

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.

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).

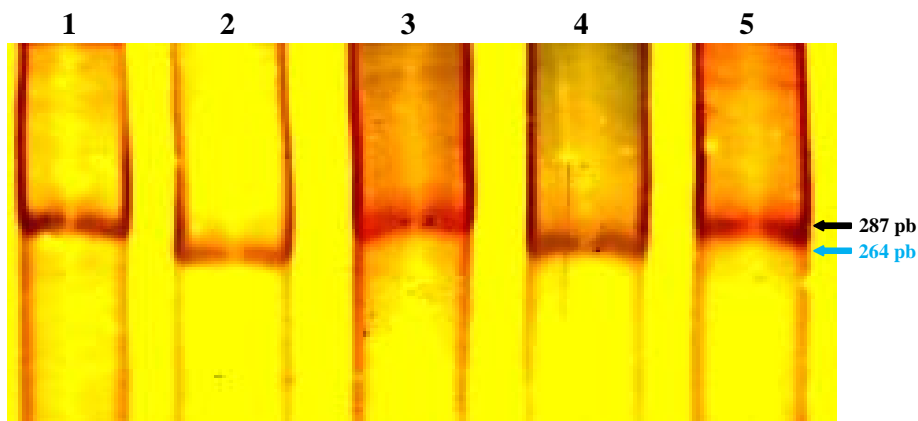
Penggunaan unit aktifitas enzim sampai berlebih dari seharusnya 1 unit dilakukan untuk memastikan bahwa semua sampel terpotong sempurna.

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)

- 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.



Gambar 1 Pita sekuen DNA hasil amplifikasi gen SLC35A3. Kolom 1,3,5 adalah produk PCR sebelum direstriksi *Pst*I sepanjang 287 pb dan kolom 2,4 adalah hasil restriksi *Pst*I sepanjang 264 pb.

AY160683	Bos taurus	solute carrier family 35 member 3 (SLC35A3)	gene
9841	gctggctcacaattttaggtctcatggca↓G/Tttctcacag catgttttcc cagtggcttt		
9901	gctgggggttt actttgagaa aatcttaaaa gaaaccaaac aatcagtgtg gataagaaac		
9961	attcaacttg gtaagtttta aatgttttct aacattactt ttaaagtgat tatattgtta		
10021	tatttaaaga tttctatgta tctttaatta aataaacctt ataaaaactg cttgttggtg		
10081	caaataaaat tttagaaaga acatttcaca tcccttttgg ttccttttcc atcgtggaat		

Gambar 2 Urutan basa nukleotida gen SLC35A3. Deret nukleotida yang diberi garis bawah merupakan situs penempelan primer. Basa 9871 merupakan titik mutasi, basa guanin (G) bila normal dan basa timin (T) bila termutasi. Tanda ↓ menunjukkan titik potong enzim *Pst*I. AY160683 merupakan nomor akses sekuen DNA yang disimpan dalam GenBank.

Tabel 1 Persentase sampel DNA normal dan karier CVM

Asal sampel	Jumlah sampel	Jumlah sampel teramplifikasi	Jumlah sampel normal (%)	Jumlah sampel karier (%)
Pondok Rangun Jakarta	29	19	19 (100%)	0 (0%)
BPTU Baturraden	28	28	28 (100%)	0 (0%)
BIB Lembang	30	30	30 (100%)	0 (0%)
Peternakan rakyat Lembang	34	34	34 (100%)	0 (0%)
Total	121	111	111 (100%)	0 (0%)

Tabel 2 Frekuensi alel CVM pada sampel teramplifikasi

Asal sampel	Jumlah sampel teramplifikasi	Alel C	Alel c
Pondok Rangun Jakarta	19	1	0
BPTU Baturraden	28	1	0
BIB Lembang	30	1	0
Peternakan rakyat Lembang	34	1	0
Total	111	1	0



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.

(Jacobson & Moskovits 1991). PCR-PIRA dilakukan dengan mengintroduksi situs restriksi artifisial menggunakan primer yang dimodifikasi (Kanae *et al.* 2005). Metode ini dilakukan karena tidak ada situs restriksi pada daerah yang termutasi pada gen SLC35A3. Metode tersebut dapat digunakan setelah Kanae *et al.* (2005) berhasil mendeteksi penyakit CVM pada sapi FH di Belanda.

Pada penelitian ini, jumlah sampel yang berhasil teramplifikasi sebanyak 111 sampel dari 121 sampel (Tabel 1). Prasetyo (2005) menyebutkan bahwa tingkat keberhasilan amplifikasi ditentukan oleh konsentrasi sampel DNA, *taq* polimerase, dinukleotida, ion Mg^{2+} , dan primer yang digunakan.

Deteksi mutasi DNA dengan metode PCR-PIRA menunjukkan bahwa seluruh sampel FH yang dideteksi bersifat normal (homozigot normal). Frekuensi alel C menurut Nei (1987) adalah 1 dan frekuensi alel c adalah 0 (Tabel 2).

Carlin M-Ivanhoe Bell telah diketahui sebagai pembawa mutasi ini. Bell juga karier terhadap penyakit genetik lain yaitu *Bovine leukocyte adhesion deficiency* (BLAD) (Čitek & Bláhová 2004). Hasil penelitian Najmal (2007) menunjukkan beberapa sapi asal BPTU Baturraden positif BLAD. Pendeteksian terhadap sapi yang sama menunjukkan hasil negatif terhadap CVM. Hal tersebut terjadi karena menurut Thomsen *et al.* (2006) gen yang bertanggung jawab terhadap CVM dan BLAD berada pada kromosom yang berbeda dan tidak saling terpaat.

Beberapa metode alternatif untuk mendeteksi CVM telah dilakukan oleh para peneliti. Selain enzim *Pst1*, Kanae *et al.* (2005) menggunakan *EcoT22I* untuk mendeteksi mutasi ini. *EcoT22I* memotong antara basa A dan T pada situs pemotongan ATGCA↓T. Pada kasus ini, kerja enzim *EcoT22I* berlawanan dengan *Pst1*. Jika produk PCR dapat dipotong oleh *Pst1* maka sapi tersebut negatif CVM (normal). Sedangkan jika produk PCR dapat dipotong oleh *EcoT22I* maka sapi tersebut positif CVM.

Selain dengan metode PCR-PIRA, penyakit genetik ini dapat dideteksi dengan metode lain yaitu *allele-specific polymerase chain reaction* (AS-PCR). Alel tipe liar (normal) dan CVM dapat dibedakan dengan mendeteksi pita amplifikasi menggunakan dua macam primer yang berbeda. Metode ini membutuhkan DNA polimerase yang spesifik dan stabil serta pengontrolan yang tinggi terhadap kondisi reaksi (Kanae *et al.* 2005).

Kejadian *complex vertebral malformation* berkembang luas ke berbagai negara setelah ditemukan pertama kali di Denmark. Penelitian yang dilakukan dengan metode molekuler menyebutkan adanya karier CVM di beberapa negara. Sebanyak 11868 sapi telah dideteksi di USA dan diketahui sebanyak 2108 sapi (17.76%) bersifat karier CVM (Holstein Association USA 2006). Persentase CVM karier tertinggi terdapat di Jepang yaitu sebesar 32.5% (Nagahata *et al.* 2002), di Denmark sebesar 31% (Thomsen *et al.* 2006), di Swedia sebesar 23% (Berglund *et al.* 2004), dan Jerman sebesar 13.2% (Konersmann *et al.* 2003).

Kelainan fungsi tubuh karena mutasi hanya terjadi pada satu bangsa atau spesies (Gelehrter *et al.* 1998). Sapi yang umumnya menderita CVM adalah jenis Friesian-Holstein (FH). Sapi FH berasal dari propinsi Belanda Utara dan Friesland Barat. Sapi ini pertama kali didatangkan ke Indonesia oleh pemerintah Hindia Belanda. Bangsa sapi ini merupakan keturunan dari nenek moyang sapi liar *Bos taurus*. Bangsa sapi FH murni warna kulitnya hitam dan putih atau merah dan putih dengan batas-batas yang jelas. Bangsa sapi FH merupakan penghasil susu tertinggi dibandingkan bangsa sapi perah lainnya di daerah tropis maupun subtropis dengan kadar lemak terendah. Produksi susu sapi FH di Indonesia rata-rata 10 liter per hari (Sudono 1999).

Sapi yang memiliki satu alel resesif secara fisik akan muncul sebagai sapi normal dan penampilan sapi itu tidak berbeda sama sekali, tetapi sapi tersebut akan menjadi karier CVM (Čitek & Bláhová 2004).

Walaupun tidak ditemukan sapi karier CVM pada penelitian ini, namun penyakit ini harus tetap diwaspadai. Deteksi dini secara genetik terhadap calon induk baik jantan maupun betina sangat diperlukan untuk mencegah penyebaran alel resesif CVM. Sperma pejantan yang dibeli dari luar negeri juga harus diperiksa dan wajib memiliki sertifikat bebas CVM dan penyakit genetik lainnya. Dengan demikian, manajemen perkawinan untuk menjaga kontinuitas produksi susu dapat dilakukan dengan benar.

Program inseminasi buatan yang dilakukan di peternakan-peternakan di berbagai negara yang semula bertujuan untuk memperoleh ternak yang unggul, akan berakibat fatal jika induk sapi yang digunakan bersifat karier terhadap penyakit genetik tertentu seperti CVM.