pertumbuhan. Oleh karena itu, penggunaan marka molekuler berupa gen MC4R untuk sifat pertumbuhan pada sapi potong dapat diaplikasikan dalam mengoptimalkan strategi perbaikan mutu genetik pertumbuhan sapi potong. Upaya membangun sistem *breeding* pada populasi kecil diajukan contoh dengan gen MC4R pada sapi potong dengan populasi yang efektif (N_e) sekitar 40 ekor akan mendapatkan hasil generasi pertama (G1) dengan komposisi GG 61,1%, CG 33,3% dan CC 5,6% dan perbandingan jantan dan betina 178:11 serta menghasilkan N_e ideal 41 ekor. Maka pada generasi ketiga, gen GG akan menjadi 100%. Hasil kajian molekuler tersebut diharapkan dapat dijadikan petunjuk dalam strategi pemanfaatan dan peningkatan mutu genetik pertumbuhan pada sapi potong.

Kata kunci: Gen MC4R, bobot sapih, *Bos javanicus*, sapi potong, seleksi

PENDAHULUAN

Sifat-sifat ekonomis ternak sebagian besar merupakan sifat poligenik yang dikendalikan oleh banyak gen. Sekuen DNA dari gen-gen pengkode sifat-sifat ekonomis sering dikenal sebagai *quantitative traits loci* (QTL) (Hradecka et al. 2008). Saat ini, pengetahuan tentang struktur molekuler sifat-sifat kuantitatif yang kompleks tersebut telah banyak diteliti pada beberapa ternak lokal di dunia, dan gen yang

berasosiasi dengan sifat ekonomis dapat diidentifikasi sebagai bagian kandidat gen utama untuk seleksi (Grisart et al. 2002). Dengan demikian, kandidat gen pengkode sifat-sifat yang menjadi kriteria seleksi potensial dapat diaplikasikan sebagai alat seleksi pada ternak.

Studi untuk memahami variasi genetik terhadap sifat pertumbuhan yang bernilai ekonomis sangat penting dalam seleksi. Seiring dengan metode seleksi konvensional yang telah mencapai hasil yang

Tabel 1. Beberapa gen pengkode sifat-sifat ekonomis pada sapi dan domba

Gen	SNP/Lokus	Bangsa ternak	Sifat yang berasosiasi	Pustaka
<i>Growth hormone 1</i>	g. 303 A>C	Sapi lokal Thailand	Bobot sapih	Supakorn et al. (2007)
<i>Growth hormone 5</i>	g. 208 G>A	Sapi lokal Thailand	Bobot sapih	Supakorn et al. (2007)
<i>Growth hormone 5</i>	g. 388 C>G	Sapi lokal Thailand	Bobot sapih	Supakorn et al. (2007)
<i>Growth hormone IGF1</i>	GH/AluI	Sapi Karan Fries	Pertumbuhan	Pal et al. (2004)
	IGF1/SnaBI	Sapi Mexico	Bobot sapih	De la Rosa Reyna et al. (2010)
<i>Growth hormone</i>	GH4.1	Sapi Brahman	Bobot sapih	Hernández et al. (2016)
<i>Leptin</i>	LEPg.978	Sapi Brahman	Bobot badan setahunan	Hernández et al. (2016)
<i>Growth hormone</i>	GH/HaeIII	Domba Awassi	Bobot lahir dan sapih	Al-Muhsen et al. (2018)
<i>Growth hormone</i>	GH/HaeIII	Domba ekor Gemuk	Bobot lahir, bobot sapih, kecepatan tumbuh	Malewa et al. (2014)
MC4R	g.1180C>T	Sapi Madura	Bobot badan	Prihandini (2018)
MC4R	g. 1069C>G	Sapi Nanyang	Bobot badan	Zhang et al. (2009)
MC4R	g. 1016 G>A	Domba Hu	Bobot badan	Seong et al. (2012)
MC4R	g. 1069 C>G	Sapi potong	Pertumbuhan	Du et al. (2013)
MC4R		Sapi Kanada dan Amerika	Lemak karkas	McLean & Schmutz (2011)
MC4R	g. 1069 C>G	Sapi lokal Korea	Keempukan daging	Lee et al. (2013)
MC4R	g. 129 A>G	Sapi Qinchuan	Berat karkas, eempukan lemak punggung, skor <i>marbling</i>	Liu et al. (2010)
MC4R	g. 1069 C>G	Sapi Simental	Keempukan lemak punggung	Huang et al. (2010)
MC4R	g. 1016 G>A	Sapi Hanwoo	Keempukan lemak punggung dan skor <i>marbling</i>	Seong et al. (2012)

signifikan, seleksi dengan bantuan marka genetik, melalui identifikasi gen kandidat pengkode sifat-sifat ekonomis, dapat meningkatkan efektivitas dalam program seleksi ternak (Chung & Kim 2005; Tizioto et al. 2012). Beberapa gen pengkode sifat-sifat pertumbuhan pada sapi dan domba ditampilkan pada Tabel 1. Berdasarkan berbagai gen yang mempengaruhi sifat pertumbuhan (Tabel 1) maka gen MC4R mempunyai pengaruh yang paling banyak untuk sifat-sifat pertumbuhan yang bernilai ekonomis (Seeley et al. 1997; Butler 2006; Zhang et al. 2009; Huang et al. 2010; Liu et al. 2010; McLean & Schmutz (2011); Seong et al. 2012; Du et al. 2013; Maharani et al. 2018; Alfieri et al. 2010; Roth et al. 2009). Tujuan penulisan ini membahas fungsi gen MC4R, lokasi dan *pathway* gen MC4R, identifikasi *polimorfisme* gen MC4R dengan sifat ekonomis pertumbuhan dan aplikasinya dalam seleksi.

FUNGSI GEN MELANOCORTIN-4 RECEPTOR

Gen *melanocortin receptor* terdiri dari lima anggota (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R dan MC5R). Gen *melanocortin receptor* tipe 4 (MC4R) adalah gen utama yang bertugas mengatur asupan makanan dan keseimbangan energi. MC4R merupakan sepasang *receptor* protein G, diekspresikan pada inti hipotalamus, dan berperan penting dalam regulasi

homeostasis energi (Seeley et al. 1997; Benoit et al. 2000; Zhang et al. 2009; Wan et al. 2012). Protein ini mengatur perilaku asupan makanan dan pengeluaran energi (Huszar et al. 1997; Rosmond et al. 2001; MacKenzie 2006), dan juga dikenal sebagai gen yang bertanggung jawab pada respon obesitas terhadap hormon leptin pada vertebrata, termasuk manusia (Farooqi et al. 2003). Gen MC4R adalah substansi hereditas atau unit pewarisan sifat yang menerima rangsangan *alpha-melanocyte stimulating hormone* (α -MSH) yakni suatu hormon di nukleus paraventricular hipotalamus yang akan menyebabkan penurunan asupan makanan atau menghasikan sinyal kenyang. Gen MC4R mengatur asupan makanan dengan mengintegrasikan sinyal agonis (kenyang) yang disediakan oleh α -MSH dan sinyal antagonis (*orexigenic*) yang disediakan oleh *agouti-related protein* (AgRP). Selain itu, sejumlah studi menunjukkan bahwa MC4R menunjukkan aktivitas penghambatan asupan makanan, yang mana AgRP bertindak sebagai agonis terbalik (sifat lapar) (Horn et al. 2003; Haskell-Luevano et al. 2001; Lubrano-Berthelie et al. 2003).

Gen MC4R ditemukan pada semua hewan dan manusia (Dubern 2015). Respon kerja dari gen MC4R yang terdapat pada hewan dan manusia berbeda-beda. Hal ini dikarenakan ada perbedaan basa (SNP) di dalam gen MC4R pada masing-masing individu. Gen MC4R akan memberikan efek konsumsi pakan yang

tinggi apabila berikatan dengan hormon AgRP, sebaliknya apabila berikatan dengan hormon α MSH akan memberikan respon kenyang dan berhenti makan. *Melanocortin-4 receptor* utamanya diekspresikan pada hipotalamus, dan terlibat dalam kontrol konsumsi pakan (Dubern 2015). Lebih dari 70 jenis mutasi MC4R pada manusia dan ternak yang menyebabkan berkurang sampai hilangnya fungsi MC4R (Tao 2005). Apabila MC4R tidak berfungsi maka tidak ada pengisyrat kekenyangan pada otak sehingga terjadi peningkatan asupan pakan. Peningkatan nafsu makan yang tidak disertai dengan peningkatan penggunaan energi menyebabkan terjadinya penimbunan energi dan mengarah pada obesitas. Pada tikus, bila gen MC4R tersebut ditiadakan (*knock out*) maka tikus akan mengalami obesitas (Huszar et al. 1997). Demikian juga pada babi, adanya mutasi gen MC4R menyebabkan peningkatan ketebalan lemak punggung (Kim et al. 2000; Kuehn et al. 2007). Mutasi MC4R pada manusia menyebabkan obesitas (Rankinen et al. 2006).

Gen *melanocortin-4 reseptor* (MC4R) memainkan peran penting dalam mengatur asupan makanan dan bobot badan pada sapi asli Korea (cokelat, belang-belang, dan hitam) (Lee et al. 2013). Gen penyandi MC4R dilaporkan oleh Yeo et al. (1998) sebagai gen yang berkontribusi atau berkaitan dengan obesitas akibat dari adanya mutasi pada gen tersebut. Fungsi gen MC4R adalah sebagai hormon adrenokortikotropik (ACTH) dan alpha-beta serta gamma MSH yang berperan penting dalam homeostatis energi dan pertumbuhan somatik, atau sebagai reseptor pada inti heptapeptida. Pertumbuhan somatik mempunyai peranan penting dalam pertumbuhan sapi yang dikendalikan oleh sistem yang kompleks. Gen-gen yang menjalankan pertumbuhan somatik bertanggung jawab terhadap pertumbuhan setelah ternak lahir. Gen MC4R beraksi terhadap homeostasis energi yang dimediasi oleh Alpha-MSH (Wan et al. 2012; Dubern 2015).

Eksresi gen MC4R juga erat kaitannya dengan gen leptin. Sekresi leptin diregulasi oleh jumlah cadangan lemak (Guyton & Hall 2006). Adanya jaringan adiposa yang banyak akan menstimulasi sekresi leptin sampai ke hipotalamus. Leptin tersebut berikatan dengan reseptor leptin pada dua kelas neuron. Kelas pertama adalah kelas neuron yang sensitif

terhadap leptin menghasilkan neuropeptida yang memicu nafsu makan (*orexigenic*) yaitu (neuropeptida Y (NPY) dan *agouti-related* protein (AgRP)). Kelas kedua adalah kelas neuron dengan reseptor leptin yang menghasilkan peptida yang menghambat nafsu makan (*anorexigenic*) yaitu hormon *alpha-melanocyte stimulating* (α -MSH) dan transkrip yang berhubungan dengan peptida *anoreksigenic* (CART).

LOKASI DAN PATHWAY GEN MC4R

Lokasi gen MC4R pada sapi adalah di kromosom nomor 24 yaitu pada posisi 59670121 sampai dengan 59671928. Panjang gen MC4R adalah 1808 *base pair* (bp) yang hanya terdiri dari 1 ekson yang merupakan daerah yang berisi kode genetik (*coding DNA sequence* = *coding region*). *CoDing Sequence* (CDS) diawali dengan kodon ATG pada posisi 214 dan diakhiri dengan kodon AAT pada posisi 1214 (GenBank Acc. No. AC_000181) (Zhang et al. 2009). Gen MC4R juga terdapat pada spesies kambing dan domba, dimana pada kambing lokasi gen MC4R juga berada pada kromosom nomor 24, namun posisinya beda yaitu terletak pada posisi 59345387 sampai dengan 59347443, selanjutnya panjang gen MC4R pada kambing dan domba adalah 2057 *base pair* (bp), serta hanya terdiri dari 1 ekson dengan GenBank Acc. No. NC_030831.1 (NCBI 2018).

Pathway dari gen MC4R dapat dilihat pada Gambar 1. Pada *pathway* tersebut dijelaskan bahwa ekspresi gen MC4R diawali oleh adanya populasi *neuron* di hipotalamus yang menyebarkan sinyal dari berbagai molekul (leptin, insulin, ghrelin) untuk mengontrol asupan makanan dan rasa kenyang. *Proopiomelanocortin* (POMC) neuron dalam *arcuate nucleus* diaktifkan oleh leptin dan insulin dan menghasilkan *melanocyte stimulating hormone* (α -MSH), kemudian mengaktifkan reseptor MC4R dalam inti *paraventricular*, sehingga menghasilkan sinyal kenyang. Selanjutnya, *neuropeptide Y* (NPY) dan *agouti-related* (AgRP) diaktifkan oleh LepR, ISR dan GHR menghasilkan hormon AgRP yang kemudian mengaktifkan reseptor MC4R dalam inti *paraventricular* menghasilkan sinyal lapar (Dubern 2015).

Gambar 1. Pathway Gen MC4R. POMC (*proopiomelanocortin*); LepR (reseptor leptin); ISR (reseptor insulin); GHR (reseptor ghrelin); NPY (*neuropeptide Y*); AGRP (*agouti-related protein*); SIM1 (*single-minded 1*); BDNF (*brain-derived neurotropic factor*); TRKB (*tyrosine kinase receptor*); PC 1 & 2 (*proconvertase 1 & 2*) (Dubern 2015)

IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN MC4R

Polimorfisme adalah keberadaan dua atau lebih alel pada sebuah lokus pada populasi (Elrod & Stanfield 2002). Beberapa teknik untuk identifikasi polimorfisme suatu lokus gen telah ditemukan. Beberapa metode analisis untuk mengidentifikasi variasi genetik secara molekuler pada beberapa jenis spesies dapat dilakukan dengan *randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)*, *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)*, analisis sidik jari (*finger printing*), minisatelit (VNTR atau *Variable Number Tandem Repeat*), mikrosatelit (STR atau *Short Tandem Repeat*) dan analisis DNA mitokondria, dan beberapa polimorfisme telah ditemukan pada gen MC4R sapi (Zhang et al. 2009; Haegeman et al. 2001; Thue et al. 2001; Valle et al. 2004). Variasi basa atau polimorfisme yang dihasilkan akibat adanya proses replikasi disebut *single nucleotide polymorphism (SNP)* yang dapat membedakan satu individu dengan lainnya (Zhang et al. 2009). Beberapa hasil penelitian tentang pasangan primer yang telah digunakan untuk *polymerase chain reaction (PCR)* gen MC4R beserta suhu annelingnya yang digunakan tersaji pada Tabel 2. Selanjutnya Tabel 3 menampilkan beberapa primer yang digunakan dan identifikasi SNP pada gen MC4R pada sapi dengan metode RFLP, sekuensing dan SSCP.

Identifikasi SNP pada gen MC4R digunakan untuk mendeteksi mutasi urutan nukleotida (polimorfisme) dalam DNA yang diamplifikasi (Amie-Marini et al. 2012) dan bagaimana pengaruhnya terhadap produktivitas ternak sapi. Pada Gambar 2 ditampilkan contoh dari referensi SNP berdasarkan penelitian Seong et al. (2016) yang menemukan 2 SNP (g. 927 C>T dan g. 1069 C>G) yang terletak pada ekson 1 gen MC4R (Genbank Acc. No. NC_007325). Selanjutnya, berdasarkan Fathoni (2016) dan Prihandini (2018) telah ditemukan 1 SNP g.1133 C>G berdasarkan Genbank Acc. No. EU366350.1.

Selanjutnya beberapa penelitian sapi lainnya menemukan beberapa SNP MC4R yaitu sebanyak lima SNP terdeteksi pada posisi 19 (C/A), 20 (A/T), 83 (T/C), 128 (G/A) dan 1069 (G/C)) pada delapan *breed* sapi (Simmental, Angus, Hereford, Charolais, Luxi, Jinnan, Qinchuan, dan Limousin), namun hanya lokus 1069 (G/C) yang merupakan lokus yang secara signifikan berasosiasi dengan ketebalan lemak (Huang et al. 2010). Beberapa polimorfisme telah ditemukan pada gen MC4R sapi Nanyang (Zhang et al. 2009); sapi Holstein merah (Haegeman et al. 2001); sapi hasil embrio transfer betina Limousin dan pejantan Charolais (Thue et al. 2001); sapi Angus, Charolais, Hereford, Limousin, Simmental, Holstein, Wagyu, Brahman (Valle et al. 2004).

Tabel 2. Primer dan suhu *annealing* program PCR gen MC4R (ekson 1) pada beberapa bangsa sapi

Rumpun sapi	Primer	Suhu <i>annealing</i>	Referensi
Sapi Qinchuan	F: 5'-TGACTCGGTGATCTGTAGC-3' R: 5'-TTCACCTCCATGCCCTACA-3'	58,9°C	Liu et al. 2010
Sapi Nanyang	F: 5'-AAAATCAGCAGCAGCGTC-3' R: 5'-ATTGGTGGGCATTCCGT-3'	65°C	Zhang et al. 2009
Tujuh bangsa sapi : sapi Nanyang, Qinchuan, Jinnan, Angus, Chinese Holstein, Luxi, dan Jiaxian	1: F: 5'-ACGGAATGCCCACCAATG-3' R: 5'-AACAAGACGCCCCGACACC-3' 2: F: 5'-TGTTGGTGAGCGTTTC-3' R: 5'-ATGGTCAGGGTAATCG-3' 3: F: 5'-CATCACCGTGTCTTCA-3' R: 5'-GCAGGGCATAAATCAG-3'	63°C	Zhang et al. 2006
Sapi Kebumen	F: 5'-GTCGGGCGTCTTGTTCATC-3' R: 5'-GCTTGTGTTTAGCATCGCGT-3'	58°C	Maharani et al. 2018
Sapi Simmental	F: 5'-TGGAGCGCATAGAAGATAGTG-3' R: 5'-AAGTGAGAACAAAAGAGCAAGC-3'	59°C	Du et al. 2013
Sapi Hanwoo	F : 5'-GTCGGGCGTCTTGTTCATC-3' R : 5'-GCTTGTGTTTAGCATCGCGT-3'	56,4°C	Seong et al. 2012
Sapi persilangan Kanada dan Amerika	F: 5'-GCAAAGACCTGCATGCCTCCGACT-3' R: 5'-CTGTCTCTGAGAAACACACATAGT-3'	58,9°C	McLean & Schmutz 2011
Delapan bangsa sapi : sapi Simmental, Angus, Luxi, Hereford, Charolais, Jinnan, Qinchuan, dan Limousin	F: 5'-TTGCTTGAACAAATTAATCTCTCT-3' R: 5'-CTGTGTAGGGCATGGAGTGA-3'	65°C	Huang et al. 2010

Gambar 2. Hasil deteksi beberapa SNP berdasarkan studi referensi dari hasil penelitian Seong et al. (2012), Fathoni (2016) dan Prihandini (2018)

Tabel 3. Beberapa primer yang digunakan dan identifikasi SNP pada gen MC4R dengan metode RFLP, sekuensing dan SSCP

Primer	Bagian	Produk PCR (bp)	SNP	Bangsa sapi	GenBank	Pustaka
F: 5'-TGA CTCGGT GATCTGTAGC-3' R: 5'-TTC ACTCCATGCCCTACA-3'	Ekson I	741	g. 1069C>G	lokal Korean		Lee et al. (2013)
F: 5'-AAAATCAGCAGCAGCGTC-3' R: 5'-ATTGGTGGGCATTCCGT-3'	Ekson I	514	g.-293C>G	Nanyang	NW_930353	Zhang et al. (2009)
F: 5'-TGGAGCGCATAGAAGATAGTG-3' R: 5'-AAGTGAGAACAAAAGAGAGCAAGC-3'	Ekson I	731	g.-129A>G C.746G A	Sapi potong	AF265221.1	Du et al. (2013)
F: 5'-GCTCTTTGTCTCTCCCGAGG-3' R: 5'-GCCAGCATGGTGAAGAACAC-3'	Ekson I	1808	G709A	Korean	NC_007325	Seong et al. (2012)
F: 5'-AGCAGCAGCGTCTGACACTC-3' R: 5'-ATGGTTTCCGACCCGTTG-3'	5'-Untranslated region dan ekson	51,4	-293C>G	Qinchuan	NW_001494269	Liu et al. (2010)
	Ekson			Qinchuan		Liu et al. (2010)
F: 5'-TGA CTCGGT GATCTGTAGC-3' R: 5'-TTC ACTCCATGCCCTACA-3'	Ekson dan 3'-flanking	58,9	129 A>G	Qinchuan	NW_001494269	Liu et al. (2010)
F: 5'-TTGACCCTCTGATTTATGCC-3' R: 5'-AATCCCAAATTGCCTGTGAG-3'		59,8	1069 C>G		NW_001494269	
F: 5'-TTGCTTGAACAAATTAATCTCTCT-3' R: 5'-CTGTGTAGGGCATGGAGTGA-3'	Ekson I	573	G1069C 19 (C/A) 1069 (G/C)	Sapi	NW_001494269,2	Huang et al. (2010)

IDENTIFIKASI GENOTIP (*GENOTYPING*) DAN ASOSIASINYA DENGAN SIFAT EKONOMIS

Genotyping merupakan istilah yang digunakan untuk menggambarkan proses identifikasi genotip pada individu menggunakan penanda DNA pada suatu lokus tertentu dalam genom (Eenennaam 2009). *Genotyping* adalah suatu proses penentuan perbedaan genotip dari individu satu dengan individu lain dengan menggunakan urutan atau *marker* DNA dari suatu gen target sebagai alat molekuler. Hasil *genotyping* juga dapat digunakan untuk menggambarkan distribusi alel dalam populasi sehingga dapat dilihat keragaman genetik dari populasi yang diteliti. Disamping itu, *genotyping* juga dapat digunakan untuk menentukan apakah populasi yang diteliti berada dalam keseimbangan menurut *Hardy Weinberg Equilibrium* (HWE). Hasil *genotyping* menggunakan *marker* DNA suatu gen target juga dapat digunakan untuk menggambarkan genotip masing-masing ternak yang diteliti (Eenennaam 2009). Penentuan genotip salah satunya dengan menggunakan metode *restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). Penentuan enzim restriksi (RE) untuk SNP tertentu dengan menggunakan program NEBcutter V2.0 dan berdasarkan hasil program NEBcutter V2.0 diperoleh RE tertentu yang dapat memotong basa nukleotida pada posisi SNP target. Gambar 3 menampilkan contoh hasil PCR-RFLP pada gen MC4R di bagian ekson 1 pada sapi Madura menggunakan enzim restriksi HpyCH4IV (Prihandini et al. 2019).

Analisis RFLP adalah salah satu teknik yang digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuens DNA. Selanjutnya sifat-sifat fenotip dari ternak-ternak yang diteliti dapat dianalisis hubungannya dengan genotip ternak berdasarkan gen tertentu. Apabila terdapat asosiasi yang signifikan antara genotip dan fenotip, maka marka DNA tersebut dapat dijadikan sebagai alat untuk seleksi ternak berdasarkan kriteria sifat yang diteliti.

Pada populasi sapi Madura menunjukkan adanya 2 SNP yaitu SNP g.1133C>G dan g.1108C>T pada gen MC4R (Prihandini. 2018). Diantara kedua SNP tersebut, SNP g.1133 C>G mempunyai pengaruh signifikan ($P<0,05$) terhadap lingkar dada, bobot badan dan tinggi gumba. Sapi Madura jantan dan betina umur 365 hari dengan genotip GG memiliki rata-rata lingkar dada, bobot badan dan tinggi gumba yang lebih tinggi dibandingkan yang memiliki genotip CG dan CC. SNP g.1133 C>G pada gen MC4R terdeteksi merubah asam amino dari valin menjadi leusin. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka SNP g.1133C>G pada gen MC4R dapat digunakan sebagai alat seleksi untuk sapi Madura berdasarkan sifat lingkar dada, bobot badan dan tinggi gumba. Penelitian mengenai hubungan gen MC4R dengan sifat-sifat pertumbuhan telah banyak

diteliti di berbagai ternak yaitu sapi dan domba (Tabel 1). Selanjutnya pada Tabel 4 ditampilkan hasil-hasil penelitian tentang efek gen MC4R terhadap sifat-sifat bobot badan pada sapi.

Tabel 4. Hasil-hasil penelitian tentang efek gen MC4R terhadap sifat-sifat bobot badan pada sapi

Spesies	Signifikansi Sifat	Referensi
Sapi Simmental	Pertambahan Bobot Badan (PBB)	Du et al. (2013)
Sapi China dan Angus	Bobot badan dan PBB	Zhang et al. (2009)
Sapi Madura	Bobot badan	Prihandini (2018)

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa MC4R-C1069G merupakan SNP yang secara signifikan terkait dengan ketebalan lemak, berat hidup dan berat karkas pada berbagai breed sapi (Zhang et al. 2009; Liu et al. 2010; Huang et al. 2010; Gill et al. 2010; Seong et al. 2012) (Tabel 1). Ternak yg bergenotip GG mempunyai sifat ekonomis lebih tinggi dibandingkan yang bergenotip GC dan CC. Pada sapi di Korea breed Luxi yang bergenotip GG memperlihatkan sifat-sifat ekonomis yang lebih baik dibandingkan sapi bergenotip CC. Bobot hidup, bobot karkas, ketebalan lemak punggung genotip GG lebih tinggi dibandingkan CG dan CC (Huang et al. 2010). Hasil yang sama untuk genotip GG pada sapi Hanwoo umur dewasa siap potong mempunyai bobot hidup lebih tinggi dan nilai pemuliaan bobot badan umur dewasa juga lebih tinggi (Seong et al. 2012). Sapi PO Kebumen yang mempunyai genotip GG ($66,34 \pm 6,73$ cm) ukuran panjang badan lahirnya tertinggi dibandingkan dengan genotip CC ($65,43 \pm 7,21$ cm) dan GC ($59,47 \pm 5,77$ cm) (Maharani et al. 2018). Namun demikian, beberapa peneliti lain menemukan bahwa sapi bergenotip CG justru lebih baik dibandingkan yang bergenotip GG (Liu et al. 2010; Seong et al. 2012). Pada sapi Qinchuan menunjukkan bahwa frekuensi genotip CG (0,54) lebih tinggi dibandingkan genotip CC (0,28) dan GG (0,18) (Liu et al. 2010). Selanjutnya, pada sapi Korean (*brown*), frekuensi genotip sama hasilnya dengan sapi Qinchuan yaitu 0,42; 0,19; dan 0,39 untuk masing-masing genotip CG, CC, dan GG (Seong et al. 2012). Hasil yang sama pada sapi Nanyang dan Jiaxian, frekuensi genotip CG lebih tinggi dibandingkan CC, dan ternak yang bergenotip CG mempunyai rata-rata pertambahan bobot badan harian dan bobot lahir lebih tinggi dibandingkan CC (Zhang et al. 2006), sedangkan genotip GG pada penelitian Zhang et al. (2006) ini tidak dianalisis karena pada populasi pengamatan hanya ditemukan genotip GG sebanyak 4 ternak.

Beberapa penelitian menunjukkan ada perubahan asam amino pada polimorfisme gen MC4R yaitu asam amino valin (Val) menjadi metionin (Met) yang mempengaruhi sifat kualitas karkas pada sapi Hanwoo (Seong et al. 2012). Mutasi pada lisin menjadi alanin mempengaruhi sangat tinggi pada sifat produksi susu (Lacorte et al. 2006). Mutasi gen MC4R pada babi menyebabkan perubahan asam amino dari leusin menjadi valin yang mempengaruhi sifat pertumbuhan dan kualitas karkas (Huang et al. 2010). Selanjutnya, polimorfisme gen MC4R pada sapi Kebumen mempengaruhi sifat pertumbuhan panjang badan lahir (Fathoni 2016; Maharani et al. 2018). Oleh karena itu, efek gen MC4R terhadap sifat pertumbuhan menunjukkan bahwa gen MC4R dapat dijadikan sebagai kandidat gen untuk sifat-sifat pertumbuhan. Sebaran frekuensi genotip dan alel pada gen MC4R berbagai bangsa sapi disajikan pada Tabel 5.

APLIKASI GEN MC4R SEBAGAI SELEKSI MOLEKULER PADA SAPI

Aplikasi pemanfaatan gen MC4R pada sapi dapat dilakukan berdasarkan hasil identifikasi genotip gen MC4R pada suatu populasi ternak. Genotip yang telah teridentifikasi diasosiasikan dengan sifat-sifat pertumbuhan yang terdapat pada populasi sapi yang akan diseleksi. Apabila hasil analisis asosiasi positif

pada sifat pertumbuhan tertentu, maka sifat pertumbuhan tersebut digunakan atau direkomendasikan sebagai kriteria seleksi, dan apabila satu genotip menunjukkan rata-rata pertumbuhan yang paling baik dibandingkan dengan genotip yang lain, maka sapi tersebut sebaiknya digunakan untuk kelompok inti. Oleh karena itu, seleksi secara molekuler merupakan seleksi awal pada ternak sehingga tetap diperlukan uji performan dan uji zuriat apabila akan memproduksi pejantan unggul (Putra & Indrastuti 2017). Keterkaitan polimorfisme gen MC4R (SNP g.1133 C>G) dengan sifat-sifat pertumbuhan menunjukkan hasil genotip dengan sifat pertumbuhan terbukti sudah ada hubungan yang positif (Prihandini et al. 2019).

Ternak genotip GG, CG dan CC adalah ternak yang darahnya sudah dianalisis dengan metode PCR-RFLP menghasilkan 3 tipe genotip (CC, CG dan GG) dengan ukuran fragmen yang berbeda pada masing-masing genotip. Ternak dengan genotip GG mempunyai pertumbuhan lebih baik dibandingkan CG dan CC (Prihandini et al. 2019). Genotip GG adalah ternak yang mempunyai dua fragmen DNA yang berukuran 175 bp dan 318 bp. Genotip CG memiliki tiga fragmen DNA berukuran 175 bp, 318 bp dan 493 bp. Genotip CC memiliki satu fragmen yaitu sama besar dengan ukuran produk PCR-nya yaitu 493 bp (Gambar 3).

Gambar 3. Hasil PCR-RFLP. Genotip CG (heterozygotes) dan GG (homozygotes) pada gen MC4R. S 3, 4 dan 11 adalah genotip GG. S 1, 2, 5, 6, 7, 8, dan 9 adalah genotip CG. S 10 adalah genotip CC. Ukuran *Marker* yang digunakan M:100-1500 bp (Prihandini et al. 2018 yang dimodifikasi)

Tabel 5. Sebaran frekuensi genotipe dan alel pada gen MC4R berbagai bangsa sapi

Ternak	Spesies	N	Frekuensi genotip			Frekuensi alel	
			CC	CG	GG	C	G
Sapi lokal Korea ¹	Brown	281	0,271(76)	0,523(147)	0,206 (58)	0,532	0,468
	Brindle	111	0,216(24)	0,595(66)	0,189(21)	0,513	0,487
	Black	21	-	0,714(15)	0,286(6)	0,357	0,643
	Nanyang	240	0,28	0,64	0,09	0,6	0,4
	Qinchuan	68	0,27	0,49	0,24	0,51	0,49
	Jiaxian	146	0,38	0,43	0,19	0,6	0,4
	Jinnan	43	0,43	0,57	0	0,72	0,28
	Angus	36	1	0	0	1	0
	Holstein	61	0,92	0,08	0	0,96	0,04
Sapi potong ²	Simmental	118	0,3051	0,4407	0,2542	0,5254	0,4746
Sapi Korean ³	Hanwoo	57	45,5	54,5	0	72,7	27,3
	Angus	37	82,4	17,6	0	91,2	8,8
Sapi lokal Korea ⁴ (g. -129 A>G)	Qinchuan	2	0,29	0,51	0,2	0,55	0,45
	Luxi	77	0,31	0,46	0,23	0,54	0,46
	Nanyang	40	0,5	0,45	0,05	0,73	0,27
	Xianan	86	0,45	0,36	0,19	0,63	0,37
	Jiaxian Red	71	0,45	0,46	0,09	0,68	0,32
	Angus	55	0,64	0,27	0,09	0,77	0,23
	Anxi	36	0,97	0,03	0	0,99	0,01
Sapi lokal Korea ⁵ (g. 1069 C>G)	Qinchuan	2	0,28	0,54	0,18	0,55	0,45
	Luxi	77	0,21	0,35	0,44	0,38	0,62
	Nanyang	40	0,03	0,52	0,45	0,29	0,71
	Xianan	86	0,16	0,41	0,43	0,37	0,63
	Jiaxian Red	71	0,21	0,41	0,38	0,42	0,58
	Angus	55	0,13	0,4	0,47	0,33	0,67
	Anxi	36	0,65	0,25	0,1	0,77	0,23
Sapi ⁶	Simmental	103	34,95	46,6	18,45		
	Angus	36	38,89	50	11,11		
	Hereford	24	20,83	62,5	8,33		
	Charolais	21	23,81	33,33	42,86		
	Luxi	20	45	30	25		
	Jinnan	16	25	25	50		
	Qinchuan	15	26,67	33,33	40		
	Limousin	10	10	70	20		

Sumber: ¹Lee et al. (2013); ²Kim et al. (2000); ³Seong et al. (2012); ⁴Liu et al. (2010); ⁵Liu et al. (2010); ⁶Huang et al. (2010)

Pada aplikasi seleksi memerlukan jumlah populasi yang efektif. Ukuran populasi yang efektif dapat dihitung berdasarkan rumus (Hill 1979; Barton et al. 2007; Futuyma 2013; Nielsen & Slatkin 2013).

Berdasarkan hasil penelitian Prihandini (2018) diperoleh tiga kelas, namun yang digunakan pada contoh aplikasi gen molekuler sebagai seleksi molekuler sapi adalah dua kelas yaitu kelas A dan B.

Pada kelas A betina induk dengan genotip 100% GG dan kelas A jantan 66,6% GG; 33,4% CG; 0% CC. Sedangkan kelas B jantan digunakan 55,6% GG; 33,33% CG dan 11,11% CC. Hasil penelitian ini didapatkan dari materi 268 ekor dengan 11 ekor jantan (Prihandini 2018).

Berdasarkan dua kelas itu dan kemampuan populasi di lapangan, maka dapat dibangun sistem breeding dengan populasi kecil untuk populasi yang efektif (Ne) sekitar 40 ekor. Dengan sistem *breeding* ini, maka akan diperoleh generasi pertama (G1) dengan komposisi ternak dengan genotip GG 61,13%, CG 33,36% dan CC 5,6% dengan perbandingan ternak jantan dan betina 178: 11 dan menghasilkan Ne ideal 41 ekor. Selanjutnya selama waktu berjalan, dalam generasi ke tiga program *breeding* ini akan menghasilkan ternak dengan genotip 100% GG.

KESIMPULAN

Penggunaan marka molekuler berupa gen MC4R untuk sifat pertumbuhan pada sapi potong dapat diaplikasikan dalam mengoptimalkan strategi perbaikan mutu genetik pertumbuhan. Upaya membangun sistem breeding pada populasi kecil dengan menggunakan gen MC4R pada generasi awal digunakan ideal populasi efektif yang mengurangi dampak negatif *inbreeding* dan pada generasi selanjutnya frekuensi gen dan frekuensi alel yang dituju akan dicapai 100% pada generasi ketiga. Hasil kajian molekuler tersebut diharapkan dapat dijadikan petunjuk dalam strategi pemanfaatan dan peningkatan mutu genetik pertumbuhan pada sapi potong.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfieri A, Pasanisi F, Salzano S, Esposito L, Martone D, Tafuri D, Daniele A, Contaldo F, Sacchetti L, Zagari A, Buono P. 2010. Functional analysis of melanocortin-4-receptor mutants identified in severely obese subjects living in Southern Italy. *Gene*. 457:35-41.
- Amie-Marini AB, Aslinda K, Mohd-Hifzan R, Muhd-Faisal AB, Musaddin K. 2012. HaeIII-RFLP polymorphism of growth hormone gene in Savanna and Kalahari goats. *Malays J Anim Sci*. 15:13-19.
- Al-Muhsen FA, Al-Nassir HS, Mirza S, Mnati AA. 2018. Association of growth hormone gene polymorphism with birth and weaning weight of Nuimi and Awassi sheep at Kerbala province. *J Biochem Tech*. 9:27-30.
- Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA, Goldstein DB, Patel NH. 2007. *Evolution*. 1st ed. New York (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Benoit S, Schwartz M, Baskin D, Woods SC, Seeley RJ. 2000. CNS melanocortin system involvement in the regulation of food intake. *Horm Behav*. 37:299-305.
- Butler AA. 2006. The melanocortin system and energy balance. *Peptides*. 27:281-290.
- Chung ER, Kim WT. 2005. Association of SNP marker in IGF-I and MYF5 candidate genes with growth traits in Korean cattle. *Asian-Aust J Anim Sci*. 18:1061-1065.
- De la Rosa Reyna XF, Montoya HM, Castrellón VV, Rincón AMS, Bracamonte MP, Ver WA. 2010. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genet Mol Res*. 9:875-883.
- Du X, Chen C, Yuan Z, Zhang L, Chen X, Wang Y, Gao X, Zhang L, Gao H, Li J, Xu S. 2013. Genetic polymorphisms of MC4R and IGF2 gene association with feed conversion efficiency traits in beef cattle. *J Pak Vet*. 33:418-422.
- Dubern B. 2015. MC4R and MC3R mutations. In: Frelut ML, editor. *The ECOG's eBook on child and adolescent obesity*. Available on ebook. *ecog-obesity*. eu 2-7.
- Eenennaam AV. 2009. *Basics of DNA markers and genotyping*. California (USA): Department of Animal Science, University of California.
- Elrod S, Stansfield W. 2002. *Genetika*. Diterjemahkan oleh Wulandari DT. Jakarta (Indonesia): Erlangga. hlm. 33-41.
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GSH, Lank EJ, Cheetham T, O'rahilly S. 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *New England J Med*. 348:1085-1095.
- Fathoni A. 2016. Estimasi parameter genetik sifat pertumbuhan dan identifikasi gen MC4R sapi Peranakan Ongole di Kabupaten Kebumen Jawa Tengah [Tesis]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Futuyma DJ. 2013. *Evolution*. 3rd ed. Massachusetts (USA): Sinauer Associates.
- Gill JL, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, Wiener P. 2010. Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Sci*. 86: 985-993.
- Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res*. 12: 222-231.
- Guyton AC, Hall JE. 2006. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia (USA): Elsevier Saunders. p. 871-875.
- Haegeman AF, Coopman K, Jacobs M, Mattheeuws A, Van Zeveren L, Peelman. 2001. Bovine melanocortin

- receptor 4:cDNA sequence, polymorphisms and mapping. *J Anim Genet.* 32:189-192.
- Haskell-Luevano C, Monck EK. 2001. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul Pept.* 99:1-7.
- Horn F, Bettler E, Oliveira L, Campagne F, Cohen FE, Vriend G. 2003. GPCRDB informative system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 31:294-297.
- Hernández N, Martínez-González JC, Parra-Bracamonte GM, Sifuentes-Rincón AM, López-Villalobos N, Morris ST, Briones-Encinia F, Ortega-Rivas E, Pacheco-Contreras VI, Meza-García LA. 2016. Association of polymorphisms in growth hormone and leptin candidate genes with live weight traits of Brahman cattle. *Genet Mol Res.* 15:gm15038449.
- Hill WG. 1979. A note effective population size with overlapping generations. *Genetics.* 92:317-322
- Hradecka E, Čitek J, Panicke L, Řehout V, Hanusova L. 2008. The relation of GH1, GHR and DGAT1 polymorphisms with estimated breeding values for milk production traits of German Holstein sires. *Czech J Anim Sci.* 53:238-245.
- Huang M, Gao X, Li JY, Ren HY, Chen JB, Xu SZ. 2010. Polymorphisms in MC4R gene and correlations with economic traits in cattle. *J Mol Biol Rep.* 37:3941-3944.
- Huszar D, Lynch CA, Huntress FV, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 88:131-141.
- Kuehn LA, Rohrer GA, Nonneman DJ, Thallman RM, Leymaster KA. 2007. Detection of single nucleotide polymorphisms associated with ultrasonic backfat depth in segregating Meishan x White Composite population. *J Anim Sci.* 85:1111-1119.
- Lacorte GA, Machado MA, Martinez ML, Campos AL, Maciel RP, Verneque RS, Teodoro RL, Peixoto MGCD, Carvalho MRS, Fonseca CG. 2006. DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. *Genet Mol Res.* 5:475-482.
- Lee Y, Park S, Kim H, Lee SK, Kim JW, Lee HK, Lee SJ. 2013. A C1069G SNP of the MC4R gene and its association with economic traits in Korean native cattle (brown, brindle and black). *Electron J Biotechnol.* 16:1-5.
- Li H, Deeb N, Zhou H, Mitchell AD, Ashwell CM, Lamont SJ. 2003. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with transforming growth factor- β genes. *Poult Sci.* 82:347-356.
- Liu H, Tian W, Zan L, Wang H, Cui H. 2010. Mutation of MC4R gene and its association with economic traits in Qinchuan cattle. *Mol Biol Rep.* 37:535-540.
- Lubrano-Berthelie C, Cavazos M, Duben B, Shapiro A, Stunff CL, Zhang S, Picart F, Govaerts C, Froguel P, Bougnères P, Clement K, Vaisse C. 2003. Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. *Ann NY Acad Sci.* 994:49-57.
- MacKenzie RG. 2006. Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides.* 27:395-403.
- Maharani D, Fathoni A, Sumadi, Hartatik T, Khusnudin M. 2018. Identification of MC4R gene and its association with body weigh and body size in Kebumen Ongole grade cattle. *J Ind Tropic Anim Agric.* 43:87-93.
- Malewa AD, Hakim L, Maylinda S, Husain MH. 2014. Growth hormone gene polymorphisms of Indonesia fat tailed sheep using PCR-RFLP and their relationship with growth traits. *Livest Res Rural Develop.* 26:115. Available from: <http://www.lrrd.org/lrrd26/6/male26115.htm>
- McLean KL, Schmutz SM. 2011. Melanocortin 4 receptor polymorphism is associated with carcass fat in beef cattle. *Can J Anim Sci.* 91:75-79.
- Nielsen R, Slatkin M. 2013. An introduction to population genetics: Theory and applications. London (UK): Macmillan Education.
- Pal A, Chakravarty AK, Bhattacharya TK, Joshi BK, Sharma A. 2004. Detection of polymorphism of growth hormone gene for the analysis of relationship between allele type and growth traits in Karan Fries cattle. *Asian-Aust J Anim Sci.* 17:1334-1337.
- Prihandini PW. 2018. Analisis potensi genetik sapi Madura di Kabupaten Pamekasan dan Loka Penelitian Sapi Potong Jawa Timur [Disertasi]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Prihandini PW, Sumadi, Suparta G, Maharani D. 2019. Melanocortin-4 Receptor (MC4R) gene polymorphism and its effect on growth traits in Madura cattle. *J Indones Trop Anim Agric.* 44:38-46.
- Putra WPB, Indriastuti R. 2017. Gen leptin sebagai gen potensial untuk seleksi molekuler pada sapi di Indonesia. *Wartazoa.* 3:105-116.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C. 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *J Obesity.* 14:529-644.
- Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. 2001. A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. *Diabetologia.* 44:1335-1338.
- Roth CL, Ludwig M, Woelfle J, Fan ZC, Brumm H, Biebermann H, Tao YX. 2009. A novel melanocortin-4 receptor gene mutation in a female patient with severe childhood obesity. *Endocrine.* 36:52-59.
- Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Thiele TE, van Dijk G, Baskin DG, Schwartz MW. 1997.

- Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature*. 390:349.
- Seong J, Lee HK, Suh DS, Kong HS, Park HD. 2012. Identification and analysis of MC4R polymorphisms and their association with economic traits of Korean cattle (Hanwoo). *Mol Biol Rep*. 5:3597-3601.
- Supakorn C, Mekchay S, Siripholvat V, Sopannarath P, Koonawootrittriron S, Tumwasorn S. 2007. Effect of genetic polymorphism of bovine growth hormone gene on preweaning growth traits in a Thai multibreed beef population. *Kasetsart J Nat Sci*. 41:484-492.
- Tao YA. 2005. Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 239:1-14.
- Thue TD, Schmutz SM, Buchanan FC. 2001. A SNP in the cattle MC4R gene is used to map MC4R to BTA 24. *Anim Genet*. 32:390-391.
- Tizioto PC, Meirelles SL, Tulio RR, Rosa AN, Alencar MM, Medeiros SR, Siqueira F, Feijó GLD, Silva LOC, Torres Junior RAA, Regitano LCA. 2012. Candidate genes for production traits in Nelore beef cattle. *Genet Mol Res*. 11:4138-4414.
- Valle E, Habermann FA, Moore SS, Crews DH, Benkel BF. 2004. Genomic localization and SNP discovery in the bovine melanocortin receptor 4 gene (MC4R). *Anim Genet*. 35:351-352.
- Yeo GSH, Farooqi S, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. 1998. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet*. 20:111-112.
- Zhang CL, Chen H, Wang YH, Lan XY, Zhang L, Zhang AL, Zhang RF. 2006. Association of a missense mutation of The MC4R gene with growth traits in cattle (brief report). *Archiv Fur Tierzucht*. 49:515-516.
- Zhang CL, Wang YH, Chen H, Lan XY, Lei CZ, Fang XT. 2009. Association between variants in the 50-untranslated region of the bovine MC4R gene and two growth traits in Nanyang cattle. *Mol Biol Rep*. 36:1839-1843.