

**IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN RFSH
(RESEPTOR *FOLLICLE STIMULATING HORMON*)
TERHADAP PERFORMA PEJANTAN SAPI
PERAH FRIESIAN HOLSTEIN**

SKRIPSI

Oleh:
FAIZ NUR HIDAYAT
165130101111071



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2020

**IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN RFSH
(RESEPTOR *FOLLICLE STIMULATING HORMON*)
TERHADAP PERFORMA PEJANTAN SAPI
PERAH FRIESIAN HOLSTEIN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
FAIZ NUR HIDAYAT
165130101111071



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2020

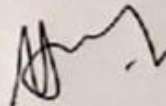
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Identifikasi Polimorfisme Gen RFSH (Reseptor *Follicle Stimulating Hormon*)
terhadap Performa Pejantan Sapi Perah Friesian Holstein**

Oleh:
FAIZ NUR HIDAYAT
165130101111071

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 17 Januari 2020
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing



drh. Yudit Oktanella, M. Si
NIK. 2014058810222001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya



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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Faiz Nur Hidayat

NIM : 165130101111071

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Identifikasi Polimorfisme Gen RFSH (Reseptor *Follicle Stimulating Hormon*) terhadap Performa Pejantan Sapi Perah Friesian Holstein

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar – benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 17 Januari 2019
Yang menyatakan,

(Faiz Nur Hidayat)
NIM. 65130101111071

Identifikasi Polimorfisme Gen RFSH (Reseptor *Follicle Stimulating Hormon*) terhadap Performa Pejantan Sapi Perah Friesian Holstein

ABSTRAK

Reseptor FSH yang diekspresikan pada membran plasma sel Sertoli hewan jantan dan sel Granulosa hewan betina sangat penting untuk menerima FSH yang diperlukan dalam regulasi sistem reproduksi. Adanya polimorfisme pada gen RFSH berpotensi untuk mempengaruhi sistem reproduksi dan performa hewan secara umum. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme gen RFSH terhadap performa pejantan yang meliputi lingkaran skrotum, BCS, dan konsentrasi spermatozoa pejantan sapi perah FH. Sampel berupa darah diambil dari 13 sapi FH di BBIB Singosari dan dianalisa di Laboratorium Animal Disease Diagnosis Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan Laboratorium Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi polimorfisme pada RFSH adalah PCR-RFLP. Metode yang digunakan untuk melihat korelasi antara polimorfisme dan performa pejantan adalah *Spearman's Rank Correlation Coefficient*. Hasil yang didapat adalah adanya korelasi sedang dan searah antara tingkat kemunculan polimorfisme G>T dengan BCS ($\rho = 0.5387884$) dan lingkaran skrotum ($\rho = 0.4269932$) serta korelasi lemah dan berlawanan arah dengan konsentrasi spermatozoa ($\rho = -0.3501423$) namun secara statistik korelasi tersebut tidak signifikan ($p > 0,05$).

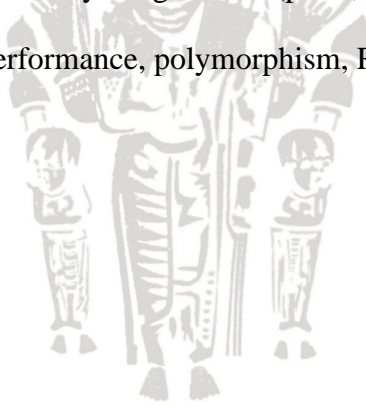
Kata kunci : pejantan, performa, poliorfisme, RFSH

Identification of FSHR (Follicle Stimulating Hormone Receptor) Gene in Correlation with Friesian Holstein Male Dairy Cow's Performance

ABSTRACT

FSH receptor in the plasmic membrane of male's Sertoli cell and female's Granulosa cell is important for receiving FSH which is needed in regulating the reproductive system. Polymorphism in RFSH gene can potentially influence reproduction and cattle performance in general. The goal of this research is to identify RFSH gene polymorphism influence on male's performance of PFH dairy cows, including testes circumferences, BCS, and sperm concentration. Blood samples are collected from 13 FH dairy cows in BBIB Singosari and analyzed in Animal Disease Diagnosis Laboratory of Veterinary Faculty, University of Brawijaya and Laboratory of Biology Course, Science and Technology Faculty, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Polymorphism of RFSH was identified by using PCR-RFLP. Correlation between polymorphisms and performance was determined using Spearman's Rank Correlation Coefficient. The result showed that there was an intermediate correlation between G>T polymorphism and BCS ($\rho = 0.5387884$) and testes circumferences ($\rho = 0.4269932$) in the same direction. There was a weak correlation with the opposing direction between G>T polymorphism and sperm concentration ($\rho = -0.3501423$), but all of those correlations were statistically insignificant ($p > 0,05$).

Key word : bull, performance, polymorphism, RFSH



KATA PENGANTAR

Puji, syukur kehadiran Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Identifikasi Polimorfisme Gen RFSH (Reseptor *Follicle Stimulating Hormone*) terhadap Performa Pejantan Sapi Perah Friesian Holstein”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih terutama kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M. App. Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
2. drh. Yudit Oktanella, M.Si selaku dosen pembimbing atas semua bantuan, nasihat, dan bimbingan yang diberikan kepada penulis.
3. drh.Wawid Purwatiningsih, M.Vet dan drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet selaku dosen penguji.
4. drh. Nofan Rickyawan, M. Sc selaku dosen pembimbing akademik atas semua bantuan, bimbingan serta dukungan yang diberikan kepada penulis.
5. Seluruh Civitas Akademika Fakultas Kedokteran Hewan yang telah membantu memfasilitasi penulisan skripsi ini.
6. Seluruh keluarga penulis, Bapak Rokhani, Ibu Ismiyati, Firstya Rafika Fauziah Salsabila, Aisyatul Maulida Nurfaizah, beserta keluarga besar yang selalu melimpahkan doa, dukungan, dan kasih sayang kepada penulis.

7. Semua rekan penelitian yang senantiasa membantu, mengajari, dan memotivasi penulis.

8. Semua rekan angkatan 2016, terutama DABITH 2016D yang senantiasa membantu, mengajari, dan memotivasi penulis.

9. Teman-teman yang senantiasa menghibur dan menyemangati penulis.

10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca. Aamiin.

Malang, 17 Januari 2020

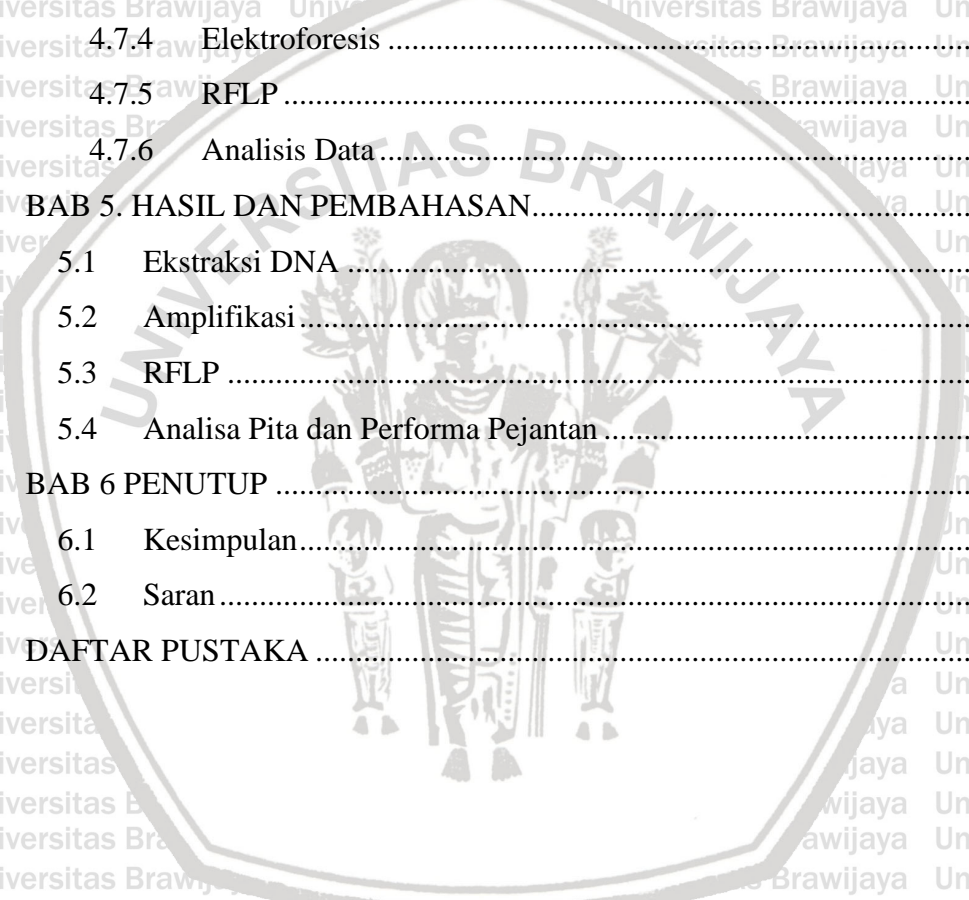
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI.....	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PERNYATAAN.....	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah Penelitian.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Sapi Perah Friesian Holstein.....	6
2.1 Follicle Stimulating Hormone (FSH) dan reseptor FSH.....	7
2.2 Polimorfisme RFSH.....	10
2.3 Penentuan <i>Body Condition Score</i> (BCS).....	12
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	15
3.1 Kerangka Konsep.....	15
3.2 Hipotesis Penelitian.....	17
BAB 4. METODE KEGIATAN.....	18
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	18
4.2 Alat dan Bahan.....	18

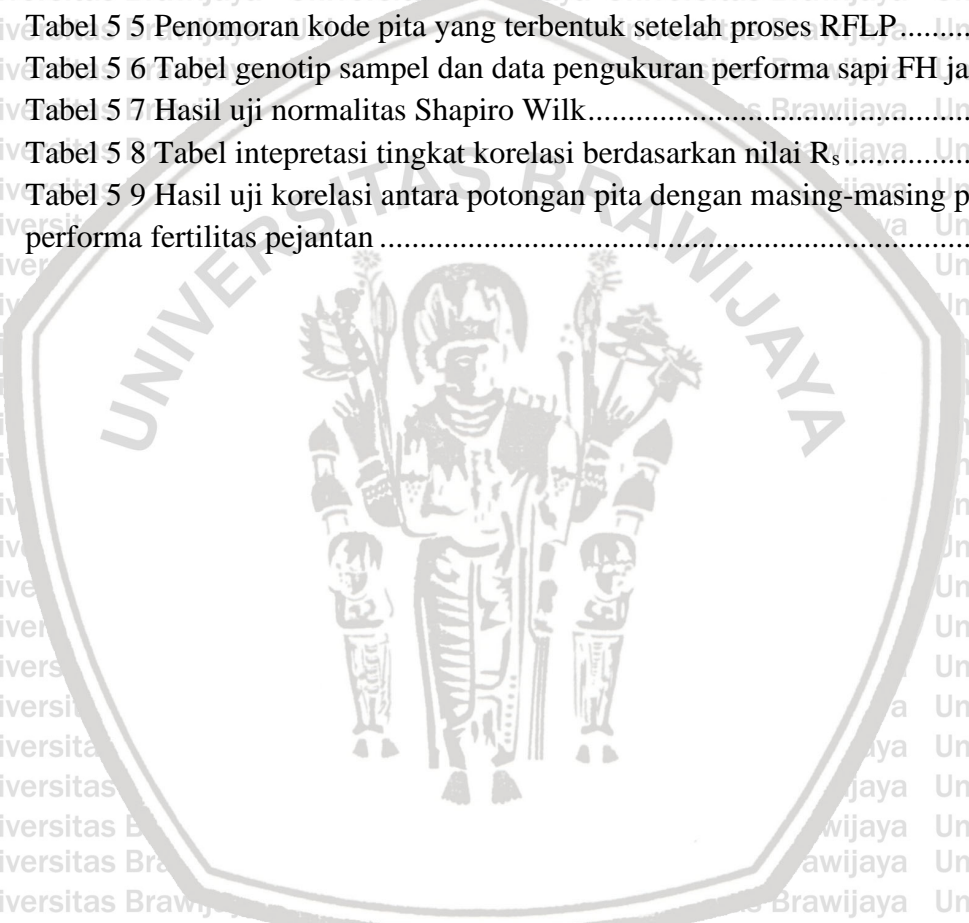


4.3	Sampel Penelitian.....	18
4.4	Rancangan Penelitian.....	18
4.5	Kriteria Sampel.....	19
4.6	Tahapan Penelitian.....	19
4.7	Prosedur Kerja.....	19
4.7.1.	Pengambilan Sampel.....	19
4.7.2	Ekstraksi DNA.....	20
4.7.3	Amplifikasi gen RFSH.....	21
4.7.4	Elektroforesis.....	22
4.7.5	RFLP.....	23
4.7.6	Analisis Data.....	23
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		24
5.1	Ekstraksi DNA.....	24
5.2	Amplifikasi.....	26
5.3	RFLP.....	29
5.4	Analisa Pita dan Performa Pejantan.....	31
BAB 6 PENUTUP.....		42
6.1	Kesimpulan.....	42
6.2	Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA.....		43



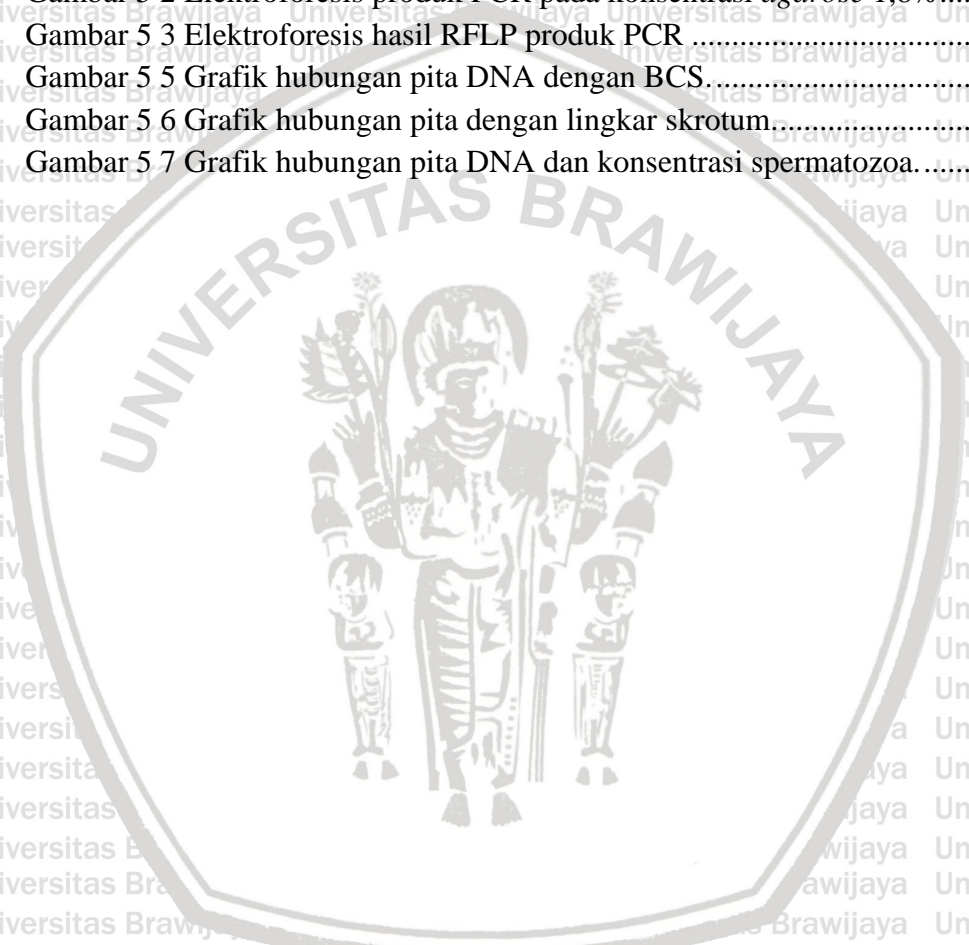
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 2 1 Scor Penilaian BCS berdasarkan Sistim Amerika (1-9)	13
Tabel 5 1 Hasil uji kuantitas ekstrak DNA dengan Nanodrop spektrofotometer. 25	25
Tabel 5 2 Sepasang primer F dan R yang digunakan pada amplifikasi PCR.....	27
Tabel 5 3 Proses amplifikasi gen RFSH pada alat <i>Thermal Cycler Bio-Rad</i>	27
Tabel 5 4 Penentuan polimorfisme berdasarkan hasil RFLP.....	30
Tabel 5 5 Penomoran kode pita yang terbentuk setelah proses RFLP.....	31
Tabel 5 6 Tabel genotip sampel dan data pengukuran performa sapi FH jantan.:	31
Tabel 5 7 Hasil uji normalitas Shapiro Wilk.....	32
Tabel 5 8 Tabel intepretasi tingkat korelasi berdasarkan nilai R_s	33
Tabel 5 9 Hasil uji korelasi antara potongan pita dengan masing-masing parameter performa fertilitas pejantan	34



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2 1 Gen RFSH pada spesies <i>Bos taurus</i>	8
Gambar 2 2 Mekanisme penghantaran sinyal FSH.....	9
Gambar 2 3 Skema substitusi asam amino pada protein RFSH	11
Gambar 5 1 Hasil visualisasi elektroforesis ekstrak DNA pada gel agarose 1% ..	24
Gambar 5 2 Elektroforesis produk PCR pada konsentrasi <i>agarose</i> 1,8%.....	28
Gambar 5 3 Elektroforesis hasil RFLP produk PCR	29
Gambar 5 5 Grafik hubungan pita DNA dengan BCS.....	35
Gambar 5 6 Grafik hubungan pita dengan lingkaran skrotum.....	36
Gambar 5 7 Grafik hubungan pita DNA dan konsentrasi spermatozoa.....	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1 Kerangka Operasional	46
Lampiran 2 Ekstraksi DNA Menggunakan “Blood DNA Preparation Kit”	46
Lampiran 3 Elektroforesis hasil ekstraksi DNA	47
Lampiran 4 Amplifikasi DNA RFSH dilanjutkan Elektroforesis	48
Lampiran 5 RFLP dilanjutkan elektroforesis hasil RFLP	48
Lampiran 6 Prediksi hasil pemotongan pita DNA oleh XbaI	48
Lampiran 7 Uji korelasi peringkat Spearman menggunakan Rstudio	49



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	Persen
< / >	Kurang dari / lebih dari
±	Kurang lebih
°C	Derajat Celcius
cm	Centimeter
kg	Kilogram
mg	Milligram
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
BB	Berat Badan
BCS	Body Condition Score
bp	<i>base pairs</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	<i>Ethylen Diamin Tetra Acetic acid</i>
FH	Friesian Holstein
FSH	Follicle Stimulating Hormone
FSHR	Follicle Stimulating Hormone Receptor
IM	Intramuscular
IV	Intravena
No.	Nomor
PFH	Peranakan Friesian Holstein
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic Acid
SC	Subcutan
TBE	Tris Borat EDTA



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sapi Friesian Holstein(FH) merupakan bangsa sapi perah yang banyak dipelihara di Indonesia. Walaupun performa FH tidak sebaik di daerah asalnya, namun sapi FH sudah menunjukkan ketahanan terhadap kondisi lokal dibandingkan dengan bangsa sapi perah unggul lainnya. Oleh karena itu, bangsa FH dipilih sebagai bibit untuk banyak proyek pengembangan sapi perah di Indonesia (Suryahadi, 2009).

Follicle Stimulating Hormone (FSH) memiliki peran mendasar dalam proses oogenesis dan spermatogenesis. Pada pejantan, kombinasi FSH dengan testosteron adalah hormon paling penting yang mengatur fungsi sel Sertoli, dibutuhkan untuk inisiasi dan pemeliharaan kualitas dan kuantitas sperma dalam proses spermatogenesis. *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) bekerja pada sel germinal dalam tubulus seminiferus testis dan bertanggung jawab untuk spermatogenesis hingga tahap spermatosit sekunder, sedangkan androgen dari testis yang mendukung tahap akhir spermatogenesis (Ishak, *et al.*, 2011).

FSH beraksi secara eksklusif melalui reseptornya. FSH berikatan dengan reseptornya yang diekspresikan pada membran sel granulosa di ovarium dan sel Sertoli di testis untuk memulai folikulogenesis dan spermatogenesis. Reseptor FSH (RFSH) bersama dengan reseptor hormon glikoprotein lainnya (LH / CGR dan TSHR) membentuk subkelompok *G-protein-coupled receptor*(GPCR) (Desai, *et al.*, 2013).

Polimorfisme adalah perubahan atau mutasi pada gen, baik yang menimbulkan perubahan struktur protein maupun tidak, namun mengakibatkan variasi fungsi protein, dan dapat menentukan kerentanan terhadap penyakit (Triwani, 2015). Perkembangan terbaru dalam biologi molekuler dan statistik telah memfasilitasi penggunaan seleksi variasi genom sebagai gen utama dalam perbaikan genetik ternak. Teknik molekuler memungkinkan deteksi polimorfisme yang ada di antara individu dalam populasi. Polimorfisme ini dapat digunakan dalam program perbaikan genetik (Sharifiyazdi, *et al.*, 2017).

Polimorfisme telah diidentifikasi pada gen RFSH, beberapa di antaranya sangat umum (Kuijper, *et al.*, 2010). Urutan pengkodean (*coding sequence*) lengkap untuk RFSH telah dikloning pada sapi dan berbagai polimorfisme pada gen RFSH telah dilaporkan. Di antaranya, beberapa dikaitkan dengan umur pubertas yang lebih awal dan sifat superovulasi (Sharifiyazdi, *et al.*, 2017).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menganalisa frekuensi polimorfisme adalah RFLP. RFLP atau *Restriction Fragment Length Polymorphism* merupakan metode yang biasa digunakan untuk memeriksa keragaman minor namun spesifik dalam urutan DNA. Hal ini didasarkan pada kekhususan endonuklease restriksi, yang mengenali satu set nukleotida yang disebut situs restriksi dan membelah DNA di situs-situs tersebut. Pola RFLP muncul pada hasil elektroforesis dari DNA yang dicerna, menghasilkan panjang fragmen pembelahan yang beragam. Individu, spesies, atau organisme dapat dibedakan berdasarkan pola RFLP yang muncul (Song, *et al.*, 2001). Keunggulan metode PCR-RFLP untuk mengidentifikasi polimorfisme adalah metode PCR-

RFLP membutuhkan waktu yang singkat dan tidak mahal daripada sekuensing DNA, walaupun teknik PCR-RFLP dalam mendeteksi pasangan basa hanya pada daerah khusus DNA (Wibowo, 2009).

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi polimorfisme gen RFSH menggunakan metode PCR-RFLP dan dampaknya terhadap performa pejantan yang meliputi lingkaran skrotum, BCS, dan konsentrasi spermatozoa yang diamati pada sapi perah Friesian Holstein yang nantinya diharapkan bisa dijadikan pedoman dalam perbaikan genetik ternak.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan, didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah polimorfisme gen RFSH dapat diidentifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP)?
2. Adakah korelasi antara polimorfisme gen RFSH terhadap performa sapi perah jantan Friesian Holstein?

1.3 Batasan Masalah Penelitian

Berdasarkan uraian rumusan masalah di atas, maka didapatkan batasan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Sampel darah sapi yang digunakan adalah darah sapi FH jantan yang diperoleh dari BBIB Singosari.
2. Antikoagulan yang digunakan adalah *Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid*.

3. Gen RFSH diisolasi dari darah sapi jantan FH menggunakan "*Blood DNA Preparation Kit by Jena Science*".
4. Amplifikasi DNA gen RFSH dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *Forward* (RFSH_F) 5'-TCCCTGCCCTTCAGTGACGAAC-3' dan *Reverse* (RFSH_R) 5'-AGATACGCCGTCCCTTTACCT-3'.
5. Analisis data dilakukan dengan melihat perbedaan potongan DNA sapi jantan FH BBIB setelah digesti enzim restriksi dan dihitung korelasinya dengan performa pejantan menggunakan metode Spearman pada *Rstudio*.
6. Enzim restriksi yang digunakan dalam metode RFLP adalah enzim *XbaI*.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui adanya potensi marka genetika tertentu yang dapat merefleksiskan sifat unggul pada kualitas sapi pejantan.
2. Memungkinkan seleksi pejantan unggul sedini mungkin menggunakan marka genetika yang telah diketahui.

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui apakah polimorfisme gen RFSH dapat diidentifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).
2. Mengetahui pengaruh polimorfisme gen RFSH terhadap performa sapi perah jantan Friesian Holsten.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi mengenai potensi marka genetica tertentu yang dapat merefleksikan kualitas pejantan unggul dan hasil penelitian diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai sumber rujukan dalam menentukan marka genetica yang dapat digunakan sebagai acuan dalam system seleksi pejantan unggul. Dimaksudkan dengan ditemukannya marka genetica sebagai acuan dalam menyeleksi pejantan unggul maka pemilihan pejantan unggul dapat dilakukan sejak dini.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi Perah Friesian Holstein

Sapi Friesian Holstein (FH) berasal dari Belanda yaitu di Provinsi North Holland dan West Friesland yang memiliki padang rumput yang sangat luas. Sapi FH mempunyai beberapa keunggulan, salah satunya yaitu jinak, dan meskipun tidak tahan panas, sapi ini mudah menyesuaikan diri dengan keadaan lingkungan. Ciri-ciri sapi FH yang baik adalah memiliki tubuh luas ke belakang, sistem dan bentuk perambingan baik, puting simetris, dan efisiensi pakan tinggi yang dialihkan menjadi produksi susu (Blakely & Bade, 1998).

Menurut Sudono, Rosdiana, & Setiawan (2003), di Indonesia sapi jenis FH ini dapat menghasilkan susu 20 liter/hari, tetapi rata-rata produksi 10 liter/hari atau 3.050 kg susu 1 kali masa laktasi (Sudono, *et al.*, 2003). Sapi jantan jenis FH ini dapat mencapai berat badan 1.000 kg, dan berat badan ideal betina adalah 635 kg. Di Amerika sapi FH ini dapat memproduksi lebih dari 7.000 kg susu dalam 1 kali masa laktasi.

Sapi FH memiliki warna cukup terkenal, yaitu belang hitam putih dengan pembatas yang jelas dan tidak ada warna bayangan serta mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan sehingga bangsa sapi ini dapat dijumpai hampir di seluruh dunia. Sapi FH memiliki kemampuan berkembang biak yang baik, rata-rata bobot badan sapi FH adalah 750 kg dengan tinggi bahu 139,65 cm. Kemampuan produksi susu sapi FH lebih tinggi dibandingkan bangsa sapi perah yang lain. Untuk mencapai produksi yang optimal sapi perah sebaiknya dipelihara di tempat yang bersuhu rendah. Suhu lingkungan yang optimum untuk sapi perah dewasa

berkisar antara 5-21°C, sedangkan kelembaban udara yang baik untuk pemeliharaan sapi perah adalah sebesar 60% dengan kisaran 50%-75% (Adriyani, *et al.*, 1980).

2.1 Follicle Stimulating Hormone (FSH) dan reseptor FSH

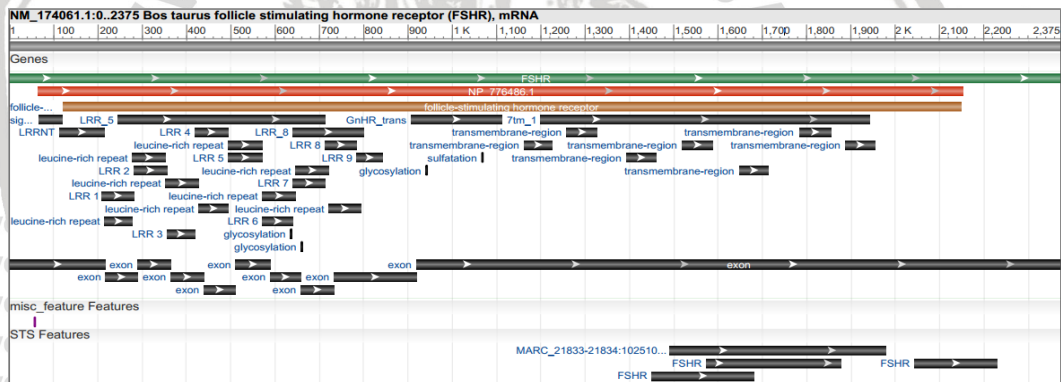
Follicle-Stimulating Hormone (FSH) memainkan peran penting dalam kontrol reproduksi jantan dan betina. FSH adalah glikoprotein heterodimerik yang terdiri dari subunit α , sama dengan hormon glikoprotein lainnya (yaitu: *luteinizing hormon* (LH), *chorionic gonadotropin* (CG) dan *thyroid-stimulating hormone* (TSH)), yang terikat secara non-kovalen dengan subunit FSH β spesifik. FSH disintesis dan disekresikan oleh hipofisis (Pascali, *et al.*, 2018).

FSH melakukan aksi fisiologisnya dengan mengaktifkan reseptor spesifik yang terletak pada sel target. Fungsi normal reseptor *Follicle Stimulating Hormone* (RFSH) sangat penting untuk pengembangan folikel dan produksi estradiol pada betina dan untuk pengaturan fungsi sel Sertoli dan spermatogenesis pada jantan. FSH berikatan dengan reseptornya yang diekspresikan pada membran sel granulosa di ovarium dan sel Sertoli di skrotum untuk memulai folikulogenesis dan spermatogenesis. RFSH bersama dengan reseptor hormon glikoprotein lainnya (LH / CGR dan TSHR) membentuk subkelompok *G-protein-coupled receptor* (GPCR) (Desai, *et al.*, 2013).

FSHR termasuk kedalam famili *rhodopsin* dari superfamili *G protein-coupled receptor* (GPCR). RFSH memiliki tingkat spesifisitas jaringan yang tinggi, diekspresikan dalam sel Sertoli dan sel granulosa yang terletak di gonad jantan dan betina. Sebagaimana reseptor hormon glikoprotein lainnya, RFSH

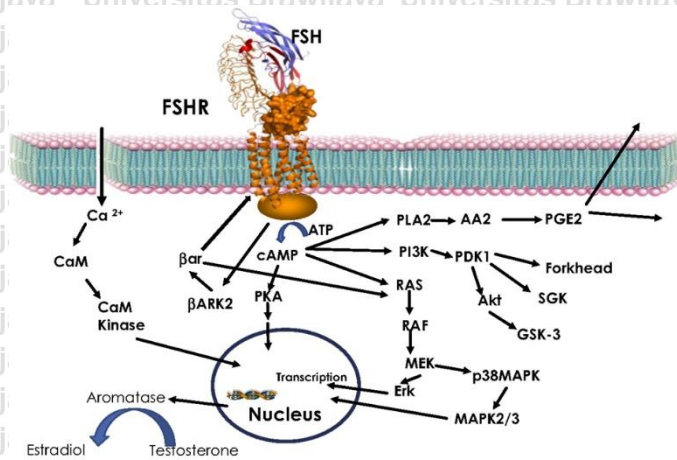
ditandai oleh domain ekstraseluler terminal (ECD) NH₂ yang besar, tempat FSH berikatan secara spesifik (Pascali, *et al.*, 2018).

FSHR termasuk famili *G protein-coupled receptors*, dan fungsi utamanya adalah untuk mengubah stimuli ekstraseluler menjadi sinyal intraseluler. Famili reseptor ini berbagi struktur yang sama dengan tujuh heliks yang menjangkau membran, sebuah N-terminus ekstraseluler dan C-terminus intraseluler. Untuk mengirimkan sinyal, domain intraseluler berinteraksi dengan protein G heterotrimerik yang mengaktifkan enzim *adenylyl cyclase* untuk meningkatkan sintesis *cAMP second messenger*, yang pada gilirannya mengaktifkan protein kinase A (Gaviria, *et al.*, 2016).



Gambar 2 1 Gen RFSH pada spesies *Bos taurus*

Gambar tersebut merupakan gambaran gen RFSH yang telah dipelajari pada *Bos taurus*. Gen ini terletak pada pada kromosom 11 dan strukturnya terdiri dari 10 exon dan 9 intron. Sembilan exon pertama mencakup domain ekstraseluler sedangkan sedangkan exon kesepuluh mencakup domain transmembran. Gen RFSH dipelajari pada berbagai hewan ternak dikarenakan pentingnya peran FSH dalam menjaga folikulogenesis dan spermatogenesis (Sosa, *et al.*, 2015).



Gambar 2.2 Mekanisme penghantaran sinyal FSH (Nataraja, *et al.*, 2015)

FSH yang berikatan dengan reseptor mengubah konformasi G-protein subunit α . Perubahan konformasi ini membuat G-protein subunit α yang awalnya berikatan dengan GDP berganti mengikat GTP. G-protein subunit α yang berikatan dengan GTP akan mendisosiasikan ikatannya dengan kompleks subunit β dan γ sehingga memungkinkan subunit α berikatan dengan enzim Adenyl Cyclase. Enzim *Adenyl cyclase* dapat mengubah *Adenosine Tri-Phosphate* (ATP) menjadi *Cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP). cAMP akan berikatan dengan Protein Kinase A (PKA) subunit regulator yang membuat subunit regulator PKA melepaskan ikatannya dengan subunit katalis PKA sehingga PKA dapat memfosforilasi target intraseluler seperti faktor transkripsi, misalnya CREB (Nataraja, *et al.*, 2015).

FSH juga dapat meningkatkan kadar kalsium intraseluler dengan mendepolarisasi saluran kalsium pada membran. Ion kalsium dalam sel akan berikatan dengan *Calcium-Mediated Protein* (CaM atau Calmodulin). Meningkatnya kadar kalsium dalam sel akan meningkatkan kerja Calmodulin

Kinase. CaM Kinase berperan dalam memfosforilasi faktor transkripsi sehingga juga berperan dalam regulasi ekspresi gen (Nataraja, *et al.*, 2015).

Penurunan kerja RFSH dilakukan oleh kompleks subunit β dan γ yang merekrut GPCR-Kinase (GRK) untuk memfosforisasi reseptor RFSH. Reseptor RFSH yang terfosforisasi akan merekrut β -arrestin yang akan memicu downregulasi dari reseptor tersebut (Nataraja, *et al.*, 2015).

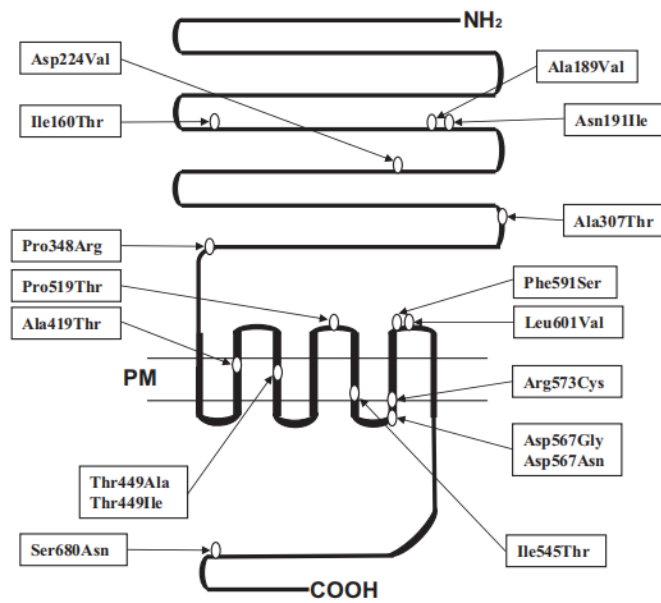
2.2 Polimorfisme RFSH

Pada manusia, kelainan genetik yang disebabkan oleh mutasi pada RFSH, yang berujung pada muncul atau hilangnya suatu fungsi, telah ditemui tetapi jarang terjadi. Namun, beberapa polimorfisme telah diidentifikasi pada gen RFSH, dan beberapa di antaranya sangat umum (Kuijper, *et al.*, 2010). Urutan pengkodean (*coding sequence*) lengkap untuk RFSH telah dikloning pada sapi dan berbagai polimorfisme pada gen RFSH telah dilaporkan. Di antaranya, beberapa dikaitkan dengan umur pubertas yang lebih awal dan sifat superovulasi (Sharifiyazdi, *et al.*, 2017).

Perkembangan terbaru dalam biologi molekuler dan statistik telah memfasilitasi penggunaan variasi genom dan seleksi sebagai gen utama dalam perbaikan genetik ternak. Teknik molekuler memungkinkan deteksi polimorfisme yang ada di antara individu dalam populasi. Polimorfisme dapat digunakan dalam program perbaikan genetik (Sharifiyazdi, *et al.*, 2017).

Mutasi titik (*point mutation*) merupakan perubahan genetik dimana satu basa nukleotida berubah, disisipkan, ataupun dihapus dari rangkaian urutan DNA atau RNA. Hasil dari mutasi poin bisa tetap mengkode asam amino yang sama

meski dengan codon yang berbeda (*silent mutation*), mengkode asam amino yang berbeda (*missense mutation*), atau bahkan mengkode stop signal (*nonsense mutation*). Mutasi pada RFSH bisa dibedakan menjadi mutasi aktivasi dan mutasi inaktivasi. Mutasi aktivasi akan meningkatkan respon RFSH terhadap FSH, bahkan dapat membuat RFSH tetap aktif tanpa keberadaan ligand atau membuat RFSH merespon hormon lain secara tidak spesifik. Mutasi inaktivasi akan mengurangi fungsi RFSH bahkan bisa menghentikan kerjanya secara total (Lussiana, *et al.*, 2008).



Gambar 2.3 Skema substitusi asam amino pada protein RFSH (Lussiana, *et al.*, 2008).

Mutasi inaktivasi RFSH misalnya Ala189 menjadi Val, Asn191 menjadi Ile, Arg573 menjadi Cys, Asp224 menjadi Val, dan Phe591 menjadi Ser dimana terjadi perubahan transduksi sinyal cAMP. Mutasi aktivasi misalnya mutasi Asp567 menjadi Asn, Thr449 menjadi Ile, Thr449 menjadi Ala, dan Ile545

menjadi Thr dimana sebagian besar menunjukkan perubahan berupa RFSH yang lebih sensitif terhadap FSH, hCG ataupun hormon tropik lain. Uniknya pada mutasi aktivasi Asp567 menjadi Gly menunjukkan terjadinya spermatogenesis secara normal tanpa adanya keberadaan FSH (Lussiana, *et al.*, 2008). Hal ini mengindikasikan bahwa adanya mutasi pada RFSH akan berpengaruh pada performa reproduksi hewan dan apabila berhasil diidentifikasi, akan berguna sebagai pedoman perbaikan mutu genetik ternak.

2.3 Penentuan *Body Condition Score* (BCS)

Body Condition Score/Skor Kondisi Tubuh adalah metode pemberian skor atau nilai terhadap tubuh seekor ternak. Penilaian BCS/SKT merupakan suatu penilaian yang bersifat sangat subyektif (sangat tergantung kepada yang melakukan pengukuran) melalui teknik penglihatan dan perabaan untuk melakukan pendugaan terhadap simpanan/cadangan lemak tubuh ternak tersebut. Simpanan lemak merupakan cadangan energi bagi ternak itu yang tersimpan pada saat ternak itu mendapatkan pakan yang cukup atau berlebih. Simpanan lemak akan dimanfaatkan oleh ternak itu pada saat kekurangan pakan terutama pada musim kemarau sehingga terjadi penurunan BCS (Cakra, 2011).

Ada dua jenis skala yang dapat digunakan untuk menentukan nilai *Body Condition Score* (BCS) pada sapi, yaitu sistem penilaian Amerika (Skor 1 hingga 9) dan sistem penilaian Skotlandia / Canada (Skor 1 hingga 5). Teknis melakukan penilaian BCS dilakukan dengan dilihat, diraba, dan ditekan. Dengan melihat tonjolan tulang kita dapat mengelompokkan penilaian menjadi 3 kelompok yaitu :
Kelompok Kurus, dengan nilai BCS 1-3 (pada kelompok ini tonjolan tulang

terlihat nyata); Kelompok Sedang, dengan nilai BCS 4-6 (pada kelompok ini tonjolan tulang masih terlihat beberapa bagian); Kelompok Gemuk, dengan nilai BCS 7-9 (pada kelompok ini tonjolan tulang sudah tidak terlihat). Penilaian skor yang lebih pasti didapatkan setelah dilanjutkan dengan diraba dan ditekan (Cakra, 2011).

Tabel 2 1 Scor Penilaian *Body Condition Score* 1-5

Skor	Pangkal ekor	Pelvis	Costae	Pinggang
BCS 1	Cekungan dalam, lemak tidak terasa	Terlihat jelas	Tampak jelas, terasa tajam	Cekungan dalam
BCS 2	Cekungan dangkal, terasa sedikit lemak	Terlihat	Terlihat, terasa tumpul	Cekungan dalam
BCS 3	Cekungan tidak terlihat, terasa lapisan lemak	Terlihat samar terlapisi lemak, terasa dengan sedikit tekanan	Tampak samar, terasa dengan sedikit tekanan	Cekungan dangkal
BCS 4	Terdapat lipatan lemak	Tidak terlihat, terasa dengan tekanan kuat	Tidak tampak, sulit dirasakan	Tidak ada cekungan
BCS 5	Tertutup lipatan lemak	Tidak terasa dengan tekanan kuat	Tidak terasa dengan tekanan	Penuh lipatan lemak

(Keown, 2005)

Tabel diatas merupakan panduan penilaian skor kondisi tubuh dengan skala 1 sampai 5 yang menurut Keown (2005) akan berguna dalam manajemen ternak dalam jumlah yang besar. Penilaian BCS dapat membantu dalam mendeteksi kemungkinan adanya masalah kesehatan dan produksi hewan. BCS juga dapat digunakan untuk memantau keberhasilan kebijakan manejerial tertentu dan bisa dijadikan dasar dalam membuat kebijakan selanjutnya (Keown, 2005).

2.4 Lingkar Skrotum

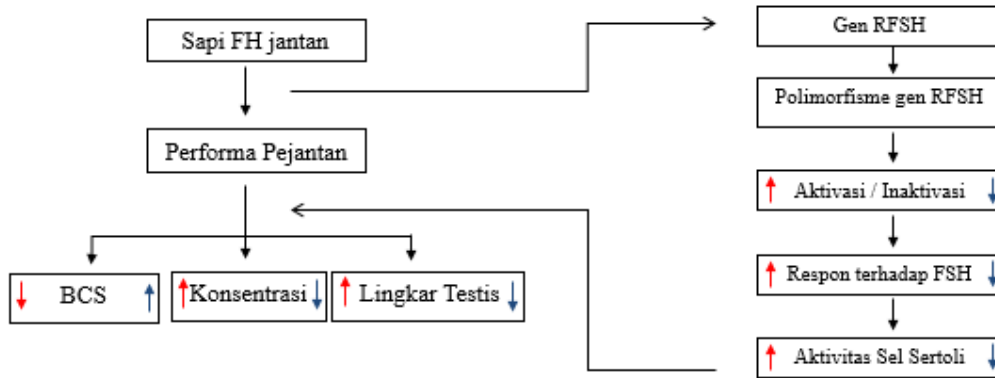
Pengukuran lingkar skrotum bisa digunakan untuk melihat perkembangan fungsi reproduksi normal sebelum dilakukannya seleksi dan pengambilan keputusan manajemen. Standar normal untuk ukuran lingkar skrotum testis biasanya didasarkan pada rata-rata lingkar skrotum pada populasi ternak sehingga masing-masing peternakan memiliki standar yang berbeda-beda. Oleh karena itu, standar-standar tersebut tidak menunjukkan tercapainya masa puber atau kematangan seksual; sebaliknya menunjukkan tingkat perkembangan skrotum testis minimum yang normal sebagaimana tercermin dalam lingkar skrotum testis. Evaluasi terpisah terhadap semen dan atau morfologi sperma diperlukan untuk mengkonfirmasi pencapaian pubertas dan kematangan seksual, dengan sebagian besar sapi jantan mencapai pubertas dalam kisaran 27 - 33 cm (Perumal, 2014).

2.5 Konsentrasi Spermatozoa

Konsentrasi spermatozoa dalam semen merupakan salah satu aspek yang dievaluasi dalam melihat kualitas semen. Konsentrasi merujuk pada jumlah spermatozoa yang ada pada setiap satu mililiter cairan ejakulat. Konsentrasi sangat erat kaitannya dengan fertilitas karena merepresentasikan jumlah spermatozoa yang ada untuk membuahi ovum. Konsentrasi normal pada setiap hewan bervariasi namun pada sapi normalnya ada pada kisaran 800- 2000 juta spermatozoa tiap mililiter (Nugroho, *et al.*, 2015).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Sapi Friesian Holstein jantan dalam menilai performanya sebagai pejantan dapat dilihat dari beberapa parameter, misalnya penilaian kondisi tubuh (*Body Condition Score*), lingkar skrotum, dan konsentrasi spermatozoa. Salah satu gen yang diduga dapat mempengaruhi performa pejantan adalah gen reseptor *follicle stimulating hormone* (RFSH). Gen RFSH mengkode pembentukan protein RFSH yang merupakan satu-satunya reseptor bagi *follicle stimulating hormone* (FSH) dan FSH sendiri hanya dapat beraksi melalui RFSH. Beberapa mutasi aktivasi pada gen RFSH telah diaporkan dapat meningkatkan respon RFSH terhadap FSH, sehingga reseptor tetap aktif meski kadar FSH sangat rendah atau bahkan tidak ada sama sekali. Sebaliknya, mutasi inaktivasi pada gen RFSH juga dilaporkan dapat mengganggu transduksi sinyal oleh reseptor atau bahkan pemadaman total terhadap fungsi reseptor (Lussiana, *et al.*, 2008).

RFSH diperlukan untuk merespon sinyal yang dibawa FSH. Pada pejantan, kombinasi FSH dengan testosteron adalah hormon paling penting yang



mengatur fungsi sel Sertoli, dibutuhkan untuk inisiasi dan pemeliharaan kualitas dan kuantitas sperma dalam proses spermatogenesis hingga tahap spermatosit sekunder (Ishak, *et al.*, 2011). FSH secara eksklusif hanya beraksi melalui reseptornya. FSH pada sapi jantan berikatan dengan reseptornya yang diekspresikan pada membran sel Sertoli di testis untuk memulai spermatogenesis (Desai, *et al.*, 2013).

Adanya polimorfisme gen RFSH berpotensi mengakibatkan perubahan regulasi sistem reproduksi. Milazzotto *et al* (2008) menyatakan bahwa ada kaitan antara perubahan nukleotida dengan fenotip pubertas dini (Milazzotto, *et al.*, 2008). Aktivasi mutasi dapat meningkatkan respon RFSH, memungkinkan proliferasi dan maturasi sel Sertoli dapat terjadi lebih awal meski dengan kadar FSH yang masih rendah. Hal ini dikarenakan FSH ikut meregulasi proliferasi sel Sertoli dan sel spermatogonia sehingga spermatogenesis bisa berjalan lebih awal. Sel Sertoli memiliki kapasitas untuk memicu pembelahan sel spermatogonia menjaga kondisi yang optimal bagi proses spermatogenesis, sehingga peningkatan jumlah sel Sertoli akan meningkatkan jumlah sel germinal. Perubahan jumlah sel germinal akan mempengaruhi jumlah spermatozoa yang diproduksi. Sel Sertoli merupakan sel yang menyokong struktur tubulus seminiferus pada testis dan pertumbuhan ukuran testis pada tingkat jaringan disebabkan oleh peningkatan panjang dan diameter tubulus seminiferus akibat proliferasi sel Sertoli (Koskenniemi, *et al.*, 2017).

Proliferasi sel Sertoli akan berpengaruh pada jumlah Androgen Binding Protein yang akan mengikat Testosteron dan membuat Testosteron terkonsentrasi

di tubulus seminiferus, sehingga jumlah Testosteron yang tersirkulasi disirkulasi tubuh akan terpengaruh. Aktivasi RFSH dapat menstimulasi sel Sertoli untuk mensekresikan enzim aromatase yang dapat mengaromatisasi testosteron menjadi estradiol. Perubahan pada RFSH akan mempengaruhi keseimbangan testosteron dan estradiol. Estradiol berperan dalam penimbunan lemak pada tubuh sedangkan testosteron berperan dalam pertumbuhan massa otot (Jardi, *et al.*, 2018).

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan kerangka konsep yang diuraikan, maka hipotesis dalam penelitian ini adalah:

- 1 Polimorfisme gen RFSH dapat diidentifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)*.
- 2 Ada kolerasi antara polimorfisme gen RFSH dan performa sapi perah jantan Friesian Holsten.

BAB 4. METODE KEGIATAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 1 bulan, mulai bulan Desember 2019 hingga Januari 2020. Penelitian bertempat di Laboratorium ADD Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya sebagai tempat identifikasi polimorfisme gen RFSH, Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari sebagai tempat pengambilan sampel darah sapi FH.

4.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah sapi FH, tabung *vacutainer*, *vacuutainer needle*, lemari es, tabung 1,5 ml, *destilation water*, JENA Bioscience *Blood DNA Preparation Kit*, *vortex mixer*, sentrifuge, inkubator, mesin Bio-Rad *thermocycler*, gel agarose, mikropipet, marker, sumur-sumur gel, gel tray, mesin UV-transiluminator, pita DNA marker (1kb dan 100bp), tabung 0,5 ml, enzim restriksi *XbaI*, buffer tango, *loading dye*, *gloves*, masker, alkohol, kapas, primer Forward (RFSH_F) 5'-TCCCTGCCCTTCAGTGACGAAC-3' dan Reverse (RFSH_R) 5'-AGATACGCCGTCCCTTTACCT-3'.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang diambil adalah darah sapi FH jantan yang diambil dari BBIB Singosari sejumlah 13 sampel.

4.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini merupakan rancangan penelitian eksploratif dengan jenis penelitian observasional dan pendekatan retrospektif menggunakan

teknik pengambilan sampel berupa *purposive sampling*. Teknik *purposive sampling* digunakan karena tidak semua sampel memiliki kriteria yang sesuai dengan fenomena yang diteliti. Pada teknik ini sudah ditetapkan kriteria-kriteria tertentu yang harus dipenuhi oleh sampel yang digunakan dalam penelitian.

4.5 Kriteria Sampel

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah:

1. Sapi FH jantan yang sudah dewasa kelamin diambil dari BBIB Singosari.
2. Pernah dilakukan pengukuran performa dan terdapat data mengenai hasil pengukuran yang telah dilakukan.

4.6 Tahapan Penelitian

1. Pengambilan sampel
2. Ekstraksi DNA
3. Nanodrop
4. Amplifikasi gen RFSH
5. Elektroforesis
6. RFLP
7. Elektroforesis
8. Analisis data

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel darah diambil dari 13 sapi FH jantan melalui vena *coccygeal* dengan menggunakan jarum *venoject*. Sebelum

pengambilan darah dilakukan tindakan aseptis dengan mengoleskan alkohol 70 %. Setelah itu darah yang diambil dimasukkan ke dalam Vacuutainer K2 EDTA 5,4 mg REF 367856 (Sjafaraenan, *et al.*, 2018). Sampel darah dimasukkan pada tabung *vacutainer* dan disimpan dalam lemari es hingga akan digunakan lebih lanjut. Pengambilan darah diikuti dengan pengambilan catatan mengenai lingkaran skrotum testis, BCS, dan konsentrasi spermatozoa sampel.

4.7.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan “Blood DNA Preparation Kit” By Jena Science. Ekstraksi dimulai dengan preparasi sampel. Mikrotube 1,5mL disiapkan sesuai jumlah sampel kemudian dimasukkan *RBC Lysis Solution* 900uL dan *Whole Blood* 300uL. Kedua bahan dihomogenkan dengan membolak-balikkan mikrotube. Mikrotube diinkubasi pada suhu ruang selama 3 menit dengan sesekali dibalik. Setelah inkubasi selesai, mikrotube disentrifus hingga terbentuk endapan putih dengan kecepatan 14000rpm selama 30 detik. Cairan supernatan dibuang dengan menyisakan cairan residu sekitar 20 uL. Mikrotube divortex selama 10 detik untuk meresuspensi *White Cell* dan cairan residu lalu ditambahkan *Cell Lysis Solution* pada suspensi sebanyak 300ul serta dipipetting hingga tiada endapan.

Protein Precipitation Solution sebanyak 100ul ditambahkan dan divortex sampai tiada gumpalan. Mikrotube disentrifus dengan kecepatan

14000rpm selama semenit atau sampai terbentuk presipitasi protein.

Dilakukan inkubasi pada es selama 5 menit dan disentrifus kembali.

Mikrotube 1,5 mL disiapkan dan ditambahkan Isopropanol >99% sebanyak 300ul. Cairan supernatan hasil sentrifus ditambahkan dan dihomogenkan dengan dibolak balik perlahan selama semenit. Mikrotube disentrifus 14000 rpm selama semenit sampai DNA terlihat endapan putih kecil. Cairan supernatan dibuang dengan dikuras perlahan menggunakan kertas saring. *Washing buffer* ditambahkan sebanyak 500uL dan dihomogenkan. Disentrifus dengan kecepatan 14000g selama semenit lalu dibuang ethanol dan dikeringkan pada suhu ruang selama 10-15menit

DNA Hydration Solution 50-100ul dimasukkan dan divortex dengan kecepatan medium. Diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit untuk *Accelerate Rehydration*. Hasil ekstraksi disimpan pada suhu 4°C.

4.7.3 Amplifikasi gen RFSH

Amplifikasi gen RFSH dilakukan dengan menggunakan sepasang primer Forward (RFSH_F) 5'-TCCCTGCCCTTCAGTGACGAAC-3' dan Reverse (RFSH_R) 5'- AGATACGCCGTCCTTTACCT-3'. Pereaksi yang dicampurkan untuk melakukan amplifikasi terdiri dari 2 µl sampel DNA, 6,5 µl *Nucelase Free Water*, 2 µl PCR *mix* dan sepasang primer masing-masing 1 µl. Amplifikasi *in vitro* ini menggunakan mesin *thermocycler*. Amplifikasi dilakukan dengan program predenaturasi 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 59°C selama 30

detik, *elongation* 72°C selama 1 menit, dan *post elongation* 72°C selama 7 menit.

4.7.4 Elektroforesis

Elektroforesis produk PCR dilakukan dengan terlebih dahulu membuat gel agarose 1,8% dengan cara agarose 0,63 g dilarutkan dalam larutan TBE sebanyak 35 ml lalu dipanaskan dalam *microwave* selama lima menit dan diaduk dengan menambahkan 1 µl PEQ Green. Larutan yang masih cair dituangkan ke dalam pencetak gel serta sisir ditempatkan di dekat tepian gel dan dibiarkan mengeras. Sisir dicabut setelah gel mengeras sehingga terbentuk sumur-sumur. Gel selanjutnya ditempatkan ke dalam *gel tray* elektroforesis yang sudah berisi larutan buffer. Produk PCR sebanyak 5 µl dicampur dengan *loading dye* (*bromothymol blue* 0,01%, *xylene cyanol* 0,01%, dan gliserol 50%) sebanyak 1 µl dengan menggunakan mikropipet dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel. Marker sebanyak 2 µl ditaruh dalam sumur paling kiri sebagai penanda. Gel tray selanjutnya dialiri listrik 100 volt selama 30 menit, molekul DNA yang bermuatan negatif pada pH netral akan bergerak ke arah positif. Setelah elektroforesis selesai, gel agarose diambil untuk dilihat panjang pita DNA dengan menggunakan sinar ultraviolet dalam mesin *UV-transiluminator*. Pembacaan fragmen DNA dilakukan dengan menarik garis lurus antara posisi pita dari masing-masing sampel DNA dengan posisi pita DNA *marker* (Sari, 2012).

4.7.5 RFLP

Tahapan RFLP dilakukan dengan memindahkan 5 μl produk PCR ke dalam tabung 0,5 ml dan ditambahkan 0,3 μl enzim restriksi *XbaI*, *buffer Universal* 0,7 μl , dan 0,1 μl *destillation water*. Campuran tersebut kemudian diinkubator pada suhu 37°C selama 16 jam. Sampel DNA yang telah dipotong dengan enzim restriksi ditambahkan *loading dye* sebanyak 1 μl , dielektroforesis pada gel agarose 3% (0,9 agarose dalam 30 ml 0,5 x TBE) dengan tegangan 100 volt selama 35 menit. Setelah dielektroforesis, gel agarose diambil untuk dilihat panjang pita DNA dengan menggunakan sinar ultraviolet dan dibandingkan dengan marker untuk mengetahui panjangnya (Sari, 2012).

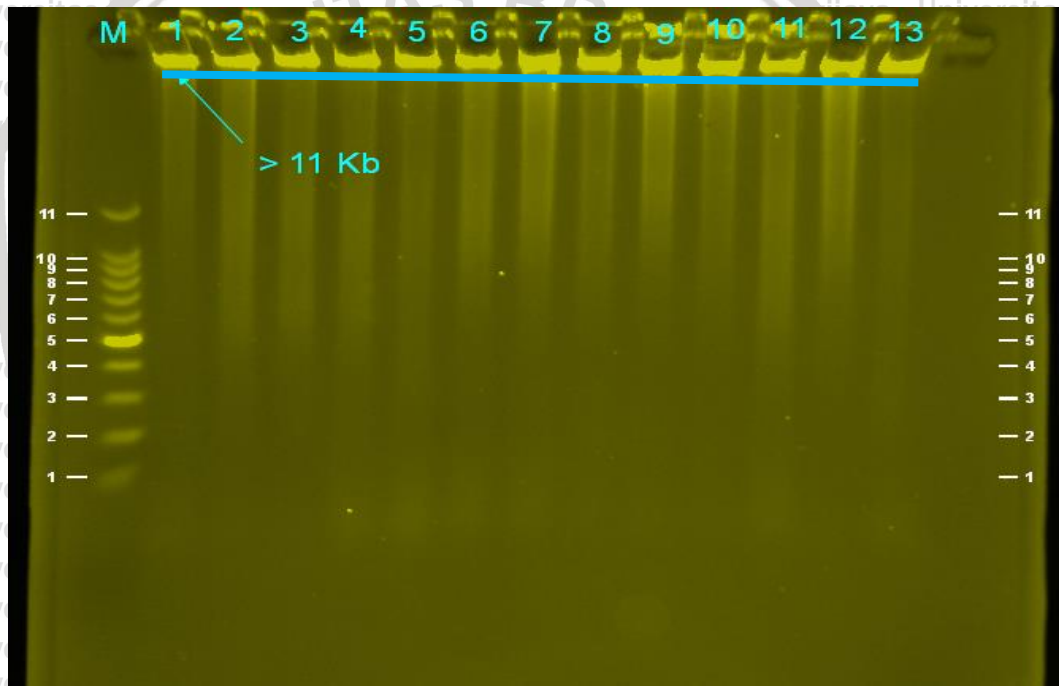
4.7.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan melihat hasil potongan pita DNA setelah RFLP yang didapat dari proses elektroforesis. Masing-masing sampel dibandingkan berdasarkan ukuran (*marker*) yang sama dan diasumsikan polimorfisme yang terjadi berdasarkan potongan kemudian diberi nomor berdasarkan kemunculan polimorfisme tersebut. Uji korelasi yang dilakukan untuk melihat adanya korelasi antara polimorfisme dengan performa (lingkar skrotum testis, BCS, dan konsentrasi spermatozoa) sapi jantan FH adalah uji *Spearman's Rank Correlation Coefficient* dengan menggunakan perangkat lunak *Rstudio*.

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekstraksi DNA

Sampel darah dari 13 sapi jantan Friesian Holstein (FH) diekstraksi DNA dilakukan menggunakan *DNA Extraction Kit* dari Jena Science dengan rincian prosedur sesuai yang terlampir pada **lampiran 2**. DNA yang didapat dari hasil ekstraksi dianalisa secara kualitatif dengan metode elektroforesis DNA pada gel agarose 1%, dan untuk mengetahui kuantitas DNA yang diperoleh menggunakan metode spektrofotometer (Nanodrop Spektrofotometer).



Gambar 5.1 Hasil visualisasi elektroforesis ekstrak DNA pada gel agarose 1%

Keterangan : M = *DNA Ladder* 1Kb, 1-13= nomor sampel

Gambar 5.1 merupakan elektroforesis hasil ekstraksi DNA yang dilakukan menggunakan gel Agarose dengan konsentrasi 1% dan sebagai standar panjang basa ditambahkan *DNA ladder* 1Kb pada sumuran pertama. Rincian prosedur dapat dilihat pada **lampiran 3**. Penggunaan konsentrasi Agarose yang

rendah dikarenakan ukuran DNA keseluruhan hasil ekstraksi yang relatif besar sehingga membutuhkan kerapatan gel yang rendah agar DNA dapat bergerak dari kutub negatif ke kutub positif saat proses elektroforesis. Menurut Zimin *et al.*(2009), genom pada spesies *Bos taurus* terdiri atas 2,857,605,192 pasang basa sehingga pada hasil elektroforesis akan tampak pita DNA sebagaimana bisa dilihat pada hasil elektroforesis diatas.

Tabel 5 1 Hasil uji kuantitas ekstrak DNA dengan Nanodrop spektrofotometer.

No	Nilai 260/230	Nilai Abs230	Nilai Abs260	Nilai Abs280	Nilai 260/280	Nilai Con(ng/ul)
1	1.07	0.04	0.04	0.04	1.16	2.03
2	1.55	1.83	2.84	2.79	1.02	142.01
3	0.54	0.14	0.08	0.17	0.46	3.79
4	1.23	0.24	0.29	0.34	0.88	14.74
5	1.50	0.52	0.78	0.75	1.03	38.93
6	1.08	0.29	0.31	0.36	0.87	15.67
7	4.96	0.02	0.07	0.13	0.56	3.73
8	3.49	0.05	0.17	0.18	0.98	8.65
9	2.22	0.91	2.02	1.05	1.92	101.14
10	0.94	0.31	0.29	0.35	0.84	14.57
11	0.81	0.19	0.15	0.17	0.93	7.68
12	1.21	0.20	0.24	0.23	1.02	11.79
13	0.72	0.16	0.11	0.25	0.45	5.59
					Rataan	28,486

Keterangan: Nilai abs = Nilai absorpsi pada panjang gelombang tertentu
 Con = Konsentrasi DNA (nanogram/mikroliter)

Tabel 5.1 merupakan hasil uji kuantitas menggunakan Nanodrop spektrofotometer yang dapat memberikan informasi mengenai konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi. Panjang gelombang maksimal yang dapat diserap asam nukleat adalah 260nm, sedangkan protein memiliki batas absorpsi pada panjang gelombang 280nm dan polisakarida pada panjang gelombang 230nm.

Perbandingan hasil absorpsi antar gelombang akan menunjukkan kemurnian DNA



hasil ekstraksi. Perbandingan antara unit absorpsi panjang gelombang 260/280 menunjukkan tingkat kontaminasi protein atau RNA, dimana 1,8 - 2 adalah nilai ideal dan dibawah 1,8 mengindikasikan adanya kontaminasi protein sedangkan diatas 2 mengindikasikan kontaminasi oleh RNA. Begitu juga dengan perbandingan 260/230 yang menunjukkan tingkat kontaminasi polisakarida dimana lebih dari 2 adalah nilai ideal dan dibawah 1,8 mengindikasikan adanya kontaminasi polisakarida (Kalendar, 2014.).

Larutan dengan konsentrasi dsDNA 50ug/ml memiliki absorpsi 1 unit pada panjang gelombang 260nm sehingga konsentrasi DNA dapat dihitung berdasarkan unit absorpsi. Untuk dilanjutkan ke reaksi PCR setidaknya dibutuhkan konsentrasi 0,1 ng/ul namun konsentrasi yang ideal adalah pada kisaran 25-100 ng/ul kecuali untuk DNA plasmid atau DNA viral dimana konsentrasi yang di rekomendasikan adalah 1 pg/ul - 10 ug/ul (Kalendar, 2014.).

Rataan konsentrasi yang didapat pada penelitian ini adalah 28,49 ng/ul yang termasuk ke dalam kisaran yang ideal yakni antara 25-100 ng/ul dan nilai konsentrasi terendah 2,03 juga melebihi 0,1 ng/ul sehingga hasil ekstraksi dapat dilanjutkan ke tahap berikutnya.

5.2 Amplifikasi

PCR merupakan proses pembentukan duplikat dari untaian DNA yang ditargetkan dalam jumlah banyak sehingga sering juga disebut amplifikasi DNA.

Proses ini dilakukan secara enzimatik yakni menggunakan enzim DNA Polimerase. Penentuan untaian DNA yang akan di amplifikasi dilakukan dengan

pemilihan primer yang mengapit regio DNA yang ditargetkan (Ehtisham, *et al.*, 2016).

Tabel 5 2 Sepasang primer F dan R yang digunakan pada amplifikasi PCR (No. referensi dari NCBI: GU253337.1)

Primer	Keterangan
<i>Forward</i>	5'-TCCCTGCCCTTCAGTGACGAAC-3'
<i>Reverse</i>	5'- AGATACGCCGTCCCTTTACCT-3'

Amplifikasi gen RFSH dilakukan menggunakan alat *Thermal Cycler Bio-Rad*. Primer yang digunakan adalah primer yang tercantum pada **Tabel 5.2**. Metode PCR pada dasarnya dibagi menjadi beberapa tahap, diantaranya adalah *denaturation*, *annealing*, dan *elongation*. Hanya saja pada tahap denaturasi pertama biasanya dilakukan lebih lama untuk memastikan untai panjang DNA terdenaturasi dengan sempurna, dan tambahan waktu pada proses denaturasi ini sering disebut dengan proses predenaturasi (Ehtisham, *et al.*, 2016).

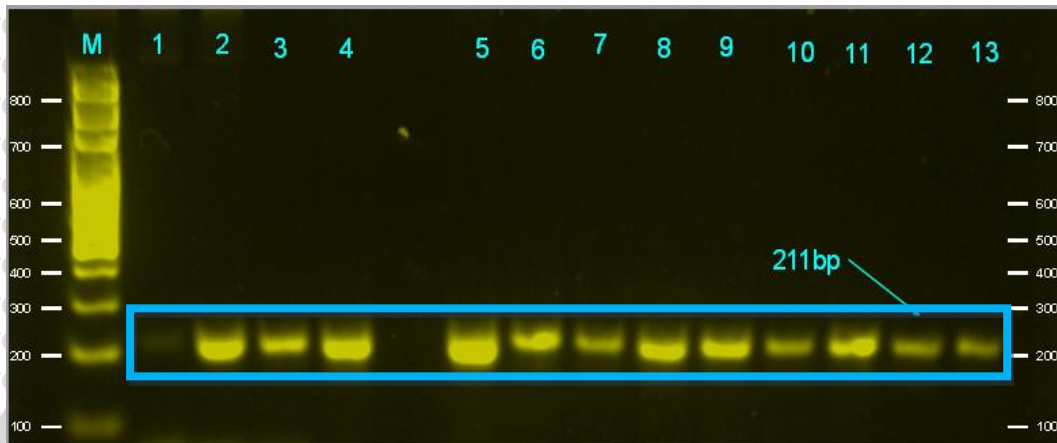
Tabel 5 3 Proses amplifikasi gen RFSH pada alat *Thermal Cycler Bio-Rad*.

Proses	Waktu	Suhu
<i>Predenaturasi</i>	2 menit	94°C
<i>Denaturasi</i>	30 detik	94°C
<i>Annealing</i>	30 detik	59-61°C
<i>Elongation</i>	1 menit	72°C

Tabel 5.3 diatas merupakan tahapan dalam proses amplifikasi gen RFSH dengan rincian prosedur dapat dilihat pada **lampiran 4**. Proses denaturasi berfungsi untuk memisahkan untai DNA yang awalnya berupa rantai ganda menjadi rantai tunggal agar primer dapat menempel pada sekuens DNA yang ditarget. Proses predenaturasi diperlukan untuk memastikan DNA terdenaturasi dengan sempurna. Proses *annealing* merupakan proses dimana primer akan



menempel pada sekuens DNA yang ditarget sedangkan proses *elongation* adalah pembentukan DNA baru berdasarkan template DNA yang akan memanjang dari lokasi primer. Tahap ini dilakukan berulang kali untuk mendapatkan duplikat DNA dalam jumlah yang besar secara eksponensial (Ehtisham, *et al.*, 2016).



Gambar 5 2 Elektroforesis produk PCR pada konsentrasi agarose 1,8%

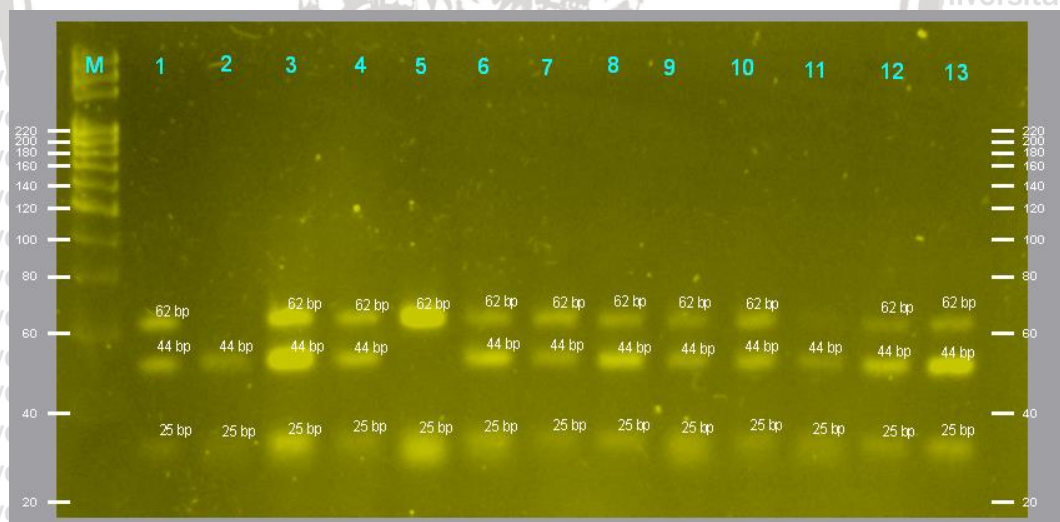
Keterangan: M= *DNA Ladder* 100bp, 1-13 = produk PCR sampel.

Setelah amplifikasi dilakukan elektroforesis untuk melihat keberhasilan proses amplifikasi dan memastikan apakah gen yang teramplifikasi sesuai berdasarkan ukuran pita. Panjang basa DNA target amplifikasi berdasarkan penelitian sebelumnya yang menggunakan primer yang sama adalah 211 pasang basa sehingga dengan adanya pita DNA yang muncul pada kisaran 211bp menunjukkan bahwa amplifikasi telah berhasil (Sharifiyazdi, *et al.*, 2017). Gel yang digunakan berupa agarose dengan konsentrasi 1,8% sehingga lebih rapat dibanding saat elektroforesis setelah ekstraksi DNA. Konsentrasi ini dikarenakan pita DNA hasil amplifikasi jauh lebih pendek dibandingkan total DNA setelah ekstraksi sehingga DNA hasil amplifikasi tetap dapat bergerak pada konsentrasi gel yang lebih tinggi dan juga *DNA ladder* yang menjadi standar juga

menggunakan DNA *ladder* 100bp. DNA *ladder* 100bp digunakan karena memiliki interval yang lebih kecil yaitu 100 pasang basa sehingga akan lebih akurat dibandingkan DNA *ladder* 1Kb untuk melihat pita target yang ada pada kisaran 211bp (Kalendar, 2014.).

5.3 RFLP

Setelah dipastikan amplifikasi gen RFSH telah berhasil kemudian dilanjutkan dengan prosedur RFLP. RFLP merupakan cara mengidentifikasi polimorfisme dengan memanfaatkan spesifisitas situs restriksi endonuklease dalam memotong untaian DNA, sehingga polimorfisme dapat dilihat dari perbedaan hasil potongan pita DNA yang terdigesti oleh enzim restriksi. Enzim restriksi yang digunakan adalah *XbaI* dengan metode RFLP sesuai yang terlampir pada lampiran 5.



Gambar 5.3 Elektroforesis hasil RFLP produk PCR pada konsentrasi *agarose* 3%;

Keterangan: M = DNA Ladder 20bp, 1-13 = hasil RFLP sampel no. 1-13

Hasil RFLP kemudian dielektroforesis untuk melihat pita DNA setelah dipotong oleh *XbaI* sebagaimana pada gambar diatas. Pita DNA yang terlihat dari

hasil elektroforesis adalah pita dengan panjang basa 25 bp , 44 bp, dan 62 bp. Hal ini menunjukkan adanya potongan pada pasang basa tersebut oleh enzim restriksi *XbaI* sedangkan enzim restriksi ini hanya dapat memotong pada sekuens T/CTAGA sehingga diketahui bahwa ada sekuens TCTAGA pada urutan basa tersebut (Promega, 2011).

Jika dibandingkan dengan sekuens pita DNA yang tersedia di GenBank : GU253337.1 dan lokasi pemotongan oleh enzim restriksi maka polimorfisme dapat diprediksi sebagai berikut.

Tabel 5 4 Penentuan polimorfisme berdasarkan hasil RFLP.

Lokasi pemotongan	Perubahan	Polimorfisme
25 bp	TCTTAA → TCTAGA	T>A (28)
		A>G (29)
44 bp	TGTAGA → TCTAGA	G>C (45)
62 bp	TGGAGA → TCTAGA	G>C (63)
		G>T (64)

Berdasarkan dari hasil potongan pita DNA dibuat asumsi sesuai yang dicontohkan oleh (Safarinejad, *et al.*, 2010). Adanya potongan pada pasang basa ke 62 berarti ada perubahan basa ke 64 dari basa Guanin menjadi Timin, maka alel dengan potongan pita pada 62 bp dapat diberi label T untuk Timin, sedangkan jika tidak ada potongan maka diberi label G untuk Guanin. Berdasarkan asumsi tersebut kemudian dilakukan penomoran berdasarkan tingkat kemunculan alel T maka didapatkan penomoran kode pita sebagai berikut.



Tabel 5 5 Penomoran kode pita yang terbentuk setelah proses RFLP

Nomor	Potongan Pita	Genotip	Kode pita
1	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
2	25 bp dan 44 bp	GG	0
3	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
4	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
5	25 bp dan 62 bp	TT	2
6	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
7	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
8	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
9	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
10	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
11	25 bp dan 44 bp	GG	0
12	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
13	25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1

Keterangan :

Potongan Pita	Genotip	Kode pita
25 bp dan 44 bp	GG	0
25 bp, 44 bp dan 62 bp	GT	1
25 bp dan 62 bp	TT	2

5.4 Analisa Pita dan Performa Pejantan

Data mengenai performa pejantan didapat dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari dengan data yang diamati berupa skor keadaan tubuh atau *Body Condition Score* (BCS), lingkaran skrotum testis, dan konsentrasi spermatozoa. Data tersebut dapat diamati pada tabel dibawah ini.

Tabel 5 6 Tabel genotip sampel dan data pengukuran performa sapi FH jantan.

No	Genotip	Rataan BCS	Lingkar Skrotum Testis (cm)	Konsentrasi spermatozoa (x 10 ⁶ /ml)
1	GT	3,50	44	699,6
2	GG	2,97	35	1604,2
3	GT	2,97	39	1531,2
4	GT	3,39	40	1268,2

5	TT	3,50	45	1364,4
6	GT	3,44	43	975
7	GT	3,25	40	1639,8
8	GT	3,50	43	965,2
9	GT	3,50	41	1408,2
10	GT	3,44	37	1414,6
11	GG	3,25	42	1499,2
12	GT	3,50	41	1426
13	GT	3,00	37	1661,2

Untuk mengetahui adanya korelasi antara polimorfisme dan performa pejantan maka perlu dilakukan uji korelasi sederhana antara pita DNA yang terbentuk dengan skor keadaan tubuh atau *Body Condition Score* (BCS), lingkaran skrotum testis, dan konsentrasi spermatozoa. Uji korelasi sederhana yang umum dipakai adalah *Pearson product-moment correlation*, namun uji ini digunakan untuk data dengan distribusi normal sehingga perlu dilakukan uji normalitas terlebih dahulu. Sebagaimana tertera pada tabel dibawah ini, beberapa data tidak terdistribusi dengan sempurna oleh karena itu tidak direkomendasikan menggunakan uji Pearson. Sebagai alternatif, uji korelasi sederhana yang dapat dilakukan adalah uji *Spearman's Rank Correlation*. Uji Spearman melihat korelasi antara dua variabel tanpa membuat asumsi mengenai distribusi frekuensi pada variabel sehingga sering digunakan pada data yang memiliki distribusi abnormal (Hauke & Kossowski, 2011).

Tabel 5 7 Hasil uji normalitas Shapiro Wilk

No	Kategori	P-value	Keterangan
1	Potongan Pita	0.0003129	Distribusi tidak normal
2	BCS	0.003319	Distribusi tidak normal
3	Lingkaran Skrotum Testis	0.8612	Distribusi normal
4	Konsentrasi Spermatozoa	0.06746	Distribusi normal



Metode Spearman mengukur seberapa kuat hubungan antara dua variabel dengan *Spearman's rank correlation coefficient*. Koefisien korelasi peringkat Spearman digunakan pada data nonparametrik dimana data dibuat dalam bentuk peringkat barulah kemudian dicari tingkat korelasinya. Keunggulan metode ini adalah tidak perlu dilakukan uji asumsi penyebaran data normal (Hauke & Kossowski, 2011).

Tabel 5.8 Tabel interpretasi tingkat korelasi berdasarkan nilai R_s

R	Intepretasi
0	Tidak berkorelasi
0,01-0,20	Sangat lemah
0,21-0,40	Lemah
0,41-0,60	Sedang
0,61-0,80	Cukup kuat
0,81-0,99	Sangat Kuat
1	Korelasi Sempurna

(Karadimitriou, 2015)

Tabel diatas merupakan tabel intepretasi koefisien korelasi mulai dari yang tidak berkorelasi hingga yang berkorelasi sempurna. Koefisien korelasi juga bisa bernilai positif ataupun negatif berdasarkan arah hubungan keduanya. Koefisien dengan nilai positif menunjukkan bahwa korelasi kedua variabel tersebut searah, dimana kenaikan satu variabel akan ikut menaikkan variabel lainnya. Sedangkan koefisien korelasi dengan nilai negatif menunjukkan bahwa korelasi kedua variabel tersebut berlawanan arah sehingga kenaikan satu variabel dapat menurunkan variabel lainnya (Karadimitriou, 2015).



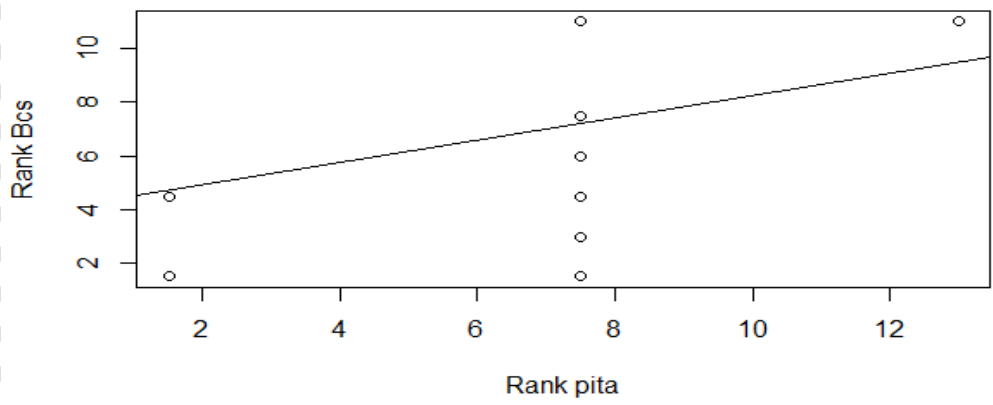
Tabel 5 9 Hasil uji korelasi antara potongan pita dengan masing-masing parameter performa fertilitas pejantan

No	Korelasi	Koefisien	Signifikansi
1	Pita DNA terhadap BCS	0.5387884	0.05745
2	Pita DNA terhadap lingkaran skrotum	0.4269932	0.1456
3	Pita DNA terhadap konsentrasi	-0.3501423	0.2409

Dengan menggunakan bantuan perangkat lunak *Rstudio* didapatkan nilai koefisien korelasi antara potongan pita DNA dengan performa pejantan sebagai mana tertera pada tabel diatas. Sebagaimana dijelaskan pada tabel sebelumnya, koefisien korelasi menunjukkan tingkat hubungan antara satu variabel dengan variabel lain, dimana hubungan akan semakin kuat jika koefisien korelasi mendekati nilai 1 dan semakin lemah jika koefisien korelasi mendekati nilai 0 (Karadimitriou, 2015). Sedangkan signifikansi (*p-value / probability value*) merepresentasikan nilai kemungkinan hipotesa nol diterima, sehingga semakin sedikit nilai *p-value* maka semakin tinggi kemungkinana hipotesa alternatif diterima. Signifikan atau tidaknya hasil suatu uji statistik bisa dilihat dengan menbandingkan *p-value* dengan taraf nyata (α) yang ditentukan sebelumnya, dimana hasil uji dikatakan signifikan jika *p-value* tidak melebihi nilai α . Umumnya α yang digunakan dalam uji statistik adalah 0,05 atau 5%, dan hasil uji statistik dinilai signifikan jika $p-value < 0.05$ (Hauke & Kossowski, 2011).



Grafik Rank Pita dan BCS

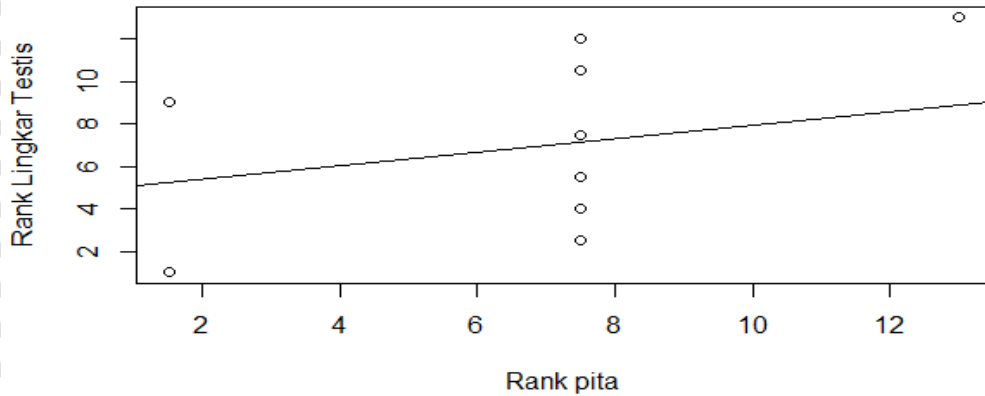


Gambar 5 4 Grafik hubungan pita DNA dengan BCS. Keterangan: X = Peringkat pita; Y = Peringkat BCS

Dari hasil uji Spearman menggunakan bantuan perangkat lunak *Rstudio* untuk mengetahui korelasi antara potongan pita DNA dengan dengan BCS, didapatkan nilai koefisien korelasi sebesar 0.5387884 dengan *p-value* 0.05745. Nilai koefisien korelasi sebesar 0.5387884 menurut Karadimitirou (2015) menunjukkan tingkat korelasi yang sedang dengan hubungan yang searah karena nilai koefisien yang positif. Artinya kenaikan pada salah satu variabel juga cenderung menaikkan variabel lain. Sedangkan nilai *p-value* 0.05745 melebihi alpha 0.05 menunjukkan bahwa korelasi tersebut secara statistik tidak signifikan untuk ukuran data tersebut (Hauke & Kossowski, 2011).



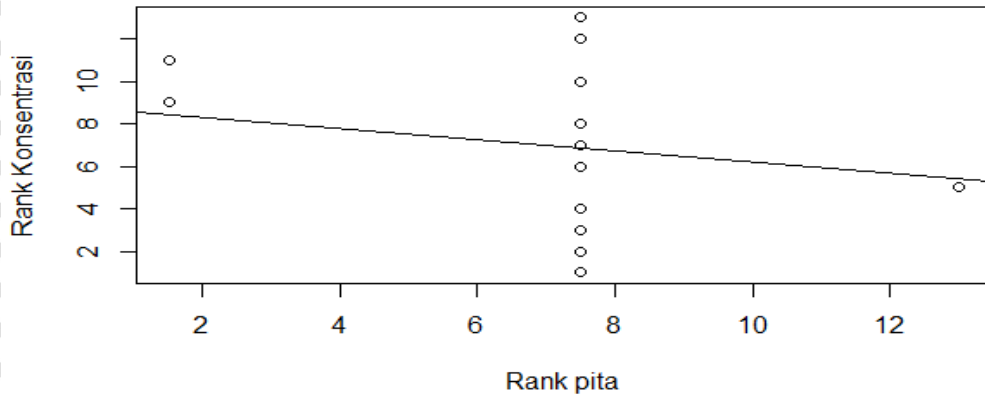
Grafik Rank Pita dan Lingkar Testis



Gambar 5 5 Grafik hubungan pita dengan lingkar skrotum testis. Keterangan: X = Peringkat pita; Y = Peringkat lingkar testis

Dari hasil uji Spearman menggunakan bantuan perangkat lunak *Rstudio* untuk mengetahui korelasi antara potongan pita DNA dengan dengan BCS, didapatkan nilai koefisien korelasi sebesar 0.4269932 dengan *p-value* 0.1456. Nilai koefisien korelasi sebesar 0.4269932 menurut Karadimitirou (2015) menunjukkan tingkat korelasi yang sedang dengan hubungan yang searah karena nilai koefisien yang positif. Artinya kenaikan pada salah satu variabel juga cenderung menaikkan variabel lain.. Sedangkan nilai *p-value* 0.1456 melebihi alpha 0.05 menunjukkan bahwa korelasi tersebut secara statistik tidak signifikan untuk ukuran data tersebut (Hauke & Kossowski, 2011).

Grafik Rank Pita dan Konsentrasi



Gambar 5 6 Grafik hubungan pita DNA dan konsentrasi spermatozoa. Keterangan:

X = Peringkat pita; Y = Peringkat konsentrasi

Dari hasil uji Spearman menggunakan bantuan perangkat lunak *Rstudio* untuk mengetahui korelasi antara potongan pita DNA dengan dengan BCS, didapatkan nilai koefisien korelasi sebesar -0.3501423 dengan $p\text{-value}$ 0.2409 . Nilai koefisien korelasi sebesar -0.3501423 menurut Karadimitirou (2015) menunjukkan tingkat korelasi yang lemah dengan hubungan yang berlawanan arah karena nilai koefisien yang negatif. Artinya kenaikan pada salah satu variabel juga cenderung menurunkan variabel lain.. Sedangkan nilai $p\text{-value}$ 0.2409 melebihi alpha 0.05 menunjukkan bahwa korelasi tersebut secara statistik tidak signifikan untuk ukuran data tersebut (Hauke & Kossowski, 2011).

Signifikansi hasil suatu uji statistik dapat dilihat dari $p\text{-value}$ atau $probability\ value$ yang merepresentasikan nilai kemungkinan hipotesa nol diterima, sedangkan hipotesa nol sendiri merupakan lawan dari hipotesa yang dibuat oleh penguji. Sehingga semakin tinggi $p\text{-value}$ justru semakin kecil kemungkinan hipotesa penguji diterima. Signifikan atau tidaknya hasil suatu uji

statistik bisa dilihat dengan membandingkan *p-value* dengan taraf nyata (α) yang ditentukan sebelumnya, dimana hasil uji dikatakan signifikan jika *p-value* tidak melebihi nilai α . Umumnya α yang digunakan dalam uji statistik adalah 0,05 atau 5%, dan hasil uji statistik dinilai signifikan jika $p\text{-value} < 0.05$ (Hauke & Kossowski, 2011).

Signifikansi sangat dipengaruhi oleh ukuran data. Pada ukuran sampel yang besar, tingkat korelasi yang lemah bisa saja memiliki nilai *p-value* yang signifikan dikarenakan semakin besar ukuran sampel, kemungkinan bahwa korelasi tersebut hanyalah kebetulan semakin kecil. Begitu juga sebaliknya, pada ukuran sampel yang kecil bisa didapatkan korelasi yang kuat namun memiliki nilai *p-value* yang tinggi karena kemungkinan bahwa korelasi tersebut hanyalah kebetulan semakin tinggi (Filho, *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil yang didapat dari analisa di atas, dapat dilihat bahwa tingkat kemunculan alel T berpengaruh pada performa sapi perah FH jantan, namun pengaruh tersebut secara statistik tidak signifikan. Secara teori, adanya polimorfisme gen RFSH dapat mengindikasikan adanya variasi asam amino yang membentuk reseptor sehingga memungkinkan adanya perbedaan tingkat respon terhadap hormon FSH. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lussiana, *et al* (2008) mengenai mutasi aktivasi dan mutasi inaktivasi yang menyatakan bahwa beberapa mutasi dapat meningkatkan atau menurunkan respon reseptor terhadap hormon (Lussiana, *et al.*, 2008).

Regio transmembran RFSH berperan dalam menghantarkan sinyal yang ditangkap oleh terminus ekstraseluler menuju terminus intraseluler saat teraktivasi

oleh FSH melalui perubahan konformasi (Gaviria, *et al.*, 2016). Perubahan pada regio transmembran dapat mempengaruhi konformasi penghantaran sinyal, baik meningkat ataupun menurun. Pada kasus tertentu, mutasi dapat membuat RFSH aktif meskipun tanpa keberadaan FSH atau membuat RFSH tidak merespon FSH sama sekali karena gangguan transduksi (Lussiana, *et al.*, 2008).

Aktivasi RFSH dapat menstimulasi sel Sertoli untuk mensekresikan enzim aromatase yang dapat mengaromatisasi testosteron menjadi estradiol. Perubahan pada RFSH akan mempengaruhi keseimbangan testosteron dan estradiol.

Estradiol berperan dalam penimbunan lemak pada tubuh sedangkan testosteron berperan dalam pertumbuhan massa otot (Jardí, *et al.*, 2018). Keseimbangan antara keduanya berpengaruh pada nilai BCS hewan, namun hasil analisa menunjukkan bahwa tingkat kemunculan alel T berkorelasi positif dengan BCS yang bersifat tidak signifikan.

RFSH yang teraktivasi juga menginisiasi pembelahan sel Sertoli hingga mencapai periode pubertas. Sel Sertoli merupakan sel yang menyokong struktur tubulus seminiferus pada testis dan pertumbuhan ukuran testis pada tingkat jaringan disebabkan oleh peningkatan panjang dan diameter tubulus seminiferus akibat proliferasi sel Sertoli (Koskenniemi, *et al.*, 2017). Ada kemungkinan bahwa polimorfisme ini meningkatkan respon sel Sertoli untuk berproliferasi dan meningkatkan ukuran testis. Hasil analisa menunjukkan bahwa tingkat kemunculan alel T berkorelasi positif dengan lingkaran skrotum testis meski korelasi ini bersifat tidak signifikan.

Testosteron diperlukan dalam proses pematangan spermatid menjadi spermatozoa (Jardi, *et al.*, 2018) dan proliferasi sel Sertoli akan memicu pembelahan sel spermatogonia (Koskenniemi, *et al.*, 2017) yang artinya juga akan mempengaruhi jumlah spermatozoa yang dihasilkan. Jumlah spermatozoa yang ada pada setiap mililiter semen menentukan konsentrasi spermatozoa semen tersebut (Nugroho, *et al.*, 2015). Peningkatan jumlah sel Sertoli akibat aktivasi RFSH dapat meningkatkan jumlah spermatogonia yang membelah namun aromatisasi testosteron akibat aktivasi RFSH juga mengurangi kadar testosteron yang dibutuhkan untuk pematangan spermatozoa, sebagaimana hasil analisa yang menunjukkan tingkat kemunculan alel T justru berkorelasi negatif, meskipun korelasi tersebut tidak signifikan.

Hasil analisa statistik yang tidak signifikan didapatkan dari *probability value* yang terlalu tinggi untuk ukuran data yang sedang diuji. *P-value* yang tinggi menunjukkan tingginya kemungkinan hipotesa nol diterima serta kemungkinan bahwa hasil analisa tersebut merupakan kesalahan acak atau kebetulan saja. Artinya meskipun pada uji korelasi penelitian ini didapatkan korelasi antara polimorfisme RFSH yang diamati dengan performa sapi jantan FH, ada kemungkinan bahwa korelasi tersebut adalah sebuah kesalahan acak atau hanya kebetulan, sehingga saat hasil uji tersebut diterapkan maka akan cenderung ditemui ketidaksesuaian (*disrepancy*) (Hauke & Kossowski, 2011). Apabila memang ada korelasi antara polimorfisme yang diamati dengan performa pejantan, maka korelasi tersebut tidak berarti jika dibandingkan dengan aspek-

aspek lain yang memiliki korelasi lebih kuat, sehingga pengaruh dari polimorfisme dapat dikesampingkan oleh aspek lain yang berhubungan.

Korelasi antara polimorfisme gen RFSH yang diamati dengan beberapa parameter performa ternak jantan yang tidak signifikan tidak menutup kemungkinan adanya polimorfisme lain yang berpengaruh pada performa ternak jantan. Diharapkan pada penelitian berikutnya dapat mengidentifikasi berbagai titik polimorfisme gen RFSH yang tepat dalam merefleksikan kualitas pejantan unggul. Dengan demikian, pemilihan kandidat pejantan unggul dapat dilaksanakan sejak dini sehingga penentuan rencana manajemen dan pengalokasian sumberdaya pemeliharaan yang tepat dapat dilakukan sejak awal tanpa menunggu kedewasaan ternak. Penelitian ini diharapkan juga dapat menjadi sumber rujukan dalam penelitian-penelitian berikutnya yang bertujuan untuk mengidentifikasi penanda-penanda genetika yang dapat dijadikan parameter kualitas pejantan unggul sehingga dapat berkontribusi dalam program perbaikan ternak di Indonesia.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Polimorfisme gen RFSH dapat diidentifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan sepasang primer *Forward* (RFSH_F) 5'-TCCCTGCCCTTCAGTGACGAAC-3' dan *Reverse* (RFSH_R) 5'-AGATACGCCGTCCCTTTACCT-3' dan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) menggunakan enzim restriksi XbaI pada basa ke 44 dan 62.
2. Terdapat kolerasi yang tidak signifikan antara polimorfisme gen RFSH yang diidentifikasi dengan PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi XbaI dengan performa sapi perah jantan Friesian Holsten, yang meliputi BCS, lingkaran skrotum testis dan konsentrasi spermatozoa dalam semen.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka penulis menyarankan untuk menggunakan primer dan enzim restriksi endonuklease yang lain untuk melihat polimorfisme lain yang mungkin berkorelasi dengan fertilitas maupun performa pejantan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adriyani, Y. *et al.*, 1980. *Pengantar Ilmu Peternakan*. Purwokerto: Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman.
- Blakely, J. & Bade, D., 1998. *Ilmu Peternakan. Edisi keempat. Terjemahan: B. Srigandono*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Cakra, I. G. L. O., 2011. *Teknis Penentuan BCS pada Ternak Sapi*. Denpasar: Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Desai, S. S. *et al.*, 2013. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction. *Reproduction*, pp. 235-248.
- Ehtisham, M. *et al.*, 2016. Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry*, pp. 4(2): 30-35.
- Filho, D. B. F. *et al.*, 2013. *When is statistical significance not significant?.* Brazil: BrazilianPoliticalScienceReview.
- Fontanesi, L. *et al.*, 2011. Haplotype variability in the bovine MIF gene and association with piebaldism in Holstein and Simmental cattle breeds. *Animal Genetics*, pp. 43 (3): 250-256.
- Gaviria, S. M., Herrera, L. A. & Echeverri, Z. J. J., 2016. Association between FSHR polymorphism with productive and reproductive traits in Antioquia Holstein cattle. *Rev.Fac.Nac.Agron.*, pp. 69 (1) : 7793-7801.
- Hauke, J. & Kossowski, T., 2011. Comparison Of Values Of Pearson'S And Spearman'S Correlation Coefficients On The Same Sets Of Data. *QUAESTIONES GEOGRAPHICAE*, 30(2), pp. 87-93.
- Hermanto, P., 2017. Pengaruh Umur Terhadap Kinerja Reproduksi Sapi Perah di Cv. Karunia Kecamatan Gampengrejo Kabupaten Kediri. *Simki-Techsain*, p. Vol. 01 No. 01.
- Ishak, A. B. L., Sumantri, C., Noor, R. R. & Arifiantini, I., 2011. *Identification of Polymorphism of FSH Beta-Subunit Gene as Sperm Quality Marker in Bali Cattle Using PCR-RFLP*. Bogor: Darmaga Campus.
- Jardí, F. *et al.*, 2018. Androgen and estrogen actions on male physical activity: a story beyond muscle. *Journal of Endocrinology*, p. 238: 1.

Kalendar, R., 2014.. *DNA Isolation*. Egypt: Field Crops Research Institute.

Karadimitriou, S. M., 2015. *Correlation in R*. Birmingham: University of Sheffield.

Keown, J. F., 2005. *How to Body Condition Score Dairy Animals*. G1583 ed. Lincoln: University of Nebraska.

Koskenniemi, J. J., Helena, Virtanen, E. & Toppari, J., 2017. Testicular growth and development in puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, p. 24: 215–224.

Kuijper, E. A. M. *et al.*, 2010. eQUENCY distribution of polymorphisms in the FSH receptor gene in infertility patients of different ethnicity. *Reproductive BioMedicine Online*, pp. 20, 588– 593.

Lussiana, C. *et al.*, 2008. Mutations and Polymorphisms of the FSH Receptor (FSHR) Gene. *Obstetrical & Gynecological Survey*, p. 63. 12: 785–795.

Milazzotto, M. P. *et al.*, 2008. New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos Taurus indicus* (Nellore). *Livestock Science*, pp. 274-279.

Nataraja, S. G. *et al.*, 2015. Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. *Frontier Endocrinology*, pp. 6. 142. 1-15.

Nugroho, Y., Susilawati, T. & Wahjuningsih, S., 2015. Kualitas Semen Sapi Limousin Selama Pendinginan Menggunakan Pengencer Cep-2 dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Kuning Telur Dan Sari Buah Jambu Biji (*Psidium guajava*). *urnal Ternak Tropika*, 15(1), pp. 31-42.

Octaviani, T. T., 2010. *Kinerja Reproduksi Sapi Perah Peranakan Friesian Holstein (PFH) Di Kecamatan Musuk Boyolali (Skripsi)*. Surakarta: Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret.

Pascali, F. D. *et al.*, 2018. *Follicle-stimulating hormone receptor: advances and remaining challenges*. France: Institut National de la Recherche Agronomique.

Perumal, P., 2014. Scrotal Circumference and Its Relationship with Testicular Growth, Age, and Body Weight in Tho Tho (*Bos indicus*) Bulls. *International Scholarly Research Notices*, Volume 2014, pp. 1-6.

Promega, 2011. *Assembly of Restriction Enzyme Digestions*. Madison: Promega Corporation.

Safarinejad, M. R., Shafiei, N. & Safarinejad, S., 2010. The Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) T-786C, G894T, and 4a/b Gene Polymorphisms in the Risk of Idiopathic Male Infertility. *Molecular Reproduction & Development*, Volume 77, pp. 720-727.

Sari, S. A., 2012. *Identifikasi Keragaman Gen Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR) Pada Spesies Sapi Bos javanicus, Bos taurus, dan Bos indicus dengan Metode PCR-RFLP [Skripsi]*. Bogor: Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

Sharifiyazdi, H. et al., 2017. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, pp. xxx-xxx.

Sjafaraenan, et al., 2018. Profil DNA Gen Follicle Stimulating Hormone Reseptor (FSHR) pada Wanita Akne Dengan Teknik PCR dan Sekuensing DNA. *Bioma Jurnal Biologi Makassar*, pp. 3 (1) 1-11.

Song, G. J. et al., 2001. Mutation Screening of the FSH Receptor Gene in Infertile Men. *Molecules and Cells*, pp. 12. 3. 292-297.

Sosa, A. et al., 2015. Genotyping of Follicle Stimulating Hormone Receptor Gene in Fertile and Infertile Buffalo. *Global Veterinaria*, pp. 163-168.

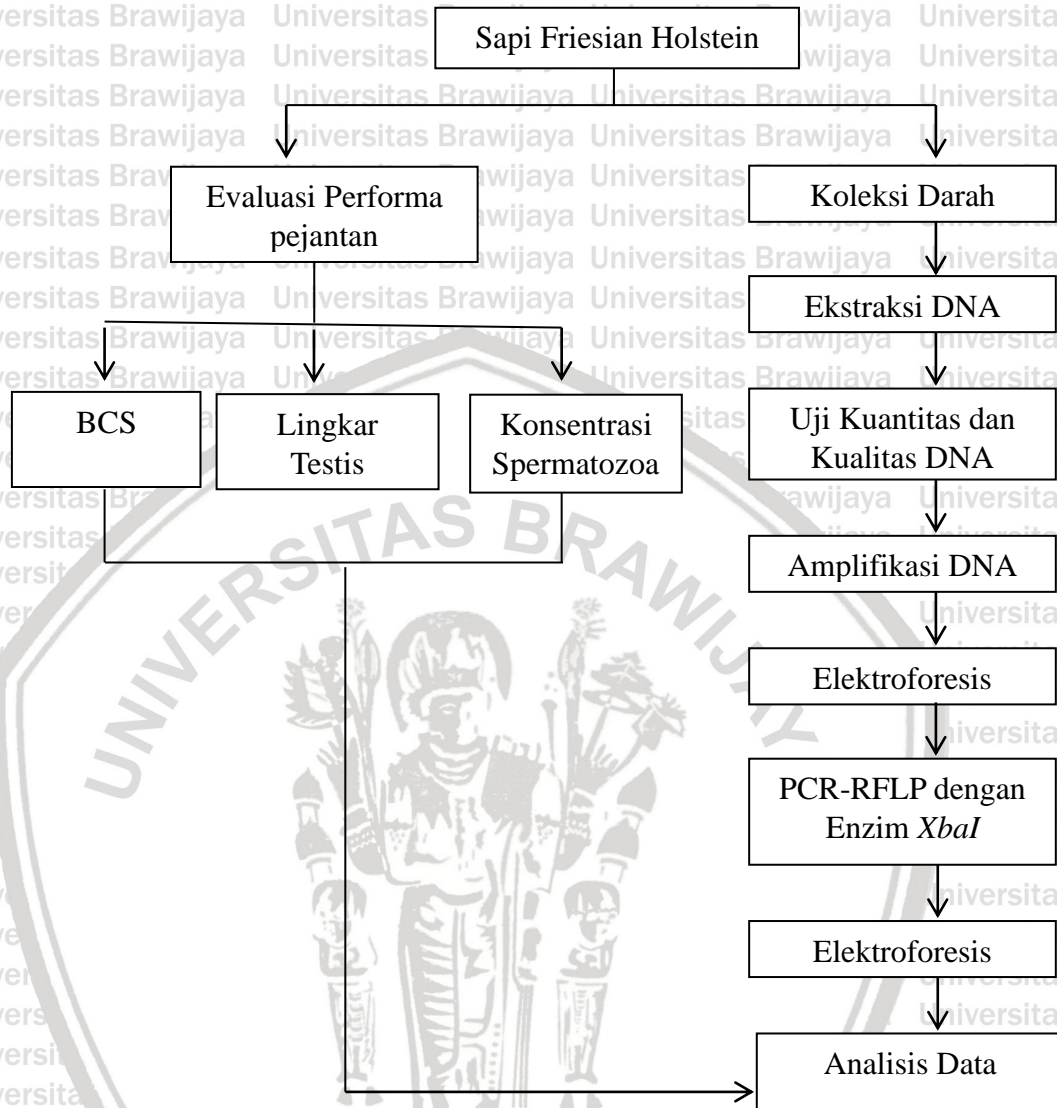
Sudono, A. et al., 2003. *Beternak Sapi Perah Secara Intensif*. Jakarta: Agromedia Pustaka.

Suryahadi, T. T. D., 2009. *Pengembangan sapi perah di Indonesia*. Bogor: Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

Triwani, I. S., 2015. Single Nucleotide Polymorphism Promoter -765g/C Gen Cox-2 Sebagai Faktor Risiko Terjadinya Karsinoma Kolorektal. *Biomedical Journal of Indonesia*, p. Vol. 1.

Wibowo, D. A., 2009. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Gen Sitokrom b DNA Mitokondria dari Delapan Spesies Burung [Skripsi]*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Lampiran 1 Kerangka Operasional



Lampiran 2 Ekstraksi DNA Menggunakan “Blood DNA Preparation Kit”

By Jena Science

Kegiatan	Keterangan
Sterilisasi & persiapan alat	
Briefing pelaksanaan tahapan ekstraksi DNA	
Ekstraksi DNA Menggunakan “Blood DNA Preparation Kit” By Jena Science	FH jantan= 1x-13x
Cell lysis	
-persiapan sampel Whole Blood pada suhu ruang	
-disiapkan microtube 1,5mL	
-dimasukkan RBC Lysis Solution	900uL
-dimasukkan Whole Blood	300uL
-dihomogenkan dengan dibolak balik	10x

-diinkubasi suhu ruang Pada sampel yang dikoleksi 1 jam sebelum preparasi, inkubasi ditambah menjadi 10menit	3menit, sesekali dibalik
-disentrifus → terbentuk endapan putih	15000g/14000rpm, 30s
-dibuang cairan supernatan, disisakan <20 ul cairan residu	
-divortex → resuspensi White Cell & cairan residu	10s
-ditambahkan Cell Lysis Solution pada suspensi	300ul
-dipipetting up and down	Hingga tiada endapan
Protein Precipitation	
- ditambahkan Protein Precipitation Solution	100ul
-divortex → tiada gumpalan	20s
-disentrifus → terbentuk precipitasi protein(dark pellet)	15000g, 60s
-diinkubasi pada es	5menit
-disentrifus	15000g, 60s
DNA Precipitation	
-disiapkan mikrotube 1,5mL	
-ditambahkan Isopropanol >99%	300ul
-ditambahkan cairan supernatan	
-dihomogenkan dengan dibolak balik perlahan	60s
-disentrifus → DNA terlihat endapan putih kecil	1500g, 60s
-dibuang cairan supernatan, dikuras perlahan dengan kertas saring	
-ditambah washing buffer dan dibolak baik	500ul
-disentrifus	15000g, 60s
-dibuang ethanol, dikeringkan pada suhu ruang	10-15menit
DNA Hydration	
-ditambahkan DNA Hydration Solution	50-100ul
-divortex medium speed	
-diinkubasi → Accelerate Rehydration	65°C, 30menit
-disimpan 4°C, jangka panjang (-20°C) – (-80°C)	

Lampiran 3 Elektroforesis hasil ekstraksi DNA

Kegiatan	Keterangan
Sterilisasi dan persiapan alat	
Pembuatan agarose 1%	
-dimasukkan agarose	0,35g
-dimasukkan buffer TBE	35 ml
-dihomogenkan dengan bantuan Microwave	Larut, mendidih
-dimasukkan gel red dan digoyang	2ul
-dituang pada tanki elektroforesis	
-didinginkan hingga mengeras	10menit
Elektroforesis (agarosen 1%)	
-direndang gel pada TBE buffer	
-dituang marker pada sumuran pertama	3ul, 1kb

-dituang Sampel pada sumuran 2-15	4ul
-ditutup dan dihubungkan power suply, dirunning	400mA, 100V, 35 menit
-dibaca di GelDoc	

Lampiran 4 Amplifikasi DNA RFSH dilanjutkan Elektroforesis hasil amplifikasi

Kegiatan	Keterangan
Amplifikasi DNA	
-dimasukkan PCR Mix	5ul
-dimasukkan ddH ₂ O	2,5ul
-dimasukkan Sampel	2,5ul
-dimasukkan Primer TEK F	1ul
-dimasukkan primer TEK R	1ul
-dirunning Thermocycler Program RFSH	
Elektroforesis (agarose 1,8% %)	
-direndam gel pada TBE buffer	
-dituang marker pada sumuran pertama	3ul, 100 bp
-dituang Sampel pada sumuran	4ul
-ditutup dan dihubungkan power suply, dirunning	400mA, 100V, 35 menit
-dibaca di GelDoc	UV Tray

Lampiran 5 RFLP dilanjutkan elektroforesis hasil RFLP

Kegiatan	Keterangan
RFLP	
- Disiapkan PCR tube	
- Ditambahkansampel (PCR reaction)	10 µl
- Ditambahkan nuclease free water	18 µl
- Ditambahkan buffer tango	2 µl
- Ditambahkan XbaI	1 µl
- Diinkubasi	37°C; 2 jam
Elektroforesis 1,8%	
- Gel direndam di TBE	
- Dituang marker padasumuranpertama	100 bp, 3 µl
- Dituangsampelpadasumuranselanjutnya	4 µl
- Dilakukanelektroforesis	400 mA, 100 V, 35 menit
- Dibaca di gel doc	

Lampiran 6 Prediksi hasil pemotongan pita DNA oleh XbaI pada polimorfisme RFSH

Gen RFSH	TCCCTGCCCTTCAGTGACGAACCTCTCTTAAATGATGTTTCA CACTGTAGATTGCATCTGTTTTGGGAGAAGTCGAGTGTGT CACTCTGTTTGGAGAAAAAATAGTGACCCACAGGAACA GTCTTACAGCGAATTTAATATAAGCTATTCTAGACATGCA TCAAGTTTCAATTTGCAAACCCAACCAAAAAAGGTAAAG GGACGGCGTATCT
Lokasi restriksi	Tanpa basa ke 148 → TCTAGA mutasi



enzim	Jika ada mutasi	basa ke 25 , jika terjadi mutasi substitusi t-a (28) dan a-g (29) : TCTTAA → TCTAGA
<i>Xba</i> I T [^] CTAGA		basa ke 44, jika terjadi mutasi g-c (45) : TGTAGA → TCTAGA
		Basa Ke 62, Jika Terjadi Mutasi G-C (63) Dan G-T (64) : TGGAGA → TCTAGA
		basa ke 71 , jika terjadi mutasi g-t (73) dan t-a (76) : TCGAGT → TCTAGA
		basa ke 90, jika terjadi mutas t-c (91) dan g-t (92) : TTGAGA → TCTAGA
		basa ke 160, jika terjadi mutasi a-t (162) dan t-a (165): TCAAGT → TCTAGA

Lampiran 7 Uji korelasi peringkat Spearman menggunakan Rstudio

```
R version 3.6.2 (2019-12-12) -- "Dark and Stormy Night"
Copyright (C) 2019 The R Foundation for Statistical Computing
Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)
```

```
R is free software and comes with ABSOLUTELY NO WARRANTY.
You are welcome to redistribute it under certain conditions.
Type 'license()' or 'licence()' for distribution details.
```

```
R is a collaborative project with many contributors.
Type 'contributors()' for more information and
'citation()' on how to cite R or R packages in publications.
```

```
Type 'demo()' for some demos, 'help()' for on-line help, or
'help.start()' for an HTML browser interface to help.
Type 'q()' to quit R.
```

```
> shapiro.test(PitaBCSTestiskonsentrasiasLI$Pita)
```

```
Shapiro-wilk normality test
```

```
data: PitaBCSTestiskonsentrasiasLI$Pita
W = 0.67461, p-value = 0.0003129
```

```
> shapiro.test(PitaBCSTestiskonsentrasiasLI$BCS)
```

```
Shapiro-wilk normality test
```

```
data: PitaBCSTestiskonsentrasiasLI$BCS
W = 0.77305, p-value = 0.003319
```

```
> shapiro.test(PitaBCSTestiskonsentrasiasLI$Testis)
```

```
Shapiro-wilk normality test
```

```
data: PitaBCSTestiskonsentrasiasLI$Testis
W = 0.96738, p-value = 0.8612
```

```
> shapiro.test(PitaBCSTestiskonsentrasiasLI$Konsentrasi)
```

```
Shapiro-wilk normality test
```

```
data: PitaBCSTestiskonsentrasiasLI$Konsentrasi
W = 0.87822, p-value = 0.06746
```



Spearman's rank correlation rho

data: Faiz_Tabel\$`Rank Pita` and Faiz_Tabel\$`Rank BCS`

S = 167.88, p-value = 0.05745

alternative hypothesis: true rho is not equal to 0

sample estimates:

rho

0.5387884

data: Faiz_Tabel\$`Rank Pita` and Faiz_Tabel\$`Rank Lingkar`

Testis S = 208.57, p-value = 0.1456

alternative hypothesis: true rho is not equal to 0

sample estimates:

rho

0.4269932

data: Faiz_Tabel\$`Rank Pita` and Faiz_Tabel\$`Konsentrasi`

S = 491.45, p-value = 0.2409

alternative hypothesis: true rho is not equal to 0

sample estimates:

rho

-0.3501423

