

IDENTIFIKASI ALEL PEMBAWA *BOVINE LEUCOCYTE ADHESION DEFICIENCY* (BLAD) PADA SAPI PERAH FRIESIAN HOLSTEIN DI INDONESIA

(Identification of Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) on Friesian Holstein Dairy Cow in Indonesia)

ACHMAD FARAJALLAH¹, CECE SUMANTRI^{2,3} dan WILDAN NAJMAL MUTTAQIN¹

¹Departemen Biologi FMIPA Institut Pertanian Bogor

Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor

³Pusat Penelitian Hewan Tropika Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

Bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD) or granulocitopathy is a genetic disease of dairy cow caused by mutation on the exon point 2 of CD18 gene so that heterodimer $\beta 2$ integrin molecule failed to present on the neutrophil surface at the case of homozygote recessive gene. This case caused a lethal death. This study was aimed to identify BLAD heterozygote on Friesian Holstein offsprings in Baturraden and Lembang. Detection method using PCR-RFLP was employed in this study since this particular method is accurate in detecting BLAD heterozygote. Two out of 20 cows with BLAD heterozygote were found in Lembang (from 61 cows). It is concluded that there is only 2.4% case of BLAD heterozygote found in Indonesia.

Key Words: BLAD, Dairy Cow

ABSTRAK

Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) atau sindrom granulositopati adalah penyakit genetik pada sapi yang disebabkan oleh kejadian mutasi titik pada ekson 2 gen CD18 sehingga tidak mengekspresikan molekul heterodimer $\beta 2$ integrin yang seharusnya ada di permukaan neutrofil. Pada kondisi homozigot resesif, mutasi ini menyebabkan lethal atau mati dini pada sapi. Tujuan penelitian adalah mengidentifikasi sapi-sapi pembawa alel BLAD (heterozigot) pada sapi-sapi perah peranakan Holstein yang ada di Baturraden dan Lembang menggunakan metode deteksi PCR-RFLP. Metode identifikasi berdasarkan PCR-RFLP adalah metode yang handal untuk mendeteksi keberadaan sapi heterozigot BLAD. Sapi heterozigot BLAD hanya ditemukan 2 ekor di Baturraden dari 20 sapi yang dianalisis, sedangkan pada sapi di Lembang (61 ekor) tidak ditemukan adanya alel BLAD. Disimpulkan, frekuensi sapi heterozigot BLAD di Indonesia sebesar 2,4%.

Kata Kunci: BLAD, Sapi Perah

PENDAHULUAN

Bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD) atau sindrom granulositopati adalah penyakit genetik pada sapi yang disebabkan oleh tidak terekspresinya molekul heterodimer $\beta 2$ integrin yang seharusnya ada di permukaan neutrofil. Integrin adalah molekul adhesi yang terlibat dalam mekanisme diapedesis neutrofil keluar dari pembuluh darah ke dalam jaringan untuk membunuh patogen yang masuk ke dalam tubuh (SHUSTER *et al.*, 1992). Sindrom genetik ini pada sapi bersifat lethal atau mati

dini. Didikte oleh kasus yang sama pada manusia, yaitu *leukocyte adhesion defisiensi* (LAD), SHUSTER *et al.* (1992) berhasil mengungkapkan dasar molekular kejadian defisiensi pada sapi, yaitu disebabkan oleh mutasi pada gen CD18 yang dalam aksinya berinteraksi dengan gen CD11 untuk menyandikan subunit $\beta 2$ integrin. Mutasi tersebut adalah substitusi A menjadi G pada ekson 2 dari gen CD18 yang mengubah asam amino glisin menjadi asam aspartat pada posisi polipeptida ke 128 (D128G). Hanya mutasi D128G saja yang ternyata mengganggu

ekspresi gen CD18 sedangkan beberapa mutasi titik lainnya tidak berpengaruh sebagaimana dilaporkan oleh VIANA *et al.* (1998) dan CZARNIK *et al.* (2004).

Hasil identifikasi posisi mutasi diatas, SHUSTER *et al.* (1992) kemudian membuatkan metode identifikasi genotip sapi normal dan sapi BLAD, yaitu PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) dengan enzim restriksi HaeIII dan TaqI. Ternyata defisiensi ini hanya ditemukan pada sapi Holstein dan keturunannya. Penyebaran defisiensi ini bisa meluas ke seluruh dunia akibat aktivitas inseminasi buatan (IB) menggunakan pejantan elite yang ternyata sebagai pembawa alel BLAD (alel mutan).

Dalam tulisan ini kami mencoba melakukan identifikasi sapi-sapi pembawa alel BLAD ini pada sapi-sapi perah peranakan Holstein yang ada di Baturaden dan Lembang menggunakan metode deteksi PCR-RFLP yang telah dikembangkan oleh SHUSTER *et al.* (1992) dan dimodifikasi oleh NAGAHATA *et al.* (1994). Diharapkan hasil identifikasi ini bisa digunakan sebagai landasan pemilihan bibit dalam program memperkecil perluasan defisiensi yang merugikan pada sapi perah di Indonesia.

MATERI DAN METODE

Pengujian alel-alel BLAD dilakukan terhadap 81 sampel sapi perah FH dari BPTU Baturaden yang dikoleksi tahun 2002 sebanyak 20 sampel dan Peternakan Sapi Perah Lembang sebanyak 61 sampel (30 sapi betina dan 31 sapi jantan). Sapi perah BPTU Baturaden dilengkapi dengan produksi susu yang dicatat selama 305 hari. Sampel darah sebagai sumber DNA diambil dari vena jugularis menggunakan *vacutainer* berheparin sekitar 5 ml. Porsi buffy coat dari darah dipisahkan dan disimpan dalam alkohol 70% dalam EDTA 1 mM sampai dikerjakan lebih lanjut.

Sebagian besar ekstraksi DNA dilakukan dari *buffy coat* mengikuti metode baku SAMBROOK *et al.* (1989). Setelah alkohol sebagai penyimpan dicuci 2 kali menggunakan bufer TE (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0). Sekitar 100 μ l *buffy coat* dilisis dengan SDS 1% dalam bufer 1xSTE dan sekaligus didigesti dengan proteinase K 0.3 mg/ml.

Ekstraksi DNA dilanjutkan dengan metode fenol dan pengendapan alkohol. Beberapa sampel DNA sapi jantan dari Lembang diekstraksi menggunakan *Genomic-DNA extraction kit* (Real Biotech Corp.).

Pengujian alel-alel BLAD dilakukan berdasarkan metode deteksi PCR-RFLP menggunakan sepasang primer BLAD-FW5'-tca acg tga cct tcc gga gg-3' dan BLAD-RV 5'-ccc agc ttc ttg acg ttg ac-3' (ZSOLNAI dan FESÜS, 1996). Primer ini memperbanyak ruas ekson 2 gen CD18 sebesar 106 bp yang bertanggungjawab terhadap munculnya BLAD. Sekitar 10 – 100 ng sampel DNA dijadikan cetakan dalam reaksi PCR bervolume 12,5 μ l dengan pereaksi terdiri atas campuran dNTP 60 μ M, Taq polimerase (TaqPlus Genray Technology) 0,75 unit beserta sistem bufernya dan masing-masing primer 1 nM. Kondisi PCR menggunakan mesin thermocycler TAKARA MP4 adalah 94°C 5 menit, 30 siklus dari 94°C 1 menit - 56°C 1 menit - 72°C 1 menit, dan pemanjangan akhir 72°C 7 menit. Ada tidaknya produk PCR diuji dengan PAGE 5% (polyacrylamide gel electrophoresis 29 : 1) dalam bufer TBE 180 mV 30 menit yang dilanjutkan dengan pewarnaan perak (FARAJALLAH *et al.*, 1998).

Sebanyak 3 μ l DNA produk PCR kemudian dicampur dengan enzim restriksi *HaeIII* (New England Biolabs) sebanyak 1 unit dan diinkubasi pada suhu 37°C selama minimal 2 jam. Penentuan alel-alel BLAD dilakukan dengan PAGE 6% yang dilanjutkan dengan pewarnaan perak.

Jika produk PCR memperlihatkan situs pemotongan *HaeIII* dengan menghasilkan pita DNA berukuran 85 bp dan 21 bp berarti gen homozigot normal (sapi normal). Sedangkan jika masih menyisakan pita DNA yang tidak terpotong dengan ukuran 106 bp selain DNA berukuran 85 bp dan 21 bp berarti gen heterozigot (sapi pembawa alel BLAD). Untuk membedakan kondisi heterozigot dari *incomplete digestion* maka pada sampel-sampel yang memperlihatkan gejala heterozigot dipotong ulang dengan melipatduakan konsentrasi enzim restriksi *HaeIII* menjadi 2 unit, dan juga dengan memperlama waktu inkubasi menjadi *overnight*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produk PCR menggunakan BLAD-FW dan BLAD-RV menghasilkan ruas DNA sebesar 106 bp. Kondisi reaksi PCR yang menghasilkan pita DNA tunggal tidak bisa membedakan sampel DNA yang diperoleh dengan metode baku maupun menggunakan *DNA-extraction* kit. Suhu penempelan primer optimum adalah 56°C walaupun masih memberikan pita bayangan halus pada posisi antara 1200 – 1500 bp. Jika dibandingkan dengan DNA *ladder* 100 bp (Biorad) dan resolusi pewarnaan perak maka DNA bayangan berukuran 1200 bp berada pada konsentrasi jauh dibawah 10 pg per 2 µl produk PCR, sedangkan DNA target berukuran 106 bp sangat tebal (>300 pg per 2 µl produk PCR).

Semua sampel asal Lembang (30 ekor betina dan 31 ekor jantan) yang telah dianalisis mempunyai genotip homozigot dominan yang normal; sedangkan dua dari 20 sampel sapi FH betina dari Baturaden mempunyai genotip heterozigot. Dengan begitu, frekuensi sapi pembawa alel BLAD atau heterozigot di Indonesia adalah 2,4%. Frekuensi genotip mencapai 10% untuk sapi FH Baturaden tampaknya bias terlalu tinggi akibat jumlah sampel yang dianalisis masih terlalu sedikit. Dalam pengujian ini tidak ditemukan adanya genotip homozigot resesif. Hal ini wajar karena sapi dengan genotip homozigot resesif tidak berumur panjang atau mati dini.

Sapi dengan genotip heterozigot berarti sapi tersebut membawa alel BLAD positif. Frekuensi alel BLAD untuk sapi FH Lembang 0% dan untuk sapi FH Baturaden 5%. Jika kedua populasi digabung, frekuensi alel BLAD untuk sapi FH di Indonesia menjadi 1,2%. Kedua sapi pembawa alel BLAD tersebut adalah sapi betina dengan catatan produksi susu harian mencapai 14,5 dan 15,1 l/hari, dan rata-rata produksi susu populasi sebesar 13,6 ($\pm 3,2$) l/hari. Hal ini menunjukkan bahwa alel BLAD tidak mempengaruhi produksi susu. Dilihat dari catatan induk, tetua keduanya didatangkan ke BPTU Baturaden sebelum tahun 1989, yaitu nenek keduanya bertanggal tahun 1987 dan tahun 1989. Sayangnya sekali catatan bapak keduanya tidak bisa tidak terdeteksi walaupun ada indikasi keduanya berasal dari dua bapak sperma yang sangat

berbeda, baik tahun masuk maupun negara asalnya.

Metode identifikasi alel BLAD

Mutasi titik sebagai *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada gen CD18 pada sapi yang membedakan alel normal dan alel BLAD pertama dikembangkan oleh SHUSTER *et al.* (1992). Pada awalnya ruas gen dengan SNP yang diamplifikasi dengan PCR berukuran sebesar 58 bp. Pada sapi normal, jika produk PCR dipotong dengan enzim restriksi *HaeIII* (GGCC) akan menghasilkan ruas DNA sebesar 9 bp dan 49 bp, dan dengan enzim restriksi *TaqI* (TCGA) akan menghasilkan ruas DNA sebesar 26 bp dan 32 bp. Kondisi diatas disebut dengan normal homozigot. Jika pada situs-situs pemotongan kedua enzim diatas mengalami mutasi maka produk PCRnya tidak terpotong yang disebut dengan kondisi resesif homozigot. Akan disebut heterozigot jika ditemukan adanya ruas DNA sebesar 9 bp, 49 bp dan 58 bp. Metode SHUSTER *et al.* (1992) ini kemudian dimodifikasi oleh NAGAHATA *et al.* (1993) dengan menggeser primer BLAD-RV ke arah 3' sehingga diperoleh produk PCR dengan ukuran yang lebih besar, yaitu 109 bp. Hal itu dimaksudkan untuk lebih mempermudah membedakan ruas DNA produk PCR dan ruas DNA hasil pemotongan dengan sisa-sisa primer. Malah CZARNIK dan KAMINSKI (1997) dan PATEL *et al.* (2007) memodifikasi desain primer yang lain sehingga produk PCR menjadi 367 bp.

Modifikasi lebih lanjut dilakukan oleh ZSOLNAI dan FÉSÜS (1996) dengan cara mendesain ulang primer sehingga menghasilkan produk PCR 106 bp dan hanya menggunakan satu enzim restriksi *HaeIII* sebagaimana yang telah diikuti penelitian ini. Desain ulang primer yang telah dilakukan pada dasarnya untuk menghindari pembentukan dupleks antar primer dalam usaha peningkatan efisiensi genotyping dua gen sekaligus (multiplex PCR), yaitu BLAD dan kappa-kasein.

Untuk tujuan genotyping massal, penelitian ini telah berhasil membuat volume reaksi PCR minimal, yaitu 12.5 µl, sehingga bisa menghemat komponen-komponen pereaksi PCR. Selain itu, teknik visualisasi DNA

menggunakan PAGE 6% yang dilanjutkan dengan pewarnaan perak mempunyai resolusi yang memadai untuk konsentrasi DNA <10 ng/pita (SAMBROOK *et al.*, 1989; AVISE, 1994). Sedangkan jika menggunakan agarosa dengan pewarnaan ethidium bromida membutuhkan konsentrasi DNA >100 ng/pita

Frekuensi genotip dan Alel BLAD

Frekuensi sapi heterozigot BLAD di Baturaden dan Lembang sebesar 2,4% masih termasuk dalam kisaran seperti di beberapa negara lain (Tabel 1). Alel BLAD ini menyebar luas ke seluruh dunia setelah aplikasi teknologi inseminasi buatan menjadi sangat populer. Permintaan sperma pejantan elite untuk meningkatkan kualitas produksi susu di seluruh dunia pada awalnya tidak diikuti dengan kekhawatiran menyebarnya penyakit genetik ini oleh sapi-sapi heterozigot BLAD sebagai pembawa. Salah satu pejantan elite yang paling banyak digunakan dan ternyata heterozigot BLAD adalah Ivanhoe Bell dari Amerika Utara (SHUSTER *et al.*, 1992). Sejak itu, alel BLAD masuk ke berbagai negara yang mengembangkan ternak perah Holstein dan Peranakan Holstein. Sampai sejauh ini, berbagai usaha identifikasi pada ternak sapi selain Holstein dan Peranakan Holstein belum ditemukan adanya alel BLAD.

Tabel 1. Frekuensi Sapi Holstein dan Peranakan Holstein heterozigot BLAD di beberapa negara

Lokasi	Jumlah sampel	Frekuensi (%)	Pustaka
Indonesia	81	2,4	Penelitian ini
India	711	3,23	PATEL <i>et al.</i> (2007)
Turki	120	1,67	AKYÜZ dan ERTURUL (2006)
Iran	30	3,33	NOROUZY <i>et al.</i> (2005)
Jepang	796	8,79	NAGAHATA <i>et al.</i> (1996)

Dalam program menurunkan pengaruh negatif BLAD maka yang bisa dilakukan adalah mengidentifikasi sapi-sapi heterozigot

dan mencegahnya agar tidak mengawini induk-induk betina yang juga heterozigot. Dari berbagai uji performan, sapi heterozigot BLAD ternyata masih menampilkan performan produksi yang normal (PATEL *et al.*, 2007; NOROUZY *et al.* 2005; CZARNIK dan KAMINSKI 1997; SIPES *et al.* 1999; JANOSA *et al.* 1999). Hasil penelitian ini juga memperlihatkan bahwa sapi heterozigot BLAD mempunyai catatan produksi susu harian mencapai 14,5 dan 15,1 l/hari, dan rata-rata produksi susu populasi sebesar 13,6 (\pm 3,2) L/hari.

KESIMPULAN

Metode identifikasi berdasarkan PCR-RFLP adalah metode yang handal untuk mendeteksi keberadaan sapi heterozigot BLAD. Primer yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan produk PCR sebesar 106 bp. Hasil pemotongan DNA produk PCR dengan enzim *HaeIII* pada sapi normal menghasilkan pita DNA berukuran 85 bp dan 21 bp, sedangkan pada sapi heterozigot BLAD menghasilkan pita DNA berukuran 85 bp, 21 bp dan 106 bp.

Sapi heterozigot BLAD hanya ditemukan 2 ekor di Baturaden dari 20 sapi yang dianalisis, sedangkan pada sapi di Lembang (61 ekor) tidak ditemukan adanya alel BLAD. Dengan begitu, frekuensi sapi heterozigot BLAD di Indonesia sebesar 2.4%.

DAFTAR PUSTAKA

- AKYÜZ, B. and O. ERTURUL. 2006. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Turkish native and Holstein cattle. *Acta Vet. Hung.* 54(2): 173 – 178.
- FARAJALLAH, A., B. SURYOBROTO and T. PUNTORINI. 1998. Analisis Keragaman Genetik dan Filogeni Molekular Bangsa Kura-Kura Air Tawar (Reptilia: Testudines) di Indonesia sebagai Dasar Pelestarian dan Pemanfaatannya. Laporan Pelaksanaan RUT V/1. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- JÁNOSA, A, B. BARANYAI and J. DOHY. 1999. Comparison of milk production of the progeny of BLAD-carrier and healthy Holstein bulls in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 47(3): 283 – 289.

- NAGAHATA, H., T. MIURA, K. TAGAKI, M. OHTAKE, H. NODA, T. YASUDA and K. NIOKA. 1997. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 59(4): 233 – 238.
- NOROUZY, A., M.R. NASSIRY, F. EFTEKHARI SHAHRODY, A. JAVADMANESH, M.R. MOHAMMAD ABADI and G.E. SULIMOVA. 2005. Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein and Brown Swiss AI bulls in Iran. *Genetika.* 41(12): 1697 – 1701.
- PATEL, R.K., K.M. SINGH, K.J. SONI JR. and K.R. RAO. 2007. Low incidence of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Indian cattle and buffalo breeds. *J Appl Genet.* 48(2): 153 – 155.
- SIPES, K.M., H.A. EDENS, M.E. KEHRLI, H.M. MIETTINEN, J.E. CUTLER, M.A. JUTILA and M.T. QUINN. 1999. Analysis of surface antigen expression and host defense function in leukocytes from calves heterozygous or homozygous for bovine leukocyte adhesion deficiency. *Am. J. Vet. Res.* 60(10): 1255 – 1261.
- SHUSTER, D.E., M.E. KEHRLI JR., M.R. ACKERMANN and R.O. GILBERT. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 9225 – 9229.