

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Complex vertebral malformation (CVM) merupakan defisiensi genetik akibat adanya gen resesif autosomal pada sapi perah (Kanae *et al.* 2005). Penyakit ini pertama kali ditemukan di Denmark pada tahun 1999 (Agerholm *et al.* 2001). Dalam waktu singkat penyakit ini menyebar luas di beberapa negara, diantaranya Amerika Serikat (Duncan *et al.* 2001), Jepang (Nagahata *et al.* 2002), dan Swedia (Berglund *et al.* 2004). Gen dan situs mutasi penyebab CVM telah diidentifikasi oleh para peneliti di *Danish Institute of Agriculture Sciences* pada tahun 2001 (Čitek & Bláhová 2004).

Penyakit CVM disebabkan oleh substitusi guanin menjadi timin pada nukleotida 559 pada gen SLC35A3 ekson 4 (Kanae *et al.* 2005) yang mengkodekan UDP-N-asetilglukosamin transporter (Thomsen *et al.* 2006). Gen SLC35A3 memiliki 22404 pb terdiri dari tujuh ekson (No. Acc GenBank AY160683). Substitusi ini bersifat *missense mutation* yakni mutasi titik yang menyebabkan perubahan kodon triplet sehingga terjadi perubahan asam amino dan perubahan struktur protein (Gelehrter 1998). Mutasi ini menyebabkan perubahan asam amino valin menjadi fenilalanin pada asam amino 180 (V180F) (Ruśc & Kamiński 2007). UDP-N-asetilglukosamin transporter berperan penting dalam mekanisme pengontrolan pembentukan vertebra dari mesoderm paraksial yang tidak tersegmen. Akibatnya, molekul transporter yang berubah akan mengalami malformasi vertebra (Agerholm 2007).

Sapi penderita CVM mengalami sejumlah deformasi anatomi terutama pada bagian serviks dan toraks pada tulang belakang, reduksi tulang rusuk dan pemendekan tulang pada kaki depan dan belakang (Revell 2001). Perubahan morfologi yang utama pada sapi penderita CVM adalah pertumbuhan menjadi lambat, malformasi vertebra dan artrogriposis simetris bilateral yang mempengaruhi tulang carpal dan metacarpophalangeal. Malformasi vertebra dicirikan dengan hemivertebra, skoliosis, dan ankylosis pada tulang serviks dan toraks pada tulang belakang (Agerholm *et al.* 2001, 2004).

Persebaran CVM pada sapi Friesian-Holstein (FH) di Indonesia berkaitan erat dengan program inseminasi buatan (IB) yang mentransfer sumber nutfah dari pejantan unggul ke induk-induk betina di peternakan

sapi FH. Peneliti Denmark menemukan bahwa *Carlin-M Ivanhoe Bell*, sapi pejantan unggul FH yang lahir tahun 1974, berperan sebagai nenek moyang yang membawa mutasi ini (Agerholm *et al.* 2001). Bell menerima gen mutan dari induk jantannya yaitu *Pennstate Ivanhoe Star* yang lahir tahun 1963. Penggunaan sapi ini telah tersebar luas sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan frekuensi karier CVM sebesar 20-30% di berbagai peternakan di banyak negara (Thomsen *et al.* 2006).

Di Indonesia belum ada laporan penelitian mengenai CVM terutama pada sapi FH. Padahal, sumber sapi FH yang ada di Indonesia merupakan hasil impor dari luar yang sangat terbuka sekali peluang adanya gen mutan penyebab CVM. Peluang ini menjadi tinggi karena CVM tidak terdapat dalam sertifikat indukan.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi defisiensi genetik *complex vertebral malformation* pada sapi Friesian-Holstein di peternakan Pondok Rangon Jakarta, peternakan rakyat Lembang, Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang, dan Balai Pembibitan Ternak Unggul (BPTU) Baturraden menggunakan metode PCR-PIRA.

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan sejak bulan Maret hingga Juni 2008 di Laboratorium Zoologi Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel darah Friesian-Holstein yang digunakan merupakan koleksi Dr. Ir. Cece Sumantri, M. Agr. Sc. (FAPET IPB). Koleksi tersebut berupa koleksi beku sebanyak 28 sampel sel darah sapi FH betina asal BPTU Baturraden (tahun 2002), 29 sampel sel darah sapi FH betina asal peternakan Pondok Rangon Jakarta (tahun 2004), 30 sampel sel darah sapi FH jantan yang berasal dari BIB Lembang (tahun 2006), dan 34 sampel sel darah sapi FH betina asal peternakan rakyat Lembang (tahun 2007).

Metode

Ekstraksi dan isolasi DNA dilakukan menggunakan kit ekstraksi DNA (*GeneAid Genomic DNA Mini Kit*), dengan prosedur

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

sesuai dengan petunjuk produsen untuk sel darah segar ataupun beku. Sedangkan untuk sampel darah yang disimpan dalam alkohol, prosedur DNA dimodifikasi. Modifikasi dilakukan untuk membuang alkohol dari darah dan melisis sel menggunakan proteinase K.

Gen SLC35A3 diamplifikasi menggunakan mesin *Thermocycler (TaKaRa PCR Thermal Cycler MP4 – TaKaRa Biomedicals)*. Amplifikasi gen ini dilakukan secara *in vitro* menggunakan primer yang digunakan oleh Kanae *et al.* (2005) yaitu primer forward 5'-CAC AAT TTG TAG GTC TCA TGA CA-3' dan primer reverse 5'-CGA TGA AAA AGG AAC CAA AAG GG-3'. Campuran untuk mengamplifikasi gen SLC35A3 terdiri dari 10-100 ng DNA sapi FH, masing-masing primer sebanyak 0.1 µM, dNTP 0.01 mM, MgCl₂ 25 mM, dan *Taq* polimerase 1.25 unit. Reaksi PCR berlangsung pada kondisi pradenaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit yang dilanjutkan dengan 30 siklus (denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 56°C selama 1 menit dan ekstensi DNA pada suhu 72°C selama 1 menit), dan diakhiri dengan ekstensi akhir DNA pada suhu 72°C selama 10 menit.

Amplifikasi kedua dilakukan melalui teknik *Polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis* (PCR-PIRA). Amplifikasi ini dilakukan menggunakan primer forward 5'-CAC AAT TTG TAG GTC TCA CTG CA-3' dan primer reverse yang sama dengan amplifikasi pertama. Hasil produk amplifikasi pertama dicampur dengan bahan-bahan yang konsentrasinya seperti amplifikasi pertama. Reaksi PCR kedua berlangsung pada kondisi yang sama dengan PCR pertama.

Setelah dilakukan optimasi, amplifikasi dapat dilakukan hanya satu kali yaitu langsung menggunakan teknik PCR-PIRA. Amplifikasi yang dilakukan dua kali menghasilkan produk yang sama dengan amplifikasi satu kali.

Deteksi mutasi gen SLC35A3 dilakukan menggunakan enzim restriksi *Pst*I. Sebanyak 100 ng produk PCR dicampur dengan 0.4 µl buffer enzim *Pst*I, enzim *Pst*I sebanyak 3 unit, dan air steril sebanyak 0.4 µl. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam.

Visualisasi produk PCR dan hasil restriksi dilakukan menggunakan metode *polyacrilamide gel electrophoresis* (PAGE) 6% yang dilanjutkan dengan pewarnaan perak menurut Farajallah *et al.* (1998). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 200 V selama 60

menit dalam bufer 1x TBE (Tris 0.5 M, asam borat 0.5 M, dan EDTA 0.02 M).

Analisis frekuensi alel dilakukan berdasarkan pada perhitungan menurut Nei (1987), yaitu :

$$x_i = \frac{(2n_{ii} + n_{ij})}{2n}$$

- x_i = frekuensi alel A_i
 n_{ii} = jumlah individu bergenotipe A_iA_i
 n_{ij} = jumlah individu bergenotipe A_iA_j
 n = jumlah total individu

HASIL

Ekstraksi dan isolasi DNA telah dilakukan terhadap 121 sampel darah sapi FH untuk kemudian dilakukan amplifikasi dengan metode PCR. Sampel yang berhasil diamplifikasi sebanyak 111 sampel terdiri dari 30 sampel asal BIB Lembang, 28 sampel asal BPTU Baturraden, 34 sampel asal peternakan rakyat Lembang, dan 19 sampel asal peternakan Pondok Rangan Jakarta.

Amplifikasi DNA terhadap gen SLC35A3 menghasilkan produk sepanjang 287 pb (Gambar 1). Produk tersebut kemudian dipotong menggunakan enzim *Pst*I untuk mendeteksi adanya mutasi pada gen tersebut. Jika produk PCR yang dipotong dengan enzim *Pst*I menghasilkan potongan pita DNA sebesar 264 pb maka gen tersebut tidak mengalami mutasi (sapi normal, homozigot CC). Sedangkan jika produk PCR yang dipotong menghasilkan potongan pita sebesar 287 pb dan 264 pb maka gen tersebut mengalami mutasi (sapi karier, heterozigot Cc).

Penggunaan unit aktifitas enzim sampai berlebih dari seharusnya 1 unit dilakukan untuk memastikan bahwa semua sampel terpotong sempurna.

Setelah dilakukan genotiping terhadap sampel hasil restriksi, seluruh sampel menunjukkan pita 264 pb pada gel akrilamid sehingga diketahui bahwa sapi tersebut bersifat normal (genotipe homozigot CC) (Gambar 1).

PEMBAHASAN

Complex vertebral malformation merupakan defisiensi genetik pada sapi FH yang dapat dideteksi dengan metode PCR-PIRA. PCR-PIRA adalah salah satu metode yang digunakan secara luas untuk mendeteksi *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs)