

TESIS

**IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN PROMOTOR
TIROSINE KINASE PADA SAPI *FRIESIAN-
HOLSTEIN* YANG MENGALAMI
*SILENT HEAT***

EKSPERIMENTAL LABORATORIK



Oleh

ANNA ZUKIATURRAHMAH

NIM 061914153002

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

TESIS

**IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN PROMOTOR
TIROSINE KINASE PADA SAPI *FRIESIAN-
HOLSTEIN* YANG MENGALAMI
*SILENT HEAT***

EKSPERIMENTAL LABORATORIK



Oleh

ANNA ZUKIATURRAHMAH

NIM 061914153002

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

**IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN PROMOTOR
TIROSINE KINASE PADA SAPI *FRIESIAN-HOLSTEIN* YANG
MENGALAMI *SILENT HEAT***

EKSPERIMENTAL LABORATORIK

TESIS

**Untuk memperoleh gelar Magister
Dalam Program Studi Biologi Reproduksi
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

**ANNA ZUKIATURRAHMAH
NIM 061914153002**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

**Identifikasi Polimorfisme Gen Promotor Tirosine Kinase Pada Sapi
Friesian-Holstein Yang Mengalami *Silent Heat***

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 30 Maret 2022



Anna Zukiaturrahmah

NIM.061914153002

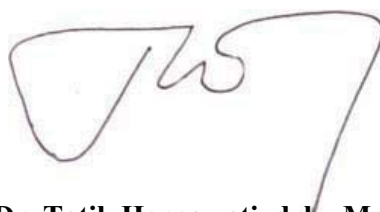
LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 30 Maret 2022

Oleh:

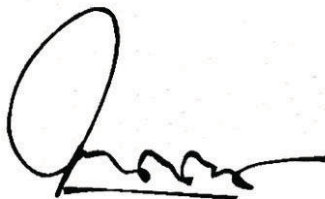
Pembimbing Ketua



Dr. Tatik Hernawati, drh., M.Si

NIP. 196008291987012001

Pembimbing



Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS.

NIP. 195205161978031002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Dr. Erma Safitri, drh., M.Si.

NIP. 196907231999032001

Usulan Penelitian Tesis ini telah diuji dan dinilai pada
Tanggal: 29 Januari 2021

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Budi Utomo, drh., M.Si.
Sekretaris : Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si.
Anggota : 1. Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.
2. Dr. Tatik Hernawati, drh., M.Si.
3. Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS.

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada
Tanggal: 8 April 2022

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Budi Utomo, drh., M.Si.
Sekretaris : Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si.
Anggota : 1. Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.
2. Dr. Tatik Hernawati, drh., M.Si.
3. Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS.

Surabaya, 27 Juni 2022

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Dr. Mirni Lamid, drh., MP
NIP. 196201161992032001

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmannirrahim

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta karunia, sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Identifikasi Polimorfisme Gen Promotor Tirosine Kinase Pada Sapi *Friesian-Holstein* Yang Mengalami *Silent Heat*”. Penulis menyadari bahwa tanpa adanya bantuan dan dorongan dari berbagai pihak, penyelesaian tesis ini tidak akan terwujud. Oleh karena itu, dengan ketulusan dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Dr. Mirni Lamid, drh., MP., Dr. Rimayanti, drh., M.Kes., selaku Wakil Dekan I, Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si., selaku Wakil Dekan II, Prof. Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH., selaku Wakil Dekan III, dan Dr. Erma Safitri, drh., M.Si. selaku Ketua Program Studi S2 Ilmu Biologi Reproduksi atas kesempatan yang diberikan kepada saya dalam menempuh pendidikan di Program Studi S2 Ilmu Biologi Reproduksi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.

Dr. Tatik Hernawati, drh., M.Si., selaku pembimbing utama dan Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS., selaku pembimbing, yang telah membimbing dengan memberikan bimbingan, arahan, dan ilmu terbaik untuk kelancaran tesis penulis.

Prof. Dr. Budi Utomo, drh., M.Si., selaku ketua penguji, Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si., selaku sekretaris penguji dan Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si., selaku anggota penguji atas semua kritik dan saran membangun yang diberikan kepada penulis.

Seluruh dosen dan staff pengajar S2 Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk bimbingan, pendidikan, dan pengarahan selama saya mengikuti pendidikan Magister di FKH UNAIR.

Kedua orangtua tercinta ayahanda Drs. H. Zulrefri Dt. Rajo Endah dan ibunda Ir. Yunita Hermi yang telah merapalkan doa untuk penulis disetiap sujudnya. Terimakasih sudah membesarkan, mendidik, menyayangi, dan memberikan *support* kepada penulis. Suami tercinta Deni Alatas, S.Hum yang dengan sabar, mendoakan, mendukung, memotivasi penulis disaat penulis berada dititik ingin menyerah. Kakak Siska Lamedies Gava, S.Kom., adik Raisa Nabila, S.Pd dan Reihan Zulni yang telah memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis. Keluarga besar rumah gadang Garegeh, Keluarga besar Dt. Rajo Endah, keluarga besar Papa H. Hasan Basri Sy, S.Pd atas semua dukungan dan do'a yang selalu mengiringi penulis sampai dititik ini.

Rekan Penelitian Polimorfisme drh. Tantri Dyah Whidi Palupi, M.Si., Dinas Peternakan Kabupaten Ponorogo, dan Kelompok Ternak Pos Susu Mulya Abadi di Dukuh, Ngelo, Pudak Wetan Kecamatan Pudak Kabupaten Ponorogo Jawa Timur yang telah bekerjasama membantu berjalannya penelitian penulis. Laboratorium Tropical Disease Diagnostic Center Universitas Airlangga dan Laboratorium ADD FKH Universitas Brawijaya atas bantuannya menyelesaikan penelitian.

Teman – teman S2 FKH UNAIR, Elly Nur Indasari, S.KH, M.Si., drh. Erprinanda Galuh Berliana, M.Si., drh. Milla Nursadida., Nindya Meidyva U, S.Pi., drh. Bagus Aditya Kuswardhana, Irlando Pradana Bayu C, S.Pt., Aryo Hanoto Saktyo, S.Pi. dan teman-teman lainnya yang tidak bisa disebutkan satu per satu, yang telah membantu, mendukung, dan mendo'akan saya hingga dapat menyelesaikan Tesis ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih kurang dan jauh dari sempurna. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang akan membantu dalam perbaikan tesis ini. Penulis berharap tesis ini bermanfaat.

Surabaya, 27 Juni 2022

Penulis

RINGKASAN

Identifikasi Polimorfisme Gen Promotor Tirosine Kinase pada Sapi *Friesian-Holstein* yang mengalami *Silent Heat*

Silent heat merupakan kasus gangguan reproduksi tertinggi kedua di Indonesia pada tahun 2015 – 2018 sebesar 33,95% yang mempengaruhi rendahnya efisiensi reproduksi terutama pada sapi perah *Friesian-holstein* (FH). Upaya peningkatan efisiensi reproduksi dapat dilakukan melalui peningkatan mutu genetik berdasarkan seleksi genetik. Apabila gen-gen yang berpengaruh sebagai penanda gangguan *silent heat* diketahui, maka akan mampu menunjang efisiensi reproduksi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari adanya polimorfisme terhadap gangguan reproduksi *silent heat* pada sapi FH berdasarkan gen promotor Tirosine Kinase. Pada penelitian ini identifikasi polimorfisme dilakukan pada sampel darah sapi FH yang didapat dari kelompok ternak pos susu Mulya Abadi di desa Pudak Wetan Ponorogo, Jawa Timur. Pemeriksaan sampel dikonfirmasi secara molekuler. Metode molekuler yang digunakan adalah *Enzyme-Linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk menguji kadar estrogen, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer TEK-F dan TEK-R, *Polymerase Chain Reaction- Restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) menggunakan enzim restriksi BamHI, dan *Sequencing* DNA menggunakan software BioEdit® dengan membandingkan sequencing sampel dengan data GeneBank NCBI NM 173964.2.

Hasil penelitian pada 10 sampel menunjukkan keseluruhan band berada pada 300bp. Terjadi perubahan komposisi gen berupa transversi (A–C), delesi (A&G) dan transisi (A-G). Hasil penelitian menunjukkan bahwa situs mutasi ini dapat dikaitkan dengan *silent heat*. Namun belum menunjukkan terjadinya polimorfisme. Studi lebih lanjut diperlukan untuk mengatasi parameter lain yang terkait dengan gangguan reproduksi.

SUMMARY

Identification of Tyrosine Kinase Promoter Gene Polymorphisms in Friesian-Holstein undergoing Silent Heat

Silent heat is the second highest reproductive disorder case in Indonesia 2015 – 2018 at 33.95% which affects the low reproductive efficiency in Friesian-Holstein (FH). Efforts to increase reproductive efficiency can be done through improving genetic quality based on genetic selection. If the genes that are influential as markers of silent heat disorders are known, they will be able to support reproductive efficiency.

This study aims to determine the effect of the presence of polymorphisms on reproductive disorders of silent heat in FH based on the tyrosine kinase promoter gene. In this study, the identification of polymorphisms was carried out on blood samples of FH obtained from the Mulya Abadi dairy cattle group in Pudak Wetan, Ponorogo, East Java. Sample examination was confirmed molecularly. The molecular methods used are Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to test estrogen levels, Polymerase Chain Reaction (PCR) using TEK-F and TEK-R primers, Polymerase Chain Reaction- Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using restriction enzymes BamHI, and DNA sequencing using BioEdit® software by comparing the sample sequencing with GeneBank NCBI NM 173964.2.

The results of the 10 samples showed that the entire band was at 300bp. There was a change in gene composition in the form of transversion (A–C), deletion (A&G) and transition (A-G). The results showed that this mutation site could be associated with silent heat. However, it has not shown the occurrence of polymorphism. Further studies are needed to address other parameters associated with reproductive disorders.

Identification of Tyrosine Kinase Promoter Gene Polymorphisms in Friesian-Holstein undergoing Silent Heat

Anna Zukiaturrahmah

ABSTRACT

This study aims to identification the polymorphism of Tيروسine Kinase promoter gene in Holstein Friesian (FH) dairy cows and its correlation with Silent Heat in FH dairy cows. The basis for determining tyrosine kinase as the main biomarker in determining silent heat in female Holstein dairy cows is based on several previous studies showing that tyrosine kinase plays an important role in the process of follicular growth and oocyte maturation. Ten FH cows (oestrus, oestrus symptoms and asymptomatic) were the targets of this study from the Mulya Abadi Livestock Group at Pudak Wetan, Ponorogo, East Java. The research method consisted of sample collection, determination of estrogen concentration with Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) test, Extracted and amplified DNA with polymerase chain reaction (PCR) using primers TEK-F and TEK-R, PCR-RFLP using restriction enzymes BamHI, and Sequencing DNA with BioEdit® software. The results obtained indicate that the 300bp band as a target was detected in all 10 samples then sequenced for analysis of the nucleotide base. All sequencing samples were compared with NCBI NM 173964.2, the results showed that there were changes in gene composition in the form of transversions (A–C), deletions (A & G) and transitions (A-G). The result indicated that this mutation site could be related with silent heat. However, it has not shown the occurrence of polymorphism. Further studies are needed to address other parameters associated with reproductive disorders.

Keywords: Polymorphism, Silent Heat, Tيروسine Kinase.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DEPAN	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
PERSYARATAN GELAR	iii
PERNYATAAN	iv
PERSETUJUAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vii
UCAPAN TERIMAKASIH	viii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xi
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Teoritis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Sapi <i>Friesian Holstein</i>	5
2.2 <i>Silent Heat</i>	7
2.3 Tirosine Kinase.....	13
2.4 <i>Polimorfisme</i>	20
2.4.1 Genetika	20
2.4.2 Polimorfisme DNA	21
2.4.3 Teknik PCR Pada Studi Polimorfisme DNA.....	24
2.4.4 Restriction fragment length polymorphism (RFLP).....	25
2.4.5 Sekuensing DNA.....	26
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS.....	27
3.1 Kerangka Konseptual	27
3.2 Hipotesis.....	29
BAB IV MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	30
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	30
4.2 Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	30
4.2.1 Populasi Sampel	30

4.2.2	Besar Sampel	30
4.2.3	Teknik Pengambilan Sampel	31
4.3	Variabel Penelitian	31
4.3.1	Klasifikasi Variabel	31
4.3.2	Definisi Operasional	32
4.4	Bahan Penelitian	34
4.5	Instrumen Penelitian	35
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	35
4.7	Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	35
4.7.1	Pengambilan Sampel	36
4.7.2	Ekstraksi DNA.....	36
4.7.3	Amplifikasi DNA	38
4.7.4	PCR-RFLP	38
4.7.5	Sequencing DNA	39
4.7.6	Pemeriksaan Kadar Polimorfisme	39
4.8	Bagan Kerangka Operasional	40
4.9	Analisis Data	41
	BAB V ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	42
5.1	Hasil Kuisisioner	42
5.2	Pemeriksaan Kadar Estrogen dengan Metode Elisa	44
5.3	Ekstraksi DNA	47
5.4	Amplifikasi DNA	49
5.5	<i>Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (PCR-RFLP) Gen Promotor Tyrosine Kinase	50
5.6	<i>Sequencing</i> DNA	51
	BAB VI PEMBAHASAN.....	59
6.1	Kuisisioner	59
6.2	Pemeriksaan Kadar Estrogen dengan Metode Elisa	60
6.3	Ekstraksi DNA	61
6.4	Amplifikasi DNA	63
6.5	PCR-RFLP Gen Promotor Tyrosine Kinase	63
6.6	<i>Sequencing</i> DNA	64
	BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	67
	DAFTAR PUSTAKA.....	68
	LAMPIRAN.....	75

DAFTAR GAMBAR

No.	Hal.
1....Gambar 2.1 Sapi Friesian Holstein.....	5
2....Gambar 2.2 Regulasi hormon reproduksi pada sapi.....	9
3....Gambar 2.3 Mekanisme Kerja Hormon Estrogen	10
4....Gambar 2.4 Tyrosine Kinase	14
5....Gambar 2.5 Ras/Raf/MAP Kinase Pathway.....	16
6....Gambar 2.6 Ras/Raf/MAP Kinase Pathway	16
7....Gambar 2.7 Aktivasi melalui Jak/Stat Pathway	17
8....Gambar 2.8 Skema transduksi sinyal hormone.....	18
9....Gambar 2.9 Transduksi sinyal hormon melalui tirosin kinase	19
10..Gambar 2.10 Struktur DNA.....	20
11..Gambar 2.11 single nucleotide polymorphisms, SNP.....	23
12..Gambar 2.12 VNTRs dan STR Polimorfisme	23
13..Gambar 2.13 Indel Polimorfisme.....	24
14..Gambar 2.14 Siklus PCR.....	25
15..Gambar 3.1 Kerangka Konseptual.....	27
16..Gambar 4.1 Bagan Kerangka Operasional.....	40
17..Gambar 5.1 Hasil Absorbansi pada pengenceran standart.....	44
18..Gambar 5.2 Hasil pemeriksaan DNA dengan metode elektroforesi.....	48
19..Gambar 5.3 Hasil elektroforesis amplifikasi DNA.....	49
20..Gambar 5.4 Hasil PCR-RFLP dengan enzim BamHI.....	50
21..Gambar 5.5 Contoh hasil kromatogram dari kelompok sampel <i>silent heat</i> .	52
22..Gambar 6.1 Sekuens gen TRK Bos Taurus genebank NCBI:NM 1739642	64

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lampiran 1. Prinsip Kerja ELISA.....	76
Lampiran 2. Proses Ekstraksi DNA.....	78
Lampiran 3. Prinsip Kerja PCR.....	80
Lampiran 4. Langkah Kerja RFLP.....	82
Lampiran 5. Langkah Kerja Sequencing DNA.....	83
Lampiran 6. Kuisioner Penelitian.....	84
Lampiran 7. Hasil Kuisioner Penelitian.....	87
Lampiran 8. Hasil Penelitian.....	89
Lampiran 9. Laik Etik Penelitian.....	94
Lampiran 10. Dokumentasi Penelitian.....	95

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Perhitungan persentase terhadap kasus kejadian <i>silent heat</i> dengan pemberian pakan hijauan dan konsentrat pada beberapa perlakuan masing-masing peternak.....	43
Tabel 5.2 Hasil absorbansi pada pengenceran standard.....	44
Tabel 5.3 Hasil absorbansi dan konsentrasi estrogen pada setiap sampel.....	45
Tabel 5.4 Hasil pemeriksaan Uji T satu sampel.....	46
Tabel 5.5 Hasil pemeriksaan DNA dengan metode NanoDrop Spektrofotometer.....	48
Tabel 5.6 Primer forward dan reverse gen promotor tyrosin kinase.....	49
Tabel 5.7 Hasil dari pemeriksaan polimorfisme pada sequence gen dari masing-masing sampel yang diperiksa.....	53
Tabel 5.8 Rincian base yang mengalami polimorfisme pada sequence gen promotor Tyrosine Kinase kelompok sampel <i>silent heat</i>	56
Tabel 5.9 Hasil analisis deskriptif pada sequence gen Tyrosine kinase normal dan sequence Tyrosine kinase sampel.....	57
Tabel 5.10 Hasil <i>RANKS</i> pada pemeriksaan uji Wilcoxon.....	58
Tabel 5.11 Hasil tabel statistic uji Wilcoxon.....	58

DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ACTH	: <i>Adrenocorticotropin</i>
ADP	: <i>Adenosin difosfat</i>
AMP	: <i>Adenosine Monophosphate</i>
ATP	: <i>Adenosina trifosfat</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
ddH ₂ O	: <i>Double-distilled water</i>
DMS	: <i>Dimetilsulfat</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	: <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FH	: <i>Friesian-Holstein</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
FSHR	: <i>Follicle Stimulating Hormone Receptor</i>
GDP	: <i>Guanosine diphosphate</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin-Releasing Hormon</i>
GMRP	: <i>Guanyl Nucleotide Release Protein</i>
GTP	: <i>Guanosine triphosphate</i>
JAK	: <i>Janus kinases</i>
LH	: <i>Leutinizing Hormone</i>
MAP	: <i>Mitogen-activated protein</i>
NFW	: <i>Nuclear Free water</i>
NGF	: <i>Nerve growth factor</i>
NRTKs	: <i>Nonreseptor Tirosin Kinase</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PEG green	: <i>Polyethylene glycols Green</i>

PGF2 α	: Prostaglandin F2 α
RAK	: Rancangan Acak Lengkap
RBC	: <i>Red Blood Cell</i>
RFLP	: <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
RTK	: Reseptor Tirosine Kinase
SDS-Page	: <i>Sodium dodecyl sulfate Page</i>
SH2	: <i>Src homology region 2</i>
SNP	: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STAT	: <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STR	: <i>Short Tandem Repeats</i>
TBE	: <i>Tris-borate-EDTA</i>
TSH	: <i>Thyrotropin</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VNTR	: <i>Variable number tandem repeat</i>