

**EKSPLORASI ALEL CARRIER BOVINE LEUCOCYTE
ADHESION DEFICIENCY (BLAD) MELALUI ANALISA
POLIMORFISME GEN CD18 DENGAN TEKNIK
PCR - RFLP PADA SAPI PERAH PERANAKAN
FH BETINA DI KECAMATAN BATU**

SKRIPSI

Oleh:
ALDRYAN CRISTIANTO PRATAMA
165130107111049



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

2020



**EKSPLORASI ALEL CARRIER BOVINE LEUCOCYTE
ADHESION DEFICIENCY (BLAD) MELALUI ANALISA
POLIMORFISME GEN CD18 DENGAN TEKNIK
PCR - RFLP PADA SAPI PERAH PERANAKAN
FH BETINA DI KECAMATAN BATU**

SKRIPSI

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh:

ALDRYAN CRISTIANTO PRATAMA
165130107111049



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

MALANG

2020



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**EKSPLORASI ALEL CARRIER BOVINE LEUCOCYTE ADHESION
DEFICIENCY (BLAD) MELALUI ANALISA POLIMORFISME GEN
CD18 DENGAN TEKNIK PCR-RFLP PADA SAPI PERAH
PERANAKAN FH BETINA DI KECAMATAN BATU**

Oleh:
ALDRYAN CRISTIANTO PRATAMA
165130107111049

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 14 Januari 2020
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing

drh. Yudit Oktanella, M.Si
NIK. 20140588 1022 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 bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aldryan Cristianto Pratama
NIM : 165130107111049
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Eksplorasi Alel Carrier Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) melalui Analisa Polimorfisme Gen CD18 dengan Teknik PCR-RFLP pada Sapi Perah Peranakan FH Betina di Kecamatan Batu

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 proposal skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata proposal 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, 14 Januari 2020

Yang menyatakan,

(Aldryan Cristianto Pratama)
NIM. 165130107111049

Eksplorasi Alel Carrier Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) melalui Analisa Polimorfisme Gen CD18 dengan Teknik PCR-RFLP pada Sapi Perah Peranakan FH Betina di Kecamatan Batu

ABSTRAK

Sapi perah PFH merupakan salah satu hewan ternak yang banyak dipelihara sebagai salah satu komoditas peternakan yang cukup menjanjikan karena selain menghasilkan susu, mereka juga memproduksi daging. Faktor genetik adalah salah satu faktor utama yang berkontribusi untuk meningkatkan produktivitas dan peningkatan jumlah ternak sapi perah. Namun, ada beberapa kelainan genetik yang mematikan dan sering ditemukan pada sapi perah. Salah satu kelainan genetik pada sapi perah yang sering terjadi adalah *bovine leucocyte adhesion deficiency* (BLAD). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui cara mengidentifikasi adanya alel carrier BLAD pada sapi perah peranakan FH betina dan cara perhitungan frekuensi sapi perah peranakan FH betina dengan heterozigot BLAD yang ada di Kecamatan Batu. Sampel yang digunakan berupa 60 sampel darah sapi perah peranakan FH betina yang dilakukan ekstraksi dan diisolasi DNANYa. Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer *forward* (BLAD_F) 5'-TCA ACG TGA CCT TCC GGA GG-3' dan primer *reverse* (BLAD_R) 5'-CCC AGA TTC TTG ACG TTG AC-3'. Amplifikasi ruas gen CD18 pada kromosom 1 exon 2 dengan panjang sesuai target 106bp telah berhasil dilakukan dengan tingkat keberhasilan 100%. Kemudian dilanjutkan dengan melakukan RFLP produk PCR dengan enzim restriksi NCOI. Analisis RFLP terhadap dengan enzim pemotong NCOI menunjukkan hasil 2 potongan pita 66bp dan 40bp, Hal ini menunjukkan bahwa Frekuensi alel normal sebesar 1 dan alel mutan sebesar 0 dengan frekuensi genotif heterozigot 0%. Deteksi dini kelainan genetik BLAD diperlukan pada suatu populasi sapi perah untuk mencegah penyebaran kelainan genetik tersebut.

Kata kunci: Sapi PFH, Gen CD18, enzim restriksi NCOI, PCR RFLP

Exploration of Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) Alel Carrier through CD18 Gene Polymorphism Analysis with PCR-RFLP Technique in PFH Female Dairy Cattle in Batu District

ABSTRACT

PFH dairy cows are one of the many livestock raised as one of the livestock commodities which is quite promising because besides producing milk, they also produce meat. Genetic factors are one of the main factors that contribute to increasing productivity and increasing the number of dairy cattle. However, there are several deadly genetic disorders that are often found in dairy cows. One of the genetic abnormalities in dairy cows that often occurs is bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD). This study aims to determine how to identify the presence of BLAD carrier alleles in female PFH dairy cows and how to calculate the frequency of female PFH dairy cows with BLAD heterozygotes in Batu District. The sample used consisted of 60 blood samples of female FH dairy cows extracted and DNA isolated. DNA amplification was carried out by PCR method with forward primer (BLAD_F) 5'-TCA ACG TGA CCT TCC GGA GG-3' primary and reverse primary (BLAD_R) 5'-CCC AGA TTC TTG ACG TTG AC-3'. Amplification of the CD18 gene segment on chromosome 1 exon 2 with a target length of 106bp has been successfully carried out with a success rate of 100%. Then proceed with RFLP on PCR products with the NCOI restriction enzyme. RFLP analysis of NCOI cutting restriction enzymes shows that there are 2 pieces of 66bp and 40bp band. This shows that the normal allele frequency is 1 and the mutant allele is 0 with heterozygous genotive frequency of 0% in the population. Early detection of genetic disorders is needed in a dairy cow population to prevent the spread of genetic disorders.

Keyword: PFH dairy cattle, CD18 gene, restriction enzyme NCOI, PCR RFLP

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
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
1.1Latar Belakang.....	1
1.2Rumusan Masalah.....	5
1.3Tujuan.....	5
1.4Batasan Masalah	5
1.5Manfaat.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Sapi Peranakan Friesian Holstein.....	8
2.2 Kelainan Genetik Pada Sapi.....	9
2.2.1 Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD).....	10
2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	15
2.3.1 PCR- RFLP.....	16
2.3.2 Amplifikasi DNA	17
2.3.3 Elektroforesis	19
2.4 Primer.....	21

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	23
3.1 Kerangka Konsep	23
3.2 Bagan Kerangka Konsep	26
3.3 Hipotesis Penelitian	27
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	28
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	28
4.2 Alat dan Bahan	28
4.3 Sampel Penelitian	29
4.4 Rancangan Penelitian	29
4.5 Tahapan Penelitian	30
4.6 Prosedur Kerja	31
4.6.1 Pengambilan Sampel	31
4.6.2 Ekstraksi DNA	31
4.6.3 Pemeriksaan kualitas dan kuantitas DNA Hasil Ekstraksi	32
4.6.4 Amplifikasi DNA	33
4.6.5 Elektroforesis Agarosa 2% Hasil Amplifikasi	34
4.6.6 Deteksi Mutasi	34
4.6.7 Elektroforesis Agarosa 2% Hasil RFLP	35
4.6.8 Analisis Frekuensi Alel	35
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	37
5.1 Uji Kualitatif dan Kuantitatif Ekstraksi DNA Sapi Betina PFH	37
5.2 Amplifikasi Gen CD18	41
5.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Gen CD18	43
5.4 Analisa Frekuensi Alel	47
BAB 6 PENUTUP	7
6.1 Kesimpulan	7
6.2 Saran	7
DAFTAR PUSTAKA	52



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Sekuen Primer untuk PCR.....	22
5.1 Hasil Spektrofotometer Isolat DNA.....	37
5.2 Urutan Basa Nukleotida Primer Gen CD18.....	42



DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

2. 1 Sapi Peranakan Friesian Holstein (Octaviani, 2010) 9

2. 2 Mekanisme Diapedesis Neutrofil ke Jaringan..... 12

2. 3 Analisis Kromatografi adanya Alel Mutan Menggantikan 13

2. 4 Adenin Ilustrasi Titik Mutasi Gen CD18 pada BLAD 14

2. 5 Ilustrasi Sekuen Gen CD18 pada Posisi Ekson 2..... 15

2. 6 Sekuen DNA Gen BLAD dan Situs Restriksi Enzim NCOI..... 21

3. 1 Komponen Reseptor dan Ligan dari β 2-Integrin 24

3. 2 Kerangka Konsep..... 26

4. 1 Kerangka Operasional Penelitian..... 30

4. 2 Situs Pemotongan Enzim NCOI 35

5. 1 Hasil Elektroforesis 1 % sampel isolat DNA 40

5. 2 Origin Oligo Nukleotida Gen CD18 42

5. 3 Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan elektroforesis 2% 43

5. 4 Gambaran Hasil Pemotongan Enzim Restriksi Berdasarkan Genotif 44

5.5 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 1..... 45

5. 6 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 2..... 46

5. 7 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 3 46

5. 8 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 4..... 46

5. 9 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 5..... 47



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Tahapan prosedur Ekstraksi DNA.....	57
2. Amplifikasi DNAdengan primer BLAD 1.....	59
3. RFLP hasil amplifikasi dengan enzim restriksi NCOI.....	61
4. Elektroforesis gel agarose 2% hasil RFLP.....	62
5. Perkiraan lokasi polimorfisme pada sekuen gen CD18.....	63
6. Elektroforesis hasil ekstraksi dengan gel agarose 1%.....	64
7. Tabel Analisa Kemunculan band/pita dan alel.....	65
8. Tabel Perhitungan Frekuensi Alel dan Frekuensi Genotif.....	65
9. Sekuen gen CD18 Bos Taurus.....	68
10. Daftar Kode Sampel.....	71
11. Tabel Persebaran BLAD.....	72
12. Peta Sebaran Pengambilan Sampel di Kecamatan Batu Kota Batu.....	73



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/singkatan

Keterangan

>	Lebih dari
%	Persen
µl	microliter
Kg	Kilogram
M	Meter
Mm	Milimeter
°C	derajat celcius
BC	Bovine Citrulinaemia
BLAD	Bovine leucocyte adhesion deficiency
Bp	Base pairs
BPS	Badan Pusat Statistika
BTA 1	Bovine Chromosome 1
CLAD	Canine leucocyte adhesion deficiency
CR3	Complement receptor 3
CVM	Complex Vertebral Malformation
ddH2O	double-distilled water
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoksiribonukleotida trifosfat
DUMPS	Deficiency of Uridine Monophosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FH	Friesian Holstein
FXID	Factor XI Deficiency
IB	Inseminasi Buatan
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule 1
LAD	leukocyte adhesion deficiency
LFA 1	Lymphocyte function-associated antigen 1
NCOI	<i>Nocardia corallina</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PFH	Peranakan Friesian Holstein
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT	Reverse transcription
Tm	Melting Temperature

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sapi perah Frisian Holstein merupakan salah satu hewan ternak yang dapat ditemukan di berbagai daerah di Indonesia. Sapi perah memiliki potensi besar untuk dikembangkan karena selain menghasilkan susu, mereka juga memproduksi daging. Sapi perah sangat rentan terhadap penyakit yang disebabkan oleh faktor internal dan eksternal tubuh. Penyakit pada sapi perah yang disebabkan oleh faktor eksternal yang paling sering terjadi adalah infeksi bakteri dan parasit seperti anaplasmosis yang menyebabkan sapi tampak lemas, terjadi penurunan berat badan, penurunan produksi susu, Mastitis yang menyebabkan penurunan produksi susu dan kerusakan ambing permanen, dan coccidiosis yang menyebabkan sapi perah mengalami diare dan pneumonia (Singh, 2015).

Untuk penyakit akibat faktor internal tubuh salah satu contohnya adalah kelainan genetik. Kelainan genetik merupakan salah satu faktor internal yang berperan sebagai faktor predisposisi perkembangan penyakit pada sapi perah. Hal tersebut dikarenakan kelainan genetik tidak memiliki gejala patognomonis sehingga terkadang apabila dilakukan diagnosis akan mengarah pada penyakit infeksius padahal gangguan tersebut muncul akibat kelainan genetik. Salah satu kelainan genetik pada sapi perah yang dapat dijumpai adalah *Bovine leucocyte adhesion deficiency* (BLAD) (Dagong *et al.*, 2018)

Bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD) adalah sindrom penyakit yang terjadi akibat penurunan ekspresi molekul adhesi pada neutrofil yang disebut β -integrin, yakni suatu kompleks protein yang terdiri dari protein CD11 / CD18 (secara struktural dan fungsional terkait glikoprotein). Integrin terlibat langsung dalam mekanisme diapedesis dan perpindahan neutrofil keluar dari pembuluh darah menuju ke dalam jaringan untuk melawan dan membunuh mikroorganisme patogen yang masuk ke tubuh. Protein tersebut membantu neutrofil untuk berpindah menuju tempat terjadinya inflamasi. Pada manusia juga ditemukan kasus yang sama, yaitu *leukocyte adhesion defisiensi* (LAD), dan temuan pada manusia tersebut berhasil membantu mengungkap dasar molekular kejadian defisiensi yang sama pada hewan sapi, yaitu disebabkan oleh adanya mutasi pada gen CD18 yang akan berinteraksi dengan gen CD11 guna menyandikan subunit β 2 integrin (Dagong *et al.*, 2018)

Mutasi tersebut merupakan substitusi basa adenin (A) menjadi basa guanine (G) pada ekson 2 dari gen CD18 yang menyebabkan perubahan asam amino glisin menjadi asam aspartat (pada posisi polipeptida D128G). Hanya mutasi pada polipeptida D128G saja yang dapat menyebabkan gangguan ekspresi gen CD18 sedangkan pada beberapa titik mutasi lainnya tidak berpengaruh. Menurunnya molekul β 2 integrin yang diekspresikan pada leukosit hewan menyebabkan hewan tersebut apabila terinfeksi penyakit akan mengalami sindrom granulositopati (Kumar *et al.*, 2009).

BLAD pertama kali diketahui terjadi di Amerika Utara dan kemudian menyebar dan meluas ke beberapa negara lainnya. Sapi jantan diketahui memiliki peran penting sebagai sumber gen mutan penyebab BLAD. Pada mulanya BLAD berasal sapi pejantan unggulan yang bernama Carlin-M Ivanhoe Bell (berasal dari Amerika Utara). Bell memperoleh warisan gen mutan dari kakeknya yang merupakan pejantan unggul bernama Osborndale Ivanhoe (lahir pada tahun 1952) yang juga mewariskan gen mutan tersebut pada induk jantan dari Bell yang bernama Pennstate Ivanhoe Star (lahit pada tahun 1963). Penyebaran BLAD ke berbagai negara di belahan dunia besar kemungkinan juga dipengaruhi oleh penggunaan produk semen sapi pejantan unggul untuk inseminasi buatan yang didistribusikan ke negara tersebut. BLAD sebagai penyakit resesif akan berdampak negatif pada anakan dan terus berlanjut keketurunan berikutnya apabila tidak ada penelitian lebih lanjut terkait identifikasi gen spesifik serta deteksi hewan *carrier* untuk mencegah penyebarluasan BLAD (Muttaqin, 2007; Kumar *et al.*, 2009).

Identifikasi gen spesifik dan deteksi hewan *carrier* BLAD dapat dilakukan dengan metode *restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction* (PCR-RFLP). Penggunaan metode ini sangat tepat karena titik mutasi BLAD sudah diketahui sehingga pemilihan enzim restriksi yang sesuai akan menghasilkan pemotongan pada situs spesifik apabila pada sampel terdapat mutasi (spesifik BLAD). Melalui hasil pemotongan tersebut kita dapat mengidentifikasi alel gen pada sampel. Selain itu, metode PCR-RFLP relatif

murah dan mudah dilakukan tanpa memerlukan instrumen yang mahal dan tanpa perlu pelatihan khusus bagi laboran (Rasmussen, 2012).

Penggunaan semen pejantan unggul yang merupakan hewan karier untuk inseminasi buatan pada akhirnya akan meningkatkan prevalensi. Prevalensi hewan karier juga dapat meningkat akibat jumlah sapi perah betina pada suatu populasi yang cukup banyak dan mampu memproduksi susu dalam skala besar. Hal tersebut menyebabkan peternak akan terus menjaga calving Interval dari Indukan betina dan terus memanfaatkan inseminasi buatan dan betina tersebut akan melahirkan anakan yang bersifat karier bahkan anakan mutan apabila semen IB yang digunakan berasal dari sapi pejantan karier. Prevalensi hewan karier akan meningkat jika populasi sapi perah memiliki banyak sapi betina karier. Hal tersebut apabila dibiarkan akan menyebabkan penurunan kualitas genetik dan fenotip anakan, penurunan produksi, kerugian ekonomi, serta kegagalan program pemuliaan ternak. Oleh sebab itu, penting untuk melakukan deteksi adanya mutasi BLAD pada betina PFH. (Farajallah, Sumantri, & Muttaqin, 2007). Dan perlu adanya studi tentang keberadaan alel heterozigot pada sapi yang bersifat carrier untuk mencegah penyebarluasan sapi carrier dan mencegah timbulnya sindrom dan penyakit BLAD yang merugikan peternakan sapi khususnya sapi perah di

Indonesia. Perhitungan frekuensi prevalensi alel carrier BLAD di Indonesia sudah dilakukan di beberapa daerah seperti Baturaden, Lembang, dan Enrekang (Dagong *et al.*, 2018; Farajallah *et al.*, 2007). Namun demikian, masih diperlukan eksplorasi dan perhitungan frekuensi alel *carrier* BLAD di daerah lain terutama lokasi sentra

pengembangan peternakan sapi perah dengan potensi lalu lintas ternak sapi perah yang tinggi seperti halnya di Kecamatan Batu.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah metode PCR-RFLP dapat mengidentifikasi adanya Polimorfisme Gen CD18 pada sapi perah peranakan FH betina?
2. Apakah polimorfisme yang muncul pada gen CD18 dengan metode PCR-RFLP berkaitan dengan alel carrier BLAD?

1.3 Tujuan

Tujuan umum dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui adanya suatu marka genetik yang menjadi penyebab suatu penyakit pada populasi hewan ternak
2. Mengetahui cara deteksi dini terhadap suatu penyakit hereditas pada hewan ternak

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui apakah metode PCR-RFLP dapat mengidentifikasi adanya alel carrier BLAD pada sapi perah peranakan FH betina.
2. Mengetahui apakah polimorfisme yang muncul pada gen CD18 dengan metode PCR-RFLP berkaitan dengan alel carrier BLAD.

1.4 Batasan Masalah

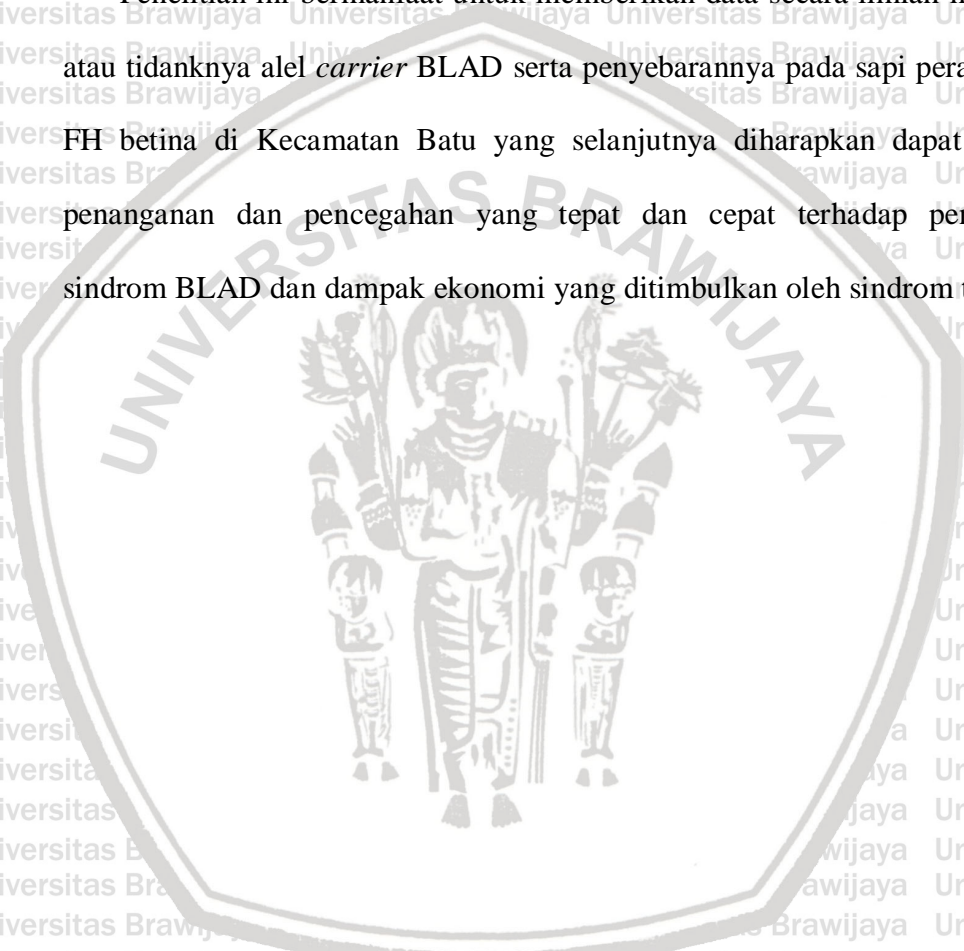
Batasan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Sampel darah yang digunakan yaitu darah Sapi Peranakan Friesian Holstein betina sejumlah 50-60 ekor yang diperoleh di peternakan rakyat sekitar Kecamatan Batu.
2. DNA diisolasi dari sampel darah Sapi PFH betina dengan menggunakan *Blood DNA Preparation Kit (Jena Bioscience Corp)*
3. Amplifikasi gen CD18 pada DNA Sapi PFH dilakukan secara in vitro melalui teknik PCR DNA dengan menggunakan forward primer 5'-TCA ACG TGA CCT TCC GGA GG-3' dan reverse primer 5'-CCC AGA TTC TTG ACG TTG AC-3' sama dengan primer yang digunakan oleh Zsolnai & Fesus (1996).
4. Reaksi PCR berlangsung dalam mesin *Biorad Thermal Cycler* dengan kondisi yang telah ditentukan yaitu pradenaturasi dilakukan selama 5 menit pada suhu 94°C kemudian dengan 30 siklus dilakukan tahap denaturasi selama 1 menit dengan suhu 94°C, kemudian pada tahap penempelan primer (Anneling) selama 1 menit dengan suhu 57°C dan dilakukan ekstensi DNA (pemanjangan primer) atau disebut juga polimerase dilakukan selama 1 menit dengan suhu 72°C dan terakhir dilakukan ekstensi akhir pada DNA selama 10 menit dengan suhu 72°C.
5. Perhitungan frekuensi pada alel mutan diperoleh dengan banyaknya alel normal dikurangi dengan satu. Alel normal dihitung dengan mengalikan dua sampel homozigot normal lalu ditambahkan dengan banyaknya sampel karier

yang akan dibagi dengan jumlah total sampel hasil amplifikasi yang terlebih dahulu dikalikan dua. Rumus tersebut menggunakan hukum Hardy-Weinberg

1.5 Manfaat

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan data secara ilmiah mengenai ada atau tidaknya alel *carrier* BLAD serta penyebarannya pada sapi perah peranakan FH betina di Kecamatan Batu yang selanjutnya diharapkan dapat mengetahui penanganan dan pencegahan yang tepat dan cepat terhadap penyebarluasan sindrom BLAD dan dampak ekonomi yang ditimbulkan oleh sindrom tersebut.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi Peranakan Friesian Holstein

Sapi perah Peranakan Friesian Holstein (PFH) merupakan hasil persilangan antara sapi asal Indonesia (sapi lokal) dengan sapi Friesian Holstein (FH) murni (Muchtar, 2006). Menurut Soetarno (2003) yang dikutip oleh Oktaviani (2010), hal tersebut pada ulanya ternak sapi PFH tersebar di beberapa daerah di Indonesia (paling banyak ditemukan di pulau Jawa) menyebabkan terjadinya perkawinan alami dan tidak terencana antara sapi lokal sapi dengan Friesian Holstein murni di Indonesia sehingga melahirkan sapi jenis peranakan Friesian Holstein (PFH) (dapat dilihat pada Gambar 2.1).

Ciri fisik dari sapi PFH dapat dilihat dari kranium sedikit panjang dengan diameter mulut yang besar, lubang hidung cukup besar serta ukuran dan bobot tubuh yang besar, ukuran pinggang cukup besar. Sapi PFH sangat diminati karena mampu memproduksi susu yang sangat banyak namun masih lebih rendah jika dibandingkan dengan sapi FH murni. Sapi perah Friesian Holstein dapat memproduksi susu lebih dari 6.000 kg per laktasi dengan kandungan lemak susu rata-rata 3,6 %. Sedangkan sapi PFH produksi susu menurut data tahun 1979 berkisar sekitar 1.800 - 2.000 kg per laktasi dengan waktu laktasi dibawah 10 bulan (Oktaviani, 2010).

Pusat pemeliharaan sapi PFH di pulau Jawa berdasarkan daerahnya, terbagi menjadi dua, yaitu daerah rendah (tinggi kurang lebih 300 meter dibawah

permukaan air laut dengan rata-rata suhu 28 - 35°C, kelembaban relatif sekitar 75% dan curah hujan 1800 - 2000 mm). Daerah tinggi (tinggi >750 meter di atas permukaan air laut dengan rata-rata suhu harian 16 - 23°C, kelembaban relatif sekitar 70% dan curah hujan 1.800 mm (Oktaviani, 2010).



Gambar 2.1 Sapi Peranakan Friesian Holstein (Oktaviani, 2010).

2.2 Kelainan Genetik Pada Sapi

Kelainan genetik disebabkan oleh adanya mutasi yang bersifat random pada genom. Perkembangan teknologi yang begitu cepat dibidang reproduksi, transfer embrio dan inseminasi buatan dapat menyebabkan kelainan genetik menyebar luas. Kelainan genetik dapat menyebabkan kerugian secara ekonomi dan merusak perbaikan mutu genetik dalam suatu peternakan (Whitlock *et al.*, 2008).

Kelainan genetik dapat disebabkan oleh adanya susunan basa nukleotida yang mengalami perubahan dan menyebabkan kerusakan gen yang menyandikan suatu asam amino tertentu (Mutmainnah, 2006). Dalam suatu usaha peternakan, Kelainan genetik merupakan satu hal yang sangat tidak diharapkan terjadi karna

mampu menimbulkan dampak negative seperti penurunan produktivitas dan kegagalan reproduksi, serta abnormalitas struktur anatomi (Meydan *et al.*, 2009).

Terdapat beberapa penelitian yang dilakukan untuk mendeteksi suatu kelainan genetik pada sapi diantaranya adalah *Deficiency of Uridine Monophosphate*

Synthase (DUMPS) yang merupakan penyakit autosomal resesif yang

menyebabkan kematian embrio dini. DUMPS belum pernah terjadi di Indonesia

(Citek *et al.*, 2006), *Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency* (BLAD) merupakan

penyakit autosomal resesif yang menyebabkan gejala klinis berupa pneumonia,

netrofilia persisten dan kesembuhan luka yang lama, *Complex Vertebral*

Malformation (CVM) menyebabkan cacat atau degenerasi vertebral pada pedet.

Kelainan genetik ini belum pernah ditemukan di Indonesia sedangkan di USA

memiliki prevalensi alel karier 1,2% dan di Jepang 2,5%, *Factor XI Deficiency*

(FXID) yang dapat menyebabkan kondisi perdarahan akut dan gangguan

reproduksi yang belum ditemukan di Indonesia serta *Bovine Citrulinaemia* (BC)

yang menyebabkan kondisi hiperammoniemia, gangguan syaraf dan koma.

Kelainan ini belum terdeteksi di Indonesia namun di Australia prevalensi kelainan

genetik ini sebesar 13% (Meydan *et al.*, 2009).

2.2.1 Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD)

Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) merupakan sindrom

granulosipati yang disebabkan oleh defisiensi keluarga reseptor integrin $\beta 2$

(CD11 / CD18) yang diekspresikan pada permukaan sel leukosit. Reseptor ini

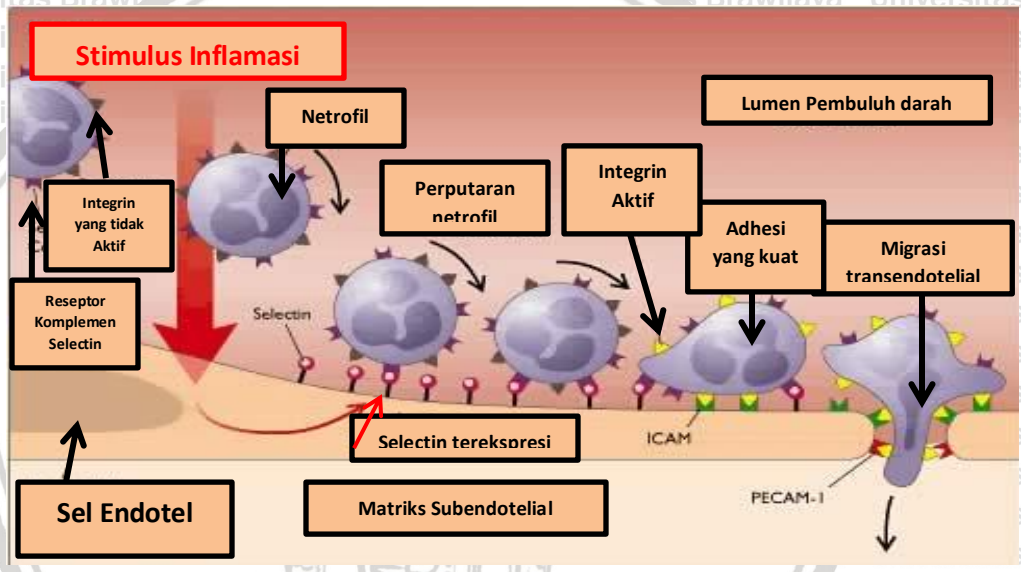
memiliki subunit β (CD18) yang identik tetapi subunit α (CD11) yang berbeda dan memiliki peran penting untuk ekstravasasi neutrofil dan migrasi ke jaringan yang terinfeksi. Mutasi titik gen CD18 pada nukleotida 383 (A383G) dari gen CD18 sapi pada BTA1 yang mengkodekan subunit β (CD18) menyebabkan substitusi asam aspartat menjadi glisin pada asam amino 128 (D128G).

Sapi yang memiliki gen homozigot resesif akan mengalami BLAD sedangkan sapi yang memiliki gen heterozigot akan menjadi karier. Mutasi lain juga terjadi pada nukleotida 775 namun bersifat silent (tidak berekspresi).

Mutasi pada nukleotida 383 menyebabkan sapi penderita BLAD mengalami penurunan jumlah ekspresi $\beta 2$ heterodimeric integrin pada permukaan sel darah putihnya. Pada hewan yang sehat, reseptor integrin $\beta 2$ biasanya diekspresikan pada permukaan sel neutrofil polimorfonuklear (Čitek *et al.*, 2004; Paape *et al.*, 2003; Adamov *et al.*, 2014).

Hewan yang terkena BLAD biasanya mati selama tahun pertama usia mereka karena tidak adanya reseptor ini mengakibatkan kerusakan parah pada sistem kekebalan tubuh atau lebih tepatnya ketidakmampuan sel-sel ini untuk menempel pada endotel pembuluh darah dan bermigrasi ke jaringan yang terinfeksi. Kemampuan sel-sel darah putih menempel ke dinding vaskular salah satunya diatur oleh gen CD18. Selain itu, hewan dengan BLAD ditandai dengan timbulnya penyakit pneumonia berulang, stomatitis ulseratif dan granulomatos, enteritis dengan pertumbuhan berlebih bakteri, periodontitis, kehilangan gigi, penyembuhan luka tertunda, neutrofilia persisten, dan

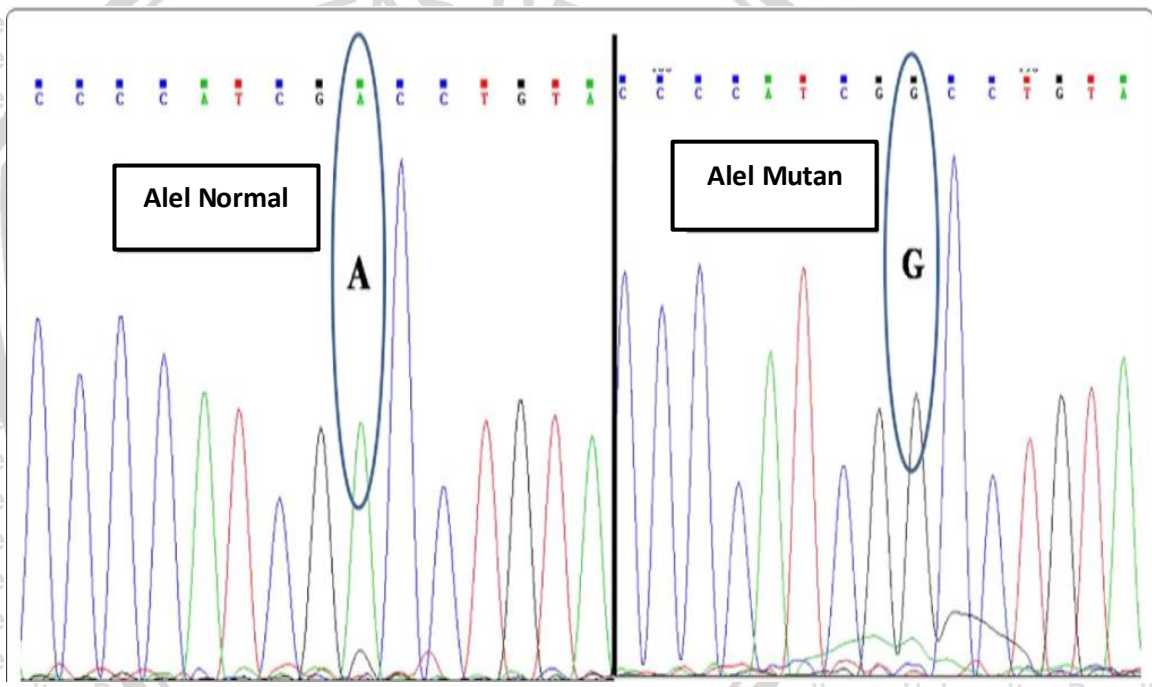
kematian pada usia dini (Kotikalapudi *et al.*, 2017). Ada banyak hasil yang dipublikasikan yang telah mengidentifikasi gangguan ini pada sapi Holstein di berbagai negara seperti di Jerman, Denmark, Nederlands, Austria, Inggris, Jepang, Switserland, Prancis, Taiwan, Polandia, Brasil, Korea, Iran, Turki dan India (Adamov *et al.*, 2014).



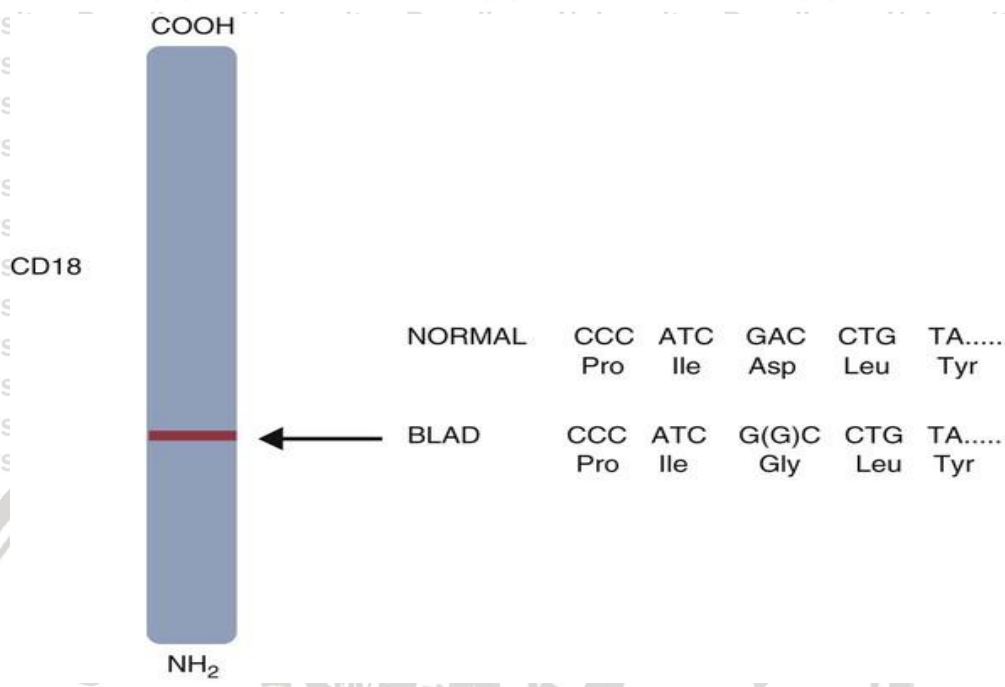
Gambar 2.2 Mekanisme diapedesis neutrofil ke jaringan

Inflamasi yang terjadi pada jaringan tubuh akan direspon secara langsung oleh tubuh melalui pembentukan stimulus inflamasi. Stimulus inflamasi akan direspon secara spesifik oleh neutrofil pada aliran darah. Melalui aktivasi integrin (α L β 2 integrin atau CD11a/CD18] yang akan berikatan dengan ligan pada permukaan membran endothelial (ICAM dan PECAM-1) maka neutrofil dapat keluar dari vaskuler dan menuju jaringan yang mengalami inflamasi (**Gambar 2.2**). Integrin adalah molekul adhesi yang terlibat dalam mekanisme diapedesis neutrofil keluar dari pembuluh darah ke dalam jaringan

untuk membunuh patogen yang masuk ke dalam tubuh. Tanpa $\beta 2$ heterodimeric integrin, sel darah putih tidak mampu masuk ke jaringan tubuh dan menghancurkan patogen. Sehingga patogen akan hidup terus dalam jaringan tubuh yang akan menyebabkan ternak mati dini ketika dilahirkan (Paape *et al.*, 2003; Filippi, 2016; Nagahata *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2000; Perkins, 2001; Shuster *et al.*, 1992).



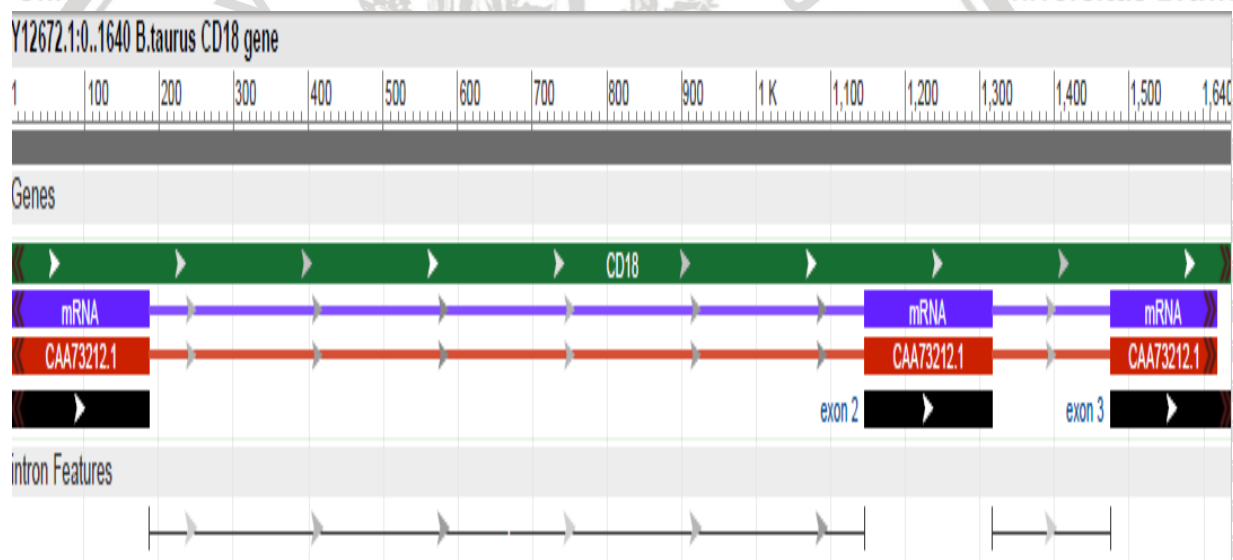
Gambar 2.3 Analisis kromatografi menunjukkan adanya alel mutan menggantikan Adenin (Alyethodi *et al.*, 2016).



Gambar 2.4 Ilustrasi titik mutasi gen CD18 pada BLAD

Sapi yang menderita BLAD mengalami kerusakan pada aktivitas kemotaktis dan fagositis sel-sel darah putihnya dikarenakan penurunan jumlah $\beta 2$ - integrin akibat mutasi gen CD18. Mutasi tersebut adalah substitusi A menjadi G dari gen CD18. Lokasi gen tersebut tepatnya pada kromosom 1 (**Gambar 2.3; Gambar 2.4**) yang mengubah asam amino glisin menjadi asam aspartat pada posisi polipeptida ke 128 (D128G).

Berdasarkan dari area coding dan non coding dari gene CD18 diketahui bahwa gene CD18 terdiri atas 2 intron dan 3 exon (exon 1, exon 2, dan exon 3) dimana mutasi D128G terjadi pada area coding tepatnya pada exon 2 (**Gambar 2.5**). Hanya mutasi D128G saja yang ternyata mengganggu ekspresi gen CD18 sedangkan beberapa titik mutasi lainnya tidak berpengaruh Mutasi tersebut menyebabkan sapi mudah terinfeksi bakteri, luka lama sembuh, pertumbuhan terhambat dan seringkali mati pada usia muda (Perkins, 2001; Shuster *et al.*, 1992; Kumarand *et al.*, 2009; . man *et al.*, 2019).



Gambar 2.5 ilustrasi sekuen gen CD18 pada posisi Ekson 2

2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode enzimatik yang digunakan untuk amplifikasi DNA secara *in vitro*. PCR pertama kali dikembangkan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1985. Amplifikasi DNA dengan

metode PCR harus menggunakan suatu amplimers (primer oligonukleotida). DNA

Primer adalah suatu sekuen dari oligonukleotida pendek yang berfungsi memulai sintesis suatu rantai DNA. PCR mampu melipatgandakan suatu fragmen DNA.

Secara umum, suatu primer terdiri dari 20-30 nukleotida. Metode PCR juga menggunakan suatu enzim yang disebut DNA polimerase dan Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP). DNA polimerase adalah suatu enzim yang

bersifat termotabil dan berasal dari bakteri termofilik (*Thermus aquaticus*).

Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) adalah suatu senyawa yang akan menempel pada ujung 3' dari primer saat proses pemanjangan dan aktivasi polimerase (distimulasi oleh ion magnesium). Terdapat beberapa jenis modifikasi dari teknik

PCR, diantaranya : PCR – RAPD, PCR- RFLP, Quantitative PCR, nested- PCR, inverse – PCR dan RT- PCR. Metode PCR sangat diunggulkan karna tingginya spesifitas, efisiensi dan keakuratan yang sangat baik dari metode ini (Yusuf, 2010).

2.3.1 PCR- RFLP

PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length*

Polymorphism). Merupakan salah satu modifikasi teknik PCR yang dapat digunakan untuk menganalisa keragaman genetik secara molekuler pada suatu individu dalam satu populasi. Metode ini juga mempunyai spesifitas sampai tingkat inter spesies. Metode ini menggunakan suatu enzim restriksi, yang berfungsi untuk mengetahui titik terjadinya mutasi dalam suatu sekuen DNA.

Adanya mutasi pada area non-coding DNA menyebabkan enzim tersebut akan

memotong pada tempat yang berbeda dan dapat dipisahkan melalui elektroforesis dengan gel agarosa. Pola potongan DNA yang berbeda (polimorfisme) tersebut akan diwariskan dari induk ke generasi berikutnya.

Metode PCR ini juga dapat menentukan adanya perbedaan atau persamaan antara dua gen. Metode ini memiliki keunggulan yaitu bersifat kodominan, sehingga sangat baik apabila digunakan untuk komparatif pemetaan genom.

Polimorfisme akan menghasilkan perbedaan pada ukuran fragmen yang terpotong (Adams *et al.*, 1992)

PCR-RFLP merupakan teknik identifikasi yang dilakukan untuk mendeteksi suatu titik mutasi, pada penelitian BLAD dilakukan deteksi pada titik mutasi gen CD18 alel D128G pada nukleotida 383 menggunakan enzim restriksi endonuklease HaeIII (GG↓CC) (Čitek & Bláhová 2004, Shuster *et al.* 1992, Zsolnai dan Fésüs 1996). Hasil amplifikasi sampel yang mengalami mutasi akan terpotong pada asam amino 128 (D128G) menyebabkan substitusi asam aspartat menjadi glisin. Sedangkan sampel yang normal tidak akan terpotong oleh enzim HaeIII karena tidak memiliki situs pemotong. Mutasi lain juga terjadi pada nukleotida 775 namun bersifat silent (tidak bereksresi) (Čitek & Blahova, 2004).

2.3.2 Amplifikasi DNA

Amplifikasi merupakan teknik pelipatgandaan suatu target DNA yang bertujuan untuk memperbanyak jumlah target DNA tersebut, sehingga dapat

terdeteksi saat elektroforesis. Amplifikasi DNA dilakukan dengan bantuan suatu alat PCR atau yang disebut dengan *thermal cycler*. Teknik Dasar Amplifikasi PCR ada 30-35 siklus meliputi:

A. Denaturasi

Pada proses denaturasi, DNA yang memiliki untai ganda akan membuka (terbelah) menjadi dua nuah untai tunggal (Gaffar, 2007). Sekuen target akan mempengaruhi suhu denaturasi. Diperlukan suhu yang lebih tinggi jika sekuen target kaya akan Guanin-Sitosin (G-C). tingginya suhu denaturasi disertai waktu denaturasi yang sangat lama mengakibatkan hilangnya atau berkurangnya aktivitas enzim taq polymerase. Enzim taq polymerase memiliki waktu paruh adalah lebih dari 2 jam pada suhu 92,5°C, pada suhu 95°C selama 40 menit dan pada suhu 97,5°C selama lima menit (Sulistyaningsih, 2007).

B. Annealing

Annealing merupakan pengenalan suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai DNA, konsentrasi primer, dan banyaknya kandungan G-C. Optimalisasi temperatur diawali dengan perhitungan *Melting Temperature* (T_m) dari ikatan primer dan template DNA. Carater untuk memperoleh *melting-temperature* yang tepat menggunakan rumus $T_m = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$. Temperatur annealing pada umumnya hanya 5°C dibawah T_m primer. Secara praktis, T_m ini dipengaruhi oleh komponen buffer, konsentrasi primer dan DNA template (Fatchiyah, 2008).

C. Elongasi

Pada proses ini, untai DNA yang baru mengalami pemanjangan, dimulai dari posisi primer (menempel di urutan basa nukleotida DNA target) akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Setiap 1Kb (1000bp) sekuen DNA yang diamplifikasi memerlukan waktu sekamati 1 menit. Apabila kurang dari 500bp hanya memerlukan waktu 30 detik dan pada kisaran 500 sampai dengan 1000 bp memerlukan waktu 45 detik, namun apabila lebih dari 1000 bp akan memerlukan waktu sekitar 2 menit di setiap siklusnya. Adapun temperatur elongasi berada dikisaran 70-72°C (Fatchiyah, 2008). Suhu elongasi yang rendah bersamaan dengan konsentrasi dioksi-nukleotida trifosfat (dNTPs) yang tinggi dapat menimbulkan mixtension primer dan perpanjangan nukleotida yang salah, sebaliknya kombinasi antara suhu annealing/extension yang tinggi dengan dNTPs yang rendah akan menghasilkan ketepatan produk akhir PCR yang tinggi. Lamanya waktu elongasi tergantung pada panjang sekuen target, konsentrasi sekuen target, dan suhu extension (Sulistyaningsih, 2007).

2.3.3 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu analisis kimiawi dengan cara menggerakkan molekul-molekul protein yang bermuatan pada suatu medan

listrik atau yang disebut dengan titik isoelektrik. Bentuk, besar muatan, ukuran, dan sifat kimia dari molekul akan mempengaruhi pergerakan dari molekul tersebut dalam medan listrik. Pemisahan akan terjadi pada pada makromolekul dengan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang berbeda. Protein akan mulai bermigrasi apabila arus listrik dialirkan pada suatu medium penyangga (berisi protein plasma). Terdapat dua teknik elektroforesis, yaitu: *moving boundary electrophoresis* (Elektroforesis larutan) dan *zone electrophoresis* (Elektroforesis area). Teknik elektroforesis larutan menggunakan larutan buffer dengan kandungan makro-molekul dan dilakukan dalam suatu wadah tertutup yang dialiri arus listrik. Kecepatan migrasi suatu makromolekul ditandai dengan pemisahan dari molekul tersebut dan akan terlihat seperti pita di dalam pelarut (Pratiwi, 2001).

Sedangkan teknik elektroforesis daerah memerlukan suatu bahan padat yang berfungsi sebagai media penunjang yang mengandung larutan buffer. Media penunjang tersebut adalah gel agarosa, gel poliakrilamida, gel pati dan kertas poliasetat selulosa. Elektroforesis daerah juga disebut sebagai elektroforesis gel dengan 2 buah bentuk yaitu *vertical* dan *horizontal*. Bentuk yang paling sering digunakan adalah bentuk *horizontal*, karena memiliki banyak keuntungan yaitu peralatan yang relatif murah dengan menggunakan alat-alat yang sederhana dan dapat menghasilkan pemisahan yang lebih baik (Pratiwi, 2001).

2.4 Primer

```

1141 ggcagggtcag gcagttgcgt tcaactgac cttccggagg gcccaagggt accccatcga
1201 cctgtactac ctgatggacc tctctactc catgggtggat gacctcgtca acgtcaagaa
1261 gctgggggggt gacctgctcc gggccctcaa tggcatcacc gactcggggc gcattgggtga
1321 ggcagctact ccattctccc ctgaaacccc aagccccggt cccaggcacc tctgcacctc
    
```

Gambar 2.6 Sekuen DNA gen BLAD dan situs restriksi enzim NCOI

Keterangan : **Garis Hitam** = Primer Forward; **Garis Biru** = Primer Reverse;
Garis Merah = Situs Pemotongan Enzim NCOI

Primer merupakan suatu oligonukleotida sintetis, primer terdiri dari 12-20 basa nitrogen yang berfungsi sebagai prekursor yang mengawali sintesis DNA dari suatu template atau cetakan DNA. Primer perbedaan urutan sekuen dan komplementer terhadap rantai yang berlawanan pada suatu cetakan atau template DNA. Teknik PCR memerlukan satu set primer dimana masing-masing primer terletak di kedua ujung fragmen DNA target (*Forward* primer (arah sintesis maju) dan *reverse* primer (arah sintesis terbalik), yang memerlukan DNA polymerase sebagai katalisator (Dieffenbach & Dveksler, 1995)



Tabel 2.1 Sekuen Primer untuk PCR

Primer	Sekuens DNA	Sumber
BLAD	F: 5' - TCA ACG TGA CCT TCC GGA GG -3' R: 5' - CCC AGA TTC TTG ACG TTG AC -3'	(Zsolnai <i>et al.</i> , 1996)

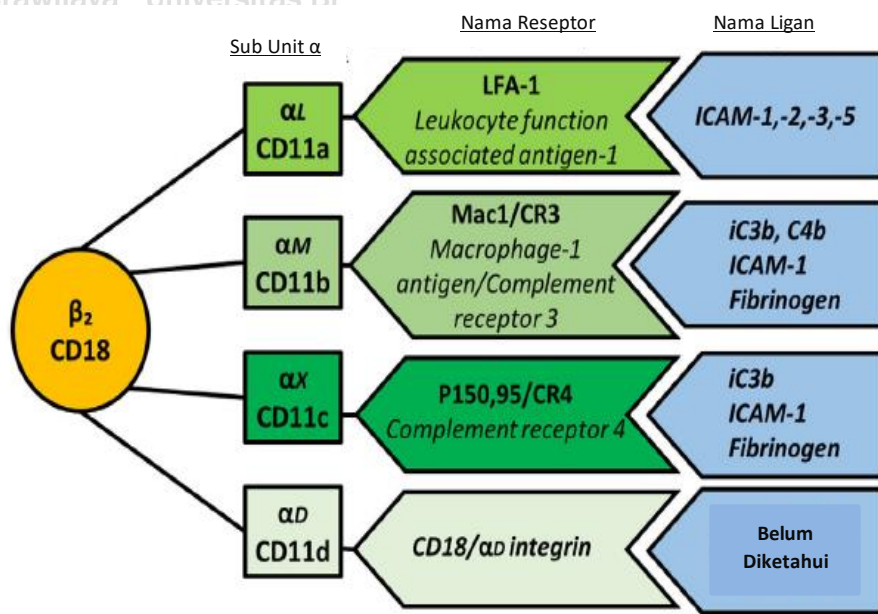
Untuk memperoleh hasil amplifikasi yang optimal, perlu diperhatikan beberapa hal dalam perancangan suatu primer, yaitu tidak terbentuk struktur sekunder (dimer atau self-dimer, hairpin (struktur seperti tusuk konde) dan cross dimer), panjang primer, titik leleh (T_m), besar dari ampikon, dan kestabilan internal (Dieffenbach & Dveksler, 1995). Struktur sekunder pada primer dapat terjadi dalam beberapa bentuk, yaitu hairpin (struktur tusuk konde) terjadi akibat komplementasi yang terjadi karna adanya ikatan intramolekul yang menyebabkan pemutaran primer sehingga terjadi pengikatan sendiri, dimer yang merupakan komplementasi antara sesama primer dan cross dimer dimana memiliki prinsip yang sama dengan dimer hanya saja, komplementasi terjadi antara primer forward dan reverse (Rychlik, 1995). Untuk sekuen Primer yang digunakan sesuai dengan literatur menurut muttaqin (2007) dan sekuen primer tersebut dapat dilihat pada

Tabel 2.1.

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep

Leukosit dalam merespon suatu infeksi memerlukan integrin spesifik untuk membantu leukosit bermigrasi dari pembuluh darah ke situs inflamasi. $\beta 2$ -integrin merupakan integrin spesifik pada permukaan leukosit yang bekerja dalam proses adhesi pada membran endotel. $\beta 2$ -integrin memiliki beberapa reseptor seperti LFA-1 (*Leucocyte Function Associated Antigen-1*/Antigen Terkait Fungsi Leukosit-1) (CD11a/CD18), CR3 (*Complement receptor 3*/Reseptor Komplemen 3) (CD11b/CD18), p(150,95) (*Complement receptor 4*/Reseptor Komplemen 4) (CD11c/CD18). Masing masing reseptor tersusun atas sub unit α (CD11) dan sub unit β (CD18), masing masing reseptor memiliki ligan yang berbeda dan dapat dilihat pada **Gambar 3.1**. Pada sindrom BLAD, terdapat adanya mutasi pada gen CD18 dengan titik mutasi pada nukleotida 383. Mutasi tersebut adalah substitusi A menjadi G pada ekson 2 dari gen CD18 yang mengubah asam amino glisin menjadi asam aspartat pada posisi polipeptida ke 128 (D128G).



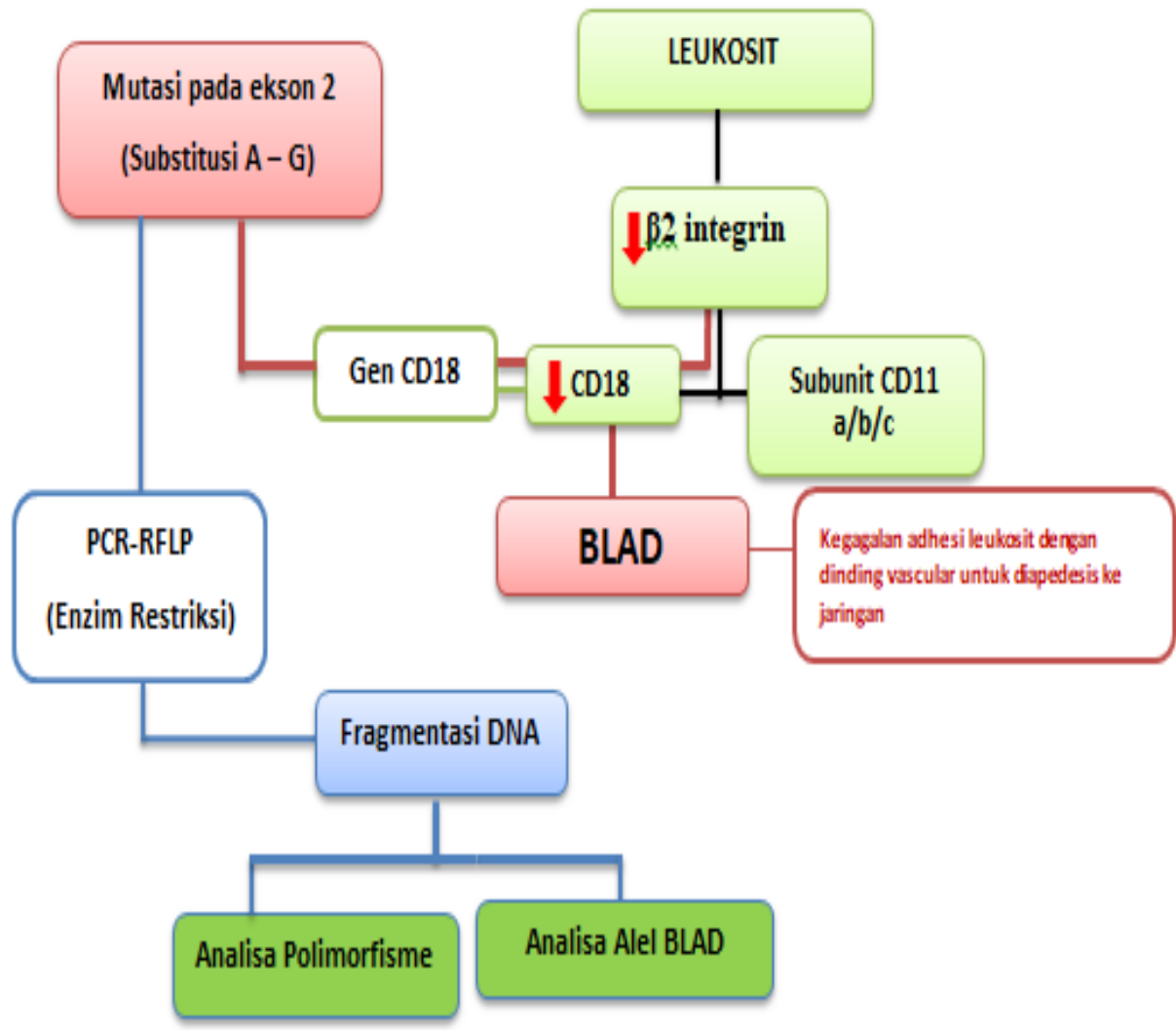
Gambar 3.1 Komponen Reseptor dan Ligan dari β 2-Integrin

Mutasi tersebut menyebabkan tidak terbentuknya sub unit protein CD18 yang menyebabkan gangguan pembentukan β 2-Integrin pada permukaan leukosit sehingga leukosit tidak dapat bermigrasi ke area inflamasi karena gangguan adhesi dengan membrane endotel. Sapi yang menderita BLAD mengalami kerusakan pada aktivitas kemotaktis dan fagositis sel-sel darah putihnya. Sehingga mudah terinfeksi bakteri, luka lama sembuh, pertumbuhan terhambat dan seringkali mati pada usia muda. Untuk mengetahui adanya mutasi genetik tersebut diperlukan uji PCR yang dilakukan dengan amplifikasi DNA secara in vitro yang akan menghasilkan sekuen DNA kemudian dilakukan uji deteksi titik mutasi dengan teknik RFLP menggunakan enzim restriksi NCOI. RFLP akan menghasilkan fragmentasi DNA sebagai titik terjadinya mutasi. Namun, akan ada beberapa kemungkinan titik mutasi (bukan merupakan mutasi spesifik BLAD) yang dapat menjadi situs pemotongan enzim restriksi NCOI dan

menghasilkan fragmentasi. Kemudian hasil fragmentasi tersebut akan diinterpretasikan sebagai alel homozigot dominan, heterozigot, atau homozigot resesif. Hasil interpretasi alel tersebut dapat digunakan untuk perhitungan jumlah alel *carrier* pada sapi perah PFH betina.



3.2 Bagan Kerangka Konsep



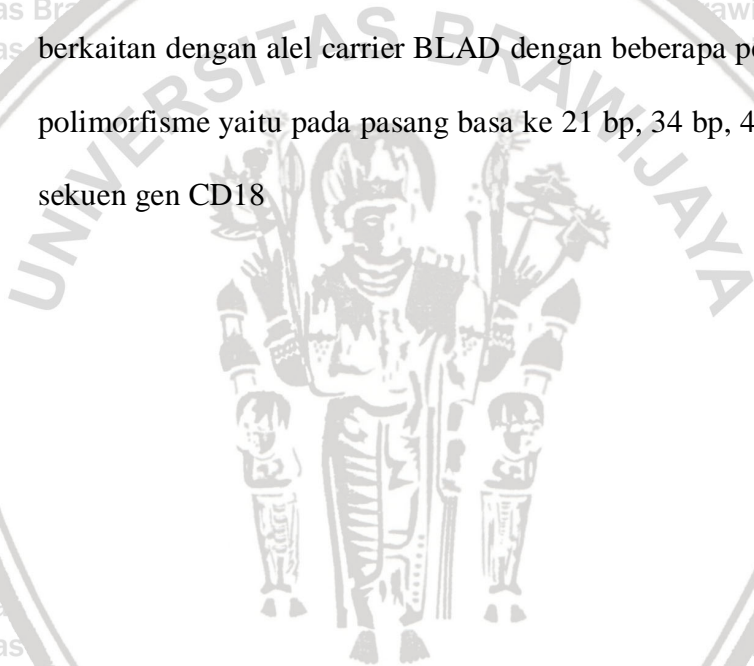
Gambar 3.2 Kerangka Konsep



3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dibuat, maka hipotesis penelitian yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Metode PCR-RFLP pada gen CD18 dapat mengidentifikasi adanya alel carrier BLAD pada sapi perah peranakan FH betina.
2. Polimorfisme yang muncul pada gen CD18 dengan metode PCR-RFLP berkaitan dengan alel carrier BLAD dengan beberapa perkiraan lokasi mutasi polimorfisme yaitu pada pasang basa ke 21 bp, 34 bp, 41 bp, dan 68 bp pada sekuen gen CD18



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan, dimulai dari Bulan Desember hingga Januari 2020. Penelitian dilaksanakan di *Animal Disease Diagnostic Laboratory* (ADD Lab) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya sebagai tempat dilakukan ekstraksi sampel darah hingga uji PCR-RFLP; serta uji kuantitatif hasil ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

4.2 Alat dan Bahan

Bahan utama penelitian ini adalah sampel darah sapi PFH betina di Malang yang berjumlah 60 sampel yang berasal dari peternakan sapi perah warga di daerah Kecamatan Batu. Bahan pendukung antara lain Primer (Primer gen BLAD1), bahan PCR (PCR Mix Thermoscientific, *nuclease free water*), bahan elektroforesis (Agarose 2% dalam bufer TBE 35 ml dan pewarnaan gel green), enzim restriksi NCOI (Thermo Fisher Scientific Inc.), Kit ekstraksi DNA dari Jena Bioscience Corp, marker DNA 100bp. Alat yang digunakan yaitu: mesin PCR (*Biorad Thermal Cycler*), sentrifus, lemari pendingin, tabung eppendorf besar kecil, gel documention, mikropipet, tip, rak tabung, elektroforesis chamber, autoclave, timbangan, sarung tangan, glove, masker, vacutainer EDTA, jarum venoject, rotator atau vortex, freezer, incubator, microwave, pcr tube, Microtube 1,5 µl, tabung Erlenmeyer, dan lain-lain.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian menggunakan darah dari Sapi PFH betina di Kecamatan Batu berjumlah 60 ekor yang diambil melalui vena coccygealis kemudian dimasukkan kedalam vacutainer ber EDTA sekitar 3 ml.

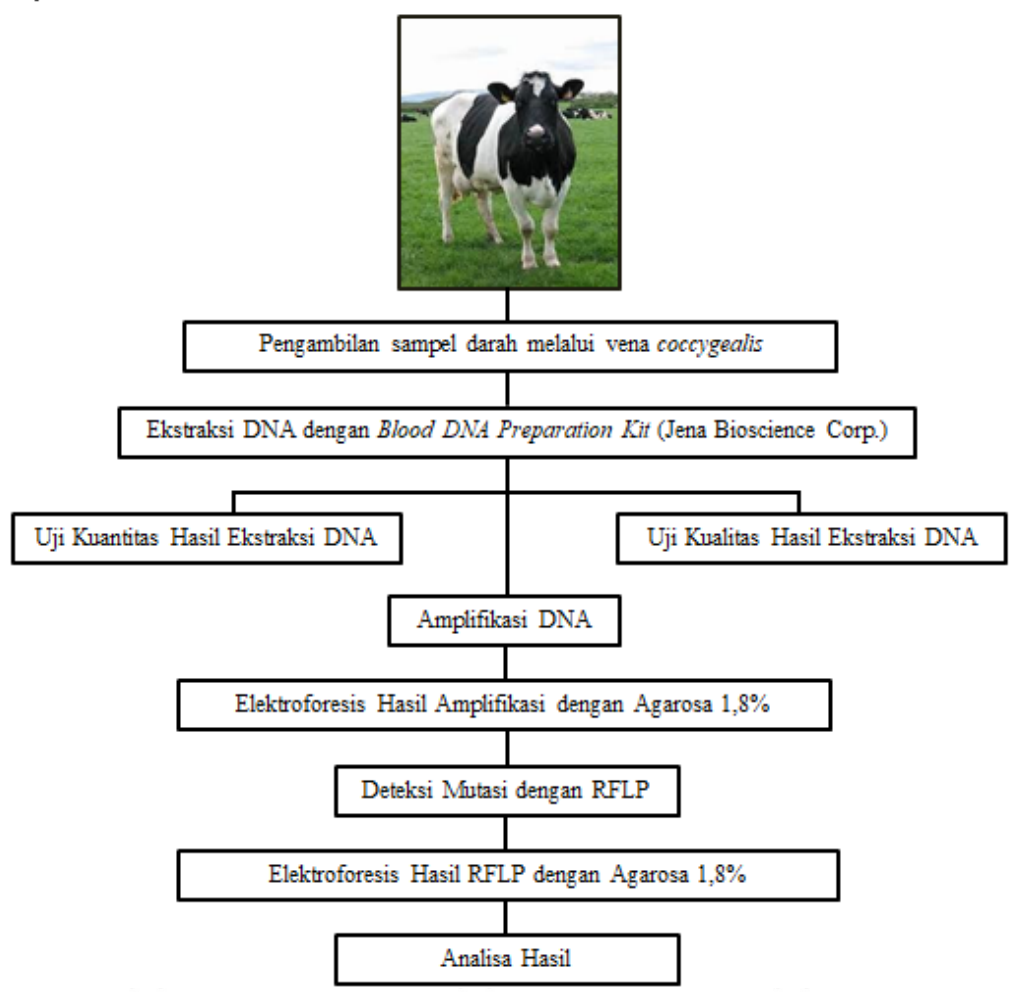
4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian observasional dengan pendekatan retrospektif. Rancangan penelitian observasional adalah penelitian dimana peneliti hanya melakukan observasi, tetapi tidak memberikan intervensi atau perlakuan pada variabel yang akan diteliti dan pendekatan retrospektif yaitu dengan pengumpulan data sekaligus pada satu waktu dan menggunakan data yang lalu dengan metode sampling teknik *purposive sampling* dalam hal pengambilan sampel. *Purposive sampling* merupakan teknik pengambilan sampel sumber data dengan pertimbangan tertentu yang bersifat selektif dan subyektif (*non random sampling/ non probability sampling*) (Kusuma, 2017; Sharma, 2017). Teknik *purposive sampling* digunakan karena tidak semua sampel memiliki kriteria yang sesuai dengan fenomena yang diteliti. Pada teknik ini ditetapkan beberapa kriteria-kriteria tertentu yang harus dipenuhi oleh sampel yang digunakan dalam penelitian (Mukhsin, 2017) diantaranya:

1. Sampel darah sapi perah betina peranakan FH berasal dari peternakan rakyat di Kecamatan Batu, Kota Batu sejumlah 60 ekor.
2. Sapi perah betina peranakan FH dewasa berumur 2,5-6 tahun.

3. Sapi perah betina peranakan FH dalam kondisi normal dan belum ada riwayat penyakit reproduksi (dilihat dari ada atau tidaknya penanda riwayat penyakit).

4.5 Tahapan Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka operasional penelitian

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan darah pada sapi peranakan FH betina yang dijadikan sebagai sumber DNA dilakukan dengan pungsi pada vena *coccygealis* di pangkal ekor bagian bawah (dekat anus) menggunakan tabung vakum (vacutainer) berantikoagula EDTA dengan vacutainer needle ukuran 22G. Kemudian sampel darah disimpan pada suhu 4°C (Herodita, 2009).

4.6.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi dan isolasi DNA dilakukan menggunakan *Blood DNA Preparation Kit* (Jena Bioscience Corp.). Disiapkan microtube 1,5 ml sejumlah sampel, kemudian ditambahkan 450 ul RBC lysis solution dan 150 ul sampel darah. Campuran tersebut di homogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit kemudian disentrifugasi 14.000 rpm selama 30 detik hingga terbentuk endapan putih. Cairan supernatan yang terbentuk dibuang lalu diresuspensi dengan cara divortex dan ditambahkan cell lysis solution sebanyak 150 ul .

Tahap selanjutnya adalah melakukan presipitasi protein dengan menambahkan *protein precipitation solution* 50 ul kemudian divortex dan disentrifugasi 14.000 rpm selama 60 detik. Hasil sentrifugasi kemudian diinkubasi suhu -22°C selama 10 menit lalu dilakukan sentrifugasi ulang.

Setelah itu, disiapkan microtube bersih sejumlah sampel yang sudah

ditambahkan isopropanol sebanyak 150 μ l kemudian ditambahkan cairan supernatant dari microtube sebelumnya dan dihomogenkan. Kemudian di sentrifugasi 14.000 rpm selama 60 detik hingga terlihat endapan kecil.

Kemudian supernatant dikuras dan ditambahkan washing buffer lalu disentrifugasi dan dikuras kembali.

Tahap berikutnya adalah menambahkan DNA hydration solution 50 μ l kemudian divortex pada kecepatan medium dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C dan disimpan pada suhu 4°C .

4.6.3 Pemeriksaan kualitas dan kuantitas DNA Hasil Ekstraksi

Pemeriksaan kualitas DNA hasil ekstraksi dapat dilakukan dengan elektroforesis 1% dengan cara mencampurkan serbuk Agarosa sebanyak 0,7 gram dan TBE buffer sebanyak 35 ml lalu dilakukan pemanasan pada microwave untuk mencampurkan kedua bahan. Setelah bahan tercampur ditambahkan pewarna gel green sebanyak 1,5 μ l lalu diaduk dan dituang pada cetakan gel kemudian ditunggu hingga mengeras dan dilakukan visualisasi pada *gel document*.

Pemeriksaan kuantitas DNA hasil ekstraksi dapat dilakukan dengan cara spektrofotometer untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian dari 60 sampel

DNA yang telah diekstraksi, uji spektrofotometer dilakukan di laboratorium Genetika Molekuler UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dengan cara 1 μ l dari masing-masing sampel diletakkan pada bagian atas pedestal (bagian bawah),

kemudian ditutup menggunakan pedestal bagian atas. Kabel fiber optik akan mengalami kontak langsung dengan sampel. Pengukuran spektrofotometer dilakukan menggunakan *software* pada komputer. Pengukuran tersebut dilakukan dengan panjang gelombang A260 dan A280. Uji tersebut dilakukan pengulangan sebanyak dua kali.

4.6.4 Amplifikasi DNA

Amplifikasi gen CD18 dilakukan secara *in vitro* melalui teknik PCR DNA dengan menggunakan forward primer 5'-TCA ACG TGA CCT TCC GGA GG-3' dan reverse primer 5'-CCC AGA TTC TTG ACG TTG AC-3' sama dengan primer yang digunakan Zsolnai & Fesus (1996). Reaksi PCR dilakukan dalam volume 12 μ l yang terdiri atas PCR mix 5 μ l, ddH₂O 2,5 μ l, sampel DNA PFH betina 2,5 μ l, dan masing-masing primer forward dan primer reverse 1 μ l. Reaksi PCR berlangsung dalam mesin *Biorad Thermal Cycler* dengan kondisi yang telah diatur yaitu pradenaturasi (selama 5 menit pada suhu 94°C) yang dilanjutkan dengan 30 siklus (selama 1 menit denaturasi dengan suhu 94°C, penempelan primer atau annealing selama 1 menit pada suhu 57°C, serta ekstensi DNA yaitu pemanjangan primer atau polimerase pada suhu 72°C selama 1 menit), dan diakhiri dengan ekstensi tahap akhir DNA selama 10 menit pada suhu 72°C (Herodita, 2009).

4.6.5 Elektroforesis Agarosa 2% Hasil Amplifikasi

Elektroforesis diawali dengan pembuatan gel agarosa konsentrasi 2% dengan cara mencampurkan serbuk Agarosa sebanyak 0,7 gram dan TBE buffer sebanyak 35 ml lalu dilakukan pemanasan pada microwave untuk mencampurkan kedua bahan. Setelah bahan tercampur ditambahkan pewarna gel green sebanyak 1,5 ul lalu diaduk dan dituang pada cetakan gel kemudian ditunggu hingga mengeras dan dilakukan visualisasi pada *gel document*.

4.6.6 Deteksi Mutasi

Deteksi mutasi gen CD18 alel D128G pada nukleotida 383 dilakukan melalui teknik RFLP menggunakan enzim restriksi NCOI (Čítek & Bláhová 2004, Shuster et al. 1992, Zsolnai dan Fésüs 1996). Hasil amplifikasi sampel yang mengalami mutasi akan terpotong pada asam amino 128 (D128G) menyebabkan substitusi asam aspartat menjadi glisin. Sedangkan sampel yang normal tidak akan terpotong oleh enzim NCOI karena tidak memiliki situs pemotong namun NCOI dapat memotong sampel apabila terjadi mutasi diluar mutasi dari BLAD (polimorfisme). Situs pemotongan enzim NCOI dapat dilihat pada **Gambar 4.2**. Mutasi lain juga terjadi pada nukleotida 775 namun bersifat silent (tidak berekspresi) (Čítek & Bláhová, 2004). Sebanyak 10 ul produk PCR dicampur dengan 2

ul Universal Buffer, 1 ul enzim NCOI, dan 18 ul *nuclease free water*.

Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam.



Gambar 4.2 Situs Pemotongan Enzim NCOI

4.6.7 Elektroforesis Agarosa 2% Hasil RFLP

Elektroforesis diawali dengan pembuatan gel agarosa konsentrasi 2% dengan cara mencampurkan serbuk Agarosa sebanyak 0,63 gram dan TBE buffer sebanyak 35 ml lalu dilakukan pemanasan pada microwave untuk mencampurkan kedua bahan. Setelah bahan tercampur ditambahkan pewarna gel green sebanyak 1,5 ul lalu diaduk dan dituang pada cetakan gel kemudian ditunggu hingga mengeras dan dilakukan visualisasi pada *gel document*.

4.6.8 Analisis Frekuensi Alel

Analisis frekuensi alel mutan dilakukan dengan cara mengurangkan satu dengan banyaknya alel normal. Alel normal dihitung dari dua kali normal homozigot ditambah dengan banyaknya sampel karier kemudian dibagi dengan dua kali jumlah total sampel yang teramplifikasi. Rumus yang digunakan memakai hukum **Hardy-Weinberg** sebagai berikut:

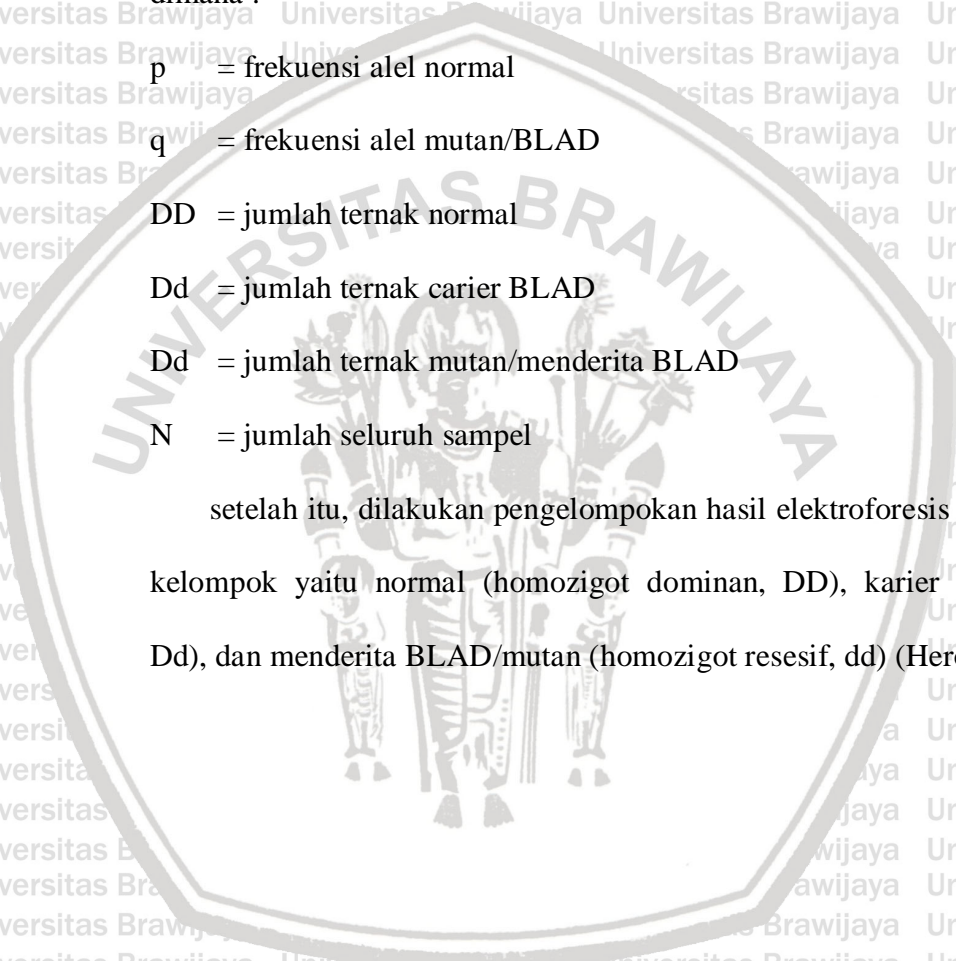


$$p = \frac{2(DD) + (Dd)}{2N} ; q = 1 - p$$

dimana :

- p = frekuensi alel normal
- q = frekuensi alel mutan/BLAD
- DD = jumlah ternak normal
- Dd = jumlah ternak carier BLAD
- dd = jumlah ternak mutan/menderita BLAD
- N = jumlah seluruh sampel

setelah itu, dilakukan pengelompokan hasil elektroforesis menjadi tiga kelompok yaitu normal (homozigot dominan, DD), karier (heterozigot, Dd), dan menderita BLAD/mutan (homozigot resesif, dd) (Herodita, 2009).



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Uji Kualitatif dan Kuantitatif Ekstraksi DNA Sapi Betina PFH

Hasil dari ekstraksi DNA adalah berupa isolat DNA yang akan digunakan sebagai templat saat amplifikasi. Hasil isolasi DNA merupakan DNA total atau genom dari sampel. Isolat DNA hasil ekstraksi kemudian dilakukan uji kualitatif DNA dengan elektroforesis 1% dan diperoleh hasil visualisasi pita lebih dari 10 kbp pada seluruh sampel (**Lampiran 6 dan Gambar 5.1**). Kemudian isolat DNA hasil ekstraksi dilakukan uji kuantitatif dengan spektrofotometer. Hasil uji spektrofotometer menunjukkan bahwa keseluruhan sampel memiliki konsentrasi DNA dengan kisaran 7-60 ng/μl dan tingkat kemurnian berkisar 0,56-1,82 (dapat dilihat pada **Tabel 5.1**)

Tabel 5.1 Hasil Spektrofotometer Isolat DNA

Kode Sampel	Nilai abs 260/230	Nilai abs 230	Nilai abs 260	Nilai abs 280	Nilai abs 260/280	Kons (ng/ul)
BT 38 (01)	1.21	0.33	0.40	0.35	1.14	19.91
BT 29 (02)	1.11	0.14	0.16	0.11	1.38	7.95
BT 23 (03)	1.72	0.62	1.07	0.66	1.61	53.31
BT 31a (04)	0.85	0.28	0.24	0.28	0.86	11.79
BT 17 (05)	0.94	0.43	0.41	0.39	1.05	20.45
BT 16 (06)	1.58	0.62	0.98	1.15	0.86	49.13
BT 34 (07)	1.74	0.40	0.70	0.49	1.42	34.91
BT 37 (08)	1.38	0.16	0.22	0.18	1.21	10.82
BT 35 (09)	1.57	0.31	0.48	0.31	1.56	24.05
BT 39 (10)	1.43	0.45	0.64	0.45	1.42	32.03
BT 01 (11)	1.07	0.50	0.53	0.42	1.28	26.69
BT 02 (12)	1.28	0.29	0.37	0.28	1.30	18.33

BT 03 (13)	0.81	0.43	0.35	0.36	0.99	17.64
BT 04 (14)	1.91	0.04	0.08	0.10	0.74	30.79
BT 05 (15)	1.74	0.17	0.30	0.27	1.11	15.06
BT 06 (16)	2.31	0.12	0.29	0.17	1.71	14.36
BT 08 (17)	2.12	0.26	0.55	0.30	1.82	27.44
BT 09 (18)	1.70	0.17	0.29	0.23	1.30	14.67
BT 13 (19)	1.12	0.60	0.67	0.57	1.17	33.56
BT 32 (20)	1.86	0.41	0.76	0.46	1.66	37.91
BT 50 (21)	1.19	0.49	0.58	0.54	1.09	29.22
BT 10 (22)	0.92	0.70	0.65	0.62	1.05	32.48
BT 48 (23)	0.73	0.52	0.38	0.39	0.96	18.78
BT 28 (24)	0.55	1.23	0.67	0.82	0.82	33.48
BT 46 (25)	0.68	1.21	0.82	1.03	0.80	40.95
BT 27 (26)	0.72	0.44	0.32	0.29	1.10	15.86
BT 47 (27)	0.85	0.69	0.58	0.55	1.06	29.02
BT 30 (28)	0.51	1.26	0.65	0.87	0.75	32.32
BT 41 (29)	0.71	1.19	0.84	1.12	0.75	41.90
BT 53 (30)	0.55	0.65	0.36	0.44	0.81	17.93
BT 36 (31)	0.77	1.02	0.79	0.99	0.80	39.39
BT 45 (32)	0.83	1.65	1.38	1.95	0.71	69.03
BT 42 (33)	0.53	1.63	0.87	1.21	0.72	43.66
BT 51 (34)	0.41	1.41	0.58	0.84	0.69	28.91
BT 44 (35)	0.67	1.31	0.88	1.20	0.73	43.76
BT 12 (36)	0.72	1.43	1.03	1.50	0.69	51.42
BT 40 (37)	0.46	0.86	0.40	0.51	0.78	19.94
BT 14 (38)	0.65	2.40	1.56	2.24	0.70	78.19
BT 54 (39)	0.52	0.52	0.27	0.38	0.71	13.40
BT 18 (40)	0.67	0.41	0.27	0.32	0.85	13.62
BT 22 (41)	1.50	0.52	0.78	0.75	1.03	38.93
BT 31b (42)	4.96	0.02	0.07	0.13	0.56	30.73
BT 31c (43)	0.85	0.34	0.29	0.21	1.38	14.27
BT 35 (44)	0.81	0.52	0.43	0.40	1.07	21.27
BT 49 (45)	0.56	1.11	0.63	0.73	0.86	31.35
BT 24 (46)	0.95	0.56	0.53	0.42	1.27	26.50
BT 52 (47)	3.24	0.07	0.22	0.27	0.82	11.08
BT 43 (48)	0.88	0.98	0.87	1.00	0.86	43.26
BT 11 (49)	1.90	0.64	1.22	1.54	0.79	60.85
BT 21 (50)	0.37	0.71	0.26	0.33	0.80	13.00
BT 26 (51)	0.54	1.24	0.67	0.79	0.85	33.74
BT 20 (52)	0.44	0.45	0.20	0.21	0.95	9.85
BT 18 (53)	0.40	0.85	0.34	0.42	0.81	17.08
BT 07 (54)	0.76	0.69	0.53	0.49	1.07	26.45
BT 48 (55)	0.46	0.50	0.23	0.27	0.84	11.55



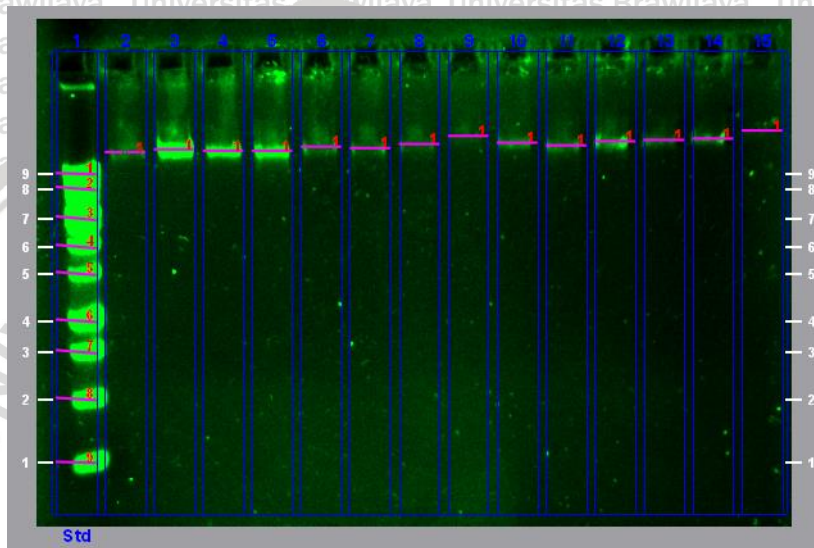
BT 28 (56)	0.75	1.44	1.08	1.13	0.96	53.99
BT 15 (57)	1.59	0.78	1.24	0.75	1.65	62.12
BT 25 (58)	0.71	0.45	0.32	0.28	1.13	15.91
BT 33 (59)	0.46	0.90	0.42	0.48	0.88	20.88
BT 19 (60)	2.31	0.12	0.29	0.17	1.71	14.36

Keterangan : **Kons**= Konsentrasi; **Nilai Abs 260/230**= Nilai tingkat kemurnian DNA terhadap kontaminan Polisakarida; **Nilai Abs 260/280**= Nilai tingkat kemurnian DNA terhadap kontaminan Protein; **Nilai abs 230**= Nilai absorbansi cahaya UV oleh kontaminan polisakarida; **Nilai abs 260**= Nilai absorbansi cahaya UV oleh DNA; **Nilai abs 280**= Nilai absorbansi cahaya UV oleh kontaminan protein atau fenol.

Uji kualitatif isolat DNA memiliki prinsip dimana konsentrasi DNA yang tinggi pada suatu sampel akan menghasilkan pita DNA yang tebal dan tidak menyebar serta DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh sedangkan sampel isolat DNA yang memiliki konsentrasi DNA yang rendah menyebabkan terbentuknya pita DNA yang tipis dan menyebar. Penyebaran pita disebabkan oleh adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus saat dilakukannya proses ekstraksi yang menyebabkan DNA terpotong menjadi sejumlah bagian kecil. Ikatan antar molekul DNA yang terputus disebabkan oleh adanya gerakan fisik berlebihan pada saat proses pemipetan, sentrifugasi, dan dapat pula disebabkan oleh suhu yang terlalu tinggi dan aktivitas bahan kimia tertentu (Harahap, 2017).

Pada hasil ekstraksi 60 sampel sapi betina PFH diperoleh hasil visualisasi dengan elektroforesis pada sampel menunjukkan terbentuknya pita dengan ketebalan yang berbeda namun tidak terlihat adanya pita yang menyebar. Dapat ditarik kesimpulan bahwa sampel darah sudah berhasil diekstraksi dengan baik tanpa menyebabkan terpotongnya ikatan antar molekul (ditandai dengan tidak ada pita yang menyebar pada hasil elektroforesis) namun keseluruhan sampel memiliki

konsentrasi DNA yang berbeda-beda ditandai dengan ketebalan pita yang juga berbeda (Susilo *et al.*, 2012). Untuk mengukur nilai konsentrasi DNA perlu dilakukan uji kuantitatif hasil ekstraksi dengan metode Spektrofotometer.



Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis 1 % sampel isolat DNA,
Keterangan: Sumuran 1= DNA marker 1kb (1000bp)

Uji Kuantitatif isolat DNA dilakukan dengan metode spektrofotometer. Pada uji tersebut diperoleh hasil kemurnian 0,56 – 1,82. Menurut Fatchiyah (2011), secara prinsipnya metode spektrofotometer menggunakan cahaya dengan panjang gelombang tertentu untuk melihat daya serap cahaya oleh molekul tertentu. Cahaya UV dengan panjang gelombang 260 nm dapat diserap oleh ds-DNA, sedangkan cahaya dengan panjang gelombang 280 nm dapat diserap oleh kontaminan protein atau phenol. Perbedaan penyerapan cahaya UV tersebut akan digunakan untuk mengukur kemurnian DNA dengan cara menghitung nilai

absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 ($\text{Å}260/\text{Å}280$) dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1.8-2.0 dimana apabila nilai kemurnian <1.8 menunjukkan adanya kontaminasi protein dan apabila nilai kemurnian >2.0 menunjukkan adanya kontaminasi RNA. Konsentrasi DNA yang dihasilkan berkisar antara 7-60 ng/ μl . Untuk memperoleh hasil amplifikasi yang maksimal dibutuhkan konsentrasi DNA minimal 25 ng/ μl (Ningsih *et al.*, 2017).

Hasil ekstraksi DNA total pada beberapa sampel dalam penelitian ini menunjukkan konsentrasi di bawah 25 ng/ μl . Sampel tersebut tetap di amplifikasi karena sampel yang memiliki konsentrasi DNA di bawah 25 ng/ μl akan tetap menunjukkan kualitas pita/band saat dielektroforesis namun pita yang dihasilkan akan lebih tipis tetapi tetap dapat dilakukan analisa selama tidak terdapat *smear* pada hasil visualisasi (Ningsih *et al.*, 2017).

5.2 Amplifikasi Gen CD18

Amplifikasi Gen CD18 pada proses PCR dengan Biorad Thermal cycler menggunakan primer yang terdiri atas 1 pasang primer forward Primer yang digunakan dalam proses PCR tersebut terdiri dari satu pasang primer *forward*

(BLAD_F) 5'- TCA ACG TGA CCT TCC GGA GG -3' dan *reverse* (BLAD_R)

5'- CCC AGA TTC TTG ACG TTG AC -3' merupakan primer yang sama dengan yang digunakan oleh Zsolnai & Fesus (1996). (Tabel 5.2) dengan target pasang basa 106 bp (Gambar 5.2).

Tabel 5.2 Urutan Basa Nukleotida Primer Gen CD18

Primer	Urutan Basa Nukleotida	Sumber
--------	------------------------	--------

BLAD F: 5'- TCA ACG TGA CCT TCC GGA GG -3' (Zsolnai *et al.*, 1996)

R: 5'- CCC AGA TTC TTG ACG TTG AC -3'

Berikut (**Gambar 5.2**) merupakan urutan basa nukleotida yang diperkirakan akan muncul jika diamplifikasi menggunakan pasangan primer F: 5'- TCA ACG TGA CCT TCC GGA GG -3' dan R: 5'- CCC AGA TTC TTG ACG TTG AC -3'

```

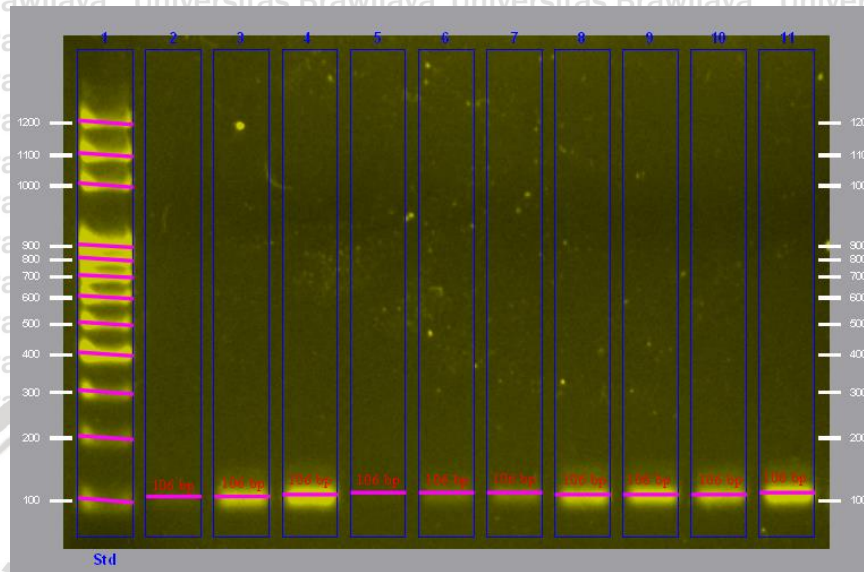
1081 gccatgaac cccccacc ccagaccag atagtacacc ctgactatct cccaaatcct
1141 ggcaggtcag gcagttgcgt tcaacgtgac cttccggagg gccaaagggt accccatcga
1201 cctgtactac ctgatggacc tctcctaactc catggtggat gacctcgtca acgtcaagaa
1261 gctggggggt gacctgctcc gggccctcaa tggcatcacc gagtccggcc gcattggtga
    
```

Gambar 5.2 Origin Oligo Nukleotida Gen CD18

Keterangan : Kuning: Primer forward BLAD, Kuning: Primer reverse BLAD, Abu-abu: Region of interest

Produk PCR hasil amplifikasi (amplikon) kemudian dilakukan uji kualitas dengan elektroforesis gel agarosa 2% dan menggunakan marker DNA ladder 100 bp. Hasil visualisasi menunjukkan pada 60 sampel terbentuk band/pita berukuran 106 bp sesuai dengan target primer yang menandakan sampel teramplifikasi dengan sangat baik walaupun memiliki ketebalan pita tidak terlalu identik (dapat dilihat pada **Gambar 5.3**).





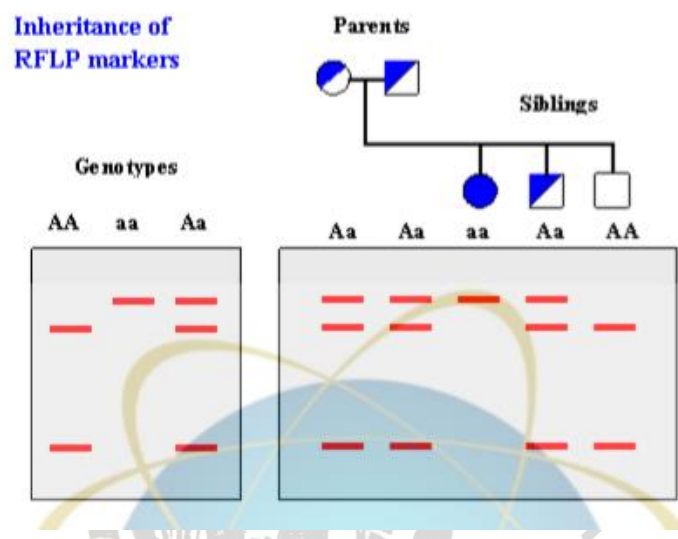
Gambar 5.3 Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan elektroforesis 2%

5.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Gen CD18

Hasil amplifikasi kemudian dilakukan RFLP dan kemudian diperoleh hasil untuk sampel 1-60 memiliki kesamaan yaitu terdapat dua fragmen pita yang berukuran 66 bp dan 40 bp (**Lampiran 7**). Dimana hasil restriksi tersebut menunjukkan adanya satu situs potong oleh enzim restriksi NCOI pada sekuen gen CD18 hasil amplifikasi. Dapat dilihat pada **Gambar 5.5**, **Gambar 5.6**, **Gambar 5.7**, **Gambar 5.8**, dan **Gambar 5.9**.

Menurut Fathimah (2017), secara normal pada sekuen gen yang memiliki satu titik potong terhadap suatu enzim restriksi akan menghasilkan 2 potong pita apabila individu tersebut homozigot dominant, 3 pita apabila individu tersebut

heterozigot, dan 1 pita dengan ukuran yang sama dengan hasil amplifikasi apabila individu tersebut heterozigot resesif (dapat dilihat pada **Gambar 5.4**).

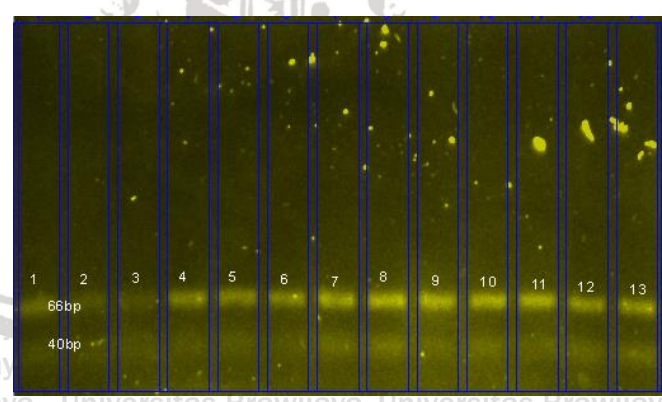


Gambar 5.4 Gambaran Hasil Pemotongan Enzim Restriksi Berdasarkan Genotif (Fathimah, 2017).

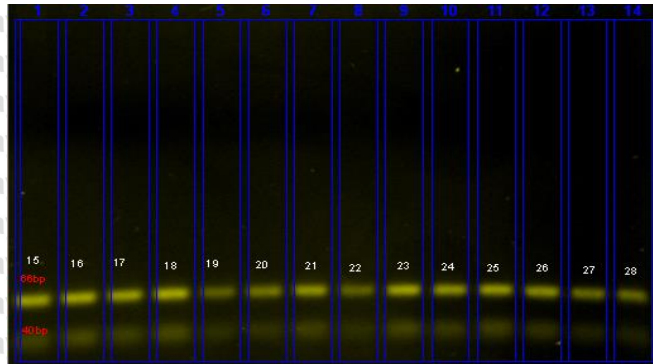
Sekuen gen CD18 hasil amplifikasi secara normal tidak memiliki situs pemotongan spesifik untuk enzim restriksi NCOI namun apabila terjadi mutasi pada basa tertentu yang menyebabkan perubahan urutan basa menjadi sesuai untuk situs restriksi dapat menyebabkan enzim restriksi NCOI memotong pada situs tersebut. Pada hasil RFLP terlihat bahwa ada 2 potong pita (66bp dan 40bp) yang menandakan bahwa ada satu situs restriksi atau situs potong. Sesuai dengan dugaan pemotongan apabila terjadi mutasi pada **Lampiran 5**. Menunjukkan bahwa 2 potongan pita tersebut berasal dari adanya mutasi pada pada pasang basa ke 68 bp dimana terdapat mutasi substitusi basa G menjadi C. Mutasi tersebut bukan merupakan mutasi spesifik BLAD. Jika terdapat mutasi spesifik BLAD

yaitu substitusi basa A menjadi G pada situs restriksi tersebut, maka walaupun terdapat mutasi G menjadi C, enzim restriksi NCOI tidak dapat memotong situs tersebut.

Sehingga untuk analisa frekuensi genotif disimpulkan bahwa apabila terbentuk 2 pita/band (ukuran 66bp dan 40bp) pada elektroforesis hasil RFLP menandakan individu tersebut merupakan homozigot dominan (DD), apabila terbentuk 3 pita/band (ukuran 66bp, 40bp, dan 106bp) menandakan individu tersebut heterozigot (Dd), dan apabila terjadi mutasi BLAD atau individu homozigot resesif (dd) maka tidak ditemukan adanya pita/band. Untuk memastikan kembali bahwa alel BLAD mutan benar benar tidak ditemukan dalam sampel populasi perlu dilakukan sekuensing DNA.



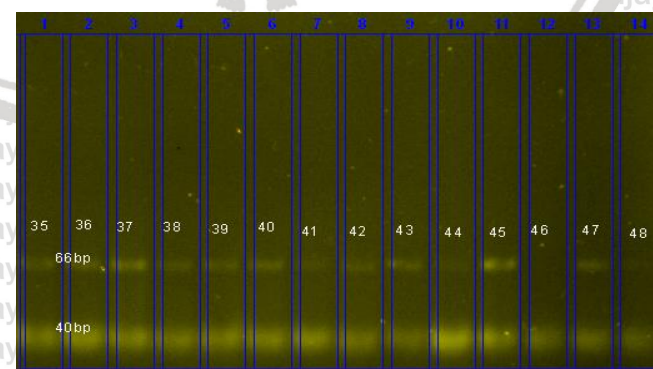
Gambar 5.5 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 1
 Keterangan : Sampel nomor 1-13, 13 sampel menghasilkan 2 pita berukuran 66 bp dan 40 bp.



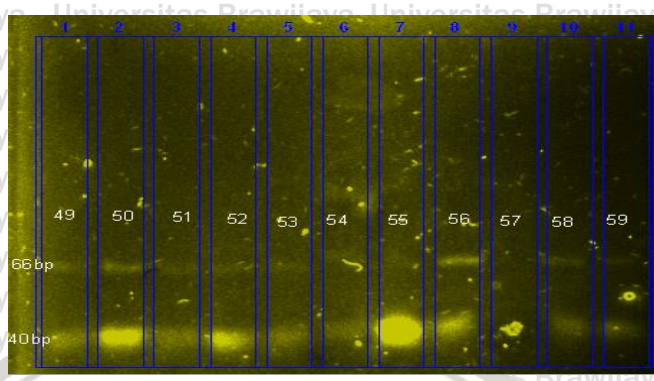
Gambar 5.6 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 2
 Keterangan : Sampel nomor 15-28, 14 sampel menghasilkan 2 pita berukuran 66 bp dan 40 bp.



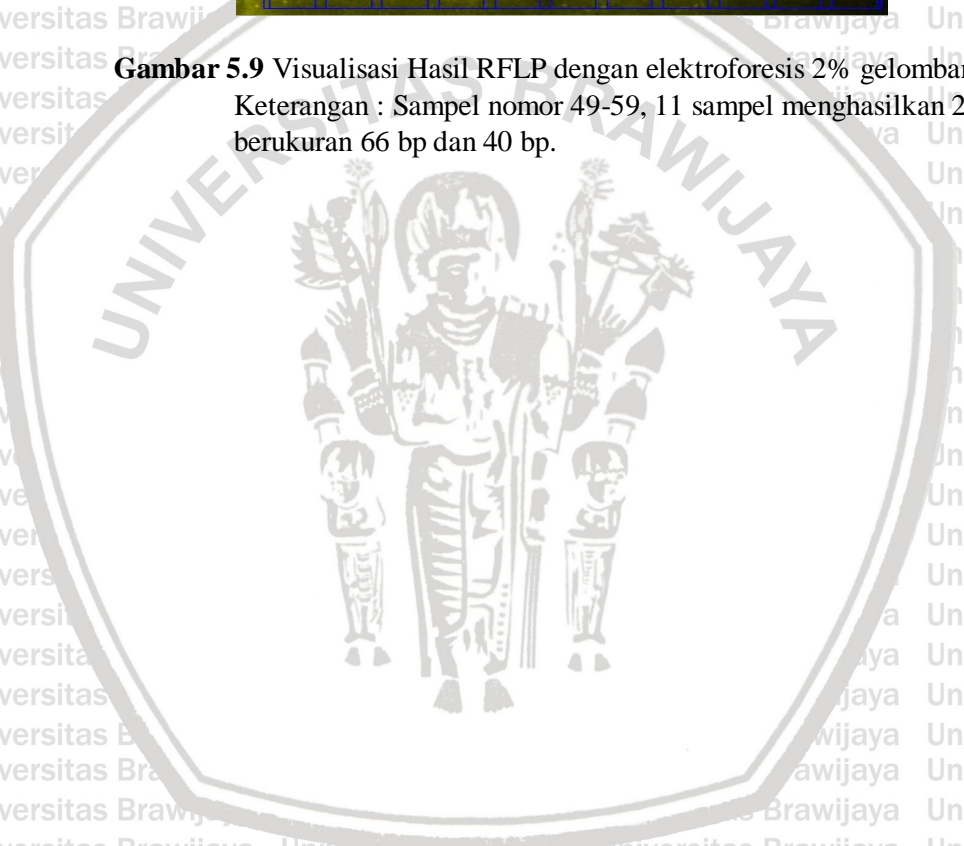
Gambar 5.7 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 3
 Keterangan : Sampel nomor 29-34, 5 sampel menghasilkan 2 pita berukuran 66 bp dan 40 bp.



Gambar 5.8 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 4
 Keterangan : Sampel nomor 35-48, 14 sampel menghasilkan 2 pita berukuran 66 bp dan 40 bp.



Gambar 5.9 Visualisasi Hasil RFLP dengan elektroforesis 2% gelombang 5
Keterangan : Sampel nomor 49-59, 11 sampel menghasilkan 2 pita berukuran 66 bp dan 40 bp.



5.4 Analisa Frekuensi Alel

Analisa frekuensi alel menggunakan rumus menggunakan rumus **Hardy-Weinberg** sebagai berikut:

$$p = \frac{2(DD) + (Dd)}{2N} ; q = 1 - p$$

- dimana :
- p** = frekuensi alel normal
 - q** = frekuensi alel mutan/BLAD
 - DD** = jumlah ternak normal
 - Dd** = jumlah ternak carier BLAD
 - N** = jumlah seluruh sampel

Analisa dengan metode **Hardy-Weinberg** dilakukan dengan cara mengalikan jumlah kemunculan genotif homozigot dominan (DD) dengan dua, dimana jumlah kemunculan genotif homosigot dominan (DD) adalah 60 kemudian ditambahkan dengan jumlah kemunculan genotif heterozigot/carrier, dimana jumlah kemunculan genotip heterozigot/carrier adalah 0. Lalu dibagi dengan jumlah seluruh sampel dikalikan dua yaitu (60 x 2 = 120), maka diperoleh hasil frekuensi alel normal D/"p" adalah 1. Untuk memperoleh frekuensi alel mutan d/"q" adalah satu dikurangi dengan frekuensi alel normal sehingga diperoleh frekuensi alel mutan adalah 0 pada populasi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada kecamatan batu belum ditemukan adanya sapi PFH betina carrier. Menurut survei terakhir dari Badan Pusat Statistik kota Batu pada tahun 2016 menunjukkan

populasi sapi perah PFH di Kecamatan Batu merupakan yang terbesar dari dua kecamatan lain di Kota Batu yaitu berkisar 5084 dari total populasi ternak di Kota Batu yaitu 11.611 sapi perah PFH. Hal ini menunjukkan bahwa penyediaan dan transportasi ternak sapi perah di Kecamatan Batu sangat besar tetapi tidak ditemukan adanya alel karier BLAD di Kecamatan Batu. Hal tersebut dapat disebabkan oleh penggunaan semen untuk Inseminasi buatan yang memiliki mutu genetik yang baik dan tidak ditemukan adanya alel karier BLAD. Penyediaan semen untuk inseminasi buatan di Kota Batu berasal dari BBIB Singosari Malang. Keberadaan individu karier BLAD di BBIB Singosari sudah pernah dilakukan penelitian oleh Herodita (2009), dimana pada 32 sampel sapi perah FH jantan yang merupakan sumber penghasil semen untuk IB dilakukan uji deteksi BLAD melalui PCR-RFLP dengan tingkat keberhasilan amplifikasi 100% menunjukkan hasil 0% untuk frekuensi genotif individu karier BLAD. Sehingga besar kemungkinan hal tersebut mempengaruhi hasil perhitungan penyebaran alel karier BLAD di Kecamatan Batu yang pada penelitian ini bernilai 0%. Hasil 0% penyebaran alel karier pada 60 sampel dari Kecamatan Batu masih belum representatif terhadap keseluruhan populasi di Kota Batu yang berjumlah 11.611 ekor dari 3 Kecamatan dan juga belum representatif terhadap keseluruhan populasi di Kecamatan Batu yang berjumlah 5084 ekor dan tersebar di 8 Kelurahan (dapat dilihat pada **Lampiran 12**). Oleh sebab itu diperlukan studi lebih lanjut dengan pengambilan sampel dengan penyebaran titik yang merata di setiap kelurahan dan kecamatan untuk dapat merepresenrasikan jumlah

persebaran alel karier pada populasi sapi perah di Kecamatan Batu maupun Kota Batu.

Sampai sekarang belum ada penelitian yang relevan untuk mengetahui berapa persebaran individu *carrier* BLAD di seluruh Indonesia. Beberapa penelitian tentang persebaran sapi karier BLAD di Indonesia hanya dilakukan di beberapa daerah seperti Jawa barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Sulawesi Selatan. Untuk Jawa Timur sebagai sentra peternakan sapi perah Indonesia bahkan tercatat hanya pernah dilakukan deteksi BLAD di BBIB Singosari Malang dan Tulungagung (Herodita, 2009). Menurut Badan Pusat Statistika (BPS) Provinsi Jawa Timur (2017), ada sekitar 27 Kabupaten dan 8 Kota di Provinsi Jawa Timur yang telah dilakukan perhitungan populasi sapi perah dengan total populasi di Jawa Timur mencapai 273.881 ekor sapi perah. Sehingga perlu dilakukan deteksi dengan metode sampling yang tepat pada area riset yang lebih merata untuk memastikan sejauh mana persebaran BLAD di Indonesia.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Metode PCR-RFLP pada gen CD18 dapat mengidentifikasi adanya alel carier BLAD pada sapi perah peranakan FH betina melalui mekanisme pemotongan enzim restriksi sehingga metode ini dapat menjadi salah satu metode skrining kualitas genetic khususnya terkait gen CD18 pada sapi perah dan deteksi dini penyebaran alel heterozigot BLAD.
2. Polimorfisme yang muncul pada gen CD18 dengan metode PCR-RFLP pada seluruh sampel terlihat adanya mutasi substitusi jenis transversasi basa G menjadi C dan tidak berkaitan dengan mutasi BLAD. Lokasi mutasi sesuai dengan perkiraan lokasi mutasi polimorfisme yaitu pada pasang basa ke 68 bp pada sekuen gen CD18.

6.2 Saran

Jika menggunakan metode PCR RFLP, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan enzim restriksi yang lebih bervariasi titik potongnya. Guna mengidentifikasi titik mutasi secara akurat, maka disarankan pula metode sekuensing DNA untuk lebih memastikan lokasi titik mutasi basa nukleotida serta memastikan kembali ada tidaknya lokasi mutasi kaitannya dengan kasus penyakit yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

Ackermann, M. R., Brodgen, K. A., Florance, A. F., & E. Kehrl, j. M. 1992. Induction of CD18-Mediated Passage of Neutrophils by *Pasteurella haemolytica* in Pulmonary Bronchi and Bronchioles.

Adamov, N., Mitrov, D., Esmerov, I., & Dovic, P. 2014. Detection of Recessive Mutations (BLAD and CVM) in Holstein-Friesien Cattle Population in Republic of Macedonia. *Mac Vet Rev* 37 , (1): 61-68.

Adams, R. L., Knowler, J. T., & Leader, D. P. 1992. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. London: Chapman and Hall Publishing.

Čitek , J., & Blahova, B. 2004. Recessive disorders a serious health hazard? . *Journal of Applied Biomedicine* , 2: 187-194.

Citek, J., Rehout, H., & Pavkova, J. 2006. Monitoring of Genetic Health of Cattle in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina* , 51(6): 333–339 .

Dagong, M., Rahim, L., Bugiwati, R. A., & Nurmulyaningsih. 2018. Allele frequency estimation of BLAD (Bovine Leukocyte. *Earth and Environmental Science*, 207.

Dieffenbach, C., & Dveksler, G. 1995. *PCR Primer, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Fatchiyah. 2015. *Prinsip Dasar Bioinformatika*. UB Press. Malang

Fatchiyah, 2011. *Pelatihan analisis fingerprinting DNA tanaman dengan metode RAPD* [Modul]. Laboratorium sentral ilmu hayati Universitas Brawijaya, Malang.

Fathimah, N. 2017. *Gambaran Polimorfisme Gen CYP1A1*2A RS4646903 (T>C) sebagai Faktor Risiko Kanker Kolorektal pada Mahasiswa Kedokteran dan Profesi Dokter Angkatan 2012-2014 UIN Syarif Hidayatullah Jakarta*. Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah.

Farajallah, A., Sumantri, C., & Muttaqin, W. N. 2007. *Identifikasi Alel Pembawa Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) pada Sapi Perah Friesien Holstein di Indonesia* . Bogor: Departemen Biologi FMIPA Institut Pertanian Bogor.

Filippi, M. D. 2016. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv Immunol* , 129:25-53.

Gaffar, S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Universitas Padjajaran: Bandung

Harahap, A. S. 2017. Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Beberapa Populasi Pohon Kapur Sumatera. *Journal of Animal Science and Agronomy Panca Budi*, 2(2).

Herodita, L. U. 2009. *Identifikasi Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) pada Peternakan Sapi Friesien-Holstein di Jawa-Bali. [Skripsi]*. Bogor: Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

Kamaruddin, K. 2015. *Identifikasi Alel Pembawa Citrullinaemia (BC) pada Sapi Perah di Kabupaten Enrekang. [Skripsi]*. Makassar: Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

Kotikalapudi, R., Patel, R., & Kommuri, M. 2017. Identification of heterozygous cases of Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Indian Holstein crossbred bulls. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(1): 018-020.

Kumar, V., & Sharma, A. 2009. Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency Syndrome (BLAD): A Review. *Agric. Rev.* , 30 (4) : 293 - 300 .

Kusuma, A. W., dan Irwan B. 2017. Media Modul Gizi Braille Terhadap Pengetahuan, Sikap, Dan Praktik Makan Pagi P Anak Tunanetra. *Journal of Health Education*, 2 (1)

Meydan, H., Yildiz, M., Özdil, F., Gedik, Y., & Özbeyaz, C. 2009. Identification of factor XI deficiency in Holstein cattle in Turkey. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(5): 1-4.

Muchtar, A. 2006. *Ilmu Produksi Ternak Perah (Cetakan I)*. Surakarta: Lembaga Pengembangan Profesi .

Muckhsin, R., Palmarudi M., dan Anti N. T. 2017. Pengaruh Orientasi Kewirausahaan Terhadap Daya Tahan Hidup Usaha Mikro Kecil Dan Menengah Kelompok Pengolahan Hasil Perikanan Di Kota Makassar: *Jurnal Analisis*, 6 (2) : 188-193.

Mutmainnah. (2006). *Identifikasi Alel Pembawa Factor XI Deficiency (FXID) pada Sapi Perah di Kabupaten Enrekang. [Skripsi]*. Makassar: Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

Nagahata, H., Miura, T., Tagaki, K., Ohtake, M., Noda, H., Yasuda, T., et al. (1997). Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. *J Vet Med Sci*, 59(4):233-8.

Ningsih, A. U., Tatag B. P. P., dan Endang T. M. 2017. Koleksi DNA dan Konfirmasi Marka ETH10 Pengkode Sifat Pertumbuhan pada Sapi Pasundan. *Biotropic*, 1(1): 18 – 25.

Oktaviani, T. T. (2010). *Kinerja Reproduksi Sapi Perah Peranakan Friesien Holstein (PFH) di Kecamatan Musuk Boyolali. [Skripsi]*. Surakarta: Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret .

Paape, M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X., & Lee, J.-W. (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.*, 34: 597–627.

Perkins, K., VandeHaar, M., Tempelman, R., & Burton, R. (2001). Negative Energy Balance Does Not Decrease Expression of Leukocyte Adhesion or Antigen-Presenting Molecules in Cattle. *J. Dairy Sci*, 84:421–428.

Pranawaty, R. N., Buwono, I. D., & Liviawaty, E. (2012). Aplikasi Polimerase Chain Reaction (PCR) Konvensional dan Real Time PCR untuk Mendeteksi White Spot Syndrome Virus pada Kepiting. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 2(4): 61-74.

Pratiwi, R. (2001). Mengenal Metode Elektroforesis. *Oseana*, 26(1): 25-31.

Rasmussen , H. B. (2012, April 4). *Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting* . Retrieved November 5, 2019, from www.intechopen.com:https://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restriction-fragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te

Ribeiro, L., Baron, E., Martinez, M. L., & Coutinho, L. (2000). PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4): 831-834 .

- Rychlik, W. (1995). Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biotechnology*, 3: 129-134.
- Sambrook, J., E. F., F., & T., M. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sharma, G. 2017. Pros And Cons of Different Sampling Techniques. *International Journal of Applied Research*, 3(7): 749-752.
- Shuster, D. E., Kehrl, M. E., Ackermann, M. R., & Gilbert, R. O. (1992). Identification and Prevalence of A Genetic Defect That Causes Leukocyte Adhesion Deficiency in Holstein Cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 9225-9229.
- Sulistyaningsih, E. 2007. Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi. *J. Biomedis*, Vol 1.
- Susilo, A., Soeparno, Tety H., dan Wayan T. A. 2012. Amplifikasi DNA Gen Meat Tendernes pada Sapi Bali (*Bos Sondaicus*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak*, 7(1): 19-23.
- Whitlock, B. K., Kaiser, L., & Maxwell, H. S. (2008). Heritable Bovine Fetal Abnormalities. *Theriogenology*, 70: 535-549.
- Workman, A. M., Chitko-McKown, C. G., Smith, T. P., Bennett, G. L., Kalbfleisch, T. S., Basnayake, V., et al. (2019). A Bovine CD18 Signal Peptide Variant with Increased Binding Activity to Leukotoxin Mannheimia Hemolytica. *F1000Research*, 7:1985.
- Yusuf, Z. K. (2010). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*, 5(6).
- Zsolnai, A., & Fesus, L. (1996). Simultaneous analysis of bovine β -casein and BLAD alleles by multiplex PCR followed by parallel digestion with two restriction enzymes. *Animal Genetics*, 27: 207-209.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN



Lampiran 1. Tahapan prosedur 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	PFH Betina Normal (KodeSampel : 1-60)
Cell lysis	
-persiapan sampel Whole Blood pada suhu ruang	
-disiapkan microtube 1,5mL	
-dimasukkan RBC Lysis Solution	450uL
-dimasukkan Whole Blood	150uL
-dihomogenkan dengan dibolak balik	10x
-diinkubasi suhu ruang	3menit,sesekali dibalik
Pada sampel yang dikoleksi 1 jam sebelum preparasi, inkubasi ditambah menjadi 10menit	
-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	150 ul
-dipipetting up and down	Hingga tiada endapan
Protein Precipitation	
- ditambahkan Protein Precipitation Solution	50ul
-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% 150ul

-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 250ul

-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 2. Amplifikasi DNA dengan primer BLAD 1

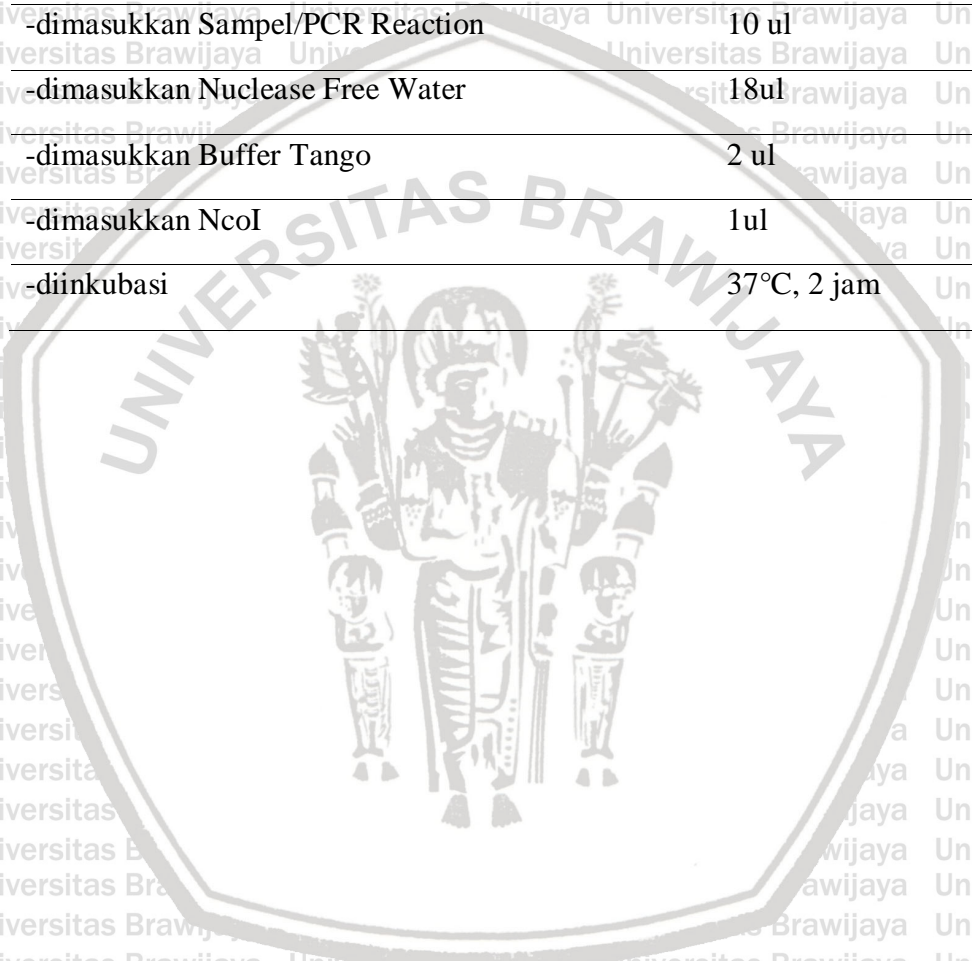
Kegiatan	Keterangan
Sterilisasi dan persiapan alat	
Briefing tahapan amplifikasi DNA	
Amplifikasi DNA dengan primer BLAD 1 (BLAD 1 Forward : 5' -TCA ACG TGA CCT TCC GGA GG-3') (BLAD 1 Reverse : 5' -CCC AGA TTC TTG ACG TTG AC-3')	Sampel PFH betina normal (Kodesampel : 1-60)
-dimasukkan pcr mix	5ul
-dimasukkan ddH ₂ O	2,5ul
-dimasukkan sampel	2,5ul
-dimasukkan primer BLAD F	1ul
-dimasukkan primer BLAD R	1ul
-dirunning Thermocycler (Biorad)	3-4 jam
Pembuatan agarose 2%	
-dimasukkan agarose	0,63g
-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 2%)	Sampel PFH betina normal (Kodesampel : 1-60)

- direndang gel pada TBE buffer
- dituang marker pada sumuran pertama 3ul
- dituang Sampel pada sumuran 4ul
- ditutup dan dihubungkan power suply, dirunning 400mA, 100V, 35 menit
- dibaca di GelDoc



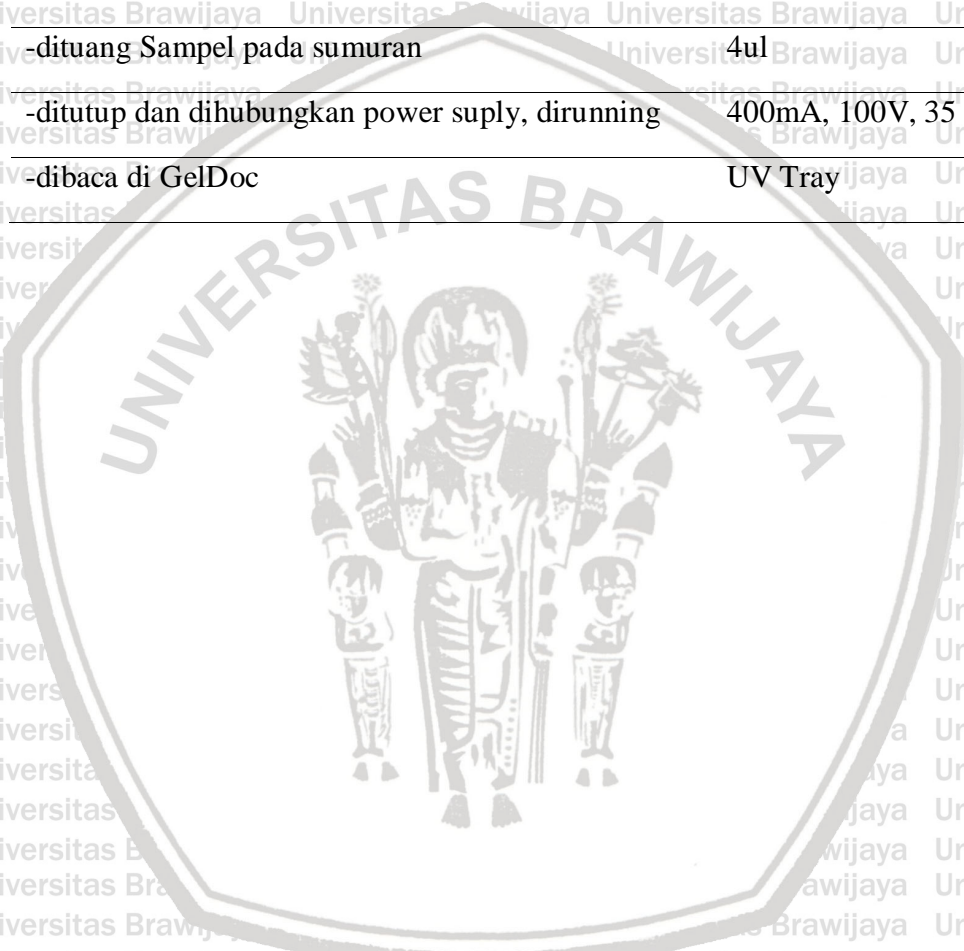
Lampiran 3. RFLP hasil amplifikasi dengan enzim restriksi NcoI

RFLP	60 sampel PFH Betina BLAD
-disiapkan PCR tube	
-dimasukkan Sampel/PCR Reaction	10 ul
-dimasukkan Nuclease Free Water	18ul
-dimasukkan Buffer Tango	2 ul
-dimasukkan NcoI	1ul
-diinkubasi	37°C, 2 jam



Lampiran 4. Elektroforesis gel agarose 2% hasil RFLP

Elektroforesis hasil RFLP		2% Agarose
-direndam gel pada TBE buffer		
-dituang marker pada sumuran pertama	3ul	
-dituang Sampel pada sumuran	4ul	
-ditutup dan dihubungkan power suply, dirunning	400mA, 100V, 35 menit	
-dibaca di GelDoc	UV Tray	



Lampiran 5. Perkiraan lokasi polimorfisme pada sekuen gen CD18

TCAACCGTGCCTTCCGGAGGGCCAAGGCTACCCCATCGACCTGTACTACCTGATGGACCTCTCC
 TACTCCATGGTGGATGACCTCCCAACGTCGAAGAGCGG

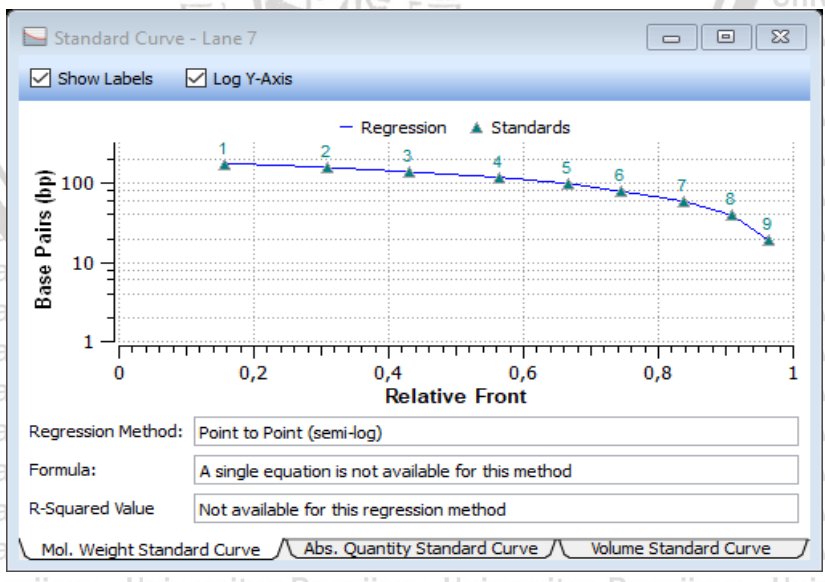
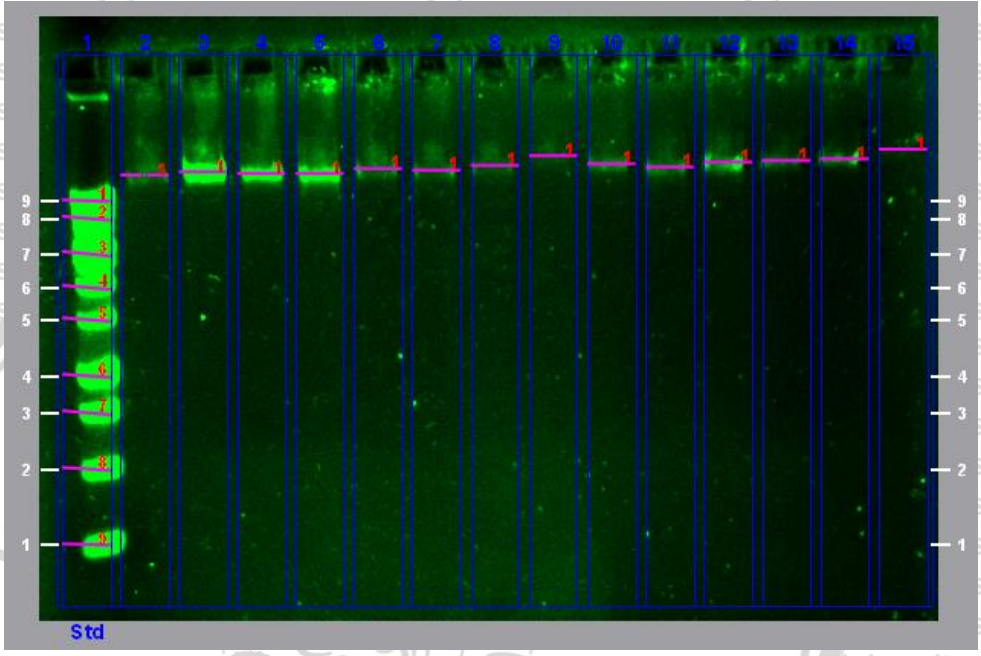
NCOI (Restriction Enzyme) C{CATGC

1. **CCAAGG** (mutasi Substitusi T-A dan C-G (Base Pair 21))
2. **CCATCG** (mutasi Substitusi C-G dan G-C) (Base Pair 34)
3. **CCATGG** (mutasi Substitusi G-C (Base Pair 68))
4. **CCT_GT** (mutasi delesi A dan substitusi T-C) (Base Pair 41))

PERKIRAAN TITIK MUTASI	JENIS MUTASI	PERKIRAAN LOKASI PEMOTONGAN PITA
CCAAGG	Substitusi T-A dan C-G	21 bp
CCATCG	Substitusi C-G dan G-C	34 bp
CCATGG	Substitusi G-C	68 bp
CCT_GT	Delesi A dan Substitusi T-C	41 bp



Lampiran 6. Elektroforesis hasil ekstraksi dengan gel agarose 1% dan kurva standar marker



Lampiran 7. Tabel Analisa Kemunculan Band dan Alel

Kode Sampel	40 bp	66 bp	106 bp	Alel			Dugaan Mutasi (ya/tidak)	Mutasi BLAD (ya/tidak)
				Homozigot Dominan	Heterozigot	Homozigot Resesif		
BT 38	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 29	✓	✓			✓		Ya	Tidak
BT 23	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 31a	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 17	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 16	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 34	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 37	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 35	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 39	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 01	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 02	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 03	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 04	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 05	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 06	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 08	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 09	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 13	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 32	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 50	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 10	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 48	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 28	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 46	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 27	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 47	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 30	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 41	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 53	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 36	✓	✓		✓			Ya	Tidak
BT 45	✓	✓		✓			Ya	Tidak



BT 42	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 51	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 44	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 12	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 40	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 14	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 54	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 18	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 22	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 31b	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 31c	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 35	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 49	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 24	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 52	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 43	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 11	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 21	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 26	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 20	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 18	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 07	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 48	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 28	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 15	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 25	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 33	✓	✓	✓	Ya	Tidak
BT 19	✓	✓	✓	Ya	Tidak



Lampiran 8. Tabel Perhitungan Frekuensi Alel dan Frekuensi Genotip

Jumlah Sampel	Jumlah Genotip			Frekuensi Genotip			Frekuensi Alel	
	DD	Dd	dd	DD	Dd	dd	D	d
n = 60	60	0	0	100%	0%	0%	100%	0%



Lampiran 9. Sekuen gen CD18 Bos Taurus (GenBank/NCBI)

B.taurus CD18 gene

GenBank: Y12672.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS Y12672 1640 bp DNA linear MAM
24-JUL-2016

DEFINITION B.taurus CD18 gene.

ACCESSION Y12672

VERSION Y12672.1

KEYWORDS antigen CD18; CD18.

SOURCE Bos taurus (cattle)

ORGANISM [Bos taurus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla;
Ruminantia;
Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.

REFERENCE 1

AUTHORS Shuster,D.E., Bosworth,B.T. and Kehrli,M.E. Jr.

TITLE Sequence of the bovine CD18-encoding cDNA: comparison
with the
human and murine glycoproteins

JOURNAL Gene 114 (2), 267-271 (1992)

PUBMED [1351021](#)

REFERENCE 2

AUTHORS Kriegesmann,B., Jansen,S., Baumgartner,B.G. and
Brenig,B.

TITLE Partial genomic structure of the bovine CD18 gene and
the
refinement of test for bovine leukocyte adhesion
deficiency

JOURNAL J. Dairy Sci. 80 (10), 2547-2549 (1997)

PUBMED [9361228](#)

REFERENCE 3 (bases 1 to 1640)

AUTHORS Kriegesmann,B.



TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (17-APR-1997) B. Kriegesmann, Institute of
 Veterinary
 Medicine, Molecular Biology, Groner Landstrasse 2, 37073
 Goettingen, FRG

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1640
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:9913"

gene <1..>1640
 /gene="CD18"

mRNA join(<1..185,1146..1316,1476..>1618)
 /gene="CD18"

CDS join(<1..185,1146..1316,1476..>1618)
 /gene="CD18"
 /codon_start=2
 /product="antigen CD18"
 /protein_id="CAA73212.1"
 /db_xref="GOA:O18961"
 /db_xref="HSSP:1L5G"
 /db_xref="InterPro:IPR001169"
 /db_xref="InterPro:IPR002369"
 /db_xref="InterPro:IPR015439"
 /db_xref="InterPro:IPR015812"
 /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:O18961"

/translation="LNFTGQGEPPDSIRCDTRAELLSKGC PADDIMEPKSLAETRDSQA
 GSRKQLSPQEVTLYL RPGQAVAFNVTFRRAKGYPIDLYLMDLSYSMVDDL VNVKKL
 GDLLRALNGITESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPEKLRNPCPNKEKECOPPF AFRHVL
 KLTDNS"

exon <1..185
 /gene="CD18"
 /number=1

intron 186..1145
 /gene="CD18"



```

/number=1
exon 1146..1316
/gene="CD18"
/number=2
variation 1200
/gene="CD18"
/citation=[1]
/phenotype="bovine leukocyte adhesion
deficiency"
/replace="g"
intron 1317..1475
/gene="CD18"
/number=2
exon 1476..>1640
/gene="CD18"
/number=3

```

ORIGIN

```

1 actgaacttc acagggcaag gggagcccga ctccattcgc tgtgacacac gagcggagct
61 gctgtcaaag ggctgcccag ctgatgacat catggaaccc aagagcctcg ctgagaccgg
121 ggacagccag gcgggcagtc ggaagcagct gtcccacacag gaagtgaacgc tctacctgag
181 accaggtagc cttggctggc taggggtggg ccggccctaa tggcgcgtgt atccatgtgt
241 ccctgcccga ggaggatgtc cccaacgccc catctgcagc tggcgcctag tctcgctttt
301 agcactgagt tctgcgtcct aaaaaaaagc gagaataaac catctggaaa aactcctta
361 tcctctctc agaagatgag gtatthtttg gctgagtga ggctctgata agcctgtaa
421 actagaaca caagtaaac tttgaatcaa tgttgcccac ctgactaac cacagaccga
481 ggtataggac acagctctct gttgaactc caagaacat ccttcaggaa ggtggcttg
541 tggaacagca ggggttatg gtggatggc atgggcagg ctgggtgag cacatggggg
601 agotgatgct ggaaggtgg ctggcagagg ggacttgat gtcatggct tgtcagcac
661 caggcatcta cctgagagct ggggacacag gctatthtga ttgacaagga aagaagtgt
721 tacaagtgca ggtggtgatt aagatgacg ggagcagaa ctaggcagc tgggattgag
781 gaagtgggg ggggtgtccc aggatggcca gggagccct ttggggcct ggcagttgtc
841 ttagcagctg gtggtagaga aggccttacc agagagacca gagagatag agaatgatta
901 acagtgtgat aacatgacac tctatatctc tgtatccagc acatagtat ccagatgtht
961 ctatgtcaga acgtgtgctt gcctgaaatg gaatctgaat aggcacctcg catcatatcc
1021 accagcataa gagaatggg agagtcctga gttctgagg cctgacaaga tgccataagt
1081 gccatgaac cccccccac ccagaccag atagtaacc ctgactatct cccaaatcct
1141 ggcaggtcag gcagttgctt tcaacgtgac ctccggagg gccaaaggct acccatcga
1201 cctgtactac ctgatggacc tctcctactc catggtggat gacctgtea acgtcaagaa
1261 gctgggggt gacctgtcc gggccctcaa tggcatcac gactcgggc gatttgggta
1321 ggcagtaact ccatcttccc ctgaaacccc aagccccgt cccaggcac tctgcacctc
1381 tgcaccccaa gggcagggcg ccaggccct cccacgtgc cgggcttcc taccctctc
1441 tggtaaagag ctcacggccc ctactgtcc cccagtttc gggccttcg tggacaagac
1501 ggtgtcccc ttcgtcaaca cgcaccocga gaagctcgg aaccctgcc ccaacaagga
1561 gaaggagtgc cagccccgt tgccttcag gcacgtgtt aagctcactg acaactocaa
1621 acagttcgag acagaagtcg //

```



Lampiran 10. Daftar Kode Sampel

NO SAMPEL	KODE SAMPEL	NO SAMPEL	KODE SAMPEL	NO SAMPEL	KODE SAMPEL
1	BT 38	22	BT 10	43	BT 31c
2	BT 29	23	BT 48	44	BT 35
3	BT 23	24	BT 28	45	BT 49
4	BT 31a	25	BT 46	46	BT 24
5	BT 17	26	BT 27	47	BT 52
6	BT 16	27	BT 47	48	BT 43
7	BT 34	28	BT 30	49	BT 11
8	BT 37	29	BT 41	50	BT 21
9	BT 35	30	BT 53	51	BT 26
10	BT 39	31	BT 36	52	BT 20
11	BT 01	32	BT 45	53	BT 18
12	BT 02	33	BT 42	54	BT 07
13	BT 03	34	BT 51	55	BT 48
14	BT 04	35	BT 44	56	BT 28
15	BT 05	36	BT 12	57	BT 15
16	BT 06	37	BT 40	58	BT 25
17	BT 08	38	BT 14	59	BT 33
18	BT 09	39	BT 54	60	BT 19
19	BT 13	40	BT 18		
20	BT 32	41	BT 22		
21	BT 50	42	BT 31b		

Lampiran 11. Tabel persebaran BLAD

No	Lokasi	Jenis Kelamin	N	Ni	Frekuensi Genotif Dd (Heterozigot)	Referensi
1	Indonesia					
	BBIB Singosari	Jantan	32	100%	0%	Herodita, 2009
	BIB Lembang	Jantan	30	100%	0%	Herodita, 2009
	BPTU Baturraden	Betina	97	100%	0%	Herodita, 2009
	BIB Lembang (61) dan BPTU Baturraden (20)	Jantan (31)+ Betina (30)		100%	2,40%	Farajallah <i>et al.</i> , 2007
	Baturraden (20)	Baturraden (Betina) (20)	81	100%		
	BET Cipelang	Betina	57	100%	0%	Herodita, 2009
	BPPT-SP Cikole	Betina	88	100%	0%	Herodita, 2009
	Enrekang	Betina	80	100%	1%	Dagong <i>et al.</i> , 2018
	Peternakan Fapet IPB	Betina	17	100%	0%	Herodita, 2009
	Peternakan Rakyat Ngantang	Betina	47	100%	0%	Herodita, 2009
	Peternakan Rakyat Boyolali	Betina	49	100%	0%	Herodita, 2009
	KPSBU Cilumber	Betina	98	100%	0%	Herodita, 2009
	KPSBU Pasar Kemis	Betina	95	100%	0%	Herodita, 2009
	Peternakan Rakyat Lembang	Betina	34	100%	0%	Herodita, 2009
	Peternakan Rakyat Pondok Rangoon	Betina	32	100%	0%	Herodita, 2009
	PT. Puri Purnama Bangli	Betina	51	100%	0%	Herodita, 2009
	KPS Kunak Bogor	Betina	44	100%	0%	Herodita, 2009
	KPBS Pengalengan	Betina	55	100%	0%	Herodita, 2009
	KPS Gunung Gede Sukabumi	Betina	53	100%	0%	Herodita, 2009
	Yayasan Tsukisima Among Tani	Betina	24	100%	0%	Herodita, 2009
2	Czech	Jantan	844	100%	7,90%	Citek <i>et al.</i> , 2006
3	India	Jantan	377	100%	3,22%	Patel <i>et al.</i> , 2007
4	Jepang	Jantan	846	100%	10,80%	Nagahata <i>et al.</i> , 1996
5	Amerika Serikat	Jantan	3584	100%	9,95%	Shuster <i>et al.</i> , 1992
6	Pakistan	Jantan dan Betina	700	100%	1%	Nasreen F., 2009
7	Iran					
	Khorazan		30		3,33%	Norouzy A., 2005
	Center of Iran		37	100%	1%	Rahimi G., 2006
8	Lithuania	Jantan (50), Betina, dan Pedet	200	100%	0,50%	Morkuniene <i>et al.</i> , 2019
9	Romania	Jantan	90	100%	0%	Vitasescu <i>et al.</i> , 2006
10	Turki	Jantan dan Betina	120	100%	1,67%	Akyuz <i>et al.</i> , 2006



Lampiran 12: Peta Sebaran Pengambilan Sampel di Kecamatan Batu Kota Batu

