

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI (PUPT)
TAHUN ANGGARAN 2016**



**PERBANDINGAN GENOTIP DAN FENOTIP SAPI MADURA GUNA MEMPEROLEH KEMURNIAN
GENETIK YANG DAPAT DIGUNAKAN SEBAGAI ACUAN PELESTARIAN PLASMA NUFTAH TERNAK
LOKAL DI PULAU MADURA**

Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun

PENELITI

**Dr. Budi Utomo, M.Si., drh. NIDN 0018055904
Dr. Rr. Ratih Ratnasari, SU., drh NIDN 0027085002**

Dibiayai oleh

**Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Surat Perjanjian Perugasan Pelaksanaan Program Penelitian
Nomor : 018/SP2H/ILT/DRPM/II/2016. Tanggal 17 Februari 2016**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
Oktober 2016**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI (PUPT)
TAHUN ANGGARAN 2016**



**PERBANDINGAN GENOTIP DAN FENOTIP SAPI MADURA GUNA MEMPEROLEH KEMURNIAN
GENETIK YANG DAPAT DIGUNAKAN SEBAGAI ACUAN PELESTARIAN PLASMA NUFTAH TERNAK
LOKAL DI PULAU MADURA**

Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun

PENELITI

**Dr. Budi Utomo, M.Si., drh. NIDN 0018055904
Dr. Rr. Ratih Ratnasari, SU., drh. NIDN 0027085002**

Dibiayai oleh
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Penelitian
Nomor : 018/SP2H/LT/DRPM/II/2016. Tanggal 17 Februari 2016

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
Oktober 2016**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Perbandingan Genotip dan Fenotip Sapi Madura Guna Memperoleh Kemurnian Genetik Yang Dapat Digunakan Sebagai Acuan Pelestarian Plasma Nuftah Ternak Lokal Di Pulau Madura

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. Budi Utomo, M.Si., drh.
NIDN : 0018055904
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala / IV-a
Program Studi : Kedokteran Hewan
No. HP. : 081553160631
Alamat surel (e-mail) : budi_reprovvet@yahoo.com

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr. Rr. Ratih Ratnasari, SU., drh.
NIDN : 0027085002
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : --
NIDN : --
Perguruan Tinggi : --
Institusi Mitra (Jika ada) : --
Nama Institusi Mitra : --
Alamat : --
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 50.000.000,-
Biaya Keseluruhan : Rp. 100.000.000,-

Surabaya, 15 Oktober 2016

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Unair


Prof. Dr. Rudi Sianto, M.Kes., drh.
NIP. 19560105198601001

Ketua Peneliti,


Dr. Budi Utomo, drh., M.Si.
NIP. 195905181987011002

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi


Prof. M. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., Ph.D.
NIP. 196705071991021001

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
ABSTRAK.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Klasifikasi Sapi	5
2.2 Tinjauan umum sapi Madura	5
2.3 Pelestarian Sumber Daya Genetik Ternak	7
2.4. Keragaman Genetik Ternak	9
2.5 DNA Mitokondria.....	12
2.6 Gen Displacement Loop (D-Loop)	15
2.7 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	16
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	18
3.1 Tujuan Penelitian	18
3.2 Manfaat Penelitian	18
BAB IV MATERI DAN METODE	19
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	19
4.2 Besar Sampel	19
4.3 Variabel Penelitian.....	19
4.4 Bahan Penelitian	19
4.4.1 Sampel.....	19
4.4.2 Bahan	19

4.4.3	Agarose Gel Electrophoresis	19
4.5	Instrumen Penelitian	20
4.5.1	Alat.....	20
4.5.2	Alat untuk membuat <i>Agarose Gel Electrophoresis</i>	20
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	20
4.7	Prosedur Pengambilan sampel dan Pengumpulan Data.....	20
4.7.1	Pengambilan sampel	20
4.7.2	Ekstraksi DNA mitokondria	20
4.7.3	Reaksi PCR.....	22
4.7.4	Amplifikasi D-Loop.....	22
4.7.5	Elektroforesis	23
4.7.6	Sekuensing	23
4.7.7	Pengumpulan Data	23
4.8	Bagan Kerangka Operasional	24
4.9	Analisis Data.....	25
BAB V	HASIL PENELITIAN.....	26
5.1	Amplifikasi DNA Mitokondria Region Displacement Loop.....	26
5.2	Sekuensing DNA Mitokondria Region Displacement Loop.....	27
BAB VI	RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....	32
	(Tahun Ke 2)	
BAB VII	KESIMPULAN	33
DAFTAR	PUSTAKA	34
GAMBAR	PENELITIAN.....	39

4.4.3	Agarose Gel Electrophoresis	19
4.5	Instrumen Penelitian	20
4.5.1	Alat.....	20
4.5.2	Alat untuk membuat <i>Agarose Gel Electrophoresis</i>	20
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	20
4.7	Prosedur Pengambilan Sampel dan Pengumpulan Data.....	20
4.7.1	Pengambilan sampel	20
4.7.2	Ekstraksi DNA mitokondria	20
4.7.3	Reaksi PCR	22
4.7.4	Amplifikasi D-Loop.....	22
4.7.5	Elektroforesis	23
4.7.6	Sekuensing	23
4.7.7	Pengumpulan Data.....	23
4.8	Bagan Kerangka Operasional	24
4.9	Analisis Data.....	25
BAB V	HASIL PENELITIAN.....	26
5.1	Amplifikasi DNA Mitokondria Region Displacement Loop.....	26
5.2	Sekuensing DNA Mitokondria Region Displacement Loop.....	27
BAB VI	RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....	32
	(Tahun Ke 2)	
BAB VII	KESIMPULAN	33
DAFTAR	PUSTAKA	34
GAMBAR	PENELITIAN.....	39

ABSTRAK

Perkawinan silang antara sapi Madura betina dengan pejantan unggul sapi bangsa lain (*sapiexotic*) sering terjadi pada suatu daerah. Persilangan ini akan memiliki konsekuensi bahwa pelestarian plasma nutfah sapi Madura di Pulau Madura akan sudah tidak berlaku lagi, kecuali di Pulau Sapudi. Menurut FAO (2000) bahwa, sumber daya genetik ternak asli akan cenderung punah akibat permintaan pasar yang baru (eksploitasi besar-besaran), persilangan yang tidak terkendali, pergantian *breed* (penggantian bangsa sapi yang sudah ada dengan bangsa sapi baru) dan kegiatan mekanisasi pertanian (penggantian penggunaan tenaga sapi dengan tenaga mesin untuk mengolah lahan pertanian). Sapi Madura menjadi *breed* (bangsa) sapi potong lokal yang terbentuk sebagai akibat isolasi alam dan pengaruh lingkungan, sehingga mempunyai keseragaman karakteristik yang menonjol antara *breed* sapi potong lokal lainnya di Indonesia. Dengan kontribusi sifat-sifat genetic sapi zebu seperti toleran terhadap stress akibat iklim dan daya tahan terhadap serangan caplak serta seleksi alam dan lingkungan yang ketat dalam kurun waktu yang lama, maka sapi Madura menjadi bangsa sapi yang mempunyai daya adaptasi sangat tinggi terhadap lingkungan. Disamping itu, sapi Madura mempunyai respon yang baik terhadap perbaikan pakan serta tahan terhadap pakan dengan kandungan serat kasar tinggi (Soehadji, 1993).

Manfaat penggunaan mtDNA menurut Duryadi (1994) antara lain (1) Sebagai marka genetik dalam studi variabilitas intraspesifik (interpopulasi) yang dapat memberikan informasi secara kualitatif maupun kuantitatif; (2) Dapat digunakan untuk melacak kejadian yang relatif baru seperti studi hibridisasi alami antara dua subspecies; (3) Dapat digunakan untuk suatu rekonstruksi historik dari genealogi matrilineer suatu spesies maupun antar populasi yang ada; (4) Dapat merekonstruksi filogenik dari beberapa spesies yang saling berdekatan. Penelitian ini menggunakan fragmen daerah D-loop sapi Madura untuk mendapatkan data keragaman genetik sehingga dapat mengetahui susunan nukleotida antar individu sapi Madura dan mengidentifikasi penampakan fenotifnya. Data tersebut dapat digunakan untuk mengidentifikasi kemurnian genetik dari sapi Madura yang ada pada daerah pulau Sapudi, Sumenep, Pamekasan, Pamekasan, Sampang, Bangkalan.

Hasil yang didapat yaitu : *Mitochondrial Deoxyribonucleic acid* (mtDNA) daerah *Displacement Loop* (*D-Loop*) sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Pamekasan, Sampang, Sumenep dapat teramplifikasi dengan baik dengan ukuran 980 bp. Dari analisis sekuen mtDNA daerah *D-Loop* ditemukan 50 situs keragaman genetik yaitu Sapi Madura Pamekasan terdapat 15 mutasi substitusi transisi, 9 mutasi substitusi transversal. Sapi Madura Sampang terdapat 13 mutasi substitusi transisi, 8 mutasi substitusi transversal. Sapi Madura Sumenep 2 mutasi substitusi transisi, 2 mutasi substitusi transversal dan 1 delesi. Walaupun demikian tingkat variasi yang tinggi pada penelitian ini tidak berakibat pada perubahan fenotipe karena daerah *D-Loop* merupakan daerah *non coding* yang tidak terekspresikan.

Key Words : Plasma Nutfah, Bangsa Sapi, Karakter Genetik, mtDNA, Kemurnian Genetik

PRAKATA

Berkat rahmat Tuhan Yang Maha Esa, maka kegiatan penelitian PUPT dengan judul : Perbandingan genotip dan fenotip sapi Madura guna memperoleh kemurnian genetik yang dapat digunakan sebagai acuan pelestarian plasma nuftah ternak lokal di pulau Madura dapat berjalan sesuai dengan rencana dan berlangsung dengan baik.

Kegiatan ini dilaksanakan mulai bulan awal April 2016, pengambilan sampel darah sapi Madura di lakukan di lima tempat yaitu pulau Sapudi, Sumenep, Pamekasaan, Sampang dan Bangkalan. Pengerjaan PCR dan sekuensing DNA dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner Denpasar Bali. Dana dari program kegiatan ini berasal dari DIPA DITLITABMAS.

Laporan ini memuat ekstraksi DNA, Uji kualitas DNA, dan analisa DNA dengan PCR, pembahasan dan kesimpulan sementara.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya atas terselenggaranya kegiatan penelitian ini disampaikan kepada :

1. Kemenristek Dikti
2. Rektor Universitas Airlangga
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga
4. Kepala Balai Besar Penelitian Veteriner Denpasar Bali
5. Semua pihak yang terlibat dalam kegiatan ini

Surabaya, 16 Oktober 2016

Penyusun
Penelitian PUPT Unair 2016

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dokumen *'World Watch List for Domestic Animal Diversity'* report (3rd ed.) melaporkan bahwa terdapat kurang lebih 6300 bangsa (*breed*) ternak di dunia dari sekitar 30 spesies hewan domestikasi dan hampir sebagian besar *breed* saat ini merupakan spesies lokal yang berasal dari negara-negara berkembang. Keragaman genetik yang dimiliki *breed* lokal berperan besar dalam keberhasilan program pemuliaan ternak di negara-negara berkembang selama kurun waktu abad 19 hingga 20. Hal ini jelas menggambarkan bahwa spesies lokal merupakan sumber daya genetik yang penting dan unik untukantisipasi kebutuhan produksi ternak saat ini maupun mendatang (Schearf, 2003).

Food and Agriculture Organization(FAO) memprediksi bahwa paling sedikit satu bangsa ternak tradisional punah setiap minggu dan lebih dari 30% ternak di Eropa sekarang ini diperkirakan dalam keadaan terancam kepunahan (FAO, 1995). Banyak bangsa ternak tradisional sudah menghilang karena para petani lebih fokus pada bangsa sapi baru. Sekitar 16% dari bangsa sapi tradisional telah punah dan kurang dari 15 % bersifat jarang (FAO, 2000). Keadaan ini dapat dilihat pada bangsa-bangsa sapi zebu di India yang secara signifikan telah kehilangan ekonomi yang sangat penting dan penurunan ukuran populasi terutama karena persilangan secara meluas (Sodhi *et al.*, 2006).

Semakin berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi pemuliaan ternak, bioteknologi, permintaan pasar, mekanisasi pertanian dan produksi ternak, akan mendorong eksploitasi ternak melalui persilangan, penggantian *breed* baru (Subandriyo dan Setiadi, 2003; Sodhi *et al.*, 2006), maupun pengurusan *stock* secara berlebihan, dan pada gilirannya akan mengancam keragaman genetik ternak. Di lain pihak pelestarian keragaman genetik ternak akan selalu diperlukan dalam pemuliaan di masa mendatang, karena tanpa adanya keragaman genetik, pemuliaan ternak tidak mungkin dilaksanakan untuk mengantisipasi keperluan di masa mendatang (Subandriyo dan Setiadi, 2003).

Sapi asli Indonesia secara genetik dan fenotipik umumnya merupakan: (1) turunan dari Banteng (*Bos javanicus*) yang telah didomestikasi dan dapat pula (2) berasal dari hasil silangan sapi asli Indonesia dengan sapi eksotik yang kemudian mengalami domestikasi serta adaptasi

lokal. Kelompok sapi yang termasuk dalam kategori pertama adalah sapi Bali karena sapi Bali diketahui merupakan hasil domestikasi langsung dari Banteng (MacHugh, 1996; Martojo, 2003; Hardjosubroto, 2004) dan mempunyai ciri-ciri fisik yang hanya mengalami perubahan kecil dibandingkan dengan moyangnya (Handiwirawan dan Subandriyo, 2004). Kelompok sapi yang kedua adalah sapi Madura karena menurut Payne dan Rollinson (1976); Nijman *et al.*, (2003); Verkaar *et al.*, (2003) merupakan hasil silangan Banteng atau sapi Bali dengan sapi zebu yang telah berlangsung kurang lebih 1.500 tahun yang lalu, walaupun hal tersebut tidak terdokumentasi dengan baik secara prinsip pemuliaan (tanpa *recording* yang jelas).

Lembaran negara (*staatblad*) nomor 226 tahun 1923, nomor 1465 tahun 1925, nomor 368 tahun 1927, nomor 57 tahun 1934, nomor 115 tahun 1937 dan secara tersirat terdapat dalam UU nomor 6 tahun 1967 menetapkan sapi Madura merupakan plasma nutfah yang dilindungi dan dipertahankan kemurniannya di Pulau Madura. Namun berdasarkan acuan terbaru yaitu (1) keputusan Menteri Pertanian nomor: 208/Kpts/ DT210/4/2001, tanggal 4 April 2001 tentang Pedoman Pembibitan Ternak Nasional; (2) arahan Direktur Pembibitan dan Direktur Jenderal Bina Produksi Peternakan tentang Persilangan sapi Madura di Pulau Madura; dan (3) pengajuan *Legal Opinion* untuk menyiasati UU atau *Staatblad* tersebut, telah dilakukan perkawinan silang antara sapi Madura betina dengan pejantan unggul sapi bangsa lain (sapi *exotic*). Persilangan ini akan memiliki konsekuensi bahwa pelestarian plasma nutfah sapi Madura di pulau Madura sudah tidak berlaku lagi, kecuali di pulau Sapudi (kawasan terisolir yang dikonsentrasikan sebagai wilayah pemurnian plasma nutfah dengan kapasitas \pm 5000 ekor sapi (Kutsiyah, 2012).

Eksplotasi sapi Madura melalui persilangan yang semakin luas dan tidak terkontrol dengan bangsa sapi eksotik akan memberikan dampak yang kurang baik terhadap sapi-sapi Madura yang telah teradaptasi pada lingkungan setempat. Kekhawatiran ini telah terjadi pada sapi asli di Lithuania (Eropa Timur) yang terancam punah (Malevičiūtė *et al.*, 2002) akibat persilangan yang disengaja tetapi tidak terstruktur. Bahkan beberapa sapi asli di negara India telah punah sebelum sapi ini diidentifikasi dan dimanfaatkan akibat persilangan yang meluas dan tidak terkontrol (Sodhi *et al.*, 2006). Hal demikian ini juga ditegaskan oleh FAO (2000) bahwa, sumber daya genetik ternak asli akan cenderung punah akibat permintaan pasar yang baru (eksploitasi besar-besaran), persilangan yang tidak terkontrol, pergantian *breed* (penggantian bangsa sapi yang sudah ada dengan bangsa sapi baru) dan kegiatan mekanisasi pertanian (penggantian penggunaan tenaga sapi dengan tenaga mesin untuk mengolah lahan pertanian).

Oleh karenanya, studi genetik sapi madura yang ada di Madura menjadi menarik dikarenakan variasi genetiknya yang cukup besar. Hal ini penting terkait dengan usaha perbaikan sifat maupun menjaga karakter genetiknya sehingga ternak lokal ini tidak semakin menurun kualitas genetiknya bahkan punah dari negeri Indonesia.

Pengkajian keragaman genetik melalui penandaan molekuler menggunakan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) baik pada DNA inti dan DNA mitokondria (mtDNA) akan didapatkan hasil yang dapat mengungkapkan perbedaan dengan lebih teliti dalam membedakan intra dan interspesies yang menyangkut tentang struktur, komposisi, dan organisasi genom pada tingkat DNA (Duryadi, 1994).

Manfaat penggunaan mtDNA menurut Duryadi (1994) antara lain (1) Sebagai marka genetik dalam studi variabilitas intraspesifik (interpopulasi) yang dapat memberikan informasi secara kualitatif maupun kuantitatif; (2) Dapat digunakan untuk melacak kejadian yang relatif baru seperti studi hibridisasi alami antara dua subspecies; (3) Dapat digunakan untuk suatu rekonstruksi historik dari genealogi matrilineer suatu spesies maupun antar populasi yang ada; (4) Dapat merekonstruksi filogenik dari beberapa spesies yang saling berdekatan.

Di dalam genom mitokondria terdapat fragmen-fragmen penyandi protein dan yang bukan penyandi protein. Fragmen-fragmen penyandi protein antara lain *Cytochrome Oxidase* unit I (COX I), *Cytochrome Oxidase* unit II (COX II), *Cytochrome Oxidase* unit III (COX III), dan *Cytochrome b* (*Cyt. b*). Bagian-bagian ini banyak digunakan untuk penelitian mengenai hubungan spesies dari genus atau famili yang sama, sedangkan fragmen bukan penyandi protein di dalam mitokondria yang sering dipakai dalam mengkaji keragaman genetik dan hubungan kekerabatan di antara spesies adalah daerah *Displacement loop* (D-loop). Daerah D-loop menarik untuk dikaji karena dua dari ketiga domainnya yaitu *Hypervariable Segments 1* (HVS-I) dan HVS-II memiliki mutasi yang tinggi sehingga perubahan runutan basa-basa nukleotidanya terjadi tidak saja pada tingkatan interspesies tetapi juga pada tingkatan intraspesies. Pengkajian daerah *D-loop* banyak digunakan untuk penelitian biologi populasi dan evolusi hewan (Widayanti, 2006)

Penelitian ini menggunakan fragmen daerah D-loop sapi Madura untuk mendapatkan data keragaman genetik sehingga dapat mengetahui susunan nukleotida antar individu sapi Madura dan mengidentifikasi penampakan fenotifnya. Data tersebut dapat digunakan untuk

mengidentifikasi kemurnian genetik dari sapi Madura yang ada pada daerah pulau Sapudi, Sumenep, Pamekasan, Pamekasan, Sampang, Bangkalan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Sapi

Penggolongan sapi ke dalam suatu bangsa (*breed*) sapi, didasarkan atas sekumpulan persamaan karakteristik tertentu yang sama. Atas dasar karakteristik tersebut, mereka dapat dibedakan dari ternak lainnya meskipun masih dalam spesies yang sama. Karakteristik yang dimiliki tersebut akan diturunkan ke generasi berikutnya. Menurut Blakely dan Bade (1992) bangsa sapi mempunyai klasifikasi taksonomi sebagai berikut :

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

2.2 Tinjauan umum sapi Madura

Pada awal domestikasi, sapi diternakkan manusia untuk dimanfaatkan tenaganya guna membantu di bidang pertanian dan transportasi. Sapi juga digunakan masyarakat sebagai perlambang status sosial dan komoditi perdagangan. Sebagai hewan ternak, sapi juga dimanfaatkan sebagai sumber protein hewani.

Sapi domestik yang berkembang saat ini merupakan hasil domestikasi dari *Bos primigenius*. Leluhur sapi tersebut punah ± 2000 tahun yang lalu. Terdapat dua tipe utama sapi domestik yang berasal dari *B. Primigenius*, yaitu jenis kelompok sapi taurin (*B. taurus*) dan zebu (*B. indicus*). Zebu merupakan sapi berpunuk (*humped*) yang tersebar di Asia bagian selatan dan Afrika. Jenis

sapi zebu masuk ke wilayah Asia dibawa oleh pengembara Verdic Aryan dari Irak menuju India. Berbeda dengan sapi zebu, sapi taurin merupakan sapi tanpa punuk (*humpless*) yang berkembang di wilayah Eropa, Asia Tengah, Afrika Barat dan Amerika (Williamson & Payne, 1965; Payne & Wilson, 1999).

Keragaman sapi lokal Indonesia merupakan hasil persilangan dari sapi zebu, taurin dan banteng (Rouse, 1972). Domestikasi banteng yang merupakan nenek moyang sapi bali telah dimulai sejak sekitar 3500 SM (Lenstra & Bradley, 1999). Menurut Uggla (2008) sebagian besar sapi lokal Indonesia berasal dari jenis sapi zebu dan sepertiganya berasal dari sapi bali.

Sapi zebu diperkirakan masuk ke Indonesia sekitar abad ke-2 M, bersamaan dengan masuknya kebudayaan Hindu ke wilayah ini (Payne & Hodges, 1997). Pada masa penjajahan Belanda, tahun 1806 – 1897 Kontrolir Rothenbuhler Surabaya melaporkan bahwa pedagang ternak di Jawa Timur telah mendatangkan sapi pejantan zebu jenis Mysore, Ongol, Hissar, Gujarat dan Gir dari India untuk dipersilangkan dengan sapi Jawa dan Madura. Tahun 1891 – 1921 di daerah Pasuruan Jawa Timur telah dilakukan usaha persilangan sapi Jawa dengan sapi madura oleh kontrolir Van Andel. Program persilangan tersebut dihentikan karena kurang memenuhi harapan para petani terhadap kerja ternak. Pada tahun 1957 dilakukan perbaikan mutu genetik sapi madura dengan jalan menyilangkannya dengan sapi Red Danis (Utoyo *et al.*, 1996; Hardjosubroto, 2004).

Sapi madura merupakan salah satu jenis sapi lokal Indonesia yang berkembang di pulau Madura serta pulau-pulau sekitarnya. Secara morfologi, sapi madura memiliki karakter hampir sama dengan sapi bali kecuali ukuran tubuh dan tanduknya yang lebih kecil. Warna kulit pada sapi madura jantan dan betina lebih coklat dari sapi bali, kaki bagian bawah sampai lutut dan sebagian bokongnya berwarna putih (Rouse, 1972). Selain itu, sapi madura lebih tahan terhadap cuaca panas, efisien terhadap makanan, memiliki kualitas daging yang baik, dan lebih resisten terhadap parasit (Payne & Hodges, 1997).

Kepastian asal domestikasi sapi Madura hingga saat ini masih belum diketahui. Masih terdapat perbedaan pada beberapa hasil penelitian mengenai asal usul sapi madura. Menurut Rouse (1972) sapi madura merupakan persilangan antara jenis sapi zebu dan banteng atau sapi bali. Litelatur lain menyatakan bahwa sapi madura merupakan hasil persilangan antara sapi bali dan sapi jawa, dimana sapi jawa sendiri merupakan hibrid dari zebu, taurin, dan banteng (Payne & Hodges, 1997). Penelitian Nijman *et al.*, (2003) dengan menggunakan penanda mikrosatelit

mengungkapkan bahwa sapi madura merupakan hasil persilangan antara banteng dan zebu atau taurin dan zebu. Penelitian dengan penanda mtDNA yang telah dilakukan oleh Uggla (2008) dan Firdhausi (2010) menunjukkan bahwa terdapat dua tipe maternal origin sapi madura yaitu banteng dan zebu. Sedangkan dengan penanda gen SRY pada kromosom Y paternal sapi madura diperkirakan adalah banteng (Verkaar *et al.*, 2003) atau sapi taurin (Kusdiantoro *et al.*, 2009).

Sapi madura merupakan sapi lokal yang dianggap sebagai salah satu kekayaan plasma nutfah Indonesia. Beberapa Undang = undang diberlakukan sebagai upaya untuk menjaga kemurniannya. Salah satu peraturan tentang pelestarian sapi madura yang dikeluarkan sejak zaman kolonial Belanda adalah staatsblad (lembaran negara) No. 226/1923, No. 57/1934, dan No. 115/1937. Pasca kemerdekaan, pasal 13a Undang-undang No. 6/1967, telah menetapkan pokok-pokok peternakan dan kesehatan hewan, sebagai upaya untuk mempertahankan populasi, menjaga bentuk, warna kulit, serta meningkatkan kualitas produksi sapi madura (Utoyo *et al.*, 1996).



Gambar 2.1 Sapi Madura

Sumber : Direktorat Jenderal Peternakan, (2012)

2.3 Pelestarian Sumber Daya Genetik Ternak

Food and Agriculture Organization(FAO) memprediksi bahwa paling sedikit satu bangsa ternak tradisional punah setiap minggu dan lebih dari 30% ternak di Eropa sekarang ini diperkirakan dalam keadaan terancam kepunahan (FAO, 1995). Banyak bangsa ternak tradisional sudah menghilang karena para petani lebih fokus pada bangsa sapi baru. Sekitar 16% dari bangsa

sapi tradisional telah punah dan kurang dari 15 % bersifat jarang (FAO, 2000). Keadaan ini dapat dilihat pada bangsa-bangsa sapi zebu di India yang secara signifikan telah kehilangan ekonomi yang sangat penting dan penurunan ukuran populasi terutama karena persilangan secara meluas (Sodhi *et al.*, 2006). Semakin berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi pemuliaan ternak, bioteknologi, permintaan pasar, mekanisasi pertanian dan produksi ternak, akan mendorong eksploitasi ternak melalui persilangan, penggantian *breed* baru (Subandriyo dan Setiadi 2003; Sodhi *et al.*, 2006), maupun pengurusan *stock* secara berlebihan, dan pada gilirannya akan mengancam keragaman genetik ternak. Di lain pihak pelestarian keragaman genetik ternak akan selalu diperlukan dalam pemuliaan di masa mendatang, karena tanpa adanya keragaman genetik, pemuliaan ternak tidak mungkin dilaksanakan untuk mengantisipasi keperluan di masa mendatang (Subandriyo dan Setiadi, 2003).

Melalui literatur diketahui bahwa sudah sejak lama, ternak asli mempunyai suatu arti penting yang sangat tinggi di dalam kegiatan pertanian dan kehidupan sosial dari masyarakat pedesaan. Diketahui pula bahwa bangsa-bangsa sapi lokal yang dipelihara petani di dalam areal pertanian menjadi titik rujukan dari tradisi-tradisi lokal pada masa lalu, yang berhubungan dengan produksi pertanian dan sektor-sektor lain, seperti makanan (Malevičiūtė *et al.*, 2002).

Pelestarian terhadap sumber daya genetik ternak lokal sebagai bagian dari komponen keanekaragaman hayati adalah penting untuk memenuhi kebutuhan pangan, pertanian dan perkembangan sosial masyarakat di masa yang akan datang. Ada beberapa alasan untuk ini, antara lain (1) lebih dari 60 persen dari bangsa-bangsa ternak di dunia berada di negara-negara sedang berkembang; (2) konservasi bangsa ternak lokal tidak menarik bagi petani; (3) secara umum tidak ada program monitoring yang sistematis dan tidak tersedianya informasi deskriptif dasar sebagian besar sumber daya genetik hewan ternak; serta (4) sedikit sekali bangsa-bangsa ternak asli yang telah digunakan dan dikembangkan secara aktif (FAO, 2001).

Kesadaran dari pentingnya memelihara sumber daya genetik hewan sudah meningkat dalam beberapa tahun terakhir. Banyak negara Eropa mempunyai atau sedang mengembangkan program-program nasional untuk pemeliharaan dan konservasi keanekaragaman hayati hewan (Malevičiūtė *et al.*, 2002).

Ada tiga metode utama program pelestarian plasma nutfah ternak yang telah dilaksanakan masyarakat atau pemulia: (1) mempertahankan populasi ternak hidup, (2) penyimpanan beku materi genetik berupa haploid (n) seperti gamet yakni semen dan *oocyte* atau berupa diploid ($2n$)

seperti embrio, dan (3) penyimpanan DNA (*deoxyribonucleic acid*). Metode bioteknologi dapat digunakan untuk mengkarakterisasi gen-gen ternak dan plasma nutfah suatu populasi. Metode ini akan membantu dalam pembuatan keputusan tentang pelestarian plasma nutfah yang unik. Studi mengenai struktur dan fungsi gen-gen pada tingkat molekuler suatu populasi ternak dapat membantu menentukan kesamaan material genetik yang dibawa oleh dua atau lebih populasi dan keragaman genetik dalam populasi ternak yang diamati. Identifikasi gen-gen dari individu ternak akan membantu program pemuliaan (genetik) ternak, yang membedakan dari penampilan (fenotipe) yang tampak, yang dapat menentukan proses pemilihan tetua untuk generasi yang akan datang (seleksi buatan). Jika gen-gen untuk sifat produksi dapat diidentifikasi, ternak-ternak tersebut dapat diseleksi walaupun tidak diekspresikan oleh individu ternak yang bersangkutan. Sebagai alternatif, jika mereka dapat diikatkan dengan gen-gen yang diketahui lokasinya dalam kromosom (marker lokus-lokusi), seleksi dapat dilaksanakan berdasarkan acuan tersebut (Subandriyo dan Setiadi, 2003).

Negara Indonesia mempunyai undang-undang dan peraturan menteri pertanian menyangkut pelestarian sumber daya genetik ternak yaitu Undang- Undang Republik Indonesia Nomor 5 tahun 1990 tentang Konservasi Sumber Daya Alam Hayati dan Ekosistemnya dan Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 5 tahun 1994 tentang Pengesahan Konvensi Perserikatan Bangsa- Bangsa Mengenai Keanekaragaman Hayati serta Peraturan Menteri Pertanian Nomor 35/Permentan/OT.140/8/2006 tentang Pedoman Pelestarian dan Pemanfaatan Sumberdaya Genetik Ternak dan Peraturan Menteri Pertanian Nomor 36/Permentan/OT.140/8/2006 tentang Sistem Pembibitan Ternak Nasional.

2.4. Keragaman Genetik Ternak

Keragaman genetik terjadi tidak hanya antarbangsa tetapi juga di dalam satu bangsa yang sama, antarpopulasi maupun di dalam populasi, atau di antara individu dalam populasi. Pada spesies domestik suatu identifikasi tingkat keragaman, terutama pada lokus-lokus yang mempunyai sifat bernilai penting mempunyai keterkaitan dengan seleksi dalam program pemuliaan (Handiwirawan dan Subandriyo, 2004). Salah satu 'alat bantu' yang dapat digunakan untuk mendeteksi keragaman populasi adalah DNA mitokondria (Muladno, 2006).

Keragaman genetik dalam populasi merupakan modal dasar aplikasi teknologi pemuliaan dalam pemanfaatan hewan. Keragaman genetik populasi yang digambarkan dalam keragaman

penampilan hewan adalah refleksi informasi genetik yang dimilikinya. Sebagai ilustrasi sapi Bali yang hidup di pulau Bali memiliki kontruksi gen-gen yang berbeda dengan populasi sapi pesisir yang ada di Sumatera Barat. Perbedaan-perbedaan tersebut dapat dinyatakan dalam kemampuan adaptasi, besarnya tubuh, dan ketahanan penyakit. Komponen ini sangat berpengaruh terhadap kemampuan menyesuaikan diri (adaptasi) terhadap perubahan lingkungan seperti degradasi kualitas lingkungan sebagai media tumbuh hewan. Perbedaan penampilan ini disebabkan selama domestifikasi, tipe-tipe atau bangsa-bangsa hewan terpisah secara genetic karena adanya penyesuaian (adaptasi) dengan masing-masing lingkungan local dan kebutuhan komunitas lokal sehingga dihasilkan bangsa berbeda (Muladno, 2006). Adanya kemampuan adaptasi hewan disebabkan hewan memiliki kemampuan menghasilkan lebih dari satu alternatif bentuk morfologi, status fisiologi, dan atau tingkah laku sebagai reaksi terhadap perubahan lingkungan (pengaturan ekspresi gen) (Noor, 2008).

Lebih dari 12.000 tahun yang lalu terdapat 14 spesies ternak telah didomestikasikan dan berevolusi sehingga menjadi rumpun (*breed*) yang secara genetika unik dan berbeda, beradaptasi terhadap lingkungan dan komunitas setempat. Saat ini terdapat sekitar 6.000-7.000 rumpun ternak domestik dari spesies yang telah terdomestikasi, bersama dengan lebih dari 80 spesies kerabat liarnya yang merupakan sumber daya genetik ternak di bumi ini yang berperanan penting untuk pangan dan produksi pertanian (Subandriyo dan Setiadi, 2003).

Beja-Pereira *et al.* (2006) menyatakan bahwa, penjinakan sapi (*Bos Taurus dan Bos indicus*) dari aurochsen liar (*Bos primigenius*) adalah satu yang penting dalam sejarah manusia, mendorong ke arah modifikasi-modifikasi pangan yang meluas, tingkah laku dan struktur sosial ekonomi dari banyak populasi: (1) proses ini dimulai sekitar 11.000 tahun yang lalu; (2) penyimpangan genetik yang besar antara bangsa-bangsa sapi taurine (*Bos taurus*) dan zebu (*Bos indicus*), minimal dua titik penjinakan bangsa sapi tersebut yang secara sendiri-sendiri dan merupakan kejadian dari dua kelompok aurochsen yang jelas terpisah; (3). Data arkeologis menyatakan bahwa penjinakan sapi zebu terjadi mungkin di Indus Valley (sekarang Pakistan); (4) dengan suatu difusi utama bangsa-bangsa sapi ini di India dan hanya yang terakhir (<3.000 tahun) pengenalan sebagai jantan sekunder di Afrika; dan (5) sebaliknya, lokasi penjinakan yang hampir bisadipastikan untuk bangsa-bangsa taurine dipertimbangkan yaitu di suatu areal paling barat di Near East, Fertile Crescent (FC), meskipun suatu peristiwa penjinakan yang berdiri sendiri mungkin telah terjadi di Afrika.

Berbagai bangsa ternak yang telah berkembang dalam berbagai system dan lingkungan yang ada saat ini telah menghasilkan berbagai kombinasi gen yang unik. Gen-gen ini tidak hanya menentukan kualitas sifat produksi dari masing-masing bangsa, tetapi juga terhadap kemampuan adaptasinya pada kondisi lokal termasuk makanan, ketersediaan air, iklim dan hama penyakit (FAO, 2001). Berbagai macam kebutuhan manusia sehari-hari dipenuhi dari spesies ternak, dalam bentuk pangan maupun kebutuhan lainnya. Namun hanya sebagian kecil dari total keragaman genetik ternak dan kerabat liarnya, yakni sekitar 40 spesies yang memenuhi sebagian besar proporsi dari produksi ternak global. Keragaman genetik di dalam spesies ternak dan beberapa kerabat liarnya telah menjadi sumber keragaman dari rumpun dan populasi ternak. Keragaman genetik ini penting dalam pembentukan rumpun ternak modern dan akan terus berkelanjutan di masa mendatang (Subandriyo dan Setiadi 2003).

Sebagai contoh, negara Lithuania memiliki dua bangsa sapi utama yaitu Lithuanian Black dan White dan Lithuanian Red, masing-masing 62% dan 32% dari populasi ternak dalam negeri. Bangsa ternak Lithuanian Black dan White ditemukan di Barat Daya Lithuania dan dikembangkan dari sapi lokal Lithuania berwarna putih dan hitam melalui persilangan sesama dengan bangsa sapi hitam dan putih Holstein-Friesian dari Belanda dan bangsa sapi hitam dan putih dari Jerman. Bangsa sapi Lithuanian Black dan Black sebagai bangsa sapi perah yang menghasilkan susu berkualitas dan telah teradaptasi dengan iklim di tempatnya. Bangsa sapi Lithuanian Red ditemukan di Timur Laut Lithuania dan dibentuk pada awal abad ini dari bangsa Lithuanian Red lokal melalui assortativemating, seleksi masal dan persilangan dengan bangsa-bangsa: Ayrshire, Angeln, Dutch, Danish Red, Swiss Brown dan Shorthorn. Bangsa-bangsa sapi unggul dipilih karena produksi susu. Umumnya ternak-ternak tersebut jelas sebagai tipe bangsa sapi perah (FAO, 2000). Di Barat Daya, bagian Tenggara dan sebagian Lithuania bagian Tengah, sapi Lithuania paling asli yaitu memiliki warna tubuh putih atau abu-abu terang. Dalam beberapa dekade terakhir, sapi Lithuania yang asli, seperti Lithuanian Light Grey dan Lithuanian White, hampir seluruhnya digantikan oleh Lithuanian Black dan White dan Lithuanian Red yang merupakan sapi produksi tinggi. Hal ini diketahui bahwa sapi Lithuanian Light Grey dan Lithuanian White-Backed dipelihara di Lithuania mulai zaman lampau dan dikhususkan untuk negara. Sekarang ini, Lithuanian White-Backed, Lithuanian Grey dan bangsa sapi Lithuanian Black dan White tua populasinya sangat kecil dan mempunyai status dari suatu bangsa sapi yang terancam kepunahan (Malevičiūtė *et al.*, 2002).

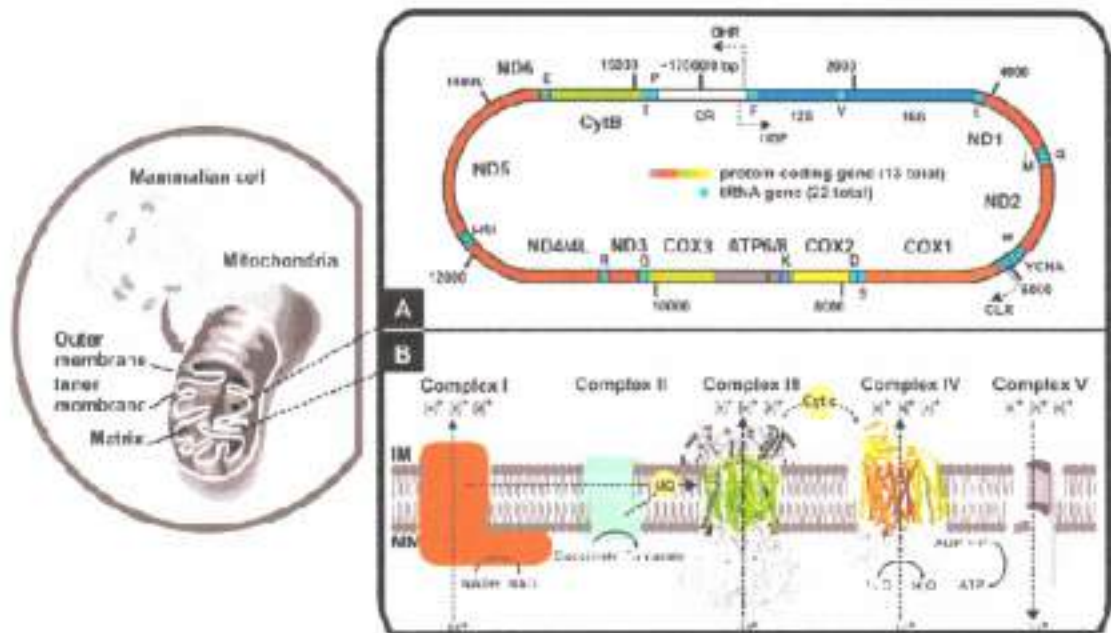
Keanekaragaman genetik ternak, sedikitnya memiliki empat manfaat, yaitu (1) keberlanjutan dan peningkatan produksi pangan; (2) memaksimalkan produktivitas lahan dan sumber daya pertanian; (3) pencapaian pertanian berkelanjutan untuk memberikan keuntungan masa kini dan generasi yang akan datang; (4) pemenuhan keanekaragaman baik yang telah maupun yang belum diketahui manfaatnya bagi kehidupan sosial masyarakat. Ketersediaan keanekaragaman genetik ternak, termasuk sapi akan mempengaruhi keberhasilan strategi pemuliaan untuk masa yang akan datang (FAO-AAAS, 1994).

2.5 DNA Mitokondria

Mitokondria merupakan organel sel penghasil energi yang terdapat dalam sitoplasma. DNA mitokondria (mtDNA) memiliki sejumlah sifat genetik khas yang membedakannya dari genom inti. Genom mitokondria berbentuk sirkuler, beruntai ganda, memiliki panjang sekitar 16.5 kb yang mengandung basa *guanine* (G) dan *cytosine* (C) berkisar antara 32-45.6%. Kedua basa tersebut menyebar tidak merata diantara kedua untai DNA. Distribusi asimetris nukleotida menimbulkan *heavy strand* (untai berat) dan *light strand* (untai ringan) ketika molekul mtDNA dipisahkan dalam gradien basa CsCl. *Heavy strand* atau untai H berisi lebih banyak nukleotida *guanin* (G) yang mempunyai berat molekul terbesar diantara keempat nukleotida, sedangkan *Light strand* atau untai L berisi lebih sedikit basa G (Butler, 2005).

Berdasarkan jenis gennya, genom mitokondria dibagi menjadi dua bagian, yaitu daerah penyandi (*coding region*) dan daerah bukan penyandi (*non coding region*). Daerah penyandi terdiri dari 37 gen yaitu 13 gen penyandi protein yang berperan penting di dalam transport elektron dan fosforilasi oksidatif, dua gen penyandi rRNA (*ribosomal Ribonucleic Acid*), dan 22 gen penyandi tRNA (*transfer RNA*). Gen tersebar secara asimetris pada kedua untai DNA. Untai berat mtDNA mengandung 28 gen yaitu dua gen penyandi rRNA (12S rRNA dan 16S rRNA), 12 gen penyandi protein yang terdiri dari enam NADH Dehidrogenase (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5), *Cytochrome c Oxydase* (COX1, COX2, COX3), sebuah *Cytochrome b* (*Cyt. b*), dua ATPase (ATP6, ATP8), dan 14 gen penyandi tRNA yang terdiri dari fenilalanin ($tRNA^{Phe}$), leusin ($tRNA^{Leu}$), valin ($tRNA^{Val,Leu}$), isoleusin ($tRNA^{Ile}$), metionin ($tRNA^{Met}$), triptofan ($tRNA^{Trp}$), asam aspartat ($tRNA^{Asp}$), lisin ($tRNA^{Lys}$), glisin ($tRNA^{Gly}$), arginin ($tRNA^{Arg}$), histidin ($tRNA^{His}$), serin ($tRNA^{Ser}$), leusin ($tRNA^{Leu}$), dan treonin ($tRNA^{Thr}$). Sedangkan untai ringan mtDNA mengandung sisanya (sembilan gen) yaitu, satu gen penyandi protein yaitu NADH Dehidrogenase 6 (ND6) dan delapan gen penyandi

tRNA yang terdiri dari asam glutamat (tRNA^{Glu}), prolin (tRNA^{Pro}), serin (tRNA^{Ser}), tirosin (tRNA^{Tyr}), sistin (tRNA^{Cys}), asparagin (tRNA^{Asn}), alanin (tRNA^{Ala}), dan glutamin (tRNA^{Gln}) (Reyes *et al.* 1998). Daerah bukan penyandi genom mitokondria hanya terdiri dari daerah kontrol (*control region*) atau d-loop (*displacement loop*) (Taylor & Turnbull, 2005). Susunan genom mitokondria disajikan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Peta genetik DNA mitokondria pada mamalia
(da Fonseca *et al.*, 2008)

Replikasi mtDNA dimulai dengan untai-H yang terdapat dalam daerah D-loop mitokondria. Sebanyak 28 produk gen dikodekan dari untai-H, sedangkan untai-L mentranskripsi delapan RNA transfer (tRNA) dan enzim yang disebut ND6.

Jumlah molekul DNA mitokondria dalam sel sangat bervariasi. Rata-rata terdapat 4-5 salinan molekul mtDNA per mitokondria. Setiap sel dapat berisi ratusan mitokondria yang secara matematis bisa sampai beberapa ribu molekul mtDNA dalam setiap sel seperti dalam sel telur (ovum), namun rata-rata diperkirakan terdapat sekitar 500 mtDNA dalam setiap sel. Hal tersebut menjadikan keberhasilan isolasi mtDNA lebih besar (relatif terhadap penanda DNA nukleus) pada sampel biologis yang mungkin telah rusak karena panas atau kelembaban. Perbandingan karakteristik dasar DNA inti dan DNA mitokondria disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Karakteristik DNA inti dan DNA mitokondria

Karakteristik	DNA inti	DNA mitokondria
Ukurangenom	~ 3,2 milyarpb	~ 16.569 pb
Diturunkandari	Ibudanbapak	Ibu
Total DNA/sel	99.75%	0.25%
Struktur	Linier; dikemasdalamkromosom	Sirkuler
Pasangankromosom	Diploid	Haploid
Rekombinasigenerasi	Ya	Tidak
Lajumutasi	Rendah	± 5-10 kali lipatdari DNA inti

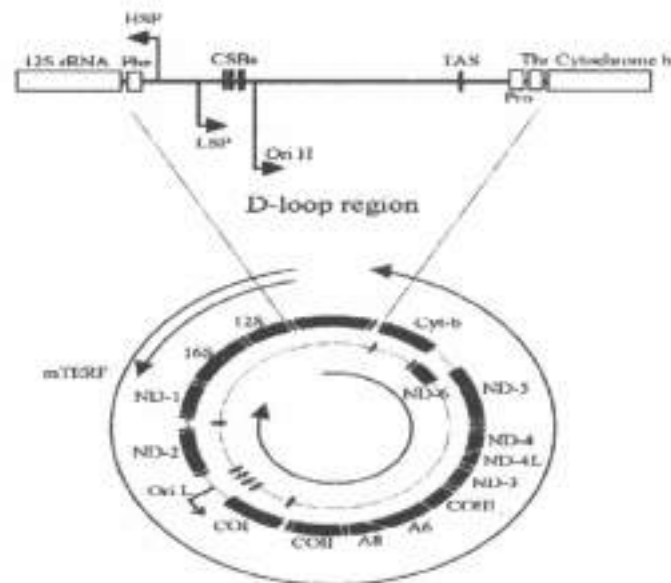
Sumber : Butler (2005)

DNA mitokondria ditinjau dari ukuran, jumlah gen dan bentuk yaitu memiliki laju mutasi yang lebih tinggi, sekitar 5-10 kali DNA nukleus, DNA mitokondria terdapat dalam jumlah banyak (lebih dari 1000 kopi) dalam tiap sel, sedangkan DNA nukleus hanya berjumlah dua kopi. DNA nukleus merupakan hasil rekombinasi DNA pejantandanindukan, sementara DNA mitokondria hanya diwariskan dari induk atau *maternally inherited* (Butler, 2005). DNA mitokondria pada sel anak seluruhnya disumbangkan oleh induk dan sperma sama sekali tidak berkontribusi. Keunikan sistem penurunan yang menarik ini telah dimanfaatkan dalam berbagai bidang yaitu penentuan hubungan kekerabatan, studi evolusi dan migrasi, bidang forensik dan identifikasi penyakit genetik.

2.6 Gen Displacement Loop (D-Loop)

Daerah bukan penyandi (*non coding region*) yaitu D-loop merupakan genom yang tidak membawa urutan informasi untuk pembentukan protein maupun RNA, namun daerah ini merupakan situs replikasi dari mtDNA secara umum. D-loop merupakan bagian dari mtDNA yang sangat variatif dalam substitusi nukleotida, insersi atau delesi (indel) dan memiliki VNTRs (*Variable Number Tandem Repeat*) yang dinamis yang terletak pada bagian yang hipervariatif dan domain yang khusus (Fumagalli *et al.*, 1996). Daerah *D-loop* dibagi menjadi tiga domain yaitu, CSB (*Conserved Sequence Block*) dan HVS-II. Domain I yang berbatasan dengan tRNA^{Pro}, terdiri dari runutan yang diasosiasikan dengan *Termination of H-strand Replication* (TAS) yang sering mengandung VNTRs (R1 repeats). Domain II yang terdapat di bagian sentral dan bersifat kekal, terdapat daerah *Conserved Sequence Block* (CSB B, C, D, E dan F). Domain III yang berbatasan dengan tRNA^{Phe}, terdiri dari runutan yang variabilitasnya tinggi karena substitusi nukleotida, insersi dan delesi (indels) serta VNTRs (R2 repeat) dan runutan nukleotida bersifat kekal yang merupakan promotor untuk transkripsi untai berat (*heavy strand*) dan untai ringan (*light strand*) (Sbisa *et al.*, 1997).

Tingginya angka dari polimorfisme nukleotida atau adanya perbedaan runutan pada kedua bagian hipervariabel dari *non coding region* digunakan untuk membedakan di antara individu suatu spesies (Melton, 1999). Selain itu analisis daerah D-loop digunakan juga untuk melihat keragaman antar subspecies ataupun antar populasi (Brown, 1986). Daerah D-loop diketahui sangat cepat berkembang dibandingkan dengan bagian mtDNA lainnya. Hal ini karena terjadinya akumulasi substitusi basa, proses insersi dan delesi yang lajunya amat cepat bila dibandingkan dengan DNA inti (Foran *et al.*, 1988).



Gambar 2.3 Skema DNA Mitokondria Daerah *D-loop*

Sumber : Selwood *et al.*, (2000)

2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) adalah suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesa molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA tersebut dengan enzim polimerase dan oligonukleotida pendek sebagai primer. Metode ini berjalan secara enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu (Buzdin & Lukyanov, 2007).

Target PCR yaitu asam nukleat (DNA) untai ganda yang diekstraksi dari sel dan terdenaturasi menjadi asam nukleat beruntai tunggal. Komponen reaksi PCR terdiri atas pasangan primer berupa oligonukleotida spesifik untuk target gen yang dipilih, enzim (umumnya *Taq polymerase*, enzim *thermostable* dan *thermoactive* yang berasal dari *Thermus aquaticus*) dan *trifosfat deoxynucleoside* (dNTP) digunakan untuk amplifikasi target gen secara eksponensial dengan hasil replikasi ganda dari target awal. Reaksi ini dilakukan dalam suatu mesin pemanas yang diprogram secara otomatis disebut *thermocycler*. Mesin tersebut menyediakan kondisi termal yang diperlukan untuk proses amplifikasi (Nollet & Toldrá, 2011).

Proses yang terjadi dalam mesin PCR meliputi tiga tahap utama yaitu denaturasi (pemisahan untai ganda DNA), *annealing* (penempelan primer) dan ekstensi (pemanjangan primer). Proses yang dimulai dari denaturasi, penempelan dan ekstensi disebut sebagai satu

siklus. Produk PCR dapat langsung divisualisasikan melalui proses elektroforesis dan digunakan untuk analisis lebih lanjut (Weissensteiner *et al.*,2004). Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel yang diwarnai dengan bromida dan divisualisasikan dengan sinar ultraviolet (Nollet & Toldrá, 2011).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan fenotip dan genotip sapi Madura yang berasal dari pulau Sapudi, Sumenep, Pamekasan, Pamekasan, Sampang, Bangkalan dengan cara analisis PCR-FRLP pada mtDNA daerah *Displacement loop* (D-loop) untuk memperoleh kemurnian *breed* sapi Madura.

3.2. Manfaat Penelitian

1. Dapat memberi informasi keragaman fenotif dan genotif sapi Madura yang berasal dari pulau, Sapudi, Sumenep, Pamekasan, Pamekasan, Sampang, Bangkalan.
2. Karakteristik sumber daya genetik sapi Madura sebagai pedoman dalam menerapkan kebijakan dalam program pelestarian plasma nuftah, pengembangan dan pemanfaatannya secara berkelanjutan.

3.3. Luaran

Penelitian ini diharapkan dapat dipublikasikan pada Jurnal Ilmiah Nasional

BAB IV MATERI DAN METODE

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian Deskriptif.

3.2 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan sapi Madura di lima lokasi di pulau Madura yang meliputi pulau Sapudi, Sumenep, Pamekasan, Sampang dan Bangkalan. Sebanyak 4 sampel darah sapi Madura diambil dari masing-masing lokasi, sehingga keseluruhan sampel 20 ekor.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah Sapi Madura, sedangkan variable terikatnya adalah *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP).

3.4 Bahan Penelitian

3.4.1 Sampel

DNA genom sapi diisolasi dari sel darah utuh (*whole blood*). Sampel darah sebanyak 5 ml diambil individu sapi Madura secara *venepuncture*, menggunakan 10 ml tabung *venoject* yang berisi larutan EDTA 10 %.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel darah sapi Madura sebanyak 20 ekor, *Wizard Genomic DNA Purification Kit* dari Promega (*cell lysis solution, nuclei lysis solution, protein precipitation solution, RNAase, DNA rehydration solution*), isopropanol, 70 % etanol, *PCR Core System 1* dari Promega ($MgCl_2$, 10 X *buffer reaction TaqDNA polymerase, PCR nucleotida mix, TaqDNA polymerase*), enzim restriksi *Hind III* dari Gibco BRL, agarosa dari Promega, 1X *tris acetic acid EDTA* (TAE), *ethidium bromida*, aquades steril, primer D-Loopy yang terdiri dari primer DL-F: 5' TTCTTCAGGGCCATCTCATC-3' dan primer DL-R: 5' GCATCTTGAGCACCAGCA TA-3', *blue loading dye*, kertas tisu, parafilm, Kristal es, *ultra pure water* dari Biotech, 50-2000 bp *marker* dari Bio Rad.

4.4.3 Agarose Gel Electrophoresis

Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat *agarose gel* 1,5% diantaranya larutan 0,5 x TBE (Tris-Borat EDTA) 30 ml, serbuk agarose 0,45 gram, EtBr 2,5 μ l. Bahan-bahan lainnya yang dibutuhkan dalam elektroforesis menggunakan *gel* agarose adalah sampel DNA hasil PCR, *loading dye* (0,01% Xylene Cyanol, 0,01% Bromtimol Blue, 50% gliserol), dan *marker* 100 bp.

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan meliputi isentrifuge (Hettich), mikropipet (ukuran 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l), *tips* 20 μ l, 200 μ l dan 1000 μ l, tabung mikro 1.5 ml (Axygen), tabung PCR 0,6 ml, satu set alat elektroforesis horizontal dan *power supply* (Consort), *microwave*, inkubator, *GeneAmp PCR System 2400 ThermoCycler* (Perkin Elmer), Gel Doc 2000 (Bio Rad), *autoclave* (Ogawa Saiki Co), gelasukur, erlenmeyer, tabung *venoject*, *vortex mixer* (Gemmy Industrial Corp), sarung tangan, penangas air (Haake), lemari pendingin suhu 4°C, *freezer* suhu -20°C, alat pembuat Kristal es (Cornelius), timbangan elektrik (Denver Instrument).

3.5.2 Alat untuk membuat *Agarose Gel Electrophoresis*

Peralatan yang digunakan diantaranya satu set *tray* pencetak *gel*, timbangan digital, *power supply* 100 volt, pipet mikro, tip, *beaker glass*, *microwave*, *stirrer*, dan *UV Transilluminator*.

3.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, *Institute of Tropical Disease* (ITD). Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai dengan bulan Februari 2013.

3.7 Prosedur Pengambilan sampel dan Pengumpulan Data

3.7.1 Pengambilan sampel

Sampel darah sebanyak 5 ml diambil dari individu sapi Madura secara *venepuncture*, menggunakan 10 ml tabung *venoject* yang berisi EDTA 10%. Tabung *vacutainer* tempat sampel diberi label menurut masing-masing sampel individu. Kemudian sampel disimpan pada suhu ruangan untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium.

3.7.2 Ekstraksi DNA mitokondria

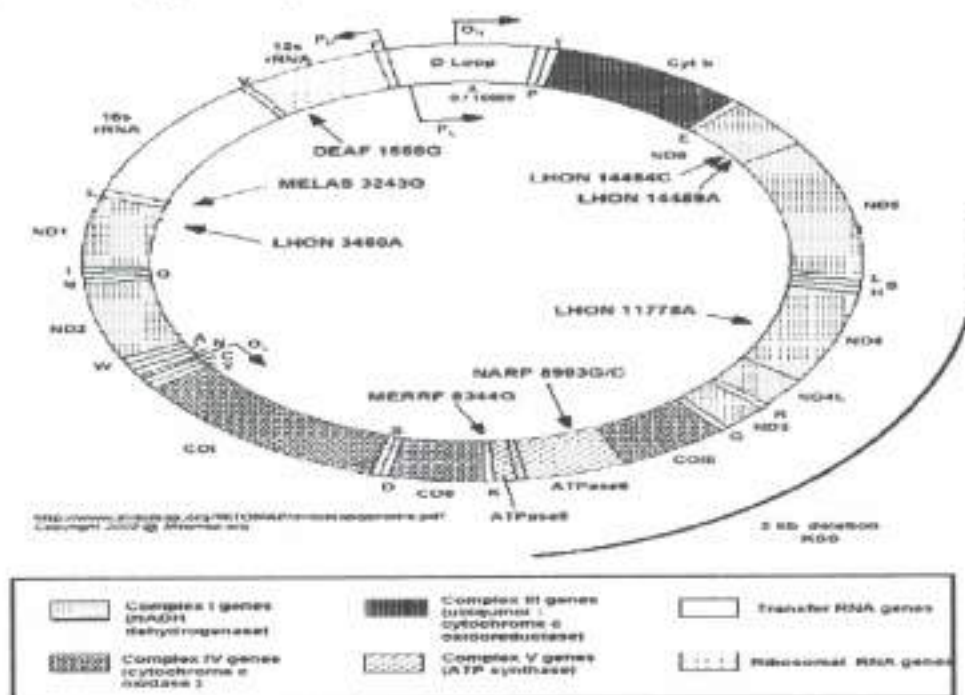
DNA diekstrak dari total darah menggunakan teknik *Wizard Genomic Purification System*. Total darah sebanyak 200 μ l dimasukkan kedalam 1.5 ml tabung mikrosentrifus yang telah diisi 450 μ l larutan pelisis sel (*cell lysis solution*), dicampur dengan membolak-balikkan tabung sebanyak 5-6 kali kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 10 menit untuk melisis sel darah merah. Jika pellet masih berwarna merah, langkah tersebut diulang sampai didapatkan pellet berwarna putih bersih (2-3 kali). Setelah itu tabung disentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 20 detik pada suhu kamar untuk memperoleh pellet sel darah putih. Supernatan dibuang dan pellet sel darah putih dibuat agar tidak menggumpal dengan vortex selama \pm 20 detik. Larutan pelisis inti (*nuclei lysis solution*) sebanyak 150 μ l ditambahkan kedalam tabung yang berisi pellet sel darah putih tersebut kemudian dicampur dengan cara membolak-balikkan tabung untuk melisiskannya. Setelah itu 1 μ l RNAase ditambahkan kedalam larutan inti dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 15-20 menit. Setelah itu sampel didinginkan pada suhu kamar selama \pm 3 menit dan kemudian ditambah 60 μ l *protein precipitation solution*, dicampur sampai homogeny dengan vortex selama 10-20 detik dan kemudian disentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 3 menit untuk membentuk pelet protein. Supernatan diambil dengan pipet dan dimasukkan kedalam 1.5 ml tabung mikro sentrifus yang sebelumnya telah diisidengan 150 μ l isopropanol. Tabung tersebut kemudian dibolak-balik sampai terbentuk materi seperti benang berwarna putih dari DNA yang terlihat. DNA kemudian disentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 1 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang kemudian kedalam pellet ditambahkan 300 μ l 70% etanol pada suhu kamar dan tabung berisi DNA dan etanol dibolak-balikkan untuk mencuci pelet DNA. DNA diendapkan dengan sentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 1 menit pada suhu kamar. Etanol dibuang pelan-pelan, tabung mikro sentrifus kemudian dibalik di atas kertas saring dan dibiarkan terbuka pada suhu kamar selama 15-20 menit. Setelah kering, ditambahkan larutan rehidrasi DNA (*DNA rehydration solution*) sebanyak 100 μ l dan DNA direhidrasi dengan cara diinkubasi semalam pada suhu kamar. DNA yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu 2-8°C sampai penggunaan berikutnya. Setelah itu DNA dicek dengan gel elektroforesis untuk mengetahui ada tidaknya DNA hasil ekstraksi. Konsentrasi DNA diukur dengan cara dibandingkan dengan DNA plasmid yang sudah diketahui konsentrasinya dalam gel elektroforesis.

3.7.3 Reaksi PCR

Hasil ekstraksi DNA kemudian digunakan untuk reaksi PCR yang dilakukan dalam mesin PCR (*thermocycler*). Reaksi ini untuk mengamplifikasi DNA mitokondria pada daerah D-Loop. Reaksi dilakukan dalam suatu volume campuran sebanyak 25 µl yang berisi 200 µM dari masing-masing dNTPs, 2 mM MgCl₂, DNA *template*, primer DL-F dan DL-R masing-masing 0,15 µM, 10 kali buffer reaksi *Taq* DNA *polymerase* dan 1,5 unit *Taq* DNA *Polymerase* dalam 0,6 ml tabung PCR.

3.7.4 Amplifikasi D-Loop.

Daerah D-Loop dari DNA mitokondria diamplifikasi dengan PCR. Amplifikasi D-Loop dengan PCR menggunakan primer berturut – turut DL-F / DL-R.



Gambar 3.1 Diagram yang menunjukkan letak primer (DL-F, DL-R) yang digunakan untuk menghasilkan D-Loop dari DNA mitokondria sapi

Primer yang digunakan dalam reaksi amplifikasi D-Loop dari DNA mitokondria adalah sebagai berikut: D-Loop primer: DL-F: 5'TTCTTCAGGGCCATCTCATC-3' dan DL-R: 5'GCATCTTGAGCACCAGCATA-3' yang diperoleh dari urutan nukleotida *Bos indicus* mitochondrial DNA, D-loop region (Kode akses AB268575) yang telah

dipublikasikan di *Genbank*. Primer tersebut didesain dengan menggunakan program Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Kondisi reaksi amplifikasi PCR untuk D-Loop adalah: satu tahap reaksi denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti dengan 30 siklus amplifikasi yang masing-masing terdiri: *denaturesi* pada suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 58°C selama 45 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit, diikuti dengan satu tahap polimerisasi akhir pada suhu 72°C selama 6 menit.

3.7.5 Analisis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Fragmen yang merupakan hasil amplifikasi PCR langsung digunakan dalam reaksi digesti dengan menggunakan enzim restriksi. Daerah D-Loop dari DNA mitokondria hasil amplifikasi dengan PCR di digesti dengan menggunakan enzim *HindIII* Aliquot yang terdiri dari ± 100 ng DNA (hasil amplifikasi D-Loop dari DNA mitokondria) dimasukkan ke dalam tabung *effendorf* yang steril. *Master mix* dibuat dari campuran enzim restriksi *HindIII*, 10 X REact 2 bufer dan *ultra pure water*. *Master mix* sebanyak 8 µl (1 unit enzim *HindIII*, 3 µl 10X React 2 bufer dan sisanya *ultra pure water*) ditambahkan ke dalam masing-masing tabung yang berisi DNA hasil amplifikasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam.

3.7.6 Elektroforesis

Visualisasi DNA dilakukan dengan elektroforesis pada bak elektroforesis horizontal dengan menggunakan 1% gel agarosa. Gel agarosa dibuat dengan melarutkan agarosa dalam bufer 1X TAE dan dipanaskan dalam *microwave* selama ± 30 detik sampai tercampur homogen. Setelah itu larutan agarosa ditunggu sampai suhunya ± 60°C dan kemudian ke dalam larutan agarosa ditambahkan *ethidiumbromida* dengan konsentrasi 0,12 µg/ml agar DNA dapat divisualisasi dibawah sinar ultra violet. Larutan agarosa kemudian dituang ke dalam bak elektroforesis yang sebelumnya telah dipasang sisir cetakan dan ditunggu sampai menjadi keras (15-20 menit). Elektroforesis dilakukan selama 90 menit pada tegangan 55 volt (lama waktu *running* tergantung pada konsentrasi gel dan voltase). Setelah elektroforesis, DNA divisualisasi di bawah sinar ultraviolet dalam ruang gelap dan diambil gambarnya dengan menggunakan Gel Doc 2000 yang menggunakan filter merah.

3.7.7 Sekuensing

Penentuan runutan nukleotida dilakukan dengan cara sekuensing DNA yaitu tahapan akhir untuk memperoleh data urutan nukleotida dari fragmen hasil perbanyak fragmen

DNA. Pita tunggal pada gel agarose sebagai produk PCR dijadikan sebagai cetakan dalam reaksi sekuensing dengan menggunakan primer *forward* dan *reverse* seperti pada saat amplifikasi.

Produk PCR yang disekuensing adalah D-loop parsial. Proses sekuensing dilakukan di *Institute of Tropical Disease (ITD)*.

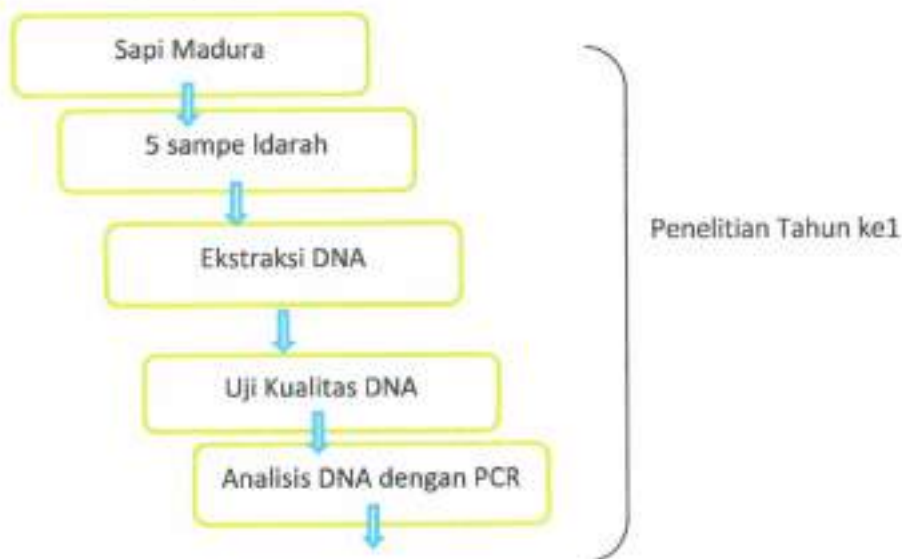
3.7.3. Pengumpulan Data

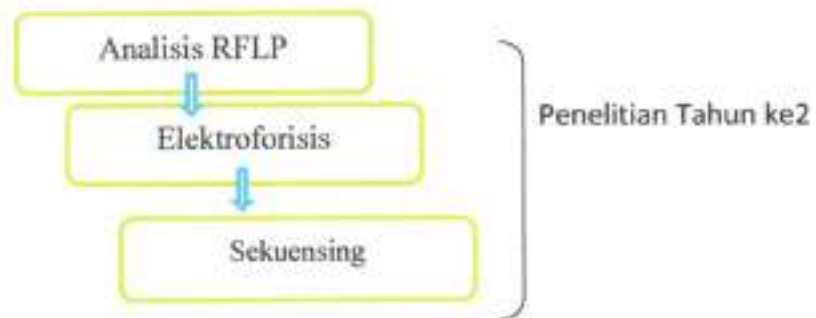
Data dikumpulkan dengan cara membandingkan Matrik perbedaan nukleotida di daerah D-loop (221bp) ke 20 individu Sapi Madura.

Tabel 3.1 Matrik perbedaan nukleotida di daerah D-loop ke 20 individu Sapi Madura.

Individu	SM1/P.Sapudi	SM2/Sumenep	SM3/Pamekasan	SM4/Sampang	SM5/Bangkalan
SM1/P.Sapudi					
SM2/Sumenep					
SM3/Pamekasan					
SM4/Sampang					
SM5/Bangkalan					

3.8 Bagan Kerangka Operasional





3.9 Analisis Data

Analisis hasil sekuensing ini dilakukan dengan membandingkan urutan basa nukleotida sampel dengan urutan basa nukleotida standart yang diperoleh dari *Genbank* dengan menggunakan program DNASTAR, dengan program ini secara otomatis akan mengurutkan nukleotida sampel dengan nukleotida standart dan menandai basa tertentu yang berbeda.

BAB V HASIL PENELITIAN

5.1 Komposisi Basa Nukleotida Pada Sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Sampang, Pamekasan, Sumenep.

Produk PCR dari Kelima DNA sapi disekuensing dan diperoleh ukuran panjang basa nukleotida yang berbeda- beda yaitu 710 bp, 1110 bp, 964 bp, 756 bp, 716 bp. Analisis keragaman susunan nukleotida dilakukan setelah susunan mtDNA daerah *D-Loop* sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Sampang, Pamekasan, Sumenep disejajarkan dengan aplikasi MEGA 6 dengan acuan utama pada susunan nukleotida sapi Madura dari Pulau Sapudi. Jumlah nukleotida dari kelima sapi adalah tidak sama setelah dilakukan perbandingan. Hal ini karena ada beberapa delesi nukleotida pada sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Sampang, Pamekasan, Sumenep. Hasil *multiple alignment* yang dapat dianalisis sebanyak 156 bp (Parsial) dan diperoleh keragaman situs nukleotida sebanyak 25 buah. Hal ini membuktikan bahwa daerah *D-loop* merupakan daerah dengan basa nukleotida yang sangat variatif. Menurut Zhang *et al.* (2006), Luo *et al.* (2004), dan Wilkinson-Herborts *et al.* (1996) diketahui bahwa daerah *D-loop* DNA mitokondria mempunyai variasi basa nukleotida yang tinggi, sehingga sangat cocok untuk membedakan perbedaan antar individu baik dalam satu keluarga maupun antar keluarga. Hasil *multiple alignment* dari kelima sapi dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Pensejajaran (*alignment*) Sekuen Nukleotida Daerah *D-Loop* antara Sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Sampang, Pamekasan, Sumenep.

Sapudi	ATG TAC ATA ACA TTA ATG TAA TAA AGA CAT GAT ATG TAT ATA GTA CAT	48
	TAA ATT ATA TAC CCC ATG CAT ATA AGC AAG	78
SB	48
	78
SP	.A.T.	48
	..CC.	78
SS	.A.T.	48
	..CCTG.	78
SSm	48
	78
Sapudi	TAC ATG ATC TCT ATA ATA GTA CAT AAT ACA TAC AAT TAT TAA TTG TAC	126
	ATA GTA CAT TAT ATC AAA TCC ATC CTC ACA	156
SB	126
AC	156
SP	... T.. .A. ..CC.G.TA .TC C.CC. ...	126
CT .C. ..T GAC	156
SS	... T.. .A. ..CC.G.TA .TC C.CC. ...	126
TT GAC	156
SSm	126
AC	156

Keterangan :

Sapudi : Sapi Madura Sapudi
 SB : Sapi Madura Bangkalan
 SP : Sapi Madura Pamekasan
 SS : Sapi Madura Sampang
 SSm : Sapi Madura Sumenep

Tanda Titik (.) Menandakan nukleotida yang sama dengan sapi Madura Sapudi.

Hasil pensejajaran (*alignment*) susunan nukleotida Sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Pamekasan, Sampang, Sumenep yang dapat dianalisis dengan MEGA 6 sepanjang 156 bp. Dari kelima sapi

yang diteliti, masing-masing memiliki komposisi basa nukleotida Timin (T), Cytosin (C), Adenin (A), Guanin (G) yang berbeda. Hal tersebut dapat dilihat dalam Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Perbandingan Komposisi Nukleotida Daerah *D-loop* Parsial Sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Pamekasan, Sampang, Sumenep.

Sapi Madura	%					
	T	C	A	G	T + A	C+G
Sapudi	32.7	16.0	42.9	8.3	75.6	24.3
Bangkalan	32.7	16.0	42.9	8.3	75.6	24.3
Pamekasan	29.5	19.9	41.7	9.0	71.2	28.9
Sampang	31.4	17.9	40.4	10.3	71.8	28.2
Sumenep	32.9	16.1	42.6	8.4	75.5	24.5

Dari tabel 5.2 dapat dilihat perbandingan persentase jumlah nukleotida T (Timin) daerah *D-loop* tertinggi sampai terendah berturut-turut dimiliki oleh Sapi Madura Sumenep 32.9 %, Sapudi 32.7%, Bangkalan 32.7%, Sampang 31.4 % dan Pamekasan 29.5 %. Perbandingan persentase nukleotida C (Cytosin) daerah *D-loop* tertinggi sampai terendah berturut-turut dimiliki oleh sapi Madura Pamekasan 19.9 %; Sampang 17.9%, Sumenep 16,1 %, Sapudi 16 % dan Bangkalan 16%. Persentase nukleotida A (Adenin) daerah *D-loop* tertinggi sampai terendah berturut-turut dimiliki oleh sapi Madura Sapudi 42.9%; Bangkalan 42.9%, Sumenep 42.6%, Pamekasan 41.7% dan Sampang 40.4 %. Persentase nukleotida G (Guanin) daerah *D-loop* tertinggi sampai terendah berturut-turut dimiliki oleh sapi Madura Sampang 10.3%; Pamekasan 9%, Sumenep 8.4%, Sapudi 8.3 % dan Bangkalan 8.3%. Perbedaan komposisi nukleotida A, T, G, dan C menunjukkan perbedaan komposisi asam amino yang dikandungnya (Ridley, 1991).

Persentase nukleotida A+T pada semua sapi yang diteliti yaitu sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Pamekasan, Sampang dan Sumenep memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan

dengan persentase nukleotida G+C. Persentase nukleotida A+T dari paling tinggi hingga paling rendah berturut-turut yaitu Sapi Sapudi 75.6%; Bangkalan 75.6 %; Sumenep 75.5%, Sampang 71.8% dan Pamekasan 71.2%. Persentase nukleotida G+C dari paling tinggi hingga paling rendah berturut-turut yaitu sapi Madura Pamekasan 28.9%; Sampang 28.2 %., Sumenep 24.5 %, Sapudi 24.3%, Bangkalan 24.3%. Pada penelitian ini, komposisi basa nukleotida A+T memiliki frekuensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan komposisi G+C.

Situs basa nukleotida yang beragam tersebut disebabkan adanya mutasi pada basa-basa nukleotidanya. Mutasi yang terjadi antara lain mutasi substitusi transisi (penggantian satu basa purin oleh basa purin yang lain yaitu A↔G, atau penggantian basa pirimidin oleh basa pirimidin yang lain yaitu T↔C) dan mutasi substitusi transversal (penggantian basa purin oleh pirimidin yaitu A↔C, A↔T, G↔C, G↔T, atau penggantian basa pirimidin oleh purin yaitu T↔A, T↔G, C↔A, C↔G). Selain itu terjadi juga mutasi delesi yaitu pengurangan pasangan basa yang menyebabkan kehilangan pasangan basa yang semula ada. Dari hasil penelitian ini, pada sapi Madura Pamekasan terdapat 15 substitusi transisi (Si), 9 substitusi transversal (ST). Pada sapi Sampang terdapat 13 Mutasi transisi, 8 mutasi transversal. Pada sapi Bangkalan terdapat 2 Mutasi Transversal dan Sapi Sumenep terdapat 2 mutasi transversal, 1 delesi.

5.2.4 Jarak Genetik antara Sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Pamekasan, sampan, Sumenep.

Kedekatan hubungan genetik antara sapi Madura Madura Sapudi, Bangkalan, Pamekasan, sampan, Sumenep.dilihat dengan mengukur jarak genetik. Jarak genetik diukur dengan menggunakan analisis *Pairwise Distance Calculation* yang ditunjukkan dengan matriks perbedaan genetik antara tiga sapi yang telah dilakukan pengurutan nukleotidanya pada daerah D-Loop MtDNA.

Jarak genetik model ini digunakan untuk melihat tingkat substitusi transisi dan tranversi melalui banyaknya perbedaan nukleotida per pasangan (Abdullah, 2008). Sapi-sapi yang memiliki nilai jarak genetik semakin rendah, maka ternak tersebut memiliki hubungan kekerabatan semakin dekat. Sebaliknya ternak yang memiliki jarak genetik tinggi, maka hubungan kekerabatannya semakin jauh. Jarak genetik antara Sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Pamekasan, Sampang, Sumenep dapat dilihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6. Jarak Genetik Berdasarkan Metode *Pairwise Distance* Daerah *D-loop* antara Sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Pamekasan, Sampang, Sumenep.

No	Sapi Madura	1	2	3	4
1	Sapudi				
2	Bangkalan	0.013	-		
3	Pamekasan	0.173	0.154	-	
4	Sampang	0.186	0.166	0.033	-
5	Sumenep	0.013	0.000	0.154	0.166

Dari Tabel 5.6 menunjukkan bahwa jarak genetik sapi Madura Sapudi (0.0000) dengan Sapi Bangkalan dan Sumenep (0.13) mempunyai tingkat kekerabatan yang dekat. Sedangkan pada sapi Madura Sampang (0.186) dan Pemekasan (0.173) mempunyai jarak genetik yang lebih jauh. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan nukleotida yang cukup signifikan pada sapi Madura Sapudi dengan sapi Pemekasan dan Sampang.

BAB VI PEMBAHASAN

Informasi mengenai keragaman genetik dapat diperoleh melalui beberapa cara, diantaranya dengan menggunakan DNA mikrosatelit (Puja dan Sulabda, 2009), AFLPs, SNPs, Y-chromosomal DNA atau menganalisis DNA mitokondria (mtDNA) (Lenstra, 2005). DNA mitokondria (mtDNA) telah mewakili unsur genomik yang paling informatif untuk menguraikan asal ternak. Hingga saat ini, sekuen mitokondria telah secara luas dipelajari pada sapi, babi, domba, kuda, anjing, keledai, dan kambing (Chen *et al.*, 2005).

Mitochondrial Deoxyribonucleic acid (mtDNA) dalam penelitian ini diisolasi dari sel darah sapi dengan kualitas yang sama dengan DNA mitokondria yang diisolasi dari jaringan otot/daging sapi. Hal ini sejalan dengan pernyataan Tapio dan Grigaliunaite (2003), menyatakan DNA mitokondria dapat diisolasi dari rambut, tulang, gigi, cairan tubuh (air liur, air mani, darah). Menurut Anderson *et al.* (1981) dalam Hartati dan Maksam (2004), DNA mitokondria banyak ditemukan pada sel-sel atau jaringan yang memiliki aktivitas metabolit tinggi atau pada daerah-daerah yang memerlukan ATP dalam jumlah banyak, seperti pada bagian ekor sel sperma, sel epitel yang aktif membelah pada jaringan epidermis kulit dan sel otot jantung.

Segmen mtDNA yang dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik suatu organisme adalah mtDNA *control region* atau daerah *D-loop*, yaitu bagian *hypervariable non coding* dari mitokondria (Elrod and Stansfield, 2007). Tingginya angka dari polimorfisme nukleotida atau adanya perbedaan runutan pada kedua bagian hipervariabel dari *non coding* daerah digunakan untuk membedakan antara individu suatu spesies (Melton, 1999). Selain itu analisis daerah *D-loop* digunakan juga untuk melihat keragaman antar subspecies ataupun antar populasi (Brown, 1986). Daerah *D-loop* mtDNA diketahui sangat cepat berkembang dibandingkan dengan bagian

mtDNA lainnya. Hal ini karena terjadinya akumulasi substitusi basa, proses insersi dan delesi yang lajunya amat cepat bila dibandingkan dengan DNA inti (Foran *et al.*, 1988).

Hasil penelitian perbandingan Sapi Madura, Bangkalan, Pemekasan, Sampang, Sumenep. dalam penelitian ini mempunyai keragaman susunan nukleotida yang tinggi. Dari data tersebut dapat dianalisis bahwa basa nukleotida A (Adenin) mempunyai persentase yang lebih tinggi dengan basa nukleotida C (Cytosine). Studi Prusak dan Grzybowski (2004) pada 20 spesies mamalia menemukan kasus pada manusia dan zebra memiliki sekuen yang dengan lebih banyak basa A dibandingkan C pada untai ringan DNA mitokondria, pada domba dan sapi (Zebu) basa A lebih banyak dibandingkan dengan basa C, dan fenomena ini umum terjadi pada mamalia. Hasil penelitian ini juga menunjukkan fenomena yang sama. Menurut Irwin *et al.* (1991) fenomena ini ada hubungannya dengan tingkat identitas asam amino yang terkait dengan kandungan protein pusat reaksi redoks (baik Q_0 maupun Q_i) yang terlibat dalam transfer elektron (Hatefi, 1985; Howell and Gilbert, 1988).

Perbedaan tingkat mutasi atau variasi pada daerah mitokondria pada penelitian ini dapat dipengaruhi banyak faktor (Kimura, 1987; Mindell and Thacker, 1996). Studi untuk mengetahui efek hambatan laju mutasi terhadap tingkat replikasi, efisiensi perbaikan DNA, dan eksposur mutagen tidak banyak dilakukan langsung, dan umumnya dikaitkan dengan variabel biologis, seperti ukuran tubuh, waktu generasi dan *SMR* (*Standart Metabolic Rate*). Menurut teori, individu taxa dengan ukuran tubuh besar, waktu hidup panjang dan nilai metabolik rendah, biasanya memiliki tingkat mutasi rendah, tetapi menurut hasil penelitian pada gen ribosom dan P12, mutasi mtDNA tidak berhubungan dengan ukuran tubuh dan *SMR* (Gissi, *et al.* 2000). Laird, *et al.* (1969), Martin and Palumbi (1993), Rand (1994) berpendapat bahwa efek laju metabolisme diusulkan sebagai faktor yang mempengaruhi tingkat mutasi mitokondria, sebab

polutan radikal bebas yang terdapat pada oksigen dapat mempengaruhi laju metabolisme tersebut. Meskipun ditemukan adanya korelasi antara tingkat mutasi dan *SMR*, namun hanya ditemukan pada kasus model perbaikan kerusakan mitokondria (*DNA repair*) akibat ketidakcukupan oksidasi. Hal ini menunjukkan bahwa mitokondria pada organisme tingkat tinggi telah dilengkapi mekanisme yang sangat baik melalui proses eksisi basa dalam sistem perbaikan kerusakan oksidatif (Bogenhagen, 1999; Sawyer and Van Houten, 1999), seperti yang terjadi pada genom inti sel (Sawyer and Van Houten, 1999), sehingga efisiensi perbaikan DNA spesifik pada taxon belum pernah terbukti. Reyes *et al.* (1998) melaporkan bahwa komposisi mtDNA tidak berhubungan dengan kerusakan oksidatif tetapi lebih pada proses spontanitas selama terjadinya replikasi. Oleh karena itu, ditemukannya kasus mutasi pada penelitian ini kemungkinan terjadi pada tingkat replikasi DNA. Hal ini sejalan dengan pendapat Wibowo (2001) yaitu keragaman genetik dapat muncul karena seleksi alam, pengaruh lingkungan, mutasi dan perkawinan. Keanekaragaman genetik dan tingkat mutasi yang tinggi pada penelitian ini tidak dimaknai sebagai hal yang merugikan. Menurut Rhymer (1999) mempertahankan keragaman genetik suatu populasi sangat penting dalam konservasi karena keragaman genetik yang tinggi akan sangat membantu suatu populasi beradaptasi terhadap perubahan-perubahan yang terjadi di lingkungan sekitarnya. Tingkat polimorfik yang tinggi pada daerah D-loop mtDNA tidak menyebabkan perubahan fenotipe ketiga sapi yang diuji. Hal ini karena daerah D-loop merupakan daerah *non coding* yang tidak terekspresikan. Daerah ini hanya berperan dalam regulasi dan inisiasi dari replikasi dan transkripsi mtDNA (Boore, 1999).

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. *Mitochondrial Deoxyribonucleic acid (mtDNA)* daerah *Displacement Loop (D-Loop)* sapi Madura Sapudi, Bangkalan, Pamekasan, Sampang, Sumenep dapat teramplifikasi dengan baik dengan ukuran 980 bp.
2. Dari analisis sekuen mtDNA daerah *D-Loop* ditemukan 50 situs keragaman genetik yaitu Sapi Madura Pamekasan terdapat 15 mutasi substitusi transisi , 9 mutasi substitusi transversi. Sapi Madura Sampang terdapat 13 mutasi substitusi transisi, 8 mutasi substitusi transversi . Sapi Madura Sumenep 2mutasi substitusi transisi, 2 mutasi substitusi transversi dan 1 delesi. Walaupun demikian tingkat variasi yang tinggi pada penelitian ini tidak berakibat pada perubahan fenotipe karena daerah *D-Loop* merupakan daerah *non coding* yang tidak terekspresikan.

7.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui penyebab utama perubahan genetik pada sapi Madura dan pengaruhnya pada kualitas genetik sapi Madura.
2. Dalam penelitian selanjutnya dapat dilakukan sekuensing pada DNA Mitokondria daerah *cyt b*, agar dapat dibandingkan dengan DNA Mitokondria daerah *D-Loop*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A.N., 2008. Karakterisasi Genetik sapi Aceh dengan Menggunakan Analisis Keragaman Fenotipik, Daerah D-loop DNA Mitokondria dan DNA Mikro-satelit. Disertasi, Institut Pertanian Bogor, Sekolah Pascasarjana, Bogor, Indonesia.
- Andersson, S.,A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden and I.G. Young 1981. Sequence and the organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290: 457-464.
- Beja-Pereira, A., D. Caramell, C. Lalueza-Fox, C. Vernesi, N. Ferrnrad, A. Casoli, *et al.* 2006. The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *PNAS*. 103 (21): 8113-8118.
- Blakely, J. and D. H. Bade. 1992. Ilmu Peternakan Edisi Ke Empat. Terjemahan Srigandono. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Brown, W.M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (6): 3605-3609.
- Brown, W.M., E.M. Prager, A. Wang, A.C. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and Mode of Evolution. *J MolEvol* 18: 225-239.
- Butler JM. 2005. *Forensic DNA Typing Biology, Technology and Genetics of STR Markers*. Ed ke-2. Burlington, USA: Elsevier Academic Press.
- Buzdin A, Lukyanov S. 2007. *Nucleic Acids Hybridization Modern Applications*. Netherlands: Springer.
- Chen, S. Y., Y. H. Su, S. F. Wu, T. Sha and Y. P. Zhang. 2005. *Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats*. *Molecular phylogenetics and Evolution*. 37: 804-814
- Da Fonseca, R.R., W.E. Johnson, S.J. O'Brien, M.J. Maria João Ramos, A. Antunes. 2008. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics* 9 : 119 : 1-22.
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2008. Buku Statistik Peternakan 2008. Jakarta: Ditjenak, Departemen Pertanian Republik Indonesia.
- Duryadi, D. 1994. Peranan DNA mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. *Hayati* 1 (1): 1-4.

- Erlich, H.A. 1989. *PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press.
- Firdhausi, N.F. 2010. *Asal Usul Sapi Madura Berdasarkan Penanda DNA Mitokondria* [Tesis]. Institut Pertanian Bogor.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1995. *Global Project for the Maintenance of Domestic Animal Genetic Diversity (MoDAD)*. World WatchList for Domestic Animal Diversity. 2nd Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2000. *World Watch List for Domestic Animal Diversity*. 3rd Ed. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Food and Agriculture Organization (FAO) . 2001. *Sustainable Use of Animal Genetic resources*. IDAD-APHD FAO. Rome, Italy.
- FAO-AAAS. 1994. *Implication on the Convention on Biological Diversity-Management of Animal Genetic Resources and the Conservation of Domestic Animal Diversity*. Strauss, M.S. (Ed). UN Food and Agriculture Organization-American Association for the Advancement of Science, Washington DC, USA.
- Foran, D.R., J.E. Hixson, W.M. Brown. 1988. Comparisons of ape and human sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and D-loop DNA synthesis. *J Nucleic Acids* 16: 13-19.
- Fumagalli, L., P.Taberlet, L. Favre, J. Hausser. 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Mol Biol Evol* 13: 31-46.
- Ghivizzani, S.C., S.L.D.Mackay, C.S.Madsen, P.J.Laipis, W.W. Hauswirth. 1993. Transcribed heteroplasmic repeated sequences in porcine mitochondrial DNA *D-loop* region. *J MolEvol*. 37: 36-47.
- Handiwirawan. E, Subandriyo. 2004. Potensi keragaman sumberdaya genetik sapi Bali. *Wartazoa*. 14 (3): 107-115.
- Hardjosubroto. 2004. Alternatif Kebijakan Pengelolaan Berkelanjutan Sumberdaya Genetik Sapi potong Lokal dalam Sistem Pembibitan Ternak Nasional. *Wartazoa* 14:107-115.
- Hartati, Y. W dan I. P. Maksum. 2004. *Amplifikasi 0,4 kb daerah D-loop DNA Mitokondria dari Sel Epitel Rongga Mulut untuk Keperluan Forensik*. FMIPA. Universitas Padjajaran.
- Kutsiyah, F. 2012. Analisis pembibitan sapi potong di pulau Madura. Skripsi. Universitas Madura.

- Lenstra, J.W., D.G. Bradley. 1999. Systematic and phylogeny of cattle. Di dalam: Fries R & Ruvinsky A, editor. *The Genetics of Cattle*. United Kingdom: CABI Publishing.
- Lewin, B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press. Oxford.
- MacHugh, D.E. 1996. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle [theses]. Department of Genetics. Trinity College, University of Dublin.
- Martojo, H. 2003. *Indigenous Bali Cattle: The Best Suited Cattle Breed for Sustainable Small Farms in Indonesia*. Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Animal Science, Bogor Agricultural University, Indonesia.
- Melnick, D.J., G.A. Hoelzer. 1993. What is mtDNA good for in the study of primate evolution? *Evolutionary Anthropology*. Issue, News and Reviews. *A Division of John Wiley and Sons, Inc.* 2 (1): 1-10.
- Melton, T. 1999. *Learn About Mitochondrial DNA*. LLC: Mitotyping Technol.
- Malevičiūtė, J., L. Baltreinaite, I. Miceikienė. 2002. Domestic cattle breed diversity in Lithuania. ISSN 1392-2130. *Veterinarija Ir Zootechnika*. T. 20 (42): 87-91.
- Muladno, 2006. *Aplikasi Teknologi Molekuler dalam Upaya Peningkatan Produktivitas Hewan*. Pelatihan Teknik Diagnostik Molekuler untuk Peningkatan Produksi Peternakan dan Perikanan di Kawasan Timur Indonesia. Kerjasama Pusat Studi Ilmu Hayati, Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat Institut Pertanian Bogor dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas, Bogor.
- Muslim, C. 2003. *Biologi Molekuler*. Jurusan Biologi Universitas Bengkulu. Bengkulu.
- Nijman, I.J., M. Otsen, E.L.C. Veekar, C. de Ruijter, E. Hanecamp, J.W. Ochieng, S. Shamshad, J.E.O. Rege, O. Hanotte, M.W. Barwegwn, Sulawati T, Lenstra JA. 2003. Hybridization of Banteng (*Bos javanicus*) and Zebu (*Bos indicus*) Revealed by Mitochondrial DNA, Satellite DNA, AFLP and Microsatellites. *Heredity* 90:10-16.
- Nollet LML, Toldrá F. 2011. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*. New York: CRC Press.
- Noor, R.R. 2008. *Genetika Ternak*. Cet ke-4. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Park, L.K., P. Moran. 1995. Development in Molecular Genetics Techniques in Fisheries. Di dalam: Gary R. Carvalho dan T.T. Pitcher. Editor. *Molecular Genetics in Fisheries*. Cornwall: TJ Press Ltd.
- Payne, W.J.A., J. Hodges. 1997. *Tropical Cattle: Origin, Breed, and Breeding Policies*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Payne, W.J.A., D.H.L. Rollinson. 1976. Madura cattle. *Z Tierzucht Züchtbiol.* 93:89-100.

- Payne, W.J.A., Wilson. 1999. *An Introduction to Animal Husbandry in the Tropics*. Oxford: Blackwell science Ltd.
- Reyes, A., C. Gissi, G. Pesole, C. Saccone. 1998. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals. *Mol Biol Evol* 15 (8): 957-966.
- Rouse, J.E. 1972. *Cattle of Africa and Asia*. Oklahoma: University of Oklahoma Press.
- Sbisa, E., F. Tanzariello, A. Reyes, G. Pesole, Saccone. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: Identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205: 125-140.
- Schearf, B. (ed.). 2003. World Watch List for Domestic Animal Diversity. FAO. 2003.
- Selwood, S.P., Z.M.A. Chrzanowska-Lightowlers, and R.N. Lightowlers. 2000. Does the mitochondrial transcription-termination complex play an essential role and controlling differential transcription of mitochondrial DNA? *Biochemical Society Transactions* 28: 154-159.
- Sodhi, M., M. Mukesh, B. Prakash, S.P.S. Ahlawat, R.C. Sobti. 2006. Microsatellite DNA typing for assessment of genetic variability in Tharparkar breed of Indian zebu (*Bos indicus*) cattle, a major breed of Rajasthan. *J Genet.* 85: 165-170.
- Sochadji, 1993. Kebijakan pengembangan ternak potong di Indonesia tinjauan khusus sapi Madura. Pros. Pertemuan Ilmiah Hasil Penelitian dan Pengembangan Sapi Madura. Sumenep. hlm. 1 – 12.
- Subandriyo. 2003. Pengelolaan data plasma nutfah ternak. Makalah disampaikan dalam Lokakarya Pemantapan Pengelolaan Database dan Pengenalan Jejaring Kerja Plasma Nutfah Pertanian, Bogor, 21-28 Juli, 2003, Komisi Nasional Plasma Nutfah.
- Subandriyo, B. Setiadi. 2003. Pengelolaan plasma nutfah hewani sebagai aset dalam pemenuhan kebutuhan manusia. Makalah disampaikan dalam Lokakarya Pemantapan Pengelolaan Database dan Pengenalan Jejaring Kerja Plasma Nutfah Pertanian, Bogor, 21-28 Juli, 2003, Komisi Nasional Plasma Nutfah.
- Tapio, M. and I. Grigaliunaite. 2003. *Use of Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Domesticated Mammalia*. *Ekologija (Valinius)*. Nr.1
- Taylor RW, Turnbull DM. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Natl Rev Gen* 6:389-402.
- Ugla, C.M. 2008. Investigating Genetic Variability Within Specific Indigenous Indonesian Cattle Breed [Disertasi]. Swedish University of Agricultural Science.

- Utoyo, D.P, Djarsanto, S.N.Nasution. 1996. *Animal Genetic Resources and Domestic*. Jakarta: Ministry of Agriculture Directorate General of Livestock Services. Directorate of Livestock Breeding Development.
- Verkaar, E.L.C., H.Vervaecke, C.Roden, L.R.Mendoza, M.W.Barwegwn, T.Susilawati, I.J.Nijman, J.A.Lenstra. 2003. Paternally inherited markers in bovine hybrid populations. *Heredity* 91: 565-569.
- Wandia, I.N. 2001. Genommitokondria. *J Vet.* 2 (4): 131-137.
- Widayanti, R. 2006. Kajian Penanda Genetik Gen Cytochrome B dan Daerah D-loop pada *Tarsius* sp. [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Weissensteiner T, Griffin HG, Griffin A. 2004. *PCR Technology Current Innovations*. Ed ke-2. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.
- Williamson, G., W.J.A.Payne. 1965. *An Introduction To Animal Husbandry In The Tropic*. London: Lougman

Gambar Sapi Madura



Sapi Pamekasan



Sapi Sampang



Sapi Bangkalan



Sapi Sapudi



Sapi Sumenep

LAMPIRAN

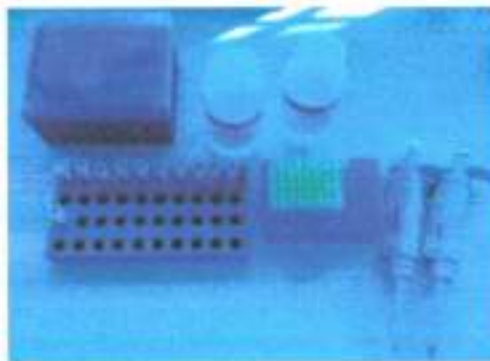
Gambar-gambar Penelitian



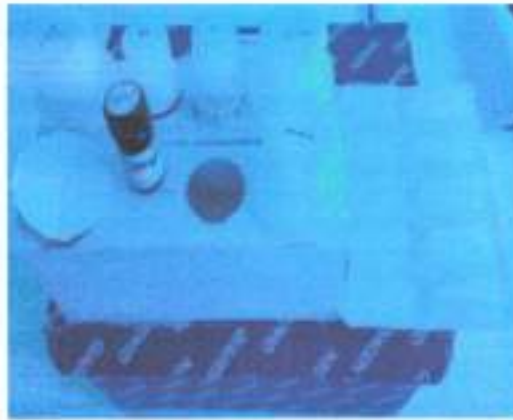
Gambar 1. Sampel Darah Sapi Madura dalam tabung EDTA.



Gambar 2. Mini DNA Kit dari Qiagen untuk Ekstraksi DNA



Gambar 3. Alat untuk ekstraksi (Pipet 200 ul, 1000 ul, Tip 200 ul, Tip 1000 ul, Tabung ependorf).



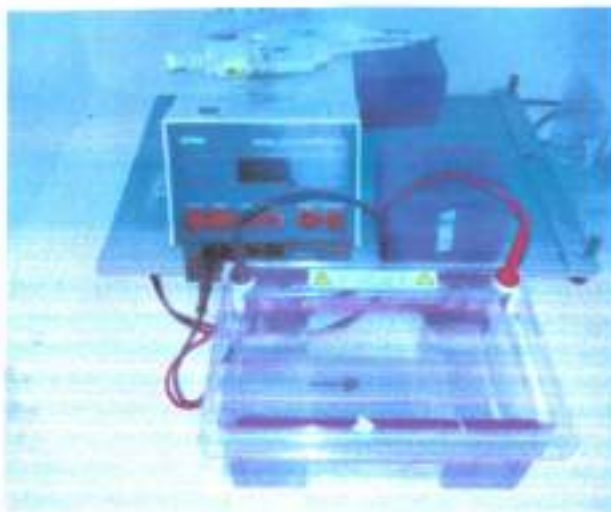
Gambar 4. Reagen untuk Ekstraksi DNA (Protease K, Buffer AE, AW1, AW2, Buffer AL)



Gambar 5. Thermal Cycler untuk Amplifikasi DNA.



Gambar 6. PCR Cabinet



Gambar 7. Alat untuk elektroforisis



Gambar 8. Reagen Untuk PCR (Mater Mix 2x, Nuclease Free Water, Primer BIDLF dan BIDLR)