



# IDENTIFIKASI DEFISIENSI GENETIK *COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION* PADA SAPI FRIESIAN-HOLSTEIN

ERNA IKHTIARINI



DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2008

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

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.



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.

## ABSTRAK

ERNA IKHTIARINI. Identifikasi Defisiensi Genetik *Complex Vertebral Malformation* pada Sapi Friesian-Holstein. Dibimbing oleh ACHMAD FARAJALLAH dan CECE SUMANTRI.

*Complex vertebral malformation* (CVM) merupakan defisiensi genetik akibat adanya gen resesif autosomal pada sapi perah. Penyakit ini disebabkan oleh substitusi guanin menjadi timin pada nukleotida 559 pada gen SLC35A3 yang mengkodekan UDP-N-asetilglukosamin transporter. Mutasi ini menyebabkan perubahan asam amino valin menjadi fenilalanin pada asam amino 180 (V180F). 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. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi defisiensi genetik CVM pada sapi Friesian-Holstein menggunakan metode *Polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis* (PCR-PIRA). PCR-PIRA adalah metode yang digunakan untuk mendeteksi mutasi dengan mengintroduksi situs restriksi artifisial menggunakan primer yang dimodifikasi. Pada penelitian ini, 111 sapi Friesian-Holstein yang berasal dari peternakan Pondok Rangun Jakarta, peternakan rakyat Lembang, BIB Lembang, dan BPTU Baturraden telah dideteksi. Hasilnya menunjukkan bahwa seluruh sapi tersebut normal. 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.

## ABSTRACT

ERNA IKHTIARINI. Identification of Genetic Deficiency Complex Vertebral Malformation of Holstein-Friesian Cattles. Supervised by ACHMAD FARAJALLAH and CECE SUMANTRI.

Complex vertebral malformation (CVM) is genetic deficiency determined by autosomal recessive gene in cattles. It is due to the substitution of guanine by thymine at nucleotide position 559 in a SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter. This mutation results in the substitution of valine by phenylalanine at position 180 (V180F). Calves affected by this defect not only have numerous anatomic deformations, mainly within the cervical and thoracic part of the vertebral column, but also exhibit a reduced number of ribs and joint contractures in the front and hind legs. This research aims to identify genetic deficiency of CVM of Holstein-Friesian cattle using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA) method. PCR-PIRA is a method for detection of single nucleotide mutations by introducing artificial restriction endonuclease sites using primer containing mismatches. In this research, 111 calves from Pondok Rangun Jakarta, dairy-farming Lembang, BIB Lembang, and BPTU Baturraden are identified to be normal. Eventhough no CVM carrier calves were identified, the diseases still needs to be prevented. Early genetical detection in calves is extremely necessary to prevent the spreading of CVM recessive allele.



**IDENTIFIKASI DEFISIENSI GENETIK  
*COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION*  
PADA SAPI FRIESIAN-HOLSTEIN**

**ERNA IKHTIARINI**

Skripsi  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains pada  
Departemen Biologi

**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2008**

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.



Judul : Identifikasi Defisiensi Genetik *Complex Vertebral Malformation*  
pada Sapi Friesian-Holstein  
Nama : Erna Ikhtiarini  
NIM : G34104027

Menyetujui:

Pembimbing I,

Pembimbing II,

(Dr. Ir. Achmad Farajallah, M.Si)  
NIP 131 878 947

(Dr. Ir. Cece Sumantri, M.Agr.Sc)  
NIP 131 624 187

Mengetahui:

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Pertanian Bogor

Dr. drh. Hasim, DEA  
NIP 131 578 806

Tanggal Lulus:

- 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.



## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini dapat diselesaikan. Penelitian yang berjudul Identifikasi Defisiensi Genetik *Complex Vertebral Malformation* pada Sapi Friesian-Holstein ini dilaksanakan sejak bulan Maret 2008 hingga Juni 2008 di Laboratorium Zoologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Institut Pertanian Bogor (IPB).

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. Ir. Achmad Farajallah M.Si dan Dr. Ir. Cece Sumantri M.Agr.Sc selaku pembimbing atas saran dan bimbingannya dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan karya ilmiah ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Mas Wildan Najmal, Kusnandar, Bapak Khairul Mahfud, Ibu Nur Khabibah, Ibu Retno, Eryk Andreas, Pak Jhony dan seluruh keluarga besar Departemen Zoologi FMIPA IPB atas bantuannya selama ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Papa, Mama, Kak Riyan, dan Roni atas dukungan, doa dan kasih sayangnya. Terima kasih penulis sampaikan pula kepada teman-teman kos 177, Bioniq, Dyna Rochmyaningsih atas dukungan dan motivasinya dan sahabat-sahabatku tercinta di Biologi 41 atas kebersamaannya.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, Agustus 2008

*Erna Ikhtiarini*

### 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.



## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Jakarta pada tanggal 7 Desember 1986 sebagai anak kedua dari tiga bersaudara dari pasangan Ma'mun dan Hariroh. Pada tahun 2004, penulis lulus dari SMUN 60 Jakarta dan diterima di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Institut Pertanian Bogor (IPB) melalui Undangan Seleksi Masuk IPB (USMI).

Penulis aktif sebagai anggota Pengembangan Sumber Daya Manusia (PSDM) Himpunan Mahasiswa Biologi (Himabio) pada tahun 2005/2006, staf PSDM Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) IPB pada tahun 2006/2007 dan anggota Organisasi Kewirausahaan Mahasiswa Biologi (BIOWORLD) Divisi Tanaman Organik pada tahun 2006/2007.

Penulis menjadi asisten praktikum mata kuliah Biologi Dasar Tingkat Persiapan Bersama pada tahun 2007-2008, Mikrobiologi Dasar tahun 2007, dan Struktur Hewan tahun 2008. Pada tahun 2007, penulis melakukan praktik lapangan di PT Tunas Agro Lestari, Ciawi, Bogor.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

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.



- 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.

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN .....	vii
PENDAHULUAN .....	1
Latar Belakang .....	1
Tujuan .....	1
Waktu dan Tempat .....	1
BAHAN DAN METODE .....	1
Bahan .....	1
Metode .....	1
HASIL .....	2
PEMBAHASAN .....	2
SIMPULAN .....	5
SARAN .....	5
DAFTAR PUSTAKA .....	5



- 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.

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
1. Persentase sampel DNA normal dan karier CVM.....	3
2. Frekuensi alel CVM pada sampel teramplifikasi .....	3

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
1. Pita sekuen DNA hasil amplifikasi gen SLC35A3.. ..	3
2. Urutan basa nukleotida gen SLC35A3.....	3





## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Ankylosis	: Penyatuan tulang, umumnya disebabkan oleh penyakit
Arthrogyposis	: Penyakit yang dibawa sejak lahir yang menyebabkan pemendekan tulang dan dicirikan dengan lemah otot dan fibrosis
Carpal	: Pergelangan ; berhubungan dengan tulang pada pergelangan
Genotiping	: Penentuan genotip
Hemivertebra	: Kelainan bentuk vertebra yang menyebabkan terbentuknya sudut pada tulang belakang
Metacarpal	: Tulang kaki depan, antara pergelangan dan digit
Metacarpophalangeal	: Tulang antara metacarpal dan phalang
Mutasi resesif autosomal	: Mutasi yang terjadi pada sel autosom dan menghasilkan fenotipe yang tidak terdeteksi
Phalang	: Tulang jari tangan atau kaki
Skoliosis	: Lengkungan pada tulang belakang
SLC35A3	: <i>Solute carrier family 35 member 3</i>
Serviks	: Tulang belakang yang berada di belakang tengkorak
Toraks	: Tulang belakang yang berada di bagian tengah, antara serviks dan lumbar
Vertebra	: Tulang belakang

### 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.

## 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.

## 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, MgCl<sub>2</sub> 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). Elektrofesis 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).

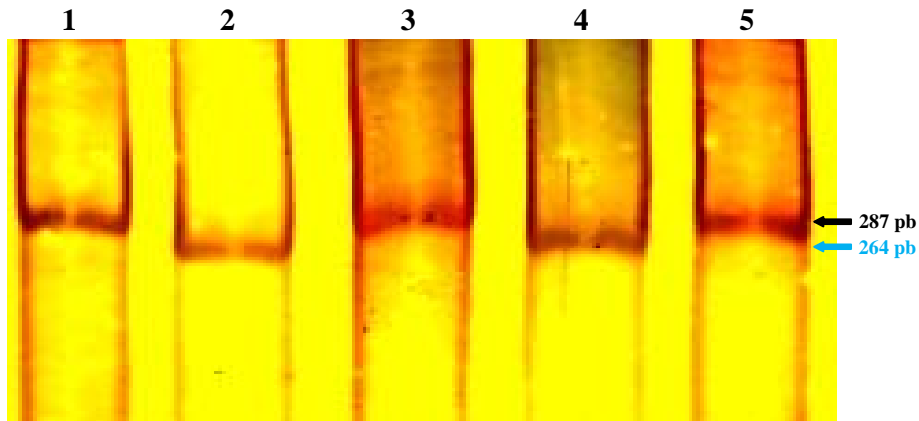
Penggunaan unit aktifitas enzim sampai berlebih dari seharusnya 1 unit dilakukan untuk memastikan bahwa semua sampel terpotong sempurna.

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.

## SIMPULAN

Deteksi mutasi DNA dengan metode PCR-PIRA menunjukkan bahwa seluruh sapi FH yang dideteksi bersifat normal. Deteksi dini secara genetik terhadap sapi perah sebelum dikawinkan sangat diperlukan untuk mencegah penyebaran alel resesif CVM.

## SARAN

Identifikasi CVM perlu dilakukan terhadap sapi perah di BIB dan BPTU lain di Indonesia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O, Arnbjerg J. 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J Vet Diagn Invest* 13: 283-289.
- Agerholm JS, Bendixen C, Arnbjerg J, Andersen O. 2004. Morphological variation of complex vertebral malformation in Holstein calves. *J Vet Diagn Invest* 16: 548-553.
- Agerholm JS. 2007. Complex vertebral malformation syndrome in Holstein cattle : the story so far. *Acta Vet Scand* 49 (suppl 1) : S5.
- Berglund B, Persson A, Stalhammar H. 2004. Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle. *Acta Vet Scand* 45: 161-165.
- Čítek J, Bláhová B. 2004. Recessive disorders-a serious health hazard?. *J Appl Biomedic* 2:187-194.
- Duncan RB, Carrig CB, Agerholm JS, Bendixen C. 2001. Brief communications Complex vertebral malformation in a Holstein calf: report of a case in the USA. *J Vet Diagn Invest* 13: 333-336.
- Farajallah A, Suryobroto B, Takenaka O. 1998. Nucleotide sequence of whole mitochondrial DNA of a soft-shelled turtle, dogania, and PCR RFLP analysis of cytochrome B gene. Prosiding of The Tokyo International Forum on Conservation and Sustainable Use of Tropical Bioresources. New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) and Japan Bio Industry Association (JBA).
- Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. 1998. *Principles of Medical Genetics*. Ed ke-2. USA : Williams & Wilkins.
- Jacobson DR, Moskovits T. 1991. Rapid, nonradioactive screening for activating *ras* oncogene mutations using PCR-primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). *PCR Meth. Appl* 1:146-148.
- Kanae Y, Endoh D, Nagahata H, Hayashi M. 2005. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis. *J Vet Diagn Invest* 17:258-262.
- Konersmann Y, Wemheuer W, Brenig B. 2003. Origin, distribution and relevance of the CVM defect within the Holstein Friesian population. *Zuechtungskunde* 75: 9-15.
- Nagahata H *et al.* 2002. Complex vertebral malformations in a stillborn Holstein calf in Japan. *J Vet Med Sci* 64: 1107-1112.
- Najmal W. 2007. Frekuensi Alel Subunit CD18 Sapi Friesian-Holstein (FH) pada Peternakan di Lembang dan BPTU Baturraden. [skripsi]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York : Columbia University Pr.
- Prasetyo A. 2005. Metode ekstraksi DNA dan identifikasi gen kappa kasein (K-kasein) pada sapi Friesian Holstein (FH) di peternakan rakyat. [skripsi]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Revell S. 2001. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. *Vet Rec* 149:659-660.
- Ruść A, Kamiński S. 2007. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet* 48(3): 247-252.
- Sudono A. 1999. *Ilmu Produksi Ternak Perah*. Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Thomsen B, *et al.* 2006. A missense mutation in the bovine *SLC35A3* gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res* 16: 97-105.

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.



#### 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.