

repository.ub.ac.id

IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN TEK (*Tyrosine kinase*) PADA SEMEN SEGAR SAPI PERAH PERANAKAN FRIESIAN HOLSTEIN DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

SKRIPSI

Oleh:

SHAHNAZ AUDYA DHANESWARI

145130101111035



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN TEK (*Tyrosine kinase*) PADA SEMEN SEGAR SAPI PERAH PERANAKAN FRIESIAN HOLSTEIN DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

SKRIPSI

Sebagaisalahsatusyaratuntukmemperolehgelar
SarjanaKedokteranHewan

Oleh:

SHAHNAZ AUDYA DHANESWARI

145130101111035



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN TEK (*Tyrosine kinase*) PADA SEMEN SEGAR SAPI PERAH PERANAKAN FRIESIAN HOLSTEIN DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

Oleh :

SHAHNAZ AUDYA DHANESWARI

NIM. 145130101111035

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 8 Agustus 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Yudit Oktanella, M.Si
NIK. 201405881022 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Shahnaz Audya Dhaneswari

NIM : 145130101111035

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Identifikasi polimorfisme gen TEK (*Tyrosine kinase*) pada semen segar Sapi Perah Peranakan Friesian Holstein dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar – benarkarya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isidantertulis di daftarpustakadalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulisterbukti hasiljiplakan maka saya akan bersedia menanggung egala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segalakesadaran.

Malang, 10 Mei 2019

Yang menyatakan,

(SHAHNAZ AUDYA DHANESWARI)

NIM. 145130101111035

IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN TEK (*Tyrosine kinase*) PADA SEMEN SEGAR SAPI PERAH PERANAKAN FRIESIAN HOLSTEIN DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

ABSTRAK

Sapi Peranakan Friesian Holstein (*Bostaurus*) merupakan mamalia endemik Pulau Jawa yang memiliki perbedaan kualitas semen pada setiap individu. *Tyrosin kinase* (TEK) merupakan salah satu gen yang menentukan kualitas semen. Protein Tyrosin kinase ialah salah satu molekul protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa dan berfungsi pengenalan dengan ZP3 serta berperan dalam signal transduksi yang akan menghasilkan autofosforilasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme pada Gen TEK guna mendukung proses seleksi pejantan berdasarkan sekuen gen TEK metode PCR. Sampel yang digunakan adalah DNA yang diisolasi dari darah. Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer *Forward* (TEK_F) 5'-TAGATTGTCGCTTGCTGGG-3' dan *Reverse* (TEK_R) 5'-CCTGTGCCGACAGGTTTACT-3' dan dilanjutkan dengan sekuensing terhadap produk PCR. Analisis hasil sekuen DNA dilakukan dengan menggunakan software BioEdit dan NCBI BLAST. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari ke-7 sampel menghasilkan 262 bp dan ditemukan polimorfisme/perubahan sekuen TEK pada 23 database gene bank. Pada analisis hubungan antar motilitas individu spermatozoa dengan mutasi, diperoleh $r_{hitung} > r_{table}$ ($0,806 > 0,754$) atau nilai signifikansi $<$ taraf nyata 5% ($0,029 < 0,050$). Pada analisis hubungan antar konsentrasi semen dengan mutasi, diperoleh $r_{hitung} > r_{table}$ ($0,897 > 0,754$) atau nilai signifikansi $<$ taraf nyata 5% ($0,006 < 0,050$).

Kata Kunci : Darah, Gen TEK, Sapi Peranakan Friesian Holstein (*Bostaurus*), PCR

IDENTIFICATION OF GEN TEK (Tyrosine kinase) POLYMORPHISM IN FRESH CEMENT HOLSTEIN FRIESIAN CROSSBREED DAIRY COWS USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD

ABSTRACT

The Holstein Friesian Crossbreed bull (*Bostaurus*) is an endemic mammal of Java Island that has an amount of semen quality in each individual. Tyrosine kinase (TEK) is one of the genes that determine semen quality. Protein Tyrosine kinase is one of the proteins present in the plasma membrane and works with ZP3 and signals in signal transduction which will produce autophosphorylation. This study aims to identify polymorphisms in TEK genes to support the male selection process based on TEK gene sequences by the PCR method. The DNA sampels were isolated from the blood. The process of DNA amplification was carried out using the PCR method using the Forward (TEK_F) primer 5'-TAGATTGTCGCTTGCTGGG-3' and Reverse (TEK_R) 5'-CCTGTGCCGACAGGTTTACT-3' and continued by sequencing of PCR products. The DNA sequence was carried out using BioEdit software and NCBI BLAST. The results showed that from the 7 samples produced 262 bp and found a polymorphism/changes in the sequence of the TEK gene on 23 database gene bank. On the analysis of the relationship between individual motility of spermatozoa and mutations, $r_{count} > r_{table}$ ($0.806 > 0.754$) or significance value $< 5\%$ ($0.029 < 0.050$) was obtained. In analyzing the relationship between cement concentration and mutation, $r_{count} > r_{table}$ ($0.897 > 0.754$) or significance value $< 5\%$ ($0.006 < 0.050$) was obtained.

Keywords: TEK genes, Friesian Holstein Crossbreed Cattle (*Bostaurus*), PCR

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas rahmat, karunia, dan hidayah-Nya, sehingga skripsi yang berjudul ***“Identifikasi polimorfisme gen TEK (Tyrosine kinase) pada semen segar Sapi Perah Peranakan Friesian Holstein dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR)”*** dapat diselesaikan. Sholawat serta salam tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

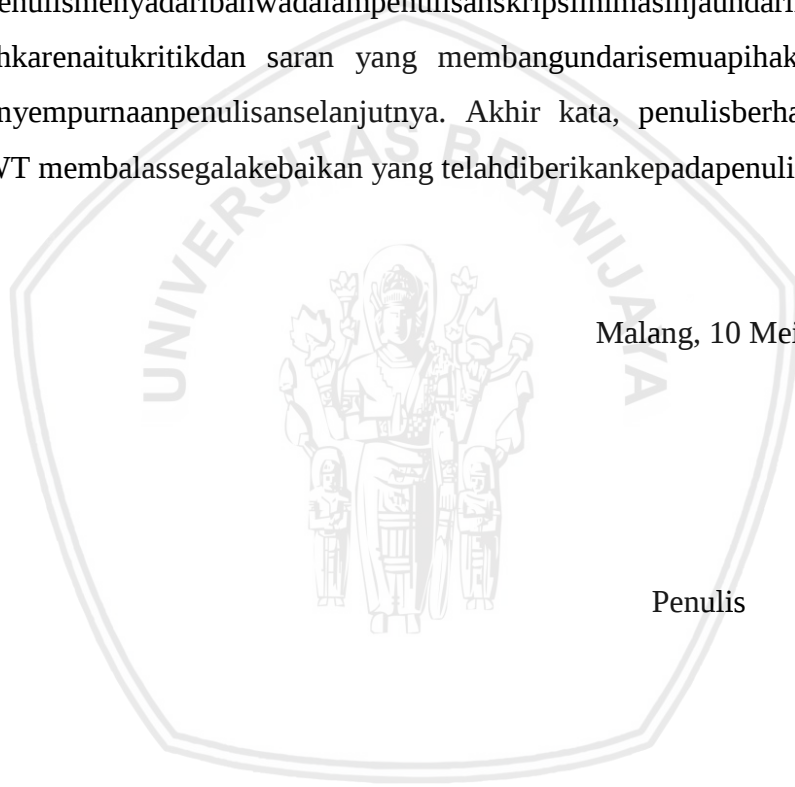
1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES sebagai pembimbing pertama dan drh. Yudit Oktanella, M.Si sebagai pembimbing kedua atas waktu, bimbingan, arahan, dan kesabarannya dalam membimbing penulis.
2. drh. Wawid Purwatiningih, M. Vet selaku dosen penguji 1 dan drh. Desi Wulansari, M. Vet selaku dosen penguji 2 atas bimbingan dan arahnya dalam penulisan skripsi ini.
3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB).
4. Ayahanda Agus Sugiarto, Ibunda Rizki Linawati, dan Adik Shafa Dinda untuk kasih sayang, doa, dukungan, dan pengorbanan baik moral maupun materi selama ini.
5. drh. Muhammad Ibenk Abdillah selaku kakak tercinta yang senantiasa mengajarkan dan membimbing penulis dengan sabar dan baik.
6. Teman-teman Siti Maria, Restifa Argiandani, Febrina Larasati, Adeka Yunanza, Cheptien Winda dan Caesarin Asgita yang selalu memberikan semangat.

7. Teman-teman BRAVE yang telah memberikan persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan, dan mimpi-mimpi yang luar biasa.
8. Teman-teman perjuangan mahasiswa FKH UB angkatan 2014 yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.
9. Semua pihak yang telah turut berperan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun dari semua pihak diharapkan demi penyempurnaan penulisan selanjutnya. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Aamiin.

Malang, 10 Mei 2019

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PERNYATAAN	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR TABEL	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR GAMBAR.....	Error! Bookmark not defined.
BAB I PENDAHULUAN.....	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang.....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah.....	Error! Bookmark not defined.
1.3 Batasan Masalah	Error! Bookmark not defined.
1.4 Tujuan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
1.5 Manfaat Penelitian	Error! Bookmark not defined.
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Sapi Friesian Holstein.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Klasifikasi Sapi Peranakan Friesian Holstein.....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Fisiologis Semen Segar Sapi Jantan	Error! Bookmark not defined.
2.2.1 Penentuan Kualitas Spermatozoa	Error! Bookmark not defined.
2.2.2 Kualitas Semen Segar.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Peran <i>Tyrosine kinase</i> sebagai Pengatur Kualitas Spermatozoa.....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	Error! Bookmark not defined.
2.4.1 Teknik Dasar Amplifikasi PCR.....	Error! Bookmark not defined.
2.5 Desain Primer	Error! Bookmark not defined.
2.6 Sekuensing DNA	Error! Bookmark not defined.
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	Error! Bookmark not defined.
3.1 Kerangka Konsep.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Bagan Kerangka Konsep	Error! Bookmark not defined.
3.3 Hipotesis Penelitian	Error! Bookmark not defined.

BAB 4 METODE PENELITIAN	Error! Bookmark not defined.
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	 Error! Bookmark not defined.
4.2 Alat dan Bahan	 Error! Bookmark not defined.
4.3 Tahapan Penelitian	 Error! Bookmark not defined.
4.4 Rancangan Penelitian	 Error! Bookmark not defined.
4.5 Prosedur Kerja	 Error! Bookmark not defined.
4.5.1 Pemilihan Sapi Peranakan Friesian Holstein	 Error! Bookmark not defined.
4.5.2 Pengambilan Sampel Darah	 Error! Bookmark not defined.
4.5.3 Isolasi DNA	 Error! Bookmark not defined.
4.5.4 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA	 Error! Bookmark not defined.
4.5.4.1 Uji Kuantitas DNA	 Error! Bookmark not defined.
4.5.4.2 Uji Kualitas DNA	 Error! Bookmark not defined.
4.5.5 Desain Primer	 Error! Bookmark not defined.
4.5.6 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)	 Error! Bookmark not defined.
4.5.7 Uji Kualitas Produk PCR	 Error! Bookmark not defined.
4.5.8 Sekuensing DNA	 Error! Bookmark not defined.
4.5.9 Analisa Data	 Error! Bookmark not defined.
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	Error! Bookmark not defined.
5.1 Isolasi DNA dari Sampel Darah Sapi PFH Jantan	 Error! Bookmark not defined.
5.2 Amplifikasi Gen TEK dengan Metode PCR	Error! Bookmark not defined.
5.3 Sekuensing Gen TEK	 Error! Bookmark not defined.
5.4 Analisis Sekuen Gen TEK Sapi PFH	 Error! Bookmark not defined.
5.5 Data Pemeriksaan Kualitas Semen Segar Sampel Sapi PFH	 Error! Bookmark not defined.
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	Error! Bookmark not defined.
6.1 Kesimpulan	 Error! Bookmark not defined.
6.2 Saran	 Error! Bookmark not defined.
DAFTAR PUSTAKA	Error! Bookmark not defined.
LAMPIRAN	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
5.1 KonsentrasidanKemurnian DNA Total Sapi PFH.....	30
5.2 Urutan Oligonukleotida Primer Gen TEK Sapi PFH.....	33
5.3 Program PCR untuk Amplifikasi gen TEK Sapi PFH.....	33
5.4 HasilPenyejajaran dengan database NCBI.....	35
5.5 Karakteristik Mutasi pada Analisa Sekuens Gen TEK Sapi PFH.....	36
5.6 Hasil Perbandingan Sekuen Gen dengan Hasil Data Konsentrasi dan Motilitas Semen.....	40
5.7 Hasil Analisis Korelasi <i>BivariatePearson</i>	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Sapi Friesian Holstein.....	8
4.1 Ilustrasi Tahapan Penelitian.....	24
5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarosa 1%).....	32
5.2 Hasil elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 2%.....	34
5.3 Hasil penyejajaran basa nukleotida menggunakan <i>software</i> BioEdit®	39



DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

<u>Singkatan/Lambang</u>	Keterangan
°C	Derajat Celsius
%	Persen
Å	Angstrom
BLAST	<i>Basic Logical Alignment Search Tool</i>
bp	<i>Base Pair</i>
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
cm	<i>Centimeter</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
kb	<i>Kilobase</i>
kg	Kilogram
TEK	<i>Tyrosine kinase</i>
TEK_F	<i>Tyrosine kinase Forward</i>
TEK_R	<i>Tyrosine kinase Reverse</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PFH	Peranakan Friesian Holstein

nm
PCR

Nanometer
Polymerase Chain Receptor





BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keberhasilan inseminasi buatan (IB) ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah kualitas semen yang digunakan. Penampilan produksi ternak tergantung kepada potensi genetik dan pengaruh lingkungan. Upaya yang harus dilakukan adalah mencari dan mengembangkan genetik ternak yang dapat merespon terhadap lingkungan peternakan, untuk selanjutnya secara bertahap memeliharanya dan mengembangkannya melalui seleksi yang ketat dan berkelanjutan. Saat ini dalam peningkatan mutu dilakukan dengan pemeriksaan semen pada pejantan sebagai tolak ukur tingkat kesuburan. Selain pemeriksaan tersebut bisa juga dilihat dari silsilahnya (*pedigree*), yaitu seleksi yang didasarkan pada reputasi yang ditunjukkan oleh nenek moyang sapi yang bersangkutan namun suatu *bloodline* atau keturunan dari individu yang baik tidak selalu berarti bahwa ciri yang baik itu akan diwariskan melalui seleksi dan perkawinan.

Berbagai upaya telah dilakukan pemerintah untuk mendorong peningkatan populasi ternak sapi perah, penyediaan bibit yang bermutu dan peningkatan produksi (baik mutu maupun jumlah), di antaranya melalui kegiatan Uji Zuriat Sapi Perah Nasional. Uji zuriat merupakan pengujian untuk mengetahui potensi genetik calon pejantan melalui produksi susu anak betinanya (Daughter Cow/DC) dan dilakukan untuk menghasilkan bibit pejantan unggul yang sudah beradaptasi dengan kondisi agroklimat di Indonesia (Direktorat Pembibitan Ternak 2012). Pelaksanaan uji zuriat dilakukan dalam beberapa tahapan dan memerlukan waktu

yang relatif lama $\pm$ 7 tahun dan biaya yang relatif mahal. (Direktorat Perbibitan ternak, 2015)

Guna melengkapi evaluasi kualitas spermatozoa perlu dilakukan pemeriksaan molekuler, mengingat bahwa dalam seminal plasma terdapat kumpulan bio-marker yang dapat dipakai untuk menunjukkan kesuburan semen. Apabila gen-gen yang berpengaruh terhadap fenotip kualitas spermatozoa diketahui, maka tujuan seleksi bibit unggul yang mempunyai sifat ekonomis tinggi dapat dilakukan sejak dini.

Seiring dengan berkembang teknologi dalam bidang genetika molekuler, seleksi dapat dilakukan dengan lebih cepat dan akurat. Seleksi dapat dilakukan pada level DNA dengan menilai keragaman gen tertentu yang berkaitan dengan kualitas semen segar pejantan.

Tyrosin kinase merupakan subgrup dari kelas protein kinase (Muhaiminrifai, 2011). *Tyrosin kinase* merupakan salah satu protein membran plasma spermatozoa yang memiliki fungsi sebagai mediator pertemuan antara spermatozoa dengan sel telur, serta berperan dalam signal transduksi yang akan menghasilkan autofosforilasi dari residu tirosin Morales dan Lianos (1996). Konsentrasi *tyrosin kinase* endogen dalam plasma semen juga dapat memicu hiperaktivitas dan peningkatan motilitas spermatozoa. Aktivitas *tyrosin kinase* mampu dalam membantu spermatogenesis, maturasi epididimis, kapasitas spermatozoa, eksositosis akrosom, dan membantu proses fusi dan interaksi membran (Ijiri *et al.*, 2012).

Hingga saat ini, diduga adanya polimorfisme gen promotor TEK berkaitan dengan fertilitas sapi pejantan, yang secara langsung mempengaruhi kualitas semen segar. Selanjutnya, Ijiri et al (2012) menuliskan bahwa adanya penurunan / peningkatan ekspresi TEK dengan kualitas semen segar pada berbagai spesies yakni hewan laut, mamalia maupun amfibi. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi ada tidaknya polimorfisme pada sekuens gen TEK dan kaitannya dengan kualitas semen sapi perah Peranakan FH.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat perbedaan sekuens/polimorfisme gen *Tyrosinekinase* (TEK) pada semen segar sapi perah peranakan FH melalui metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)?
2. Apakah polimorfisme gen *Tyrosinekinase* mempengaruhi kualitas semen segar sapi perah peranakan FH ditinjau dari motilitas dan konsentrasi?

1.3 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah semen dan darah dari Peternakan Rakyat.
2. Gen TEK diisolasi dari darah Sapi jantan Peranakan Friesian Holstein menggunakan *GeneaidDNA mini Kit*.
3. Primer gen *Tyrosin kinase* didesain menggunakan gen *Tyrosin kinase* dari sapi Peranakan Friesian Holstein (*Bos taurus*) menggunakan program Primer3Plus.

4. Amplifikasi DNA gen *Tyrosine kinase* (TEK) Sapi Peranakan Friesian Holstein dilakukan dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *Forward* (TEK_F) 5'-TAGATTGTCGCTTGCCTGGG-3' dan *Reverse* (TEK_R) 5'-CCTGTGCCGACAGGTTTACT-3'.
5. Metode PCR dilakukan dengan program: pradenaturasi 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing 52,3°C selama 30 detik, extension 72°C selama satu menit, dan post extension 72°C selama tujuh menit.
6. Sekuensing DNA dilakukan dengan memilih tujuh sampel darah Sapi Peranakan Friesian Holstein Peternakan Rakyat dengan metode sanger.
7. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen DNA antara tujuh sampel darah Sapi PFH Peternakan Rakyat menggunakan program *BioEdit* dan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, terdapat beberapa tujuan dari penelitian ini yakni :

1. Untuk mengetahui perbedaan sekuen gen TEK pada Sapi PFH dengan menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR).
2. Untuk mengetahui pengaruh polimorfisme gen TEK pada kualitas semen segar sapi PFH ditinjau dari motilitas dan konsentrasi.

1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi genetik berupa perpustakaan gen guna keperluan seleksi pejantan.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi Friesian Holstein

Menurut Sudono et al. (2003), sapi Fries Holland (FH) berasal dari Provinsi Belanda bagian Utara dan Provinsi Friesland Barat. Sapi FH di Amerika Serikat disebut Friesian atau disebut juga dengan Holstein, sedangkan di Eropa disebut Friesian. Kedua propinsi tersebut merupakan daerah yang memiliki padang rumput yang bagus. Hadisutanto (2008) menyatakan bahwa sapi perah Fries Holland telah ditenakkan lebih dari 2000 tahun yang lalu dan berasal dari North Holland dan West Friesland. Menurut sejarah, bangsa sapi Fries Holland berasal dari Boss Taurus yang mendiami daerah beriklim sedang di dataran Eropa.

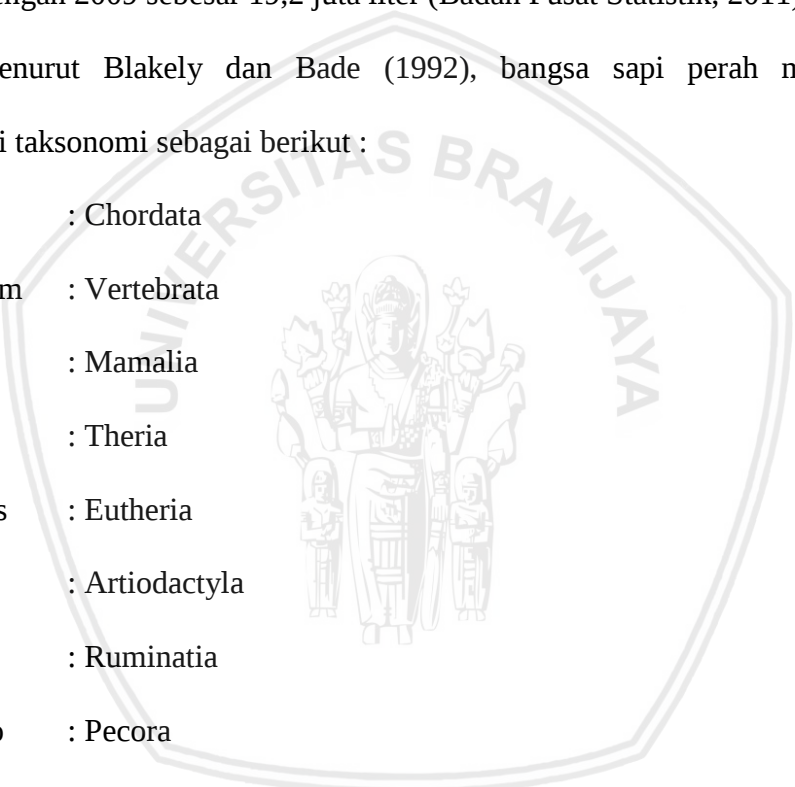
2.1.1 Klasifikasi Sapi Peranakan Friesian Holstein

Sapi perah yang umum digunakan sebagai ternak penghasil susu di Indonesia adalah sapi Peranakan Friesian Holstein (PFH). Sapi Peranakan Friesian Holstein (PFH) merupakan hasil persilangan antara sapi Friesian Holstein (FH) dengan sapi setempat atau sapi lokal yang ada di Indonesia (Mukhtar, 2006). Persilangan ini dilakukan dengan tujuan untuk menghasilkan keturunan yang memiliki performa produksi susu tinggi dan tingkat adaptasi yang baik terhadap lingkungan tropis. Pemilihan sapi perah PFH sebagai ternak perah disesuaikan dengan keadaan iklim tropis di Indonesia.

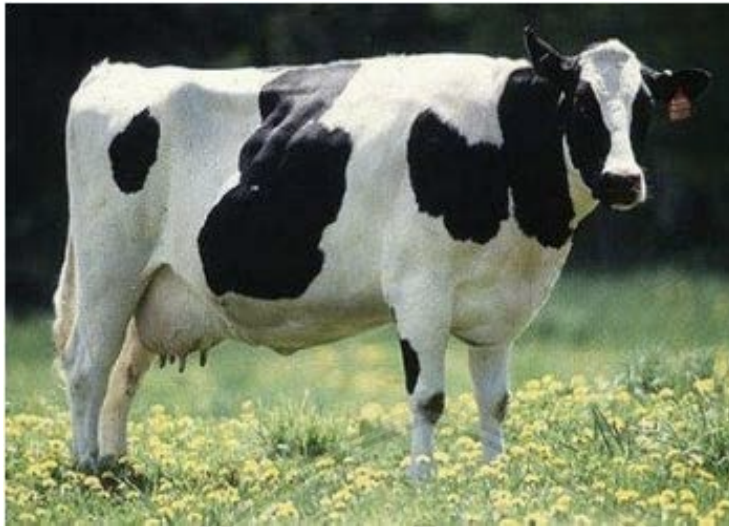
Menurut Rustamadji (2004), ciri-ciri sapi PFH adalah : (1) Warna bulunya belang hitam dan putih; (2) Mempunyai ukuran tubuh yang besar dan beratnya hampir sama dengan sapi FH; (3) Mempunyai kadar lemak susu yang juga

rendah; (4) Produksi susu dapat mencapai 15-20 liter perhari per masa laktasi; (5) Mempunyai sifat tenang dan jinak sesuai dengan induknya; (6) Lebih tahan panas jika dibandingkan dengan sapi FH, sehingga lebih cocok di daerah tropis; (7) Mudah beradaptasi di lingkungan barunya. Populasi sapi perah di Indonesia sampai dengan Juni 2011 tercatat 597 ribu ekor dan produksi susu nasional sampai dengan 2009 sebesar 19,2 juta liter (Badan Pusat Statistik, 2011).

Menurut Blakely dan Bade (1992), bangsa sapi perah mempunyai klasifikasi taksonomi sebagai berikut :



Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Sub class	: Theria
Infra class	: Eutheria
Ordo	: Artiodactyla
Sub ordo	: Ruminatia
Infra ordo	: Pecora
Famili	: Bovidae
Genus	: Bos (cattle)
Group	: Taurinae
Spesies	: <i>Bos taurus</i> (Sapi Eropa)
	<i>Bos indicus</i> (Sapi India/Sapi Zebu)



Gambar 2.1 Sapi Friesian Holstein (Leondro, 2009)

2.2 Fisiologis Semen Segar Sapi Jantan

Semen adalah cairan yang disekresikan dari kelamin hewan jantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran kelamin betina. Semen terdiri dari spermatozoa dan cairan kelenjar aksesoris atau plasma semen. Semen sapi normal berwarna seperti susu atau krem keputih-putihan dan keruh (Turman *and* Rich, 2010). Volume semen dan konsentrasi spermatozoa yang diejakulasikan pada sapi jantan sangat bervariasi, antara $0,8 - 2,0 \times 10^9$ spermatozoa/mL (Hafez *and* Hafez, 2000). Menurut Feradis (2010a) semen adalah sekresi kelamin pejantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran kelamin betina sewaktu kopulasi, tetapi dapat ditampung untuk keperluan IB.

2.2.1 Penentuan Kualitas Spermatozoa

Tujuan dari pengamatan kualitas semen segar antara lain untuk mengetahui fertilitas pejantan, menentukan layak atau tidaknya hasil koleksi semen tersebut untuk diproses menjadi semen beku, dan memprediksi kualitas

post-thawing semen beku (Morrell *et al.*, 2017; Pamungkas, 2009; Nofa dkk., 2017).

Pengamatan dan evaluasi semen segar secara umum dapat dikategorikan menjadi dua metode, yakni secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan semen secara makroskopis meliputi volume, bau, warna, konsistensi, serta derajat keasaman (pH). Pengamatan mikroskopis meliputi gerakan massa, konsentrasi sperma, motilitas dan abnormalitas sperma.

2.2.2 Kualitas Semen Segar

1. Volume

Volume merupakan salah satu standar minimum untuk evaluasi kualitas semen yang akan digunakan untuk Inseminasi Buatan (Garner dan Hafez, 2000). Volume semen dapat diketahui dengan membaca skala yang terdapat pada tabung penampungan. Volume semen per ejakulat berbeda menurut bangsa, umur, berat badan, tingkatan makanan, dan frekuensi penampungan. Volume semen akan menurun sesudah mencapai puncak dewasa (Toelihere, 1993). Sapi jantan yang telah dewasa dapat menghasilkan semen lebih banyak yaitu 10 – 15 ml tiap ejakulasi.

2. Warna

Semen sapi normal berwarna seperti susu atau krem keputih-putihan dan keruh. Derajat kekeruhannya tergantung pada konsentrasi spermatozoa. Sekitar 10% sapi-sapi jantan menghasilkan semen yang normal berwarna kekuning-kuningan yang disebabkan oleh pigmen

riboflavin yang dibawa oleh satu gen autosom resesif dan tidak mempunyai pengaruh terhadap fertilitas (Toelihere, 1993).

3. Bau

Variabel pemeriksaan bau pada semen jarang dilakukan karena tidak berhubungan dengan kualitas spermatozoa. Umumnya bau semen dikategorikan sebagai bau khas (Rizal dan Herdis, 2008).

4. pH

Derajat keasaman memegang peran yang sangat penting karena mempengaruhi viabilitas spermatozoa. Rata-rata pH (derajat keasaman) pH semen sapi berkisar 6,4-7,8 (Garner dan Hafez, 2000).

5. Viskositas

Viskositas atau konsistensi atau derajat kekentalan semen sapi dapat dikriteriakan menjadi: konsistensi rendah, sedang, dan tinggi. Perkiraan konsentrasi semen pada konsistensi kental; sekitar >1.000 juta/ml, konsistensi sedang; sekitar 600-800 juta/ml dan konsistensi encer; sekitar 200-500 juta/ml (Waluyo, 2014).

6. Motilitas spermatozoa

Peluang terjadinya fertilisasi sangat ditentukan oleh jumlah spermatozoa motil progresif yang ada dalam suatu ejakulat. Suatu ejakulat ataupun semen cair dan semen beku yang digunakan harus memiliki total spermatozoa motil yang optimal untuk terjadinya fertilisasi. Jumlah spermatozoa motil dapat dihitung dengan mengalikan konsentrasi spermatozoa dengan spermatozoa yang motil progresif (Nikbakht and Saharkhiz, 2011).

Proses pembentukan energi spermatozoa terjadi melalui dua mekanisme, yaitu glikolisis dan fosforilasi oksidatif. Spermatozoa sapi mampu mempertahankan motilitas dibawah kondisi aerob, namun hambatan rantai respirasi dalam sintesis ATP pada mitokondria mampu menurunkan motilitas pada spermatozoa sapi. Pembentukan ATP dalam mitokondria merupakan proses yang bersifat membran-*dependent*, adanya gangguan intra-seluler dapat menimbulkan pengaruh negatif terhadap potensial membran mitokondria dan pembentukan energi pada mitokondria. Tanpa energi yang cukup, spermatozoa tidak akan bergerak progresif. *Tyrosine kinase* merupakan salah satu molekul protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa dan pengantar ke ZP3 dan memainkan peran dalam transduksi sinyal yang dapat menyebabkan autofosforilasi residu tirosin. *Tyrosine kinase* termasuk dalam kelompok protein yang salah satu fungsinya adalah stabilisasi ikatan kovalen dari konstituen protein membran, sehingga ketika ditambahkan dalam media pengencer untuk semen beku dapat mencegah pecahnya ikatan kovalen membran spermatozoa.

2.3 Peran *Tyrosine kinase* sebagai Pengatur Kualitas Spermatozoa

Semua tahapan dalam spermatogenesis diatur oleh ekspresi spesifik dari berbagai gen diataranya adalah Protein-Tyrosine Kinase (PTK). Faktor lain yang mempengaruhi spermatogenesis adalah interaksi antara sel Sertoli dan testosteron yang dihasilkan dari sel Leydig. Sperma mamalia perlu mengalami perubahan lebih lanjut agar menjadi kompeten untuk mengikat dan melebur dengan oosit setelah dilepaskan ke dalam saluran reproduksi wanita. Perubahan ini disebut

"kapasitasi" dan mengakibatkan sperma menjadi motil dan mampu melakukan *acrosomal exocytosis* (AE). Agar terkapasitasi, sperma memerlukan masa inkubasi dan interaksi dalam saluran reproduksi betina. Namun, keadaan ini dapat diinduksi secara *in vitro* dalam media eksperimental yang sesuai. Kapasitasi mengakibatkan perubahan kadar kolesterol, fluiditas membran plasma, dan konsentrasi ion intraseluler. Penanda lainnya bahwa kapasitasi berlangsung dengan baik adalah peningkatan fosforilasi protein tirosin.

Korelasi lain dari PTKs dengan spermatogenesis adalah dalam pengaturan *Sertoli cell tight junction*, termasuk *Blood Testis Barrier* (BTB). Sel germinal jantan perlu berhubungan dengan sel Sertoli selama sebagian besar proses spermatogenesis. Spermatogonia berdiferensiasi menjadi spermatosit preleptoten/leptoten di kompartemen epitel basal seminiferus. Selain itu, spermatosit ini harus pindah ke kompartemen adluminal dari epitel seminiferus untuk diferensiasi lebih lanjut. Namun bagaimanapun terdapat BTB, yang bertindak sebagai penghalang imunologis antara basal dan kompartemen adluminal. Baru-baru ini, telah ditunjukkan bahwa *Focal Adhesion Kinase* (FAK), sebuah tirosin kinase nonreseptor, memainkan peran dalam proses ini. FAK mengatur pembukaan dan / atau penutupan BTB dengan memodulasi status fosforilasi protein integral membran. Selain itu, secara tradisional, FAK juga terlibat pada *adherens junction* (AJ) antara Sertoli dan sel germinal melalui interaksi dengan $\beta 1$ -integrin dan protein terkait lainnya termasuk Src.

Menariknya, sperma pada caput epididimis, yang kurang memiliki kemampuan untuk menjalani kapasitasi *in vivo*, tidak dapat menginduksi

terjadinya fosforilasi tirosin bahkan dengan menggunakan media kapasitas, menunjukkan bahwa maturasi epididimis sangat diperlukan untuk respons sperma. Selain itu, juga telah dibuktikan dibutuhkan BSA, CaCl_2 , dan NaHCO_3 dalam proses kapasitas dan pensinyalan PTK terkait sepenuhnya dengan penambahan cAMP atau analog aktifnya dan inhibitor kimia untuk PKA mengganggu proses yang disebutkan di atas. Hasil ini jelas menunjukkan bahwa proses kapasitas melibatkan aktivasi berurutan dari produksi cAMP dan jalur PKA/PTK sebagai respons terhadap zat-zat pemicu kapasitas.

Sudah lama dipercaya bahwa pemicu fisiologis untuk *acrosomal exocytosis* adalah pengikatan sperma dengan struktur ZP, yaitu, ZP3; jadi studi tersebut telah membuka jendela untuk menganalisis peran PTK untuk *acrosomal exocytosis*. Studi selanjutnya telah membuktikan tidak hanya kepentingan fisiologis Fosforilasi tirosin yang diinduksi ZP3 dari protein 95 kDa dan protein sperma lainnya tetapi juga efek dari beberapa jenis penginduksi *acrosomal exocytosis* selain ZP3 dan/ atau berbagai PTK atau protein kinase inhibitor yang dapat mempengaruhi peristiwa fosforilasi tirosin yang terkait dengan *acrosomal exocytosis*.

Epidermal Growth Factor (EGF) yang turut menginduksi *acrosomal exocytosis* pada sperma sapi menunjukkan bahwa reseptor EGF (EGFR)/kinase terlibat dalam proses ini. Penelitian lebih lanjut menggunakan spesies ini telah menunjukkan bahwa *acrosomal exocytosis* terutama melibatkan aktivasi G-protein coupled reseptor oleh asam lysophosphatidic atau angiotensin II atau *acrosomal exocytosis* yang diinduksi oleh ouabain- Na^+/K^+ . Sistem ATPase

mempromosikan transaktivasi EGFR/kinase melalui jalur PKA-Src-matrixmetalloproteinase (MMP) atau PKA-Src. Dalam sistem sebelumnya, produksi AMP yang diperantarai G-protein mempromosikan aktivasi PKA, PKA mengatur-Src (seperti yang terlihat pada sperma yang terkapasitasi), Src mengaktifkan sekresi growth factor mirip heparin binding EGF melalui aktivasi MMP, dengan demikian mengaktifkan EGFR/kinase, dan Src juga mempengaruhi aktivitas EGFR/kinase melalui fosforilasi langsung pada tirosin 845, sebuah situs fosforilasi Src-dependen, yang fosforilasinya terlibat pada beberapa jenis sel kanker.

Proses fosforilasi dari protein membran spermatozoa merupakan aspek penting dalam hubungannya dengan kapasitasi spermatozoa, hiperaktivasi motilitas, zona pelusida binding serta reaksi akrosom. Penelitian ekstensif telah dilakukan untuk mengetahui beberapa hal yang terlibat dalam proses fosforilasi protein membran spermatozoa selama kapasitasi. Tiga hal yang terlibat di dalamnya yaitu siklik adenosin monophosphat (cAMP) atau protein kinase A (PKA), reseptor tirosin kinase, dan non reseptor tirosin kinase (Naz dan Preeti, 2004). Motilitas sperma diregulasi oleh fosforilasi yang dimediasi oleh protein kinase (protein kinase-A) yang bergantung pada cAMP dari sekelompok protein flagel yang sebagian besar tidak teridentifikasi.

Tyrosine kinase (TEK) adalah salah satu protein membrane plasma spermatozoa yang berfungsi sebagai mediator fusi utama spermatozoa dengan zona pelusida 3 (ZP3). *Tyrosine kinase* merupakan salah satu molekul protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa dan pengantar ke ZP3 dan

memainkan peran dalam transduksi sinyal yang dapat menyebabkan autofosforilasi residu tirosin. *Tyrosine kinase* termasuk dalam kelompok protein yang salah satu fungsinya adalah stabilisasi ikatan kovalen dari konstituen protein membran, sehingga ketika ditambahkan dalam media pengencer untuk semen beku dapat mencegah pecahnya ikatan kovalen membran spermatozoa.

Menurut Morales and Llanos (1996) dan Bunch et al. (1992), *Tyrosin kinase* merupakan salah satu molekul protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa dan berfungsi untuk pengenalan dengan ZP3 serta berperan dalam signal transduksi yang akan menghasilkan autofosforilasi. Aktivitas protein tirosin kinase menginisiasi sinyal transduksi yang menghasilkan beberapa perubahan biokimiawi di dalam sel, meningkatkan level kalsium intraseluler, meningkatkan glikolisis dan sintesis protein, dan pada akhirnya berujung pada sintesis *Deoxyribo Nuclei Acid* (DNA) dan proliferasi sel (Fallon et al., 1984).

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan sekuen nukleotida tertentu secara *in vitro* menggunakan mesin PCR. Metode ini sekarang banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik karena metode tersebut sangat sensitif. Pada awalnya hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA tetapi sekarang digunakan pula untuk melipatgandakan molekul mRNA (Yuwono, 2006). Komponen utama dalam PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) primer oligonukleotida, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali

sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polimerase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi sintesis rantai DNA.

2.4.1 Teknik Dasar Amplifikasi PCR

Proses dalam PCR dibagi menjadi tiga langkah, yaitu denaturasi DNA pada suhu tinggi, penempelan (*annealing*) primer pada DNA target, serta sintesis DNA (*extension/elongation*). Satu kali putaran denaturasi, *annealing*, dan *elongation* disebut dengan siklus (*cycle*). Reaksi amplifikasi fragmen DNA dengan PCR terjadi secara berulang dalam 30-45 siklus.

1. Denaturasi DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal dilakukan pada suhu 95°C. Suhu kemudian diturunkan saat proses *annealing* menjadi sekitar 40-60°C. Optimasi suhu untuk tahap *annealing* sangat penting karena jika suhu terlalu rendah, primer akan menempel pada daerah yang tidak spesifik (*non target*). Di sisi lain jika suhu yang dipakai terlalu tinggi, primer tidak akan dapat menempel pada DNA target (Walker dan Rapley, 2009).
2. Untuk proses *annealing* yang efisien, penentuan suhu *annealing* yang tepat merupakan tahap yang penting dalam metode PCR. Salah satu teknik yang sering dipakai untuk optimasi suhu *annealing* adalah metode Touchdown PCR. Dalam metode ini, digunakan suhu gradien untuk *annealing* dengan cara menggunakan suhu dari yang paling rendah sampai yang paling tinggi. Suhu *annealing* yang tidak optimal akan terlihat pada produk amplifikasi yang tidak spesifik (lebih dari satu produk) jika suhunya terlalu rendah, atau

sama sekali tidak terbentuk produk amplifikasi karena suhunya terlalu tinggi (Walker dan Rapley, 2009).

3. Tahap PCR terakhir adalah tahap *elongation* (sintesis fragmen DNA) pada suhu 68-72°C. Pada tahap ini, enzim penyintesis DNA yang termostabil, umumnya yang paling sering dipakai adalah enzim Taq polimerase, akan mulai bekerja. Pada umumnya suhu optimal Taq polimerase untuk dapat aktif bekerja adalah pada suhu 68-72°C. Setelah proses PCR selesai, ampikon (fragmen DNA produk amplifikasi) PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarose (Pelt-Verkuil dkk., 2007).

2.5 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat, dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain (Yuwono 2006). Menurut Suryanto (2003), primer biasanya terdiri dari 10-20 nukleotida. Semakin panjang primer, maka harus spesifik daerah yang diamplifikasi. Jika suatu kelompok organisme memang berkerabat dekat, maka primer dapat digunakan untuk mengamplifikasi daerah tertentu yang sama dalam genom kelompok tersebut.

2.6 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA merupakan proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens sampel dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui.

Metode Sekuensing dapat digunakan untuk mengidentifikasi sebuah mutasi gen dan dapat membandingkan gen homolog diantara spesies. Pada tahun 1977 metode sekuensing telah berkembang di Amerika yang dipelopori oleh Maxam and Gilbert dan pada tahun 1974 di Inggris oleh Sanger. Ada dua metode Sekuensing yaitu metode Maxam and Gilbert dan Sanger (Lilian et al. 2002).

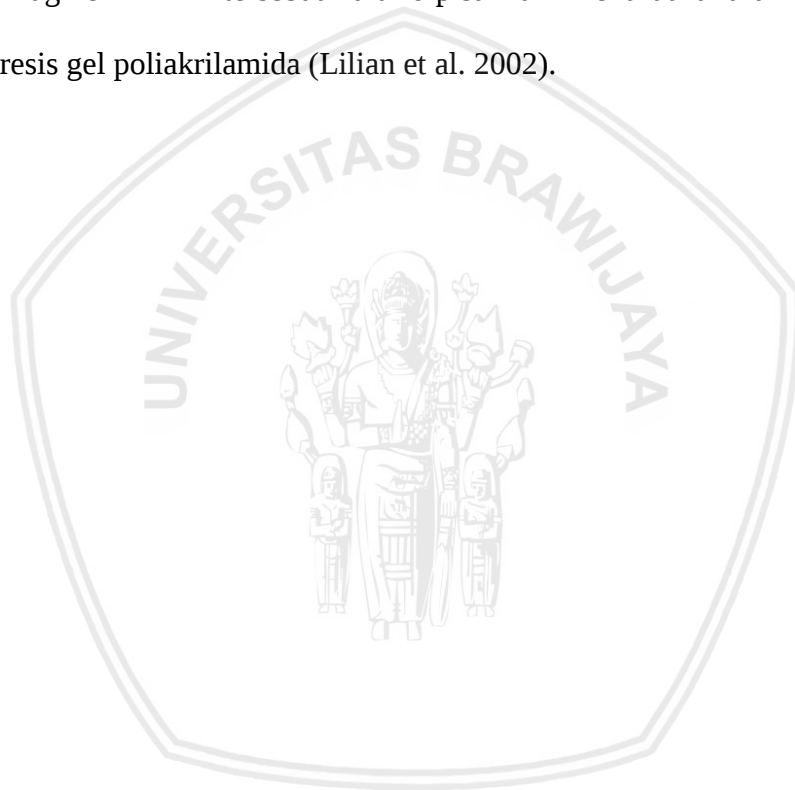
a. Metode Maxam and Gilbert

Metode ini didasarkan pada degradasi basa secara kimiawi. Pada metode ini DNA yang akan disekuensing ditandai dengan zat radioaktif. Fragment DNA yang sudah dilabeli merupakan subjek untuk pemecahan secara acak pada posisi basa adenine, sitosin, guanine dan timin menggunakan agen kimia spesifik. Degradasi senyawa kimia ini didasarkan pada tiga tahap: Perubahan basa nukleotida, penggantian dari basa yang telah mengalami perubahan pada molekul gulanya dan rantai DNA yang dipecah pada molekul gulanya. Hal ini akan menghasilkan sekumpulan fragmen bertanda radioaktif yang panjangnya tergantung pada jarak antara letak basa yang dihilangkan dengan ujung molekul bertanda radioaktif. Sekuens DNA dapat dibaca dari hasil pemisahan fragmen – fragmen yang terbentuk pada gel poliakrilamida (Lilian et al. 2002).

b. Metode Sanger

Pada metode Sanger, ekstensi rantai DNA dimulai pada situs spesifik pada DNA cetakan dengan menggunakan oligonukleotida pendek yang disebut primer. Primer tersebut diperpanjang menggunakan DNA polimerase, enzim yang mereplikasi DNA. Bersama dengan primer dan DNA polimerase, diikutsertakan pula empat jenis basa deoksinukleotida (dNTP) dan nukleotida pemutus atau

dalam konsentrasi rendah (ddNTP). Metode ini didasarkan pada penghambatan sintesis nukleotida akibat adanya persaingan antara dNTP dengan ddNTP. Penempelan ddNTP pada cetakan mengakibatkan berhentinya sintesis utas yang komplementer dengan DNA cetakan oleh dNTP. Pada reaksi ini dihasilkan berbagai fragmen yang berbeda-beda panjangnya dengan label radioaktif. Fragmen-fragmen DNA tersebut lalu dipisahkan menurut ukurannya dengan elektroforesis gel poliakrilamida (Lilian et al. 2002).



BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep

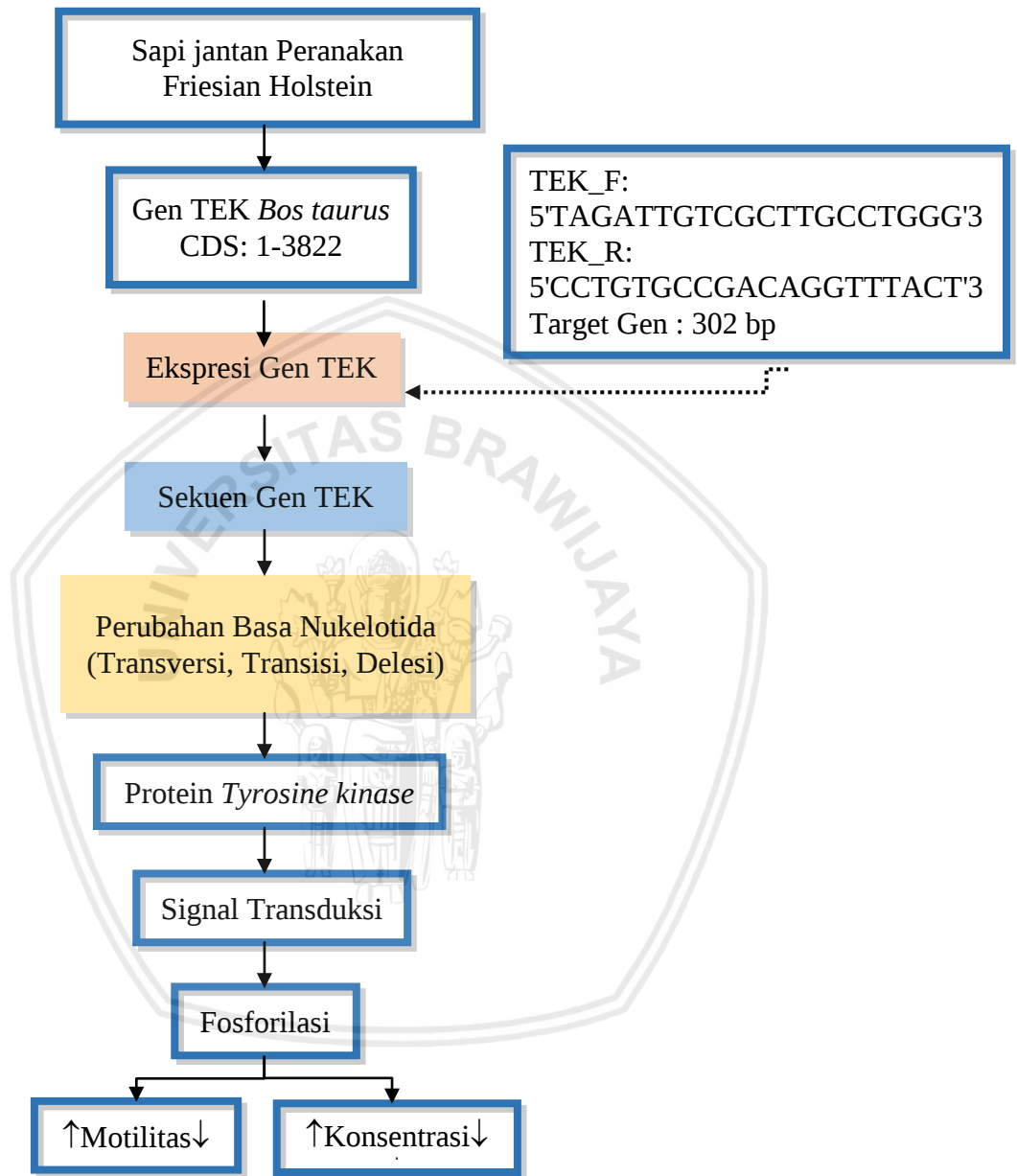
Spermatozoa sapi mampu mempertahankan motilitas dibawah kondisi aerob, namun hambatan rantai respirasi dalam sintesis ATP pada mitokondria dapat menimbulkan pengaruh negatif terhadap potensial membran mitokondria dan pembentukan energi pada mitokondria. Tanpa energi yang cukup, spermatozoa tidak akan bergerak progresif. *Tyrosine kinase* termasuk dalam kelompok protein yang salah satu fungsinya adalah stabilisasi ikatan kovalen dari konstituen protein membran, sehingga ketika ditambahkan dalam media pengencer untuk semen beku dapat mencegah pecahnya ikatan kovalen membran spermatozoa. *Tyrosine kinase* dapat menginduksi aktivitas tirosin kinase endogen melalui pengikatan dengan reseptornya yang berada di membran plasma spermatozoa kemudian akan mengaktifkan signal transduksi sampai terjadi proses fosforilasi tirosin kinase yang dapat menyebabkan hiperaktivitas dan peningkatan motilitas spermatozoa. Kualitas semen segar dapat diketahui dengan melihat ekspresi gen TEK (*Tyrosine kinase*). Karena gen tersebut dapat menentukan kaitannya dengan konsentrasi, dan motilitas semen segar.

Darah dapat digunakan untuk melihat ekspresi gen TEK. Sampel darah tersebut selanjutnya dilanjutkan untuk dilakukan isolasi DNA untuk mendapatkan isolat DNA. Hasil isolat DNA, dengan menggunakan sepasang primer yang spesifik untuk amplifikasi DNA dengan metode PCR. Sepasang primer *forward*

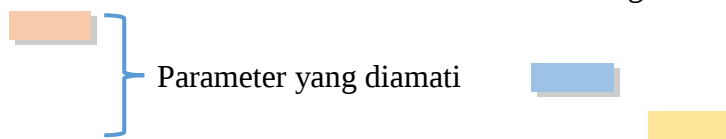
dan *reverse* untuk amplifikasi gen TEK *Bos taurus* didapatkan dari database NCBI dengan target gen 302 bp dari Cds: 3822 bp.



3.2 Bagan Kerangka Konsep



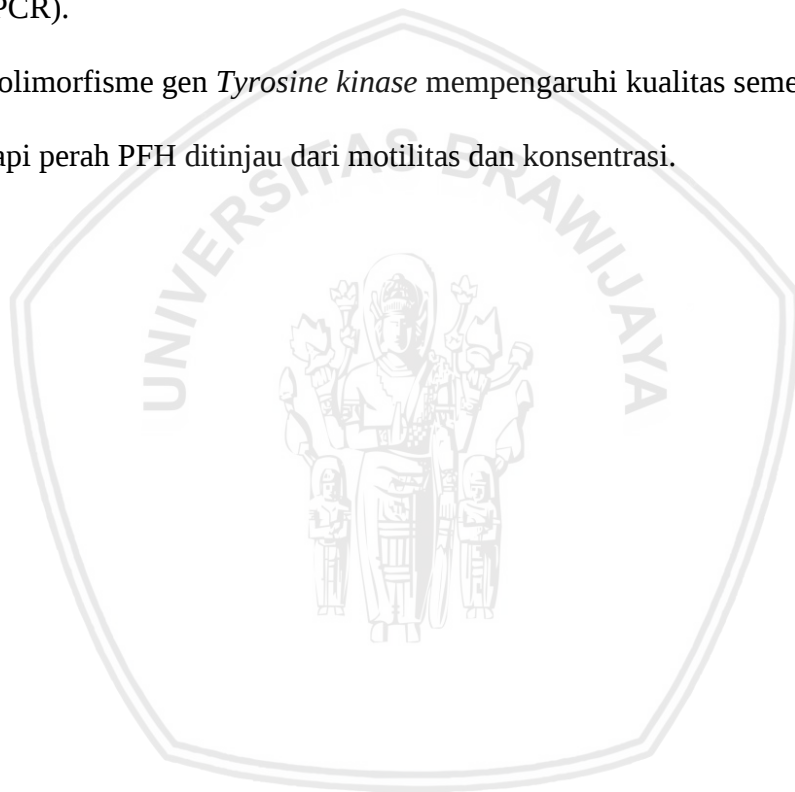
Keterangan :



3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diuraikan didapatkan hipotesa penelitian sebagai berikut :

1. Terdapat perbedaan sekuens/polimorfisme gen *Tyrosine kinase* pada semen segar sapi perah PFH melalui metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).
2. Polimorfisme gen *Tyrosine kinase* mempengaruhi kualitas semen segar sapi perah PFH ditinjau dari motilitas dan konsentrasi.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel darah Sapi Jantan Peranakan Friesian Holstein (PFH) dilakukan di Peternakan Rakyat Batu, Jawa Timur. Selanjutnya penelitian dilaksanakan di Laboratorium ADD Fakultas Kedokteran Hewan dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya pada bulan Februari-Mei 2018.

4.2 Alat dan Bahan

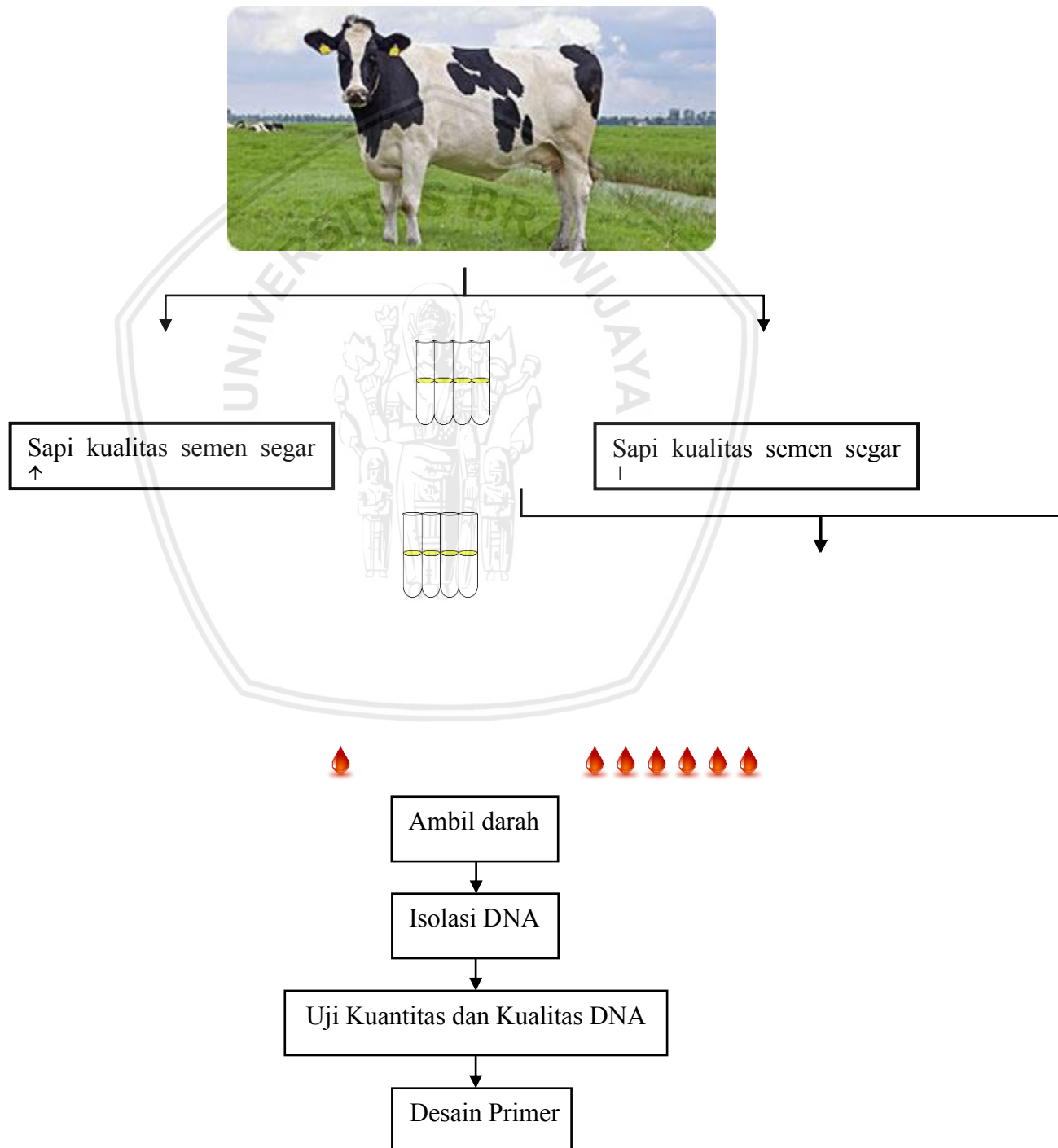
Peralatan yang diperlukan dalam penelitian antara lain kandang jepit, disposable syringe 3 cc, Vacutainer EDTA, sarung tangan, masker, gunting, ice box, kertas label, micro tube 1,5 ml, micro tube rack, microtube 200 µL, mikropipet 1 – 10 µL, 20 – 200 µL, dan 200 – 1000 µL, labu Erlenmeyer 100 ml, timbangan analitik digital, microwave, mesin vortex, white tip, yellow tip, blue tip, pipete tube rack, sentrifugator, freezer -20 °C, Thermocycler SensoQuest GmbH, mesin sequencing, computer, Gel Doc EZ-IMAGER BioRad, Mupid-Exu Electrophoresis.

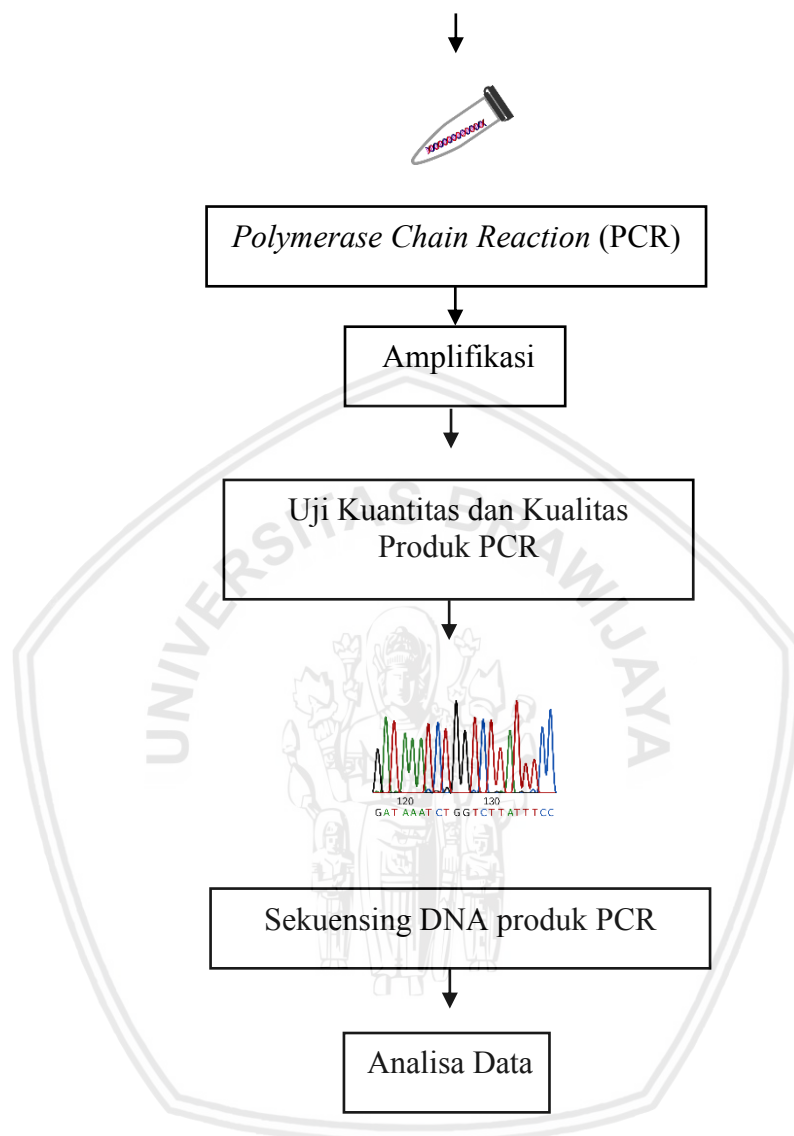
Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain darah Sapi PFH Jantan Peternakan Rakyat masing-masing 3 mL, agen anestesi, Geneaid™ DNA Isolation Kit (Tissue), ddH₂O, primer forward (TEK_F) 5'-TAGATTGTCGCTTGCCTGGG-3' dan reverse (TEK_R) 5'-CCTGTGCCGACAGG TTTACT-3', PCR mix (Promega GoTaq® Green Master Mix), DNA ladder 100 bp dan 1 kb, agarosa 1% dan 2%, Promega blue loading

dye 6x, etanol absolut, etanol 70%, Natrium asetat 3M, kertas parafilm, alumuniom foil, dan larutan etidium bromida (EtBr).

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut **Gambar 4.1:**





Gambar 4.1 Ilustrasi Tahapan Penelitian

4.4 Rancangan Penelitian

Data penelitian yang didapat dianalisa secara sistematis untuk menjelaskan suatu gambaran pada tiap tahapan penelitian. Sebanyak tujuh sampel darah yang diuji merupakan darah dari sapi PFH (*Bos taurus*) sebanyak 3 mL tiap individu. Darah kemudian dilakukan pengisolasian DNA dengan menggunakan *GeneaidTM DNA Isolation Kit (Tissue)*. Hasil isolasi DNA akan diukur konsentrasinya dengan

nanospektrofotometri dan ukurannya dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Setelah itu, sampel DNA akan diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang *forward*(TEK_F) 5'-TAGATTGTCGCTTGCCTGGG-3' dan *reverse* (TEK_R) 5'-CCTGTGCCGACAGGTTTACT-3'. Untuk mengetahui ukuran fragmen produk PCR diukur dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Produk PCR kemudian disekuensing dengan metode *Sanger*. Prinsip kerja metode *Sanger* yaitu terminasi sintesis DNA oleh dideoksinukleotida yang ditempatkan pada empat tabung yang berbeda. Terminasi sintesis DNA akan menghasilkan chain terminating dideoxynucleotide sehingga terbentuk fragmen-fragmen dengan ukuran yang beragam. Pembacaan fragmen-fragmen tersebut kemudian dilakukan melalui elektroforesis dengan mengidentifikasi jenis dideoksinukleosida yang digunakan untuk terminasi (Fairbanks & Andersen 1999). Hasil sekuensing fragmen DNA kemudian dibandingkan dengan menggunakan *software* *nucleotide* BLAST pada NCBI dan *software* *BioEdit* untuk mengetahui kecocokan dan kesejajaran sekuens amplikon dengan beberapa sekuens yang juga diamplifikasi dengan primer TEK_F dan TEK_R.

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Pemilihan Sapi Peranakan Friesian Holstein

Sapi PFH yang digunakan diambil sebanyak 7 ekor berdasarkan kualitas semen segarnya. Pemilihan sapi dilakukan oleh petugas berdasarkan pejantan yang belum dikoleksi semen.

4.5.2 Pengambilan Sampel Darah

Lokasi pengambilan darah dilakukan di vena *coccygeal* sapi jantan kemudian darah yang diambil sebanyak tujuh sampel dalam tabung penampung yang sudah ditambahkan EDTA masing-masing sebanyak 3-5 mL tiap individu.

4.5.3 Isolasi DNA

Isolasi DNA dari darah Sapi Friesian Holstein menggunakan *Geneaid™ DNA Isolation Kit* mengikuti protokol KIT yang dimodifikasi sehingga dapat digunakan untuk isolasi DNA darah. Terdapat tiga langkah utama dalam isolasi DNA, yaitu perusakan dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Ardiana, 2009).

4.5.4 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

4.5.4.1 Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas dilakukan dengan menggunakan mesin Implen *NanoPhotometer® Pearl*. Pengujian dilakukan dengan *buffer* terakhir saat isolasi DNA (*buffer AE*) sebagai blanko. *Buffer* diteteskan langsung di atas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1 μ L, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutupkan. Sebanyak 1 μ L sampel diteteskan di atas *pedestal submicroliter cell* yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup di atas sampel yang telah diteteskan dan ditekan tombol *sample* untuk diukur kemurnian DNA. Hasil ditunggu hingga keluar di layar monitor (Fatchiyah dkk, 2009)

4.5.4.2 Uji Kualitas DNA

Hasil konfirmasi isolat DNA diukur menggunakan gel elektroforesis agarose 1%. Penggunaan agarose 1% karena pori-pori agar lebih besar sehingga DNA

total akan berjalan melewati pori-pori agar. Sehingga akan terlihat diatas marker. Uji kualitas DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1% menggunakan mesin Mupid-Exu *Electrophoresis*. Cetakan agarose dibersihkan dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 ml dan gel agarose 1% (0,15 g) hingga mendidih atau larut. Campuran selanjutnya ditambahkan larutan GelRed 10.000x sebanyak 10% total volume TBE dan didinginkan. Gel selanjutnya didiamkan hingga memadat selama 20 – 30 menit pada suhu kamar. Gel dengan sumuran yang telah terbentuk diambil sisir dari gel secara perlahan lalu dimasukkan ke dalam chamber Mupid-Exu *Electrophoresis*. Kemudian larutan *buffer* elektroforesis (*running* TBE 1x) dituangkan di atas gel hingga menutupi seluruh bagian gel. Marker (DNA ladder) dan loading dye (1:1) selanjutnya diletakkan di sumur paling kiri, diikuti selanjutnya larutan *loading dye* dan isolat DNA (1:1). Chamber elektroforesis ditutup rapat. Alat elektroforesis dinyalakan (diberi arus listrik) dengan tegangan 100 Volt selama 30 menit. DNA akan bergerak dari muatan negatif menuju muatan positif. Komputer dinyalakan dan gel agarose hasil elektroforesis dimasukkan ke dalam UV transiluminator. UV transiluminator dinyalakan dan pita DNA akan berpendar saat terkena sinar UV. Pendaran tersebut dapat didokumentasikan dengan *software gel doc imaging* kemudian disimpan dalam komputer (Vivikananda, 2014).

4.5.5 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik PCR didesain menggunakan NCBI *GeneBank*: NM 173964.2 Primer *forward* dan *reverse* didapatkan dari *primer3plus* dengan menggunakan datalocus *Bos Taurus*

NM173964.2. Sepasang sekuen primer yang didapatkan adalah primer *forward* (TEK_F) 5'-TAGATTGTCGCTTGCCTGGG-3' dan *reverse* (TEK_R) 5'-CCTGTGCCGACAGGTTTACT-3' dengan komposisi GC *content* 55% dan Tm 52,5°C. Proses desain primer dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

4.5.6 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sampel DNA dari darah diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (TEK_F) dan *reverse* (TEK_R). Amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1 µL DNA, 1 µL primer *forward* 10pmol, 1 µL primer *reverse* 10 pmol, 5 µL PCR *mix*, dan 2 µL ddH₂O kedalam *microtube* 200 µL. Tahapan amplifikasi dimulai dari pradenaturasi 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, kemudian *annealing* pada suhu 52,5°C selama 30 detik dengan gradien +/- 5°C, *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit dan *post extension* pada suhu 72°C selama 7 menit. Proses tersebut akan berulang selama 35 siklus.

4.5.7 Uji Kualitas Produk PCR

Gel agarosa 2% dibuat dengan mencampurkan serbuk agarosa ke dalam Tris-Buffer-EDTA di Erlenmeyer. Campuran kemudian dimasukkan ke dalam microwave selama tiga menit pada suhu medium. Campuran ditambahkan EtBr (*Etidium bromide*) dan dituangkan ke dalam cetakan gel. Gel selanjutnya dimasukkan ke dalam alat elektroforesis. Larutan TBE 1x dituang ke alat elektroforesis hingga gel tenggelam.

Sebanyak 2µl produk PCR ditambahkan 2µl *loading dye* dan dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada gel agarose dan dielektroforesis pada tegangan 100 volt

selama 45 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan dengan mesin *UV-transilluminator*. Setiap sampel dengan pita DNA yang muncul, kemudian dibandingkan dengan marker agar diketahui panjang fragmennya (Winarno dan Agustinah, 2007). Hasil uji ini diamati pada ukuran fragmen dengan menyejajarkan fragmen yang terlihat dengan fragmen DNA *ladder* (*Promega : BenchTop 100bp DNA Ladder*).

4.5.8 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen TEK dilakukandua arah yaitu dengan menggunakan primer TEK_F 10 pmol dan TEK_R 10 pmol untuk melihat sekuen TEK sebesar 183 bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50 ng/μL untuk dapat dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin, dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs.

4.5.9 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini kemudian dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendiskripsikan perbedaan DNA gen TEK antara individu sapi. Tahap analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuen DNA dengan membandingkan ketujuh sampel dan *database* NCBI *GeneBank*:NM173964.2. Penyejajaran menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada *software* *BioEdit*. Analisis korelasi *Bivariate Pearson* digunakan untuk menguji korelasi dengan semen segar.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi DNA dari Sampel Darah Sapi PFH Jantan

Isolasi DNA dari sampel Sapi Jantan Peranakan Friesian Holstein (*Bos taurus*) berupa *wholeblood* dilakukan dengan menggunakan *Geneaid™ DNAMiniKit* sesuai dengan protokol. Isolat DNA yang dihasilkan kemudian diuji secara kuantitatif dengan menggunakan mesin Nano-200 Micro-asam nukleat spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. DNA total hasil dari isolasi tersebut selanjutnya digunakan untuk proses amplifikasi gen TEK dari sapi jantan dengan teknik PCR untuk mengetahui sekuen gen TEK dari beberapa sapi jantan, sehingga untuk mengetahui adanya polimorfisme gen promoter TEK pada sapi perah Peranakan Friesian Holstein (PFH), dan hubungannya dengan tingkat fertilitas spermatozoa, yang ditunjukkan dengan kualitas spermatozoa sapi perah FH dari semen segar dan *post-thawing*.

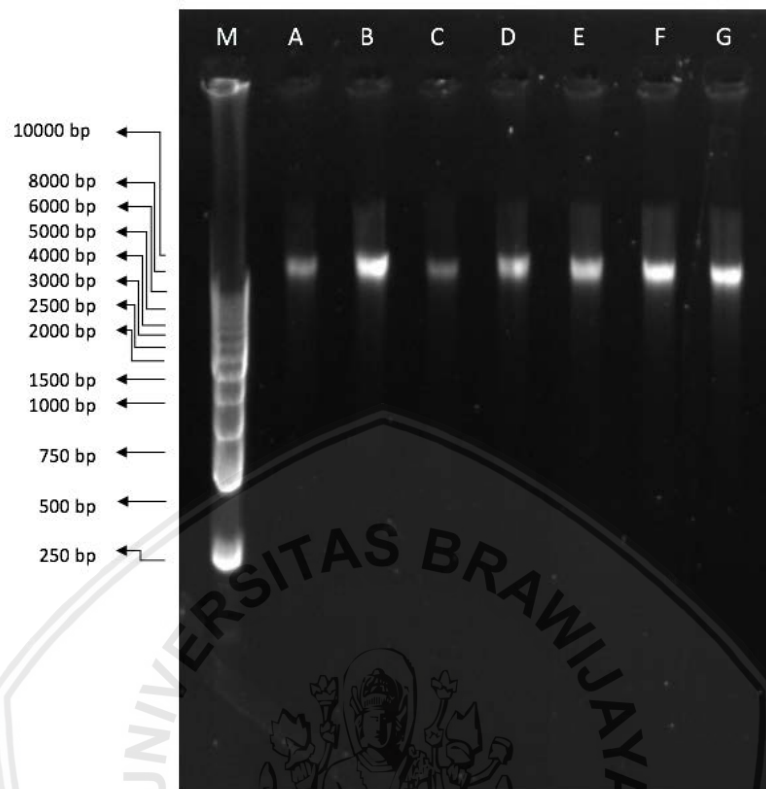
Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Total Sapi PFH Jantan

No	Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (260/280)
1	A	20.36	1.19
2	B	20.15	1.04
3	C	17.75	1.01
4	D	16.55	1.01
5	E	21.63	1.06
6	F	62.80	0.72
7	G	14.46	0.96

Konsentrasi DNA dapat dihitung secara akurat melalui penyerapan spektrofotometrik sinar ultraviolet (Siswanto, dkk., 2016). New England Biolabs

(2018) merekomendasikan bahwa konsentrasi yang digunakan pada *running* PCR adalah 0,2 ng/ μ L untuk DNA target yang relatif pendek. Hasil isolasi sampel (A, B, C, D, E, F, G) menunjukkan konsentrasi yang baik untuk proses PCR karena lebih dari 0,2 ng/ μ L. Metode yang sering digunakan untuk menentukan kemurnian DNA yaitu menggunakan rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm (A_{260nm}/A_{280nm}). Hasil isolasi sampel menunjukkan tingkat kemurnian dibawah 1,3, maka terindikasi adanya 50% kontaminan. Hal ini sesuai dengan Clark and Christopher (2001) menyatakan bahwa hasil isolasi DNA murni apabila nilai absorbansi 260/280 adalah 1,8-2,0, sedangkan apabila hasil isolasi memiliki nilai lebih rendah dari 1,8 maka hasil isolasi mengalami 50% kontaminan dan 50% mengandung asam nukleat, apabila memiliki nilai absorbansi nilainya lebih rendah daripada 1,3 maka hasil isolat mengandung 50% kontaminan dan apabila lebih dari nilai 2,0 maka mengalami kontaminasi phenol atau mengandung RNA murni. Kontaminasi berupa senyawa protein pada DNA dapat disebabkan oleh tidak adanya penambahan enzim proteinase K pada protokol isolasi DNA, berguna sebagai penghancur protein kontaminan (Kartini, 2012).

Hasil isolasi DNA total juga diuji secara kualitas dengan menggunakan elektroforesis agarose 1% didapatkan pita DNA total dengan ukuran fragmen >10.000 bp yang dapat dilihat pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1 Hasil Elektrofesis DNA Total (Agarosa 1%)

5.2 Amplifikasi Gen TEK dengan Metode PCR

Amplifikasi gen TEK dilakukan untuk memperbanyak fragmen gen TEK sebelum dilakukan sekuensing sehingga dapat digunakan untuk mengetahui sekuen gen TEK Sapi PFH jantan. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen TEK diambil dari genbank dengan nomor sekuen NM_173964.2 dan didesain menggunakan program Primer3plus. Sepasang primer yang digunakan untuk melakukan amplifikasi gen TEK pada Sapi PFH ditunjukkan pada **Tabel 5.2**. Program PCR yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 5.3**.

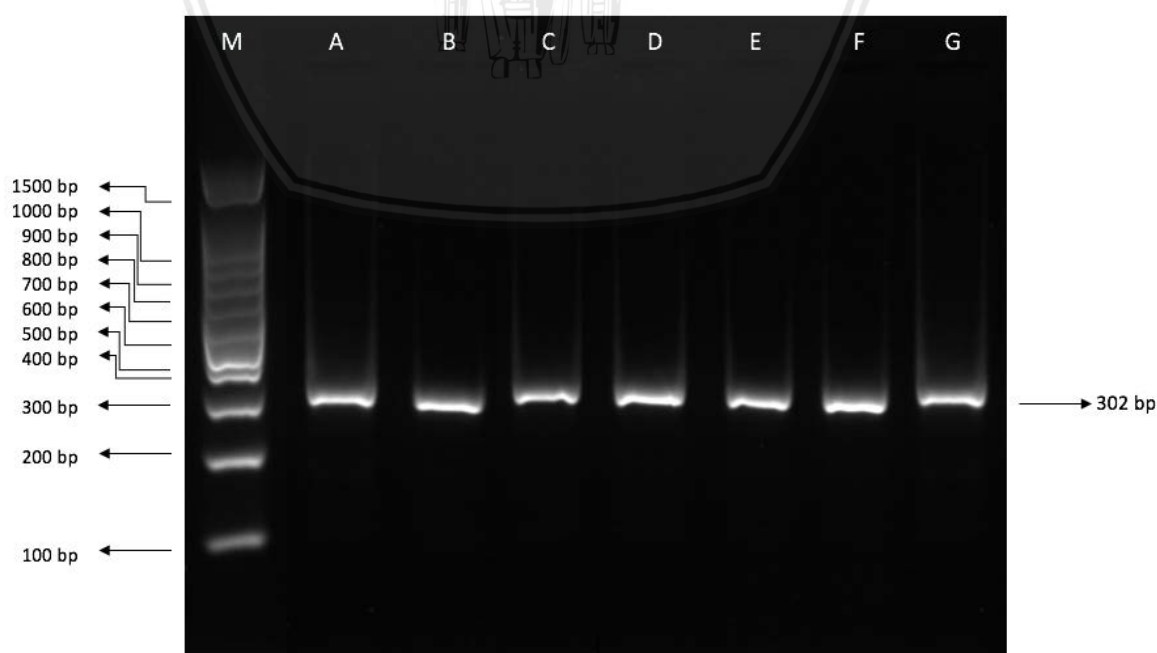
Tabel 5.2 Urutan Oligonukleotida Primer Gen TEK Sapi PFH Jantan

Primer	Urutan Oligo Nukleotida
<i>Forward</i> (TEK_F)	5'- TAGATTGTCGCTTGCCTGGG -3'
<i>Reverse</i> (TEK_R)	5'- CCTGTGCCGACAGGTTTACT -3'

Tabel 5.3 Program PCR untuk Amplifikasi gen TEK Sapi PFH Jantan

Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	3 menit	94°C
Denaturasi	30 detik	94°C
<i>Annealing</i>	30 detik	52,5°C
Ekstensi	1 menit	72°C
<i>Post Ekstensi</i>	7 menit	72°C

Proses PCR selama kurang lebih 90 menit menghasilkan produk yang selanjutnya melalui uji kualitatif elektroforesis *agarose* 2%. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.



Gambar 5.2 Hasil elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 2%

Target yang diinginkan dari produk hasil PCR menggunakan primer *forward* dan *reverse* yang didesain menggunakan *Primer3plus* yaitu 302 bp. Hasil visualisasi pada produk PCR menunjukkan pita dengan ukuran fragmen 302 bp sesuai dengan target berdasarkan desain primer. Produk PCR yang sudah spesifik seperti pada **Gambar 5.2** sudah dapat dilakukan sekuensing.

5.3 Sekuensing Gen TEK

Semua produk PCR selanjutnya melalui tahap sekuensing dengan metode *Sangersequencing (dideoxysequencing)* berdasarkan pada metode *dye terminator labelling*. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan *softwareBioEdit®* pada komputer sistem operasi Windows 10 (**Lampiran 5**).

Hasil sekuensing berupa grafik elektroferogram dan data berupa urutan fasta (urutan basa-basa hasil sekuensing). Hasil tersebut kemudian dilakukan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk penyejajaran hasil sekuensing dengan *genbank* NCBI NM_173964.2. Hasil penyejajaran dapat dilihat pada **Tabel 5.4**. Hasil BLAST kemudian menjadi patokan terhadap keberhasilan atau kesesuaian sekuensing (panjang sekuen yang dapat dibandingkan) (Madden, 2003).

Tabel 5.4 Hasil Penyejajaran dengan database NCBI

No	Sampel	Panjang Basa (Bp)	Query Coverage	Ident
1	A	273	99%	98.85%
2	B	265	98%	99.61%
3	C	286	98%	99.61%
4	D	280	98%	99.61%
5	E	271	98%	99.22%
6	F	265	99%	98.85%
7	G	296	98%	99.61%

Hasil Blast sampel A, B, C, D, E, F, G memiliki *query coverage* yang baik, yaitu A dan F sebesar 99%, serta sampel B, C, D, E, G sebesar 98% dan *ident* 98,85% untuk sampel A dan F, serta 99.61% untuk sampel B, C, D, dan G, sedangkan sampel E memiliki *ident* 99.22%. Hal ini sesuai dengan Wiley (2011), bahwa sekuens dengan *Query cover* dan *ident* pada kisaran 95% memiliki kualitas yang baik untuk dilakukan analisa.

5.4 Analisis Sekuen Gen TEK Sapi PFH

Hasil sekuensing dari ke-7 sampel menghasilkan 262 bp dan ditemukan beberapa perbedaan sekuen DNA. Analisa data menggunakan *softwareBioEdit*[®] terdapat adanya 23database gene bank menunjukkan terjadi mutasi (**Tabel 5.5**).

Tabel 5.5 Karakteristik Mutasi pada Analisa Sekuens Gen TEK Sapi PFH

Sampel	Jenis Mutasi	Jumlah	Keterangan	Total
A	Transisi	1	(c.4018T>C)	3
	Transversi	1	(c.3821A>T)	
	Delesi	1	(c.4079T>-)	
B	Transisi	-	-	3
	Transversi	2	(c.3821A>T) (c.3832C>G)	
	Delesi	1	(c.4079T>-)	
C	Transisi	-	-	4
	Transversi	2	(c.3821A>T) (c.3832C>G)	
	Delesi	2	(c.3831G>-) (c.4079T>-)	
D	Transisi	-	-	3
	Transversi	1	(c.3821A>T)	
	Delesi	2	(c.3831G>-) (c.4079T>-)	
E	Transisi	-	-	3
	Transversi	2	(c.3821A>T) (c.3832C>G)	
	Delesi	1	(c.4079T>-)	
F	Transisi	1	(c.4018T>C)	3
	Transversi	1	(c.3821A>T)	
	Delesi	1	(c.4079T>-)	
G	Transisi	1	(c.4018T>C)	4
	Transversi	1	(c.3821A>T)	
	Delesi	2	(c.3831G>) (c.4079T>-)	
				23

Menurut (Aisah dkk., 2015) terdapat empat tipe perubahan basa (1) transisi, yaitu penggantian satu basa purin (A,G) dengan satu purin atau penggantian satu basa pirimidin (C,T) dengan pirimidin, (2) transversi, yaitu penggantian satu basa pirimidin oleh basa purin atau sebaliknya, (3) delesi, yaitu pasangan basa tertentu menghilang sehingga terjadi susunan nukleotida yang berbeda (4) dan insersi, yaitu penambahan nukleotida pada suatu gen saat replikasi DNA. Hasil

penyejajaran sekuensing dihomologikan dengan database *genebank* NCBI (NM_173964.2), berdasarkan **Tabel 5.5** didapatkan adanya perbedaan pada sampel A, F, dan G dimana pada sekuen ke-4018 terjadi mutasi transisi yaitu pergantian basa timin (T) menjadi sitosin (C) (c.4018T>C), selanjutnya sampel A, B, C, D, E, F, dan G pada sekuen ke-3821 terjadi mutasi transversasi yaitu pergantian basa adenin (A) menjadi timin (T) (c.3821A>T), selanjutnya sampel B, C, dan E pada sekuen ke-3832 terjadi mutasi transversasi yaitu pergantian basa sitosin (C) menjadi guanin (G) (c.3832C>G), selanjutnya sampel C, D, dan G pada sekuen ke-3831 terjadi mutasi delesi yaitu pengurangan basa guanin (G) (c.3831G>-), selanjutnya sampel A, B, C, D, E, F, dan G pada sekuen ke-4079 terjadi mutasi delesi yaitu pengurangan basa timin (T) (c.4079T>-).

					
	3810	3820	3830	3840	3850
NM_173964.2	GACAGAAAAT	GGACATGTAT	ATAGATTGTC	GCTTGCCTGG	GACTTTGACT
A_TEKR	-----	-----	TTAGATTGTC	GGTTGCCTGG	GACTTTGACT
B_TEKR	-----	-----	TTAGATTGTC	GGTTGCCTGG	GACTTTGACT
C_TEKR	-----	-----	TTAGATTGTC	GTTGCCTGG	GACTTTGACT
D_TEKR	-----	-----	TTAGATTGTC	GTTGCCTGG	GACTTTGACT
E_TEKR	-----	-----	TTAGATTGTC	GGTTGCCTGG	GACTTTGACT
F_TEKR	-----	-----	TTAGATTGTC	GCTTGCCTGG	GACTTTGACT
G_TEKR	-----	-----	TTAGATTGTC	CTTGCCTGG	GACTTTGACT

					
	3860	3870	3880	3890	3900
NM_173964.2	GTAAGACCCC	TGTGTGAATC	TGTAGCACCT	TCTGACTAGG	ACTGTATATA
A_TEKR	GTAAGACCCC	TGTGTGAATC	TGTAGCACCT	TCTGACTAGG	ACTGTATATA
B_TEKR	GTAAGACCCC	TGTGTGAATC	TGTAGCACCT	TCTGACTAGG	ACTGTATATA
C_TEKR	GTAAGACCCC	TGTGTGAATC	TGTAGCACCT	TCTGACTAGG	ACTGTATATA
D_TEKR	GTAAGACCCC	TGTGTGAATC	TGTAGCACCT	TCTGACTAGG	ACTGTATATA
E_TEKR	GTAAGACCCC	TGTGTGAATC	TGTAGCACCT	TCTGACTAGG	ACTGTATATA
F_TEKR	GTAAGACCCC	TGTGTGAATC	TGTAGCACCT	TCTGACTAGG	ACTGTATATA
G_TEKR	GTAAGACCCC	TGTGTGAATC	TGTAGCACCT	TCTGACTAGG	ACTGTATATA

					
	3910	3920	3930	3940	3950
NM_173964.2	CTATTTTGAG	TAAGAATGTG	CTGGAATCAG	AATGCCTGTG	GTTTCATATA
A_TEKR	CTATTTTGAG	TAAGAATGTG	CTGGAATCAG	AATGCCTGTG	GTTTCATATA
B_TEKR	CTATTTTGAG	TAAGAATGTG	CTGGAATCAG	AATGCCTGTG	GTTTCATATA
C_TEKR	CTATTTTGAG	TAAGAATGTG	CTGGAATCAG	AATGCCTGTG	GTTTCATATA
D_TEKR	CTATTTTGAG	TAAGAATGTG	CTGGAATCAG	AATGCCTGTG	GTTTCATATA
E_TEKR	CTATTTTGAG	TAAGAATGTG	CTGGAATCAG	AATGCCTGTG	GTTTCATATA
F_TEKR	CTATTTTGAG	TAAGAATGTG	CTGGAATCAG	AATGCCTGTG	GTTTCATATA
G_TEKR	CTATTTTGAG	TAAGAATGTG	CTGGAATCAG	AATGCCTGTG	GTTTCATATA

					
	3960	3970	3980	3990	4000
NM_173964.2	CAATAATATA	TTTTTCTAAA	AACATGGACT	TTATGGGAAG	GTGTGAGAGT
A_TEKR	CAATAATATA	TTTTTCTAAA	AACATGGACT	TTATGGGAAG	GTGTGAGAGT
B_TEKR	CAATAATATA	TTTTTCTAAA	AACATGGACT	TTATGGGAAG	GTGTGAGAGT
C_TEKR	CAATAATATA	TTTTTCTAAA	AACATGGACT	TTATGGGAAG	GTGTGAGAGT
D_TEKR	CAATAATATA	TTTTTCTAAA	AACATGGACT	TTATGGGAAG	GTGTGAGAGT
E_TEKR	CAATAATATA	TTTTTCTAAA	AACATGGACT	TTATGGGAAG	GTGTGAGAGT
F_TEKR	CAATAATATA	TTTTTCTAAA	AACATGGACT	TTATGGGAAG	GTGTGAGAGT
G_TEKR	CAATAATATA	TTTTTCTAAA	AACATGGACT	TTATGGGAAG	GTGTGAGAGT

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      4010      4020      4030      4040      4050
NM_173964.2 ACAATTACTG TAATGCATAA CTCATTGTCC TAGATATTTT TTTTATATTT
A_TEKR      ACAATTACTG TAATGCACA CTCATTGTCC TAGATATTTT TTTTATATTT
B_TEKR      ACAATTACTG TAATGCATAA CTCATTGTCC TAGATATTTT TTTTATATTT
C_TEKR      ACAATTACTG TAATGCATAA CTCATTGTCC TAGATATTTT TTTTATATTT
D_TEKR      ACAATTACTG TAATGCATAA CTCATTGTCC TAGATATTTT TTTTATATTT
E_TEKR      ACAATTACTG TAATGCATAA CTCATTGTCC TAGATATTTT TTTTATATTT
F_TEKR      ACAATTACTG TAATGCACA CTCATTGTCC TAGATATTTT TTTTATATTT
G_TEKR      ACAATTACTG TAATGCACA CTCATTGTCC TAGATATTTT TTTTATATTT

      ....|....| ....|....| ....|....| ...
      4060      4070      4080
NM_173964.2 ACCTATATAT TGGATGCTCT AAGATGTTTC ACT
A_TEKR      ACCTATATAT TGGATGCTCT AAGATGTT-C ACT
B_TEKR      ACCTATATAT TGGATGCTCT AAGATGTT-C ACT
C_TEKR      ACCTATATAT TGGATGCTCT AAGATGTT-C ACT
D_TEKR      ACCTATATAT TGGATGCTCT AAGATGTT-C ACT
E_TEKR      ACCTATATAT TGGATGCTCT AAGATGTT-C ACT
F_TEKR      ACCTATATAT TGGATGCTCT AAGATGTT-C ACT
G_TEKR      ACCTATATAT TGGATGCTCT AAGATGTT-C ACT

```

Gambar 5.3 Hasil penyejajaran basa nukleotida menggunakan *software*BioEdit®

Keterangan : Transisi, Transversi, Delesi

5.5 Data Pemeriksaan Kualitas Semen Segar Sampel Sapi PFH

Metode pemeriksaan semen menggunakan analisis *Pearson Correlation* untuk mengetahui keeratan hubungan antar variabel. Koefisien korelasi sederhana menunjukkan seberapa besar hubungan yang terjadi antar variabel.

No.	Kode	Konsentrasi Semen	Motilitas Individu	Hasil Sekuen	Total Mutasi
-----	------	----------------------	-----------------------	-----------------	-----------------

		(10 ⁶ /mL)	Spermatozoa	Gen	
1	A	1173,9	70.70%	Transisi, Transversi, Delesi	3
2	B	1075,5	71.80%	Transversi, Delesi	3
3	C	557,6	45%	Transversi, Delesi	4
4	D	1290	71.40%	Transversi, Delesi	3
5	E	1418,7	70.40%	Transversi, Delesi	3
6	F	1031,4	71.40%	Transisi, Transversi, Delesi	3
7	G	705,7	65%	Transisi, Transversi, Delesi	4

Tabel 5.6 Hasil Perbandingan Sekuen Gen dengan Hasil Data Kualitas Semen

	Mutasi
Motilitas	Pearson Correlation
	Sig. (2-tailed)
	N
Konsentrasi	Pearson Correlation
	Sig. (2-tailed)
	N

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel 5.7 Hasil Analisis Korelasi *Pearson*

Pada analisis hubungan antara motilitas individu spermatozoa dengan mutasi, diperoleh $r_{hitung} > r_{table}$ ($0,806 > 0,754$) atau nilai signifikansi $<$ taraf nyata 5% ($0,029 < 0,050$) maka disimpulkan terdapat hubungan yang signifikan antarmotilitasindividu spermatozoadengan mutasi. Koefisien korelasi yang bertanda negatif menunjukkan bahwa hubungan yang terjadi antara motilitasindividu spermatozoadengan mutasi adalah tidak searah, artinya semakin

tinggi motilitas individu spermatozoa maka mutasi akan semakin menurun, sebaliknya semakin rendah motilitas individu spermatozoa maka mutasi akan semakin meningkat.

Pada analisis hubungan antara konsentrasi semen dengan mutasi, diperoleh $r_{hitung} > r_{table}$ ($0,897 > 0,754$) atau nilai signifikansi $<$ taraf nyata 5% ($0,006 < 0,050$) maka disimpulkan terdapat hubungan yang signifikan antarkonsentrasi semen dengan mutasi. Koefisien korelasi yang bertanda negatif menunjukkan bahwa hubungan yang terjadi antara konsentrasi semen dengan mutasi adalah tidak searah, artinya semakin tinggi konsentrasi semen maka mutasi akan semakin menurun, sebaliknya semakin rendah konsentrasi semen maka mutasi akan semakin meningkat.

Hasil perbandingan antara sekuen gen dengan data motilitas individu spermatozoa dan konsentrasi semen tiap sampel didapatkan pada sampel yang mengalami tingkat delesi lebih tinggi pada sampel C dan G menunjukkan motilitas dan konsentrasi yang lebih rendah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nakada (2006) bahwa tingkat delesi sebanding dengan tingkat penurunan motilitas sperma dan konsentrasi semen.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Terdapat perbedaan sekuens DNA/polimorfisme gen *Tyrosine kinase* (TEK) pada sapi PFH yaitu (c.4018T>C), (c.3821A>T), (c.3832C>G), (c.3831G>-), (c.4079T>-).
2. Polimorfisme gen *Tyrosin kinase* mempengaruhi kualitas semen segar sapi PFH, dengan tingkat delesi sebanding terhadap tingkat penurunan motilitas sperma dan konsentrasi semen.

6.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai gen TEK pada Sapi Peranakan Friesian Holstein kaitannya dengan pemilihan indukan sapi yang berkualitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisah, I., K. Edi, C. Ema, dan U. Nurul. 2015. Representasi Mutasi Kode Genetik Standar Berdasarkan Basa Nukleotida. *Jurnal Matematika Integratif*. Volume 11. No.1 pp. 25-34.
- Ardiana, D.W. 2009. *Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk menggunakan modifikasi buffer CTAB*. Buletin Teknik Pertanian 14:12- 16
- Artika, I.M. 2003. *Struktur, fungsi dan biogenesis Mitokondria*. Eijkman Lecture Series I: Mitochondrial medicine. Lembaga Biologi Molekul Eijkman Jakarta.
- Atabany A., B.P.Purwanto, T.Toharmatdan A. Anggraeni. 2011. *Hubungan Masa Kosong dengan Produktivitas pada Sapi Perah Friesian Holstein di Baturraden, Indonesia*. Jurnal. Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Bakely, J.dan D. H. Bade. 1998. *Ilmu Peternakan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Bath, D.L., F.N. Dickinson, H.A. Tucker and R.D. Appleman. 1985. *Dairy Cattle Principles, Practice, Problems, Profit*. Lea and Febiger. Philadelphia
- Blakely, J. dan D.H. Bade. 1992. *Pengantar Ilmu Peternakan*. Penerjemah: B. Srigandono. Cet. ke-2. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Budi, U. 2006. *Buku Ajar Dasar Ternak Perah*. Sumatera Utara: Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara.
- Bunch,D., L.Leytonand P. Saling. 1992. *Sperm Interaction with The Zona Pellucida : Role of a Tyrosine Kinase receptor for ZP3 in Fertilization and Contraception*. Schering Foundation Workshop 4 (ed. E Nieschlag and U.F. Habenicht). Pp. 367-381.
- Dematawewa, C. M. B., R. E.Pearson and P. M. VanRaden. 2007. *Modeling extended lactations of Holstein*. J. Dairy Sci. 90: 3924-3936.
- Fatchiyah, E.L., S. Arumingtyas, Widyartidan S.Rahayu. 2011. *Biologi molekuler prinsip dasar analisis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Hadisutanto, B. 2008. *Pengaruh Paritas Induk terhadap Performans Sapi Perah Fries Holland*, Bandung.
- Kartini, A.R. 2012. *Karakterisasi Molekular Padi Transgenik dengan Beberapa Metode Isolasi DNA*. Departemen Biokimia. FMIPA. IPB.

- Leondro, Henny. 2009. *Dasar Ternak Perah*. Fakultas Peternakan. Universitas Kanjuruhan Malang
- Lilian, Franca C., E.Carrilho and T.B.L. Kist. 2002. *A review of DNA sequencing techniques*. Quarterly Reviews of Biophysics. 35 (2) 169–200.
- Lodish, H., A. Berk, A.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. Darnell. 2000. *Molecular cell Biology*, 4th ed. Freeman and Company: New York.
- Madden, Tom. 2003. *The BLAST Sequence Analysis Tool : The NCBI handbook*. The National Laboratory Medicine. USA.
- Morales P. and M. Llanos. 1996. *Interaction of Human Spermatozoa with The Zona Pellucida of Oocyte: Development of The Acrosome Reaction*. Frontiers in Bioscience 1:August 1:d149-160
- Nakada, K. 2006. *Mitochondria Related Male Infertility*. PNAS 103(41):15148-53.
- New England Biolabs. 2018. *PCR Troubleshooting Guide*. <https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide>. [20 Juni 2019]
- Siswanto, J.E., B. Tiara, P. Evira, V.P. Lidya dan Y. Luluk. 2016. Isolasi DNA pada Sampel Darah Tepi dan *Swab Buccal* Pada Bayi Penderita ROP: Perbandingan Hasil Uji Konsentrasi dan Indeks Kemurnian. *Sari Pediatri*. 18 :4.
- Sudono, A., F. Rosdiana dan S. Budi. 2003. *Beternak Sapi Perah*. PT. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Suryanto, D. 2003. *Melihat keanekaragaman organisme melalui beberapa teknik genetika molekuler*. Medan: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara.
- Susmiarsih, T. 2010. *Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa*. Majalah Kesehatan PharmaMedika Vol.2, No.2
- Widowati, E.W. 2013. *Desain Primer Sitokrom B (cyt b) Sebagai Salah Satu Komponen PCR (polymerase chain reaction) Untuk Deteksi DNA Babi*. Skripsi. Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- Wiley. E. O. and S.L. Bruce. 2011. *Phylogenetics: Theory and Practise of Pylogenetic Systematics: Second Edition*. Wiley-Blackwell., USA.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: Andi Yogyakarta.