

**IDENTIFIKASI POLYMORPHISME GEN IGF-1 PADA SAPI
BALI DAN BALI PERSILANGAN SEBAGAI KANDIDAT GEN
PENANDA KELAHIRAN KEMBAR**

*POLYMORPISM IDENTIFICATION IGF-1 GENE ON BALI
AND BALI PERSILANGAN CATTLE AS CANDIDATE FOR
MARKER GENE OF TWINS OF BIRTH*

NURUL PURNOMO

P4000210004



**ILMU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**IDENTIFIKASI POLYMORPHISME GEN IGF-1 PADA SAPI
BALI DAN BALI PERSILANGAN SEBAGAI KANDIDAT GEN
PENANDA KELAHIRAN KEMBAR**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Ilmu dan Teknologi Peternakan

Disusun dan diajukan oleh

NURUL PURNOMO

Kepada

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

TESIS

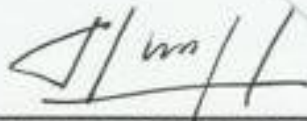
**IDENTIFIKASI POLYMORPHISME GEN IGF-1 PADA SAPI BALI DAN
BALI PERSILANGAN SEBAGAI KANDIDAT GEN PENANDA
KELAHIRAN KEMBAR**

Disusun dan diajukan oleh

NURUL PURNOMO
Nomor Pokok P4000210004

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
pada tanggal 01 Agustus 2013
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,

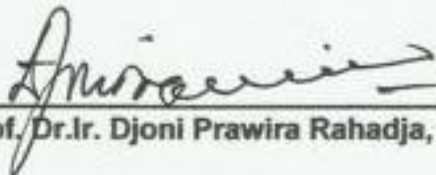


Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DEA. DES
Ketua



Dr. Muhammad Yusuf, S.Pt.
Anggota

Ketua Program Studi
Ilmu dan Teknologi Peternakan,



Prof. Dr. Ir. Djoni Prawira Rahadja, M.Sc

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasaniudin,



Prof. Dr. Ir. Mursalim

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : NURUL PURNOMO

Nomor Pokok : P 4000210004

Program Studi : Ilmu dan Teknologi Peternakan

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebahagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 01 Agustus 2013

NURUL PURNOMO

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul “Identifikasi Polymorphisme Gen IGF-1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan sebagai Kandidat Gen Penanda Kelahiran Kembar” pada Program studi Ilmu dan Teknologi Peternakan Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin, Makassar.

Tesis ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Terpadu Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar. Penulis menyadari bahwa tesis ini dapat selesai berkat bantuan dan partisipasi berbagai pihak, maka dalam kesempatan ini dengan ketulusan hati dan keikhlasan penulis menghaturkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DEA. DES. dan Dr. Muhammad Yusuf, S.Pt selaku pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam menyelesaikan karya akhir ini.
2. Prof. Dr. Ir. Latief Toleng, M.Sc, Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco, M.Sc, dan Prof. Dr. Ir. Lellah Rahim, M.Sc. selaku tim penguji atas kesedian waktunya dan saran-sarannya dalam melengkapi tesis ini.
3. Dr. Muhammad Ihsan A.D, S.Pt. M.Si. selaku pengelola Laboratorium Bioteknologi Terpadu Fakultas Peternakan Unhas yang banyak memberikan informasi, masukan dan bimbingan.

4. Ketua Program Studi Ilmu dan Teknologi Peternakan Prof. Dr. Ir. Djoni Prawira Rahadja, M.Sc yang banyak membantu dan sekaligus penyemangat penulis dalam menyelesaikan tesis.
5. *Special thanks for all my friends* angkatan pertama Program Studi Peternakan saudara dan saudariku Hassani, Rasyidah Mampangro, Andi Nurhayu, Rusny, Widiastuti Ardiansyah dan Martina Ranggadatu.
6. Akhirnya ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua saya (Bapak Tukiyo dan Ibu Subarkah), saudara-saudara saya (Kakak Toni, Adek Tini dan Budi), Bapak Ahmad Baehaki beserta keluarga, dan seluruh keluarga besar atas kasih sayang dan dukungannya selama ini.
7. Khusus kepada calon istriku tercinta Uchie ucapan terima kasih yang sebanyak-banyaknya atas pengorbanan, pengertian, kesetiaan, keikhlasan serta doa yang tulus, selama ini yang telah mengiringi perjalanan penulis sehingga dapat menyelesaikan studi ini dengan baik. Pesan “Semangaaaattt...☺☺☺” dan “Sabaaaarr... dikerjakan saja nanti kan lama-lama juga selesai” adalah pesan yang selalu dapat membangkitkan semangat saat lelah dan meredakan emosi saat sedang menghadapi situasi yang kurang menguntungkan.

Penulis berharap agar tesis ini dapat memberikan manfaat yang sebesar-besarnya bagi masyarakat pada umumnya dan keilmuan bidang peternakan khususnya.

Semoga amal ibadah semua pihak yang telah membantu penulis mendapatkan ridha dari Allah SWT. Amin

Makassar , Agustus 2013

Penulis

ABSTRAK

NURUL PURNOMO. *Identifikasi Keragaman Gen IGF-1 pada Sapi Bali dan Bali Persilangan dan Hubungannya dengan Kelahiran Kembar dan Tunggal (dibimbing oleh Hery Senjaya dan Muh. Yusuf)*

Penelitian ini bertujuan mengetahui (1) adanya polimorfisme gen IGF-1, keseimbangan hardy Weinberg dan hubungan fenotip kelahiran kembar dan tunggal dengan genotip gen IGF-1 pada sapi Bali dan Bali persilangan, (2) gen IGF-1 yang dapat dijadikan sebagai penanda kelahiran kembar.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Terpadu Fakultas Peternakan Unhas pada bulan Februari sampai dengan Mei 2013. Variabel yang diamati adalah hasil uji PCR-RFLP gen IGF-1 SnaB1 pada sapi Bali dan Bali persilangan dengan riwayat kelahiran kembar dan tunggal. Sampel adalah induk Bali melahirkan kembar 14 ekor dan tunggal 14 ekor, induk Bali persilangan melahirkan kembar 5 ekor dan tunggal 5 ekor, anak Bali lahir kembar 9 ekor dan tunggal 12 ekor, dan anak bali persilangan lahir kembar 8 ekor dan tunggal 10 ekor. Primer IGF-1 yang digunakan adalah IGF677F dan digestasi menggunakan enzim SnaB1. Analisis data dilakukan terhadap frekuensi alel, frekuensi genetik, heterozigositas, keseimbangan hardy-weinberg menggunakan persamaan Nei and Kumar (2000), hubungan fenotip kelahiran kembar dan tunggal dengan genetik gen IGF-1. Data dianalisis dengan program SPSS 17^R.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen IGF-1 SnaB1 pada sapi Bali induk kembar, induk tunggal, dan sapi Bali anak tunggal bersifat monomorfik, sedangkan pada sapi Bali persilangan induk kembar dan induk tunggal, sapi Bali persilangan anak kembar dan anak tunggal bersifat polimorfik dan dalam keseimbangan hardy-weinberg. Tidak terdapat perbedaan genotip antara sapi Bali induk kembar dan sapi Bali induk tunggal, sapi Bali persilangan induk kembar dan induk tunggal, sapi Bali persilangan anak kembar dan anak tunggal. Terdapat perbedaan genotip antara sapi Bali anak kembar dan anak tunggal. Gen IGF-1 SnaB1 tidak dapat dijadikan sebagai penanda kelahiran kembar pada sapi Bali dan sapi Bali persilangan.

Kata kunci : sapi Bali dan persilangan, keragaman, gen IGF-1, kelahiran kembar



ABSTRACT

NURUL PURNOMO. *The Identification of IGF-1 Gene Polymorphism in Bali and Bali Cross Cattle and Its Relationship with Twin and Single Birth (Supervised by Hery Sonjaya and Muh. Yusuf)*

The objective of this study is to find out the polymorphism of IGF-1 gene; Hardy-Weinberg balance; and the relationship between twin and single birth phenotype, and IGF-1 gene genotype in Bali and Bali cross cattle. In addition, this study aims to find out whether IGF-1 can be used as an indicator of twin birth.

The study was conducted at the Integrated Biotechnology Laboratorium of Animal Husbandry Faculty, Hasanuddin University from February to May 2013. The variables observed in the study were the result of PCR-RFLP test of IGF-1 SnaB1 gene in Bali and Bali cross cattle with twin and single birth history. The samples were: Bali cows with twin birth history (14), Bali cows with single birth history (14), Bali cross cows with twin birth history (5), Bali cross cows with single birth history (5), twin-birth Bali calves (9), single-birth Bali calves (12), twin-birth Bali cross calves (8), and single-birth Bali cross calves (10). The IGF-1 primer used in the study was IGF677F. The digestion used SnaB1 enzym. Data analysis was conducted on allele frequency, genetic frequency, and heterozygosity. The Hardy-Weinberg balance was analysed with the equation of Nei and Kumar (2000). The phenotype relationship between twin and single births, and IGF-1 gene genetic was analysed by using SPSS 17^R program.

The results reveal that IGF-1 SnaB1 genes in Bali cows with twin-birth history, Bali cows with single-birth history, and single-birth Bali calves are monomorphic; while the ones in Bali cross cows with twin-birth history, Bali cross cows with single-birth history, twin-birth Bali calves, twin-birth Bali cross calves, and single-birth Bali cross calves are polymorphic (existing in hardy-Weinberg balance). There is no genotype difference between Bali cows with twin-birth history and Bali cows with single-birth history; between Bali cross cows with twin-birth history and Bali cross cows with single-birth history; and between twin-birth Bali cross calves and single-birth Bali cross calves. On the other hand, there is a genotype difference between twin-birth Bali calves and single-birth Bali calves. Therefore, IGF-1 SnaB1 gene can be used as an indicator of twin birth in Bali and Bali cross cattle.

Keywords: Bali and Bali cross cattle, polymorphism, IGF-1 gene, twin-birth



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Sapi Bali dan Persilangannya	7

2.2 Sistem Reproduksi Sapi Betina	9
2.3 Kelahiran Kembar pada Sapi	16
2.4 Insulin-like Growth Faktor 1 (IGF-1)	26
2.5 Analisa DNA dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)	35
2.6 Kerangka Konsep	44
2.7 Hipotesis	45
BAB III. METODE PENELITIAN	46
3.1. Jenis Penelitian	46
3.2. Waktu dan Tempat Penelitian	46
3.3. Variabel Penelitian	46
3.4. Bahan dan Alat Penelitian	46
3.5. Metode Penelitian	48
3.6. Analisa Data	50
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	51
4.1. Genotip Gen IGF-1 / SnaB1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan dengan Riwayat Kelahiran Kembar	51
4.2. Frekuensi Alel dan Genotip, Heterozigositas dan Keseimbangan Hardy-Weinberg Gen IGF-1 / SnaB1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan dengan Riwayat Kelahiran Kembar dan Tunggal	55

4.3. Hubungan Riwayat Kelahiran Kembar dan Genotip gen IGF-1 / SnaB1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan	59
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	76

DAFTAR TABEL

No.	<u>Uraian</u>	Hal.
1.	Frekuensi Alel, frekuensi genotip, Heterozigositas dan Keseimbangan <i>Hardy-Weinberg</i> Gen IGF-1 / SnaB1 pada sapi Bali dan Bali <i>persilangan</i> dengan Riwayat Kelahiran Kembar dan Tunggal	55
2.	Hubungan Riwayat Kelahiran Kembar dan Genotip gen IGF-1 / SnaB1 pada Sapi Bali dan Bali <i>persilangan</i>	59

DAFTAR GAMBAR

No.	<u>Uraian</u>	Hal.
1.	Kerangka Konsep	44
2.	Pola Pita genotip gen IGF-1 SnaB1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan dengan Riwayat Kelahiran Kembar dan Tunggal	52

DAFTAR LAMPIRAN

No.	<u>Uraian</u>	Hal.
1.	Hasil PCR-RFLP Gen IGF-1 SnaB1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan dengan Riwayat Kelahiran Kembar dan Tunggal	79
2.	Genotip Gen IGF-1 SnaB1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan dengan Riwayat Kelahiran Kembar dan Tunggal	88
3.	Analisa Frekuensi Alel dan Genotip, Heterozigositas dan Keseimbangan Hardy-Weinberg Gen IGF-1 / SnaB1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan dengan Riwayat Kelahiran Kembar dan Tunggal	89
4.	Analisa Hubungan Riwayat Kelahiran Kembar dan Genotip gen IGF-1 / SnaB1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan menggunakan SPSS 17 ^R	91

BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Jumlah penduduk Sulawesi Selatan terus mengalami peningkatan. Berdasarkan data BPS, jumlah penduduk selama 5 tahun terakhir rata-rata meningkat 1,16 % (7.595.000 orang pada tahun 2006 menjadi 8.034.776 orang pada tahun 2010). Selain jumlah penduduk, PDRB Perkapita Sulawesi Selatan juga terus mengalami peningkatan. Data BPS menunjukkan bahwa rata-rata peningkatan PDRB Perkapita Sulawesi Selatan selama 5 tahun terakhir 17,03 % (Rp. 7.920.519,- pada tahun 2007 menjadi Rp. 14.665.035,- pada tahun 2011) (BPS, 2011). Kondisi tersebut mengakibatkan peningkatan permintaan bahan pangan termasuk daging sapi. Namun, pertumbuhan permintaan terhadap daging sapi tersebut tidak diimbangi dengan peningkatan produksi yang memadai. Hal ini dapat dilihat dari pertumbuhan populasi sapi di Sulawesi Selatan selama 5 tahun terakhir hanya 6,65 % (638.524 ekor pada tahun 2006 menjadi 850.893 ekor pada tahun 2010) (BPS, 2011). Akibatnya terjadi ketimpangan permintaan dan ketersediaan daging sapi secara terus-menerus. Jika permasalahan ini tidak segera diselesaikan, maka ketergantungan kita terhadap daging sapi impor akan semakin meningkat.

Sapi Bali merupakan sapi lokal Indonesia yang didomestikasi dari Banteng (*Bos banteng*) (Namikawa *et al.* 1980). Sapi Bali menjadi

primadona sapi potong di Indonesia karena mempunyai kemampuan reproduksi tinggi, serta dapat digunakan sebagai ternak kerja di sawah dan ladang (Putu et al., 1998; Moran, 1990), persentase karkas tinggi, daging tanpa lemak, heterosis positif tinggi pada persilangan (Pane, 1990), daya adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan dan persentase kelahiran dapat mencapai 80 persen (Ngadiyono, 1997; Tanari, 2001).

Berdasarkan keunggulan sifatnya, sapi Bali memiliki potensi untuk dikembangkan guna memenuhi kebutuhan daging dalam negeri. Salah satu cara yang kemungkinan dapat meningkatkan perkembangan sapi Bali dan Bali persilangan yaitu dengan meningkatkan kelahiran kembar. Kelahiran kembar merupakan kejadian langka pada sapi. Namun demikian, banyak masyarakat yang melaporkan adanya kelahiran kembar pada sapi Bali dan Bali persilangan di peternakan mereka. Menurut Rutledge (1975) sapi merupakan hewan ovulasi tunggal, dan frekuensi kelahiran kembar dizigot (bersaudara) berkisar dari kurang dari 1% untuk breed Inggris, 2 sampai 4% untuk breed Kontinental dan lebih dari 4% untuk breed sapi perah. Menurut Echterkamp (2000) dengan seleksi kelahiran kembar, angka kelahiran kembar pada sapi meningkat secara linear dari 4% pada tahun 1984 menjadi 35% pada tahun 1996.

Kelahiran kembar pada sapi kemungkinan dikontrol oleh salah satu atau beberapa gen. Salah satu gen yang layak diduga sebagai kandidat gen penanda yang mempengaruhi kelahiran kembar pada sapi Bali dan Bali persilangan adalah gen IGF-1. IGF-1 dikenal juga sebagai

Somatomedin C, yaitu protein yang dikodekan oleh gen IGF-1. Echtenkamp *et al.*, (1990) mengindikasikan bahwa peningkatan level IGF-1 pada darah peripheral maupun cairan folikel erat hubungannya dengan peristiwa kelahiran kembar yang terjadi secara alami pada sapi. Oleh karena itu, IGF-1 mungkin memainkan peran penting tidak hanya pengaturan pada tahap folikulogenesis tetapi juga genetik pada multiple ovulasi pada sapi. IGF-1 memiliki sejumlah bioaktifitas termasuk regulasi metabolisme dan peningkatan pertumbuhan dan perkembangan jaringan, reproduksi dan sistem kekebalan. Selain itu, IGF-1 juga dapat mempengaruhi proliferasi dan diferensiasi sel granulosa, pertumbuhan folikel pasca melahirkan dan ovulasi pertama dari folikel dominan, perkembangan korpus luteum dan perkembangan embrio praimplantasi.

Pengetahuan gen penanda kelahiran kembar untuk sapi Bali dan Bali persilangan tersebut dapat dimanfaatkan dalam seleksi sapi yang memiliki potensi melahirkan kembar. Sebab seleksi kelahiran kembar secara konvensional pada sapi memerlukan waktu yang sangat panjang dan biaya yang mahal, karena sapi memiliki interval generasi yang cukup panjang. Selain itu, faktor lingkungan juga dapat mempengaruhi ekspresi kelahiran kembar, sehingga dapat mengaburkan dalam proses seleksi. Dengan demikian, mengetahui gen penanda kelahiran kembar pada sapi menjadi sangat penting.

Oleh karena itu, untuk mengetahui apakah gen IGF-1 dapat dijadikan sebagai penanda gen kelahiran kembar pada sapi Bali dan Bali persilangan, maka perlu dilakukan penelitian Identifikasi Polymorphisme Gen IGF-1 pada Sapi Bali dan Bali persilangan Sebagai Kandidat Gen Penanda Kelahiran Kembar.

2. Identifikasi dan Rumusan Masalah

1. Gen IGF-1 SnaB1 pada populasi sapi bersifat polimorphik (Ge, *et al.*, 2001; Siadkowska, *et al.*, 2006; Mehmannaevaz, *et al.*, 2010; Szewczuk, *et al.*, 2012; dan Mirzaei, *et al.*, 2012), tetapi gen IGF-1 SnaB1 pada sapi PO dan FH bersifat monomorphik (Anggraeni dkk., 2010).
2. Frekuensi genotip gen IGF-1 pada sapi dalam keadaan keseimbangan *Hardy-Weinberg* (Siadkowska, *et al.*, 2006; Mehmannaevaz, *et al.*, 2010; Szewczuk, *et al.*, 2012; dan Mirzaei, *et al.*, 2012), tetapi frekuensi genotip gen IGF-1 SnaB1 pada sapi Brangus di Amerika menyimpang dari keseimbangan *Hardy-Weinberg* (Ge, *et al.*, 2001)
3. Terdapat perbedaan genotip gen IGF-1 pada sapi PO melahirkan kembar dan melahirkan tunggal (Kustono, 2010), tetapi Gen IGF-1 SnaB1 pada sapi PO dan FH melahirkan kembar tidak berbeda dengan yang melahirkan tunggal (Anggraeni dkk., 2010)
4. Gen IGF-1 dapat dijadikan sebagai penanda kelahiran kembar pada sapi PO (Kustono, 2010), tetapi gen IGF-1 SnaB1 tidak dapat

dijadikan penanda kelahiran kembar pada sapi PO dan FH (Anggraeni dkk., 2010)

Rumusan masalah :

1. Apakah terdapat polymorphisme pada gen IGF-1 sapi Bali dan sapi Bali persilangan dengan riwayat kelahiran kembar dan tunggal?
2. Apakah gen IGF-1 pada sapi Bali dan Bali persilangan dengan riwayat kelahiran kembar dan tunggal menyimpang keseimbangan *Hardy-Weinberg*?
3. Apakah terdapat perbedaan genotip gen IGF-1 *SnaB1* pada sapi Bali dan Bali persilangan dengan riwayat kelahiran kembar dan tunggal?
4. Apakah gen IGF-1 dapat dijadikan sebagai penanda kelahiran kembar pada sapi Bali dan Bali persilangan?

3. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui adanya polymorphisme gen IGF-1 pada sapi Bali dan sapi Bali persilangan dengan kelahiran kembar dan tunggal,
2. Untuk mengetahui apakah gen IGF-1 *SnaB1* pada sapi Bali dan sapi Bali persilangan dengan riwayat kelahiran kembar dan tunggal menyimpang dari keseimbangan *Hardy-Weinberg*,
3. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan genotip gen IGF-1 pada sapi Bali dan sapi Bali persilangan dengan riwayat kelahiran kembar dan tunggal, dan

4. Untuk mengetahui apakah gen IGF-1 dapat dijadikan sebagai penanda gen kelahiran kembar pada sapi Bali dan sapi Bali persilangan.

4. Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini adalah :

1. Kegunaan teoritis : sebagai pengembangan bidang ilmu peternakan terutama yang berkaitan dengan kelahiran kembar pada ternak sapi.
2. Kegunaan praktis :

- a. Bagi penulis :

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan penulis terhadap ilmu-ilmu peternakan khususnya genetika dan reproduksi ternak dan dapat mengaplikasikannya di lapangan.

- b. Bagi stake holder :

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi tambahan bagi stake holder yang berkepentingan terhadap peningkatan populasi dan produksi daging sapi di Indonesia, sehingga program swasembada daging sapi dapat tercapai yang pada gilirannya dapat meningkatkan pembangunan manusia Indonesia melalui peningkatan konsumsi daging.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Sapi Bali dan Persilangannya

Sapi Bali (*Bibos sondaicus*) yang ada saat ini diduga berasal dari hasil domestikasi Banteng liar (*Bibos banteng*). Menurut Rollinson (1984) proses domestikasi sapi Bali itu terjadi sebelum 3.500 SM di Indonesia atau Indochina. Banteng liar saat ini biasa ditemukan di Jawa bagian Barat dan bagian Timur, di Pulau Kalimantan, serta ditemukan juga di Malaysia. Martojo (2003), menyatakan bahwa bangsa sapi Bali adalah salah satu ras sapi asli yang ada (Aceh, Pesisir, Madura, Jawa dan Bali) di Indonesia. Meskipun tidak ada catatan sejarah resmi tersedia, secara umum diterima bahwa sapi Bali adalah keturunan langsung domestikasi dari Banteng liar (*Bos sondaicus*, *Bos javanicus*, *Bos bantinger*) masih bertahan sebagai spesies terancam punah dalam tiga Reservasi Alam Taman Nasional (Ujung Kulon, Baluran dan Blambangan) di Jawa.

Ditinjau dari sistematika ternak, sapi Bali masuk familia *Bovidae*, Genus *bos* dan Sub-Genus *Bovine*, yang termasuk dalam sub-genus tersebut adalah *Bibos gaurus*, *Bibos frontalis* dan *Bibos sondaicus*. Sapi Bali mempunyai ciri-ciri khusus antara lain: warna bulu merah bata, tetapi yang jantan dewasa berubah menjadi hitam. Karakteristik lain yang harus dipenuhi dari ternak sapi Bali murni, yaitu warna putih pada bagian belakang paha, pinggiran bibir atas, dan pada paha kaki bawah mulai

tarsus dan carpus sampai batas pinggir atas kuku, bulu pada ujung ekor hitam, bulu pada bagian dalam telinga putih, terdapat garis hitam yang jelas pada bagian atas punggung, bentuk tanduk pada jantan yang paling ideal disebut bentuk tanduk silak congklok yaitu jalannya pertumbuhan tanduk mula-mula dari dasar sedikit keluar lalu membengkok ke atas, kemudian pada ujungnya membengkok sedikit keluar. Pada yang betina bentuk tanduk yang ideal yang disebut manggul gangsa yaitu jalannya pertumbuhan tanduk satu garis dengan dahi arah ke belakang sedikit melengkung ke bawah dan pada ujungnya sedikit mengarah ke bawah dan ke dalam, tanduk ini berwarna hitam (Hardjosubroto, 1994).

Penampilan reproduksi sapi Bali yaitu nilai *service per conception* 1,22 (Davendra *et al.*, 1973), antara 1-2 (Lubis dan Sitepu, 1998), Lama kebuntingan sekitar $287 \pm 0,7$ hari (Davendra *et al.*, 1973), 286 ± 15 hari (Darmadja dan Sutedja, 1976), 9,55 bulan (Pastika dan Darmadja, 1976), dan antara 276-295 hari (Lubis dan Sitepu, 1998). Sapi Bali beranak pertama pada umur antara 29-39 bulan, rataan panen anak 60% dan jarak beranak berkisar antara 14-19 bulan (Liwa, 1990). Kemudian rata-rata kembali birahi setelah beranak (*estrus postpartus*) antara 106-165 hari (Lubis dan Sitepu, 1998); Sedangkan jarak beranak (*calving interval*) dilaporkan antara 15,48-16,28 bulan atau $15,88 \pm 0,4$ bulan (Davendra *et al.*, 1973), antara 373-683 hari atau 528 ± 155 hari (Darmadja dan Sutedja, 1976), dan antara 351-440 hari (Lubis dan Sitepu, 1998). Jarak beranak yang ideal adalah 12 bulan (Bozwort *et al.*, 1971), atau antara 12-14 bulan

(Jainudeen dan Hafez, 1987). Rataan produksi susu sapi Bali 1,8 liter per hari selama 4 bulan sesudah beranak dan rataan produksi susu selama masa laktasi 10 bulan adalah 1,1 liter per hari. Produksi susu tertinggi terjadi pada induk laktasi ketiga dan keempat. Bobot badan anak sapi sangat dipengaruhi oleh umur dan produksi susu induk serta jenis kelamin anak (Liwa, 1990).

Rata-rata berat sapih dan Pertambahan Berat Badan (PBB) sapi Bali lebih rendah dari bangsa sapi Brahman persilangan. Berat sapih sapi Bali 87,46 kg lebih rendah dari sapi Brahman persilangan 150,14 kg. pertambahan berat badan sapi Bali 0,50 kg/hr, lebih rendah dari sapi Brahman persilangan 0,72 kg/hr (Rahim, 2005).

B. Sistem Reproduksi Sapi Betina

Sistem reproduksi hewan betina yang telah mengalami dewasa kelamin biasanya mengalami perubahan-perubahan secara teratur yang disebut dengan siklus estrus. Lamanya siklus estrus dari seekor hewan dihitung dari munculnya estrus, sampai munculnya estrus lagi pada periode berikutnya (Feradis, 2010). Siklus estrus dibagi menjadi beberapa fase yang dapat dibedakan dengan jelas yang disebut proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (Frandsen, 1996).

Periode proestrus dimulai dari saat beregresinya korpus luteum sampai hewan benar-benar estrus (Feradis, 2010). Pada periode proestrus, di bawah stimulasi FSH (*follicle Stimulating Hormone*) dari adenohipofisis pituitary, dan LH (*Luteinizing Hormone*) ovarium

meningkatkan produksi estrogen, yang menyebabkan meningkatnya perkembangan uterus, vagina, oviduk dan folikel ovarium (Frandsen, 1996).

Estrus adalah periode penerimaan seksual pada hewan betina, yang terutama ditentukan oleh tingkat sirkulasi estrogen. Selama atau segera setelah periode itu, terjadilah ovulasi. Ini terjadi dengan penurunan tingkat FSH dalam darah dan peningkatan level LH. Sesaat sebelum ovulasi, folikel membesar dan 'turgid', dan ovum yang ada di situ mengalami pematangan. Estrus berakhir kira-kira pada saat pecahnya folikel ovarium, atau terjadinya ovulasi. Pada saat tersebut ovum dilepaskan dari folikel menuju ke bagian atas tuba uterum (Frandsen, 1996).

Periode metestrus adalah fase pasca ovulasi di mana korpus luteum berfungsi. Panjangnya metestrus dapat tergantung pada panjangnya waktu LTH (*Luteotrophic hormone*) disekresikan oleh adenohipofisis. Selama metestrus, rongga yang ditinggalkan oleh pemecahan folikel, mulai teratur kembali (Frandsen, 1996). Dibagian bekas ovum yang berovulasi bertumbuh dengan cepat membentuk korpus luteum di bawah pengaruh LH (*Luteinizing Hormone*) dari adenohypophysis. Korpus luteum yang terbentuk menghasilkan progesteron, yang menghambat sekresi FSH (*Follicle Stimulating Hormone*). Akibatnya pematangan folikel tertier menjadi folikel de graaf terhenti (Feradis, 2010).

Periode diestrus dimulai hari kelima pada sapi, pada periode ini korpus luteum sudah berfungsi sepenuhnya. Sudah terlihat pengaruh progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum, yang menyebabkan terjadinya perubahan pada saluran reproduksi (Feradis, 2010). Korpus luteum yang telah berkembang dengan sempurna memberikan pengaruh yang menonjol pada uterus. Selaput endometrium yang melapisi uterus menebal, kelenjar uterin membesar, dan otot uterin juga menunjukkan peningkatan perkembangan. Semua reaksi diarahkan pada usaha mensuplai zat-zat makanan untuk embrio. Jika terjadi kebuntingan, keadaan tersebut akan berlangsung selama masa kebuntingan itu, dan korpus luteum akan tetap ada pada sepanjang atau sebagian besar periode itu. Apabila ovum tidak dibuahi, korpus luteum akan mengalami regresi (Frandsen, 1996).

Sel telur atau ovum (jamak : ova) adalah suatu sel khas yang mampu dibuahi dan selanjutnya dapat menjalani perkembangan embrional. Hampir semua ternak mamalia yang jauh lebih kecil dari pada telur unggas karena pertukaran zat-zat makanan dapat berlangsung secara efisien di dalam uterus. Pengadaan ovum terjadi di dalam ovarium dan meliputi pembentukan ova atau oogenesis atau ovogenesis, pembentukan folikel atau folliculogenesis dan pelepasan sel telur atau ovulasi (Feradis, 2010).

Oogenesis adalah transformasi atau perubahan bentuk dari oogonia menjadi bentuk oosit. Pada semua ternak mamalia proses

oogenesis berakhir sebelum atau segera setelah partus (Feradis, 2010). Pertumbuhan oosit terbagi atas dua fase. Selama fase pertama oosit bertumbuh cepat dan erat hubungannya dengan perkembangan folikel ovarium. Ukuran dewasanya tercapai kira-kira pada waktu pertumbuhan antrum dimulai di dalam folikel. Selama fase kedua oosit tidak bertambah besar, sedangkan folikel ovarium yang berespon terhadap hormon hypophysis sangat bertambah besar diameternya (Toelihere, 1985).

Selama fase terakhir pertumbuhan folikel, oosit mengalami pematangan. Nukleus yang telah memasuki profase pembelahan meiosis selama pertumbuhan oosit siap-siap untuk menjalani pembelahan reduksi. Kromosom dalam pasangan-pasangan diploid dibebaskan ke dalam sitoplasma dan tersusun pada dataran katulistiwa *spindle* (metaphase I). Oosit primer kini menjalani pembelahan meiosis. Pada pembelahan pertama dua anak sel terbentuk, masing-masing mengandung setengah jumlah kromosom. Akan tetapi, satu anak sel akan mengambil hampir semua sitoplasma. Sel ini disebut oosit sekunder; anak sel lain yang lebih kecil disebut badan kutub (*polar body*). Pada pembelahan sel kedua, oosit sekunder membagi diri menjadi ootid (n) dan badan kutub kedua (n). Kedua badan kutub tersebut yang mengandung sedikit sekali sitoplasma terperangkap di dalam zona pellucida dan mengalami degenerasi. Badan kutub pertama dapat pula membagi diri sehingga zona pellucida dapat berisi satu, dua atau tiga badan kutub (Feradis, 2010).

Menjelang kelahiran, semua oosit primer telah selesai pada tahap profase pembelahan meiosis pertama, tetapi tidak memasuki tahap metafase melainkan akan mengalami masa istirahat pada tahap diploten (diktioten), suatu tahap istirahat selama tahap profase (meiosis I) yang ditandai oleh adanya jalinan halus kromatin. Pada tahap diploten, membran inti masih utuh dan nukleolus tampak jelas yang dikenal dengan tahap *germinal vesicle* (GV). Oosit primer tetap dalam tahap profase dan tidak menyelesaikan pembelahan meiosis pertamanya sebelum mencapai masa pubertas (Djuwita, 2000 dalam Kurniati dkk, 2006).

Jumlah oosit yang terkandung di dalam ovarium pada seekor sapi sangat bervariasi dan berkisar antara 0 (kemandulan sempurna) sampai 700.000. jumlah tersebut relatif stabil sekitar 140.000 sampai sapi mencapai umur 4 sampai 6 tahun dan kemudian menurun secara cepat sampai 25.000 pada umur 10 sampai 14 tahun dan mendekati 0 pada umur 20 tahun. Dari umur 60 hari sesudah lahir sampai umur 10 sampai 14 tahun jumlah folikel yang bertumbuh pada setiap ekor sapi adalah rata-rata 150 sampai 250 dan jumlah folikel vesikuler 25 sampai 30. Pada sapi berumur lebih dari 15 tahun jumlah tersebut masing-masing menjadi 70 dan 12 (Feradis, 2010).

Pertumbuhan dan perkembangan folikel mencapai puncaknya dalam bentuk folikel *de Graaf* yang matang dan terjadinya ovulasi hanya berlangsung hanya pada hewan-hewan yang tidak bunting setelah pubertas selama suatu siklus reproduksi. Tanpa folikel *de Graaf* tanda-

tanda estrus tidak akan terlihat, ova tidak dapat dibebaskan dan korpus luteum tidak akan terbentuk. Pertumbuhan folikel-folikel primer yang hanya dikelilingi oleh suatu lapis sel-sel epitel yang berkembang menjadi folikel-folikel vesikular atau folikel yang mengandung antrum yang disebut folikel de Graaf (Feradis, 2010).

Pada saat permulaan pematangan folikel, oosit berada di dalam suatu massa sel-sel epitel yang bertaut pada lapisan granulosa. Ovum dan sel-sel granulosa sekitarnya membentuk cumulus *oophorus*. Di antara sel-sel cumulus dan oocyt terdapat *corona radiata*, suatu lapisan sel-sel kompak mengelilingi zona pellucida yang membentangkan penonjolan-penonjolan sitoplasma melalui zona pellucida ke dalam membran vitelin untuk memberi makanan bagi oocyt untuk kehidupan dan pertumbuhannya. Sewaktu folikel mendekati pematangan dan ovulasi, cumulus oovorus terpisah dari membran granulosa dan terapung bebas dalam cairan folikuler atau lebih sering lagi tetap bertaut secara longgar. Folikel akan tumbuh ke permukaan ovarium bertepatan dengan terbentuknya lapisan-lapisan theca. Ovulasi dapat terjadi pada seluruh permukaan ovarium (Toelihere, 1985).

Ovulasi terjadi melalui suatu proses penipisan, umumnya avaskularisasi dan pemecahan, dengan sedikit pendarahan, dari bagian luar dinding folikel dan peritoneum. Ovum dengan sel-sel cumulus yang membungkusnya tercuci keluar oleh cairan folikuler yang terlepas sedikit

demi sedikit dan tertangkap atau dialihkan ke dalam ujung fimbria dari tuba fallopii, dimana pembuahan berlangsung (Toelihere, 1985).

Ovulasi terjadi dibawah pengaruh endokrin. Atas rangsangan FSH dari adenohipofisis sejumlah folikel vesikuler mulai berkembang. Sementara folikel-folikel ini berkembang, sejumlah estrogen yang makin banyak dihasilkan oleh theca interna dan diabsorpsi ke dalam sirkulasi tubuh dan juga ke dalam cairan folikel. Pada tubuh, estrogen menyebabkan perubahan-perubahan yang khas yang terlihat pada saluran reproduksi sewaktu proestrus dan estrus. Estrogen juga menimbulkan gejala-gejala khas dan manifestasi estrus memulai kerjanya pada susunan syaraf pusat. Pelepasan LH dari adenohipofisis penting untuk menyebabkan ovulasi folikel de Graaf yang sudah matang (Feradis, 2010).

Dinamika folikel ovaria pada sapi terjadi dalam bentuk gelombang-gelombang perkembangan folikel. Suatu gelombang perkembangan folikel meliputi pertumbuhan serentak sekelompok folikel, satu diantaranya akan menjadi folikel dominan, mencapai ukuran terbesar, serta akan menekan perkembangan folikel-folikel lain yang lebih kecil (Pierson *et al.*, 1988). Pemeriksaan ultrasonografi *transrektum* dari folikel memperlihatkan bahwa kebanyakan siklus estrus pada sapi mempunyai dua gelombang (Fortune, 1993 dan Garcia *et al.*, 1999) atau tiga gelombang (Gintber *et al.*, 2001) perkembangan folikel dominan. Suatu folikel dominan dalam perkembangannya sampai mencapai diameter

terbesar, berkembang secara linier selama kurang lebih 6 hari, dalam ukuran yang relatif sama selama 6 hari, kemudian akan mengalami regresi, ditunjukkan dengan pengecilan diameter antrum folikel. Gelombang perkembangan folikel dapat diikuti dengan pemeriksaan ultrasonografi mulai ukuran folikel pertama 4-5 mm pada hari 0 dan 10 untuk 2 gelombang dan hari 0, 9 dan 16 untuk 3 gelombang perkembangan folikel dominan (Ginther *et al.*, 2001 dan Jaiswal *et al.*, 2004).

C. Kelahiran Kembar pada Sapi

Sapi pada dasarnya adalah spesies monoovulatori dan monotokus, yang berarti bahwa pada kebanyakan kondisi, satu kebuntingan menghasilkan kelahiran satu anak. Meskipun demikian, terkadang proses reproduksi pada sapi, seperti kebanyakan spesies monotokus lainnya, menghasilkan kelahiran kembar (Gilmore, 1952; Rutledge, 1975). Pada beberapa sistem produksi sapi pedaging, kelahiran kembar dianggap sebagai sifat yang diinginkan yang dapat meningkatkan keuntungan keseluruhan produksi usaha dengan peningkatan berat produksi anak yang disapih per induk (Rose and Wilton, 1991, Martinez, *et al.*, 1990). Sebaliknya, kelahiran kembar pada sapi perah adalah sifat yang tidak diinginkan yang menurunkan keuntungan keseluruhan pada operasional sapi perah melalui efek negatif pada sapi yang melahirkan kembar serta pada anak yang lahir kembar (Fricke, 2000).

Kelahiran kembar pada sapi dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis: kelahiran kembar monozigot dan kelahiran kembar dizigot. Setiap folikel ovarium mengandung oosit tunggal atau telur yang dikeluarkan dari folikel ke dalam saluran telur setelah ovulasi, di mana ia menunggu pembuahan. Sebuah zigot adalah sel tunggal yang terbentuk setelah oosit yang dibuahi oleh sperma. Dengan demikian, kembar yang muncul dari pembuahan satu oosit yang kemudian membelah dan membentuk dua embrio selama perkembangan di dalam uterus ini disebut kembar monozigot, sedangkan kembar yang muncul dari pembuahan dua oosit selama siklus estrus yang sama ini disebut kembar dizigot (Fricke, 2000).

Kelahiran kembar relatif jarang terjadi, dengan frekuensi umumnya tidak lebih dari 1% pada sebagian besar ternak sapi, di mana seleksi pada sifat ini belum dipraktekkan (Rutledge 1975). Pada peternakan sapi perah, kejadian kelahiran kembar lebih tinggi (rata-rata 4-5%), dan sangat dipengaruhi oleh umur dan paritas induk, mulai dari sekitar 1% untuk heifer menjadi hampir 10% pada sapi yang lebih tua (Berry *et al.*, 1994).

Tingkat kelahiran kembar sangat erat kaitannya dengan tingkat ovulasi. Mayoritas sapi kembar adalah dari jenis dizigot, hasil dari ovulasi dan pembuahan dua oosit. Kembar dizigot lebih mirip dengan saudara kandung dengan orang tua yang sama yang lahir selama kehamilan berbeda, dan dapat dari jenis kelamin yang sama atau berlawanan. Dalam situasi yang terakhir, efek freemartin sering terjadi. Kembar monozigot, kembar yang identik secara genetik, dikarenakan pembelahan embrio

secara spontan, yang diperkirakan jumlahnya kurang dari 10% dari semua kelahiran kembar (Cady and Vleck, 1978, Erb and Morrison, 1959, Johanssen *et al.*, 1974).

Kelahiran kembar dizigot menyumbang sebagian besar kelahiran kembar pada sapi perah (Erb and Morrison, 1959; Johanssen, *at al.*, 1974., Ryan and Boland, 1991). Dengan demikian, kelahiran kembar dan tingkat ovulasi pada sapi merupakan sifat sangat berhubungan (Morris and Day, 1986; Vleck, *et al.*, 1991), kejadian ovulasi ganda yang dilaporkan pada populasi sapi perah 14% (Fricke, *et al.*, 1998., Fricke and Wiltbank, 1999.). Kembar Dizigot bisa sama atau berlawanan jenis kelamin dan tidak lebih sama fenotipik atau genetiknya dari saudara dari pejantan dan induk sama yang lahir pada kehamilan berbeda. Karena kembar dizigot timbul dari ovulasi dua folikel selama siklus estrus, Memahami sifat kelahiran kembar dizigot membutuhkan pemahaman tentang dinamika folikel pada sapi dan mekanisme dimana folikel tunggal dipilih untuk ovulasi saat estrus (Fricke, 2000).

Dalam situasi yang jarang terjadi, munculnya dua folikel bersamaan terjadi dan keduanya terseleksi untuk menggantikan folikel dominan di antara folikel dalam gelombang folikular. Pada akhirnya dua oosit dilovulasikan dari folikel co-dominan pada akhir ovulasi baik oleh stimulasi alami atau induksi buatan. Oleh karena itu, kembar, atau kembar tiga jarang terjadi, akan menjadi kenyataan bila semua kejadian terjadi secara normal sampai fertilisasi dari kedua oosit sampai kelahiran. Ovulasi dua

folikel terjadi baik dari ovarium yang sama atau masing-masing folikel dari ovarium yang berbeda (Wiltbank *at al.*, 2000). Produksi secara simultan dua oosit dari folikel berbeda juga diamati yang dibuktikan dengan adanya dua CL pada ovarium sapi terseleksi untuk kembar pada USDA- Meat Animal Research Center (MARC) di Nebraska (Echternkamp *at al.*, 1990). Penelitian tentang perkembangan folikel selama siklus estrus pada sapi lahir kembar mengindikasikan bahwa ovulasi ganda atau tiga terjadi secara simultan dari ovulasi folikel berbeda pada gelombang folikel sama dibanding ovulasi tunggal folikel dewasa dari dua gelombang berurutan (Echternkamp, 2000). Selain itu, hormon pertumbuhan dan perlakuan nutrisi sangat mempengaruhi respon *multiple* ovulasi pada individu (Webb and Armstrong, 1998). del Rio *et al.*, (2009) menunjukkan bahwa kista pada ovarium dan kurangnya CL mungkin meningkatkan kejadian ovulasi ganda selama kebuntingan. Ovulasi dua folikel juga secara simultan disebabkan peningkatan hari laktasi di antara ternak bunting.

Kembar akibat ovulasi dan fertilisasi oosit tunggal disebut anak kembar monozigot. Kembar Monozigot secara genetik dan fenotipik identik, dan oleh sebab itu selalu dari jenis kelamin yang sama. Mekanisme terjadinya kembar monozigot belum dimengerti dengan jelas, tapi kembar monozigot dapat dianggap sebagai kloning alami dari zigot asli secara *in vivo*. Meskipun perkiraan matematika tingkat kelahiran kembar monozigot pada ternak sapi perah berkisar dari 7,4% (Erb and Morrison. 1959) sampai 13,6% (Ryan and Boland, 1991) dari semua

kelahiran kembar atau kurang dari 0,3% dari semua kelahiran, perkiraan ini terlihat tinggi mengingat frekuensi ovulasi ganda (yang akan menghasilkan kembar dizigot) pada populasi sapi perah (Fricke and Wiltbank, 1999; Ryan and Boland, 1991). Dengan demikian, kelahiran kembar monozigot jarang terjadi pada sapi dan mungkin perhitungan untuk kelahiran kembar relatif sedikit pada populasi sapi perah.

Kelahiran kembar pada sapi dapat meningkat sampai periode umur 10 tahun, dan peningkatan terbesar diamati antara paritas pertama dan kedua (Berry *et al.*, 1994; Cady and Van Vleck 1978, Kinsel *et al.*, 1998, Nielen *at al.*, 1989 , Ryan, Boland 1991). Kelahiran kembar juga sedikit dipengaruhi oleh efek musiman, dengan kecenderungan menuju kelahiran lebih banyak selama musim semi (Cady and Van Vleck 1978, Karlsen *et al.*, 2000) atau musim gugur (Gregory *et al.*, 1990). Sifat efek musiman, meskipun tidak pasti, diduga berhubungan dengan perubahan suhu, lamanya siang hari atau pakan pada saat pembuahan (Fricke, 2000).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kelahiran kembar pada sapi yaitu :

1. **Genetika.** Seleksi genetik untuk kelahiran kembar pada sapi telah dibuktikan melalui eksperimen jangka panjang yang dilakukan di USDA Meat Animal Research Center (MARC) di Clay Center, Nebraska. Seleksi genetik ternak berdasarkan kelahiran kembar dan kemudian dikombinasikan dengan tingkat ovulasi kelahiran kembar meningkatkan dari 4% pada tahun 1984 menjadi 31% pada tahun

1995 (Gregory *et al.*, 1997). Pada 1997, lebih dari 35% dari semua kelahiran ternak percobaan menghasilkan kembar (Echternkamp *and* Gregory, 1999).

2. **Tingkat Ovulasi.** Kelahiran kembar dan tingkat ovulasi ternak merupakan sifat yang sangat terkait (Morris and Day, 1986; Ryan and Boland, 1991). Kejadian ovulasi ganda pada sapi perah laktasi adalah sekitar 14% (Fricke *et al.*, 1998; Fricke and Wiltbank, 1999), sebagaimana kejadian kelahiran kembar, meningkat dengan paritas (Fricke and Wiltbank, 1999, Labhsetwar *et al.*, 1963). Beberapa penelitian telah meneliti faktor yang mempengaruhi ovulasi ganda ternak sapi perah, namun produksi susu tinggi mendekati waktu ovulasi telah dikaitkan dengan frekuensi yang lebih besar dari ovulasi ganda (Fricke and Wiltbank, 1999). Kinsel *et al.*, 1998 berspekulasi bahwa pola pakan energi tinggi untuk memberi pakan sapi produksi tinggi dapat meningkatkan kejadian ovulasi ganda dan dengan demikian juga meningkatkan angka kelahiran kembar ternak sapi perah. Meskipun pengaruh nutrisi mungkin mirip dengan praktek "*flushing*" pada induk domba (Dunn and Moss, 1992), mekanisme ini belum dapat dijadikan dasar untuk kelahiran kembar pada sapi perah (Fricke, 2000).
3. **Breed.** Secara umum, tingkat kelahiran kembar untuk sebagian besar breed sapi potong adalah kurang dari 1% (Rutledge, 1975). Sebaliknya, perkiraan epidemiologi kelahiran kembar pada populasi

sapi perah lebih besar dari pada sapi potong dan kisaran 2,5 - 5,8% (Nielen *at al.*, 1989). Johansson *et al.* (1974) menemukan rata-rata frekuensi kelahiran kembar 1,9% pada sapi perah, dan 0,45% pada bangsa sapi pedaging Finlandia dan Swedia, yang dapat dijelaskan sebagian dengan sumber data yang berbeda. Hendy *and* Bowman (1970) menghitung frekuensi kelahiran kembar masing-masing 0,41 dan 0,45% pada bangsa American Hereford dan Aberdeen-Angus. Lush (1925) bekerja dengan sapi Holstein pada Stasiun Percobaan Kansas dan melaporkan bahwa frekuensi kelahiran kembar pada jenis Holstein (8,84%) lima kali lebih tinggi dari sapi perah lainnya. Hewitt (1934) melakukan studi dengan breed red Poll; 26 dari 1260 kelahiran tercatat sebagai kembar, yang merupakan 2,5%. Enam dari 200 kelahiran Friesian juga tercatat sebagai kelahiran kembar (3%). Rutledge (1975) memperkirakan tingkat kelahiran kembar adalah 0,4 sampai 1,1% untuk bangsa sapi pedaging seperti Angus, Hereford, dan Shorthorn dan 1,3 sampai 8,9% untuk bangsa sapi perah, seperti Holstein, Jersey, dan Brown Swiss. Sedangkan frekuensi tingkat kelahiran kembar dilaporkan sebaliknya untuk bangsa sapi pedaging, tingkat kelahiran kembar untuk Charolais diperkirakan sedikitnya 2% lebih tinggi dibanding bangsa sapi pedaging tradisional Inggris oleh Johansson *et al.* (1974). Secara umum, tingkat kelahiran kembar ditemukan lebih tinggi pada bangsa sapi perah dari pada sapi potong (Hendy *and* Bowman, 1970). Juga, breed sapi berukuran kecil

cenderung memiliki anak kembar pada frekuensi yang lebih rendah (Rutledge, 1975).

4. **Paritas.** Kelahiran kembar pada sapi perah meningkat dengan paritas, mulai dari 1% untuk paritas pertama hingga hampir 10% untuk paritas selanjutnya. Peningkatan terbesar dalam kelahiran kembar terjadi antara paritas 1 (misalnya, dara Heifers) dan paritas 2; kelahiran kembar terus meningkat untuk paritas selanjutnya tetapi pada tingkat yang lebih rendah. Pengaruh paritas pada kelahiran kembar tidak dimengerti dengan jelas tetapi dapat dijelaskan dengan kemampuan peningkatan sapi tua untuk mendukung anak kembar selama kebuntingan, peningkatan kejadian ovulasi ganda, atau interaksi antara faktor-faktor ini. Meskipun kapasitas peningkatan uterus sapi melahirkan kembar telah dilaporkan (Ryan and Boland. 1991), beberapa penelitian mendukung peningkatan tingkat ovulasi sebagai faktor utama yang menjelaskan efek dari paritas pada kelahiran kembar. Karena kelahiran kembar monozigot tampaknya menjadi independen dari paritas, pengaruh paritas memungkinkan menghasilkan kelahiran kembar pada peningkatan frekuensi kelahiran kembar dizigot (Johanssen *at al*, 1974), dan dengan demikian juga pada kejadian ovulasi ganda. Sesungguhnya, kejadian ovulasi ganda meningkat dengan paritas pada sapi perah laktasi (Fricke and Wiltbank. 1999; Labhsetwar *at al.*, 1963).

5. **Produksi susu.** Terdapat sebuah hubungan positif antara produksi susu dan kelahiran kembar pada sapi perah (Kinsel *at al.*, 1998, Nielen *at al.*, 1989), tetapi penelitian lain menunjukkan bahwa tidak ada hubungan antara produksi susu dan kelahiran kembar (Deluyker *at al.*, 1991, Kay, 1984). Efek dari produksi susu telah dilaporkan untuk membandingkan induk mengandung atau melahirkan anak kembar dengan induk yang tidak melahirkan kembar dalam sebuah peternakan. Sapi melahirkan kembar menghasilkan susu lebih sedikit selama laktasi berikutnya dibandingkan dengan sapi melahirkan tunggal (Nielen *at al.*, 1989). Penurunan produksi susu mungkin akibat dari peningkatan kejadian gangguan metabolisme yang dialami oleh sapi melahirkan kembar pada tahap awal laktasi. Sebaliknya, produksi susu pada 100 hari pertama laktasi lebih besar pada sapi mengandung fetus kembar dibandingkan dengan sapi yang mengandung tunggal, namun, ada perbedaan dalam produksi susu terdeteksi pada periode laktasi selanjutnya (Nielen *at al.*, 1989). Demikian pula, sapi melahirkan kembar menghasilkan susu 2,7 kg lebih tinggi pada puncak produksi dari sapi melahirkan tunggal, meskipun total produksi untuk laktasi tidak berbeda antar kelompok (Kinsel *at al.*, 1998). Kinsel *at al.*, 1998 menyimpulkan bahwa penyumbang terbesar untuk peningkatan kelahiran kembar selama periode 10-tahun (1983 sampai 1993) adalah peningkatan puncak produksi susu selama periode tersebut. Meskipun hubungan langsung

antara kejadian ovulasi ganda dan kelahiran kembar tidak jelas, sapi dengan produksi susu lebih dari rata-rata menjelang waktu Inseminasi Buatan (IB) setelah sinkronisasi ovulasi menunjukkan kejadian tiga kali lebih besar ovulasi ganda dibanding dengan sapi produksi susu kurang dari rata-rata.

6. **Musim.** Meskipun banyak penelitian telah menunjukkan efek musiman terhadap kejadian kelahiran kembar, yang lain telah gagal untuk menunjukkan suatu kecenderungan (Hendy *and* Bowman, 1970). Sebagai contoh, peningkatan musiman pada kelahiran kembar telah dilaporkan terjadi dari bulan April sampai September di Belanda (Nielen *at al.*, 1989) dan dari bulan Mei sampai Juni di Arab Saudi (Ryan *and* Boland, 1991), sedangkan penelitian terhadap sapi perah di Amerika Utara tidak menunjukkan adanya efek musiman (Kinsel *at al.*, 1998). Meskipun saat ini spekulatif, kecenderungan kelahiran kembar meningkat selama musim panas yang dikaitkan dengan sebuah program peningkatan gizi selama musim gugur ketika kelahiran sapi yang dikandung selama musim panas, sebuah penurunan cahaya matahari, atau penurunan langsung tahap awal embrio hidup yang dikandung selama bulan musim panas dibandingkan dengan mereka yang dikandung selama bulan musim gugur lebih dingin (Cady *and* Van Vleck. 1978; Nielen *at al.*, 1998).

Sebagian besar literatur awal melaporkan satu pesimisme secara langsung dari pada optimisme untuk keberhasilan seleksi untuk

mengubah secara nyata kelahiran kembar pada sapi (Rutledge, 1975). Seperti banyak ciri-ciri reproduksi lainnya, heritabilitas, repitabilitas dan variasi dari sifat kelahiran kembar rendah. Estimasi heritabilitas untuk kelahiran kembar pada sapi adalah sekitar 0,10 (Van Vleck and Gregory, 1996; Gregory *et al.*, 1997; Karlsen *et al.*, 2000). Tingkat ovulasi adalah sifat yang erat kaitannya dengan kelahiran kembar, ketika dipandang sebagai pengamatan tunggal, juga memiliki heritabilitas rendah 0,07-0,11 (Echternkamp *et al.*, 1990; Van Vleck and Gregory 1996, Gregory *et al.* 1997). Namun, ketika multiple oestrous dipertimbangkan, heritabilitasnya jauh lebih tinggi. Selama delapan siklus oestrous, heritabilitas naik ke 0,34-0,38 (Echternkamp *et al.*, 1990, Gregory *et al.*, 1997). Korelasi genetik antara kembar dan tingkat ovulasi berkisar dari 0,75 sampai hampir 1,0 (Gregory *et al.* 1997; Van Vleck *et al.*, 1991). Oleh karena rata-rata tingkat ovulasi heritabilitasnya sedang sampai tinggi ($h^2 = 0,35$) pengukuran repitabilitas tingkat ovulasi efektif sebagai kriteria seleksi langsung terhadap tingkat kelahiran kembar (Gregory *et al.*, 1997).

D. Insulin-like Growth Faktor 1 (IGF-1)

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) adalah peptida kecil dari 70 asam amino dengan massa molekul 7649 Da (Laron, 2001) yang muncul pada tahap sangat awal dalam evolusi vertebrata dari gen insulin-jenis tetuanya (Chang *et al.* 1990). IGF-1 pertama kali diidentifikasi pada tahun 1950 dan bernama sulphation faktor (Salmon dan Daughaday 1957). IGF-1 juga dikenal sebagai non-insulin-suppressible (Froesch *et al.* 1963) dan

somatomedin C (Daughaday *et al.* 1972). Nama IGF-1 diadopsi pada tahun 1970 karena kesamaan struktur dengan insulin dan mempromosikan kegiatan pertumbuhan (Rinderknecht dan Humbel 1976).

IGF-1 dan IGF-2 diatur oleh keluarga protein yang dikenal sebagai IGF-*Binding* Protein. Protein ini membantu untuk memodulasi kerja IGF dengan cara yang rumit yang melibatkan tindakan IGF menghambat dengan mencegah mengikat reseptor IGF-1 serta mempromosikan tindakan IGF dengan membantu dalam pengiriman ke reseptor dan meningkatkan waktu paruh IGF. Saat ini, ada 6 IGF-*Binding* Protein yang telah ditandai (IGFBP1-6). Saat ini data yang signifikan menunjukkan bahwa IGFBPs memainkan peran penting selain kemampuan mereka untuk mengatur IGFs (Anonim³, 2012).

Insulin like growth factors (IGFs) memiliki struktur dan fungsi yang sama seperti insulin, dan dapat dibagi menjadi IGF-1 dan IGF-2, yang keduanya mengarahkan tindakan biologis pada perkembangan embrio dan pertumbuhan (Pankov, 1999; Thrailkill, 2000). IGF-1 adalah salah satu dari dua ligan dari sistem IGF. Sistem IGF juga mencakup dua reseptor, enam afinitas tinggi IGF *binding* protein (IGFBPs) dan protease IGFBP (Hwa *et al.*, 1999). IGF-1 mengarahkan dampaknya pada proliferasi sel, diferensiasi, dan kelangsungan hidup melalui reseptor sendiri (Benito *et al.*, 1996; Vincent and Feldman, 2002).

Pada vertebrata, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) atau gen somatomedin memainkan peran kunci dalam berbagai proses fisiologis

dan metabolisme, di mana IGF-1 dan hormon pertumbuhan atau somatotrophin terlibat dalam poros somatotropik. IGF-1 adalah mediator berbagai pengaruh biologi, misalnya, meningkatkan penyerapan glukosa, merangsang myogenesis, menghambat apoptosis, berpartisipasi dalam aktivasi genetik siklus sel, meningkatkan sintesis lipid, merangsang produksi progesteron dalam sel granular, dan intervensi dalam sintesis DNA, protein, RNA, dan dalam proliferasi sel (Etherton, 2004). IGF-1 telah terbukti untuk meningkatkan tingkat dan jangkauan perbaikan otot setelah cedera dan meningkatkan laju pertumbuhan otot dari pelatihan (Anonim¹, 2012).

IGF-1 terutama diproduksi oleh hati sebagai hormon endokrin, serta dalam jaringan target parakrin / otokrin. Produksi IGF-1 dirangsang oleh hormon pertumbuhan (GH) dan dapat dihambat oleh kekurangan gizi, ketidakpekaan hormon pertumbuhan, kurangnya reseptor hormon pertumbuhan, atau kegagalan jalur sinyal pasca reseptor GH hilir, termasuk SHP2 dan STAT5B. Sekitar 98% dari IGF-1 selalu terikat ke salah satu dari 6 protein pengikat (IGF-BP). IGFBP 3 merupakan protein yang paling banyak dan menyumbang 80% dari semua pengikat IGF. IGF-1 mengikat ke IGFBP 3 dalam molar rasio 1:1 (Anonim², 2012).

Konsentrasi plasma insulin-like growth factor 1 (IGF-1) dapat digunakan sebagai alat untuk meningkatkan kesuburan sapi (Moyes, 2004). Plasma IGF-1 terkait dengan kinerja reproduksi sapi perah karena hubungannya dengan partisi nutrisi di antara fungsi-fungsi biologis

(Bauman dan Currie, 1980) dan stimulasinya langsung mempengaruhi pada ovarium (Spicer *et al.* 1993). IGF-1 merangsang proliferasi sel granulosa ovarium dan mitogenesis, meningkatkan steroidogenesis oleh sel granulosa, dan merangsang produksi progesteron (Spicer *et al.*, 1993).

Konsentrasi plasma IGF-1 sensitif terhadap gizi, dan keseimbangan energi negatif pada sapi perah awal laktasi dikaitkan dengan konsentrasi IGF-1 plasma yang rendah (Sharma *et al.*, 1994). Oleh karena itu, IGF-1 dianggap menjadi perantara pengaruh nutrisi pada reproduksi, dan dikaitkan dengan kembalinya aktivitas siklik pada awal laktasi (Lucy *et al.*, 1992;. Beam dan Butler 1998; Obese, 2003; Moyes 2004). Penelitian sebelumnya yang melibatkan IGF-1 pada sapi perah hanya menyelidiki hubungan fenotipik. Sedang korelasi genetik dan fenotipik antara IGF-1 dan produksi susu negatif telah ditunjukkan pada kelompok sapi dalam penelitian (Stirling *et al.*, 2008).

Faktor-faktor yang diketahui menyebabkan variasi dalam tingkat IGF-1 dalam sirkulasi mencakup susunan genetik individu, waktu, umur, jenis kelamin, status olahraga, tingkat stres, nutrisi dan index massa tubuh (BMI), status penyakit, ras, status estrogen dan asupan *xenobiotik* (Anonim³, 2012).

Sistem IGF memainkan peran utama dalam reproduksi spesies mamalia. IGFs mungkin memiliki peran penting dalam pengendalian fungsi ovarium (Schams *et al.*, 1999). Faktor pertumbuhan yang diproduksi secara lokal peptida/protein, bersama dengan sinyal endokrin

bertanggung jawab untuk proses folliculogenic berbeda seperti rekrutmen folikel dan seleksi folikel dominan. IGF-1 telah dilaporkan untuk merangsang proliferasi dan diferensiasi sel-sel granulose diisolasi dari folikel antrum pada berbagai spesies, di antaranya babi dan tikus (Zhao *et al.*, 2001). IGFs dan protein yang pengikat mengendalikan aktivitas mereka juga penting untuk pertumbuhan dan perkembangan janin (Gibson *et al.*, 2001). Insulin-like growth factor 1 dan 2 (somatomedins – IGF-1 dan IGF 2) secara struktural terkait protein, memainkan peran kunci dalam diferensiasi sel, embriogenesis, pertumbuhan, dan regulasi metabolisme (Siadkowska, *at al.*, 2006).

Penelitian gen telah menunjukkan bahwa IGF-1 sangat penting untuk perkembangan embrio dan janin yang normal (Steward dan Rotwein, 1996). Reseptor terdapat dalam ovarium, saluran telur, uterus, embrio praimplantasi dan janin (Velazquez *et al* 2008; Coppola *et al.*, 2009). Hal ini juga diketahui bahwa defisit IGF-1 menurunkan kegiatan reproduksi pada spesies mamalia (Zulu *et al.*, 2002;. Dees *et al.*, 2009; Giampietro *et al.*, 2009). Namun, konsentrasi supraphysiological dari IGF-1 juga terkait dengan gangguan reproduksi (Druckman dan Rohr 2002). Salah satu contoh di mana tingkat IGF-1 tinggi telah dikaitkan dengan gangguan reproduksi sindrom ovarium polikistik (PCOS), gangguan endokrin umum pada wanita usia reproduksi (Brassard *et al.*, 2008, Hart 2008).

Gen IGF-1 sapi dipetakan pada kromosom 5, pada centimorgan 73,5 (Grosse *et al.*, 1999). Urutan nukleotida sementara adalah sekitar 72 kb (nomor ID 281239). Pada manusia, babi, kambing, tikus, dan ayam, urutan nukleotida IGF-1 adalah sekitar 70-90 kb (Shimatsu dan Rotwein, 1987; Kajimoto dan Rotwein, 1991; Rose, 2002). Jumlah ekson yang berbeda antara spesies, misalnya, kambing, babi dan domba ekson 1-6 (Mikawa *et al.*, 1995.). Wang *et al.*, (2003) melaporkan bahwa IGF1 sapi memiliki 6 ekson bertanggung jawab untuk mengekspresikan mRNA heterogen. Seperti spesies lainnya, tergantung pada pemimpin ekson ini, dua transkrip diidentifikasi, kelas 1 (ekson 1 sebagai pemimpin) atau kelas 2 (ekson 2 sebagai pemimpin).

Penambahan IGF I ke media kultur tidak mempengaruhi proporsi oosit yang membelah, tapi meningkatkan proporsi oosit yang berkembang ke tahap blastokista pada hari ke 7 ($P < 0,001$) dan 8 ($P < 0,01$) setelah fertilisasi. Selain itu, IGF-1 cenderung meningkatkan proporsi oosit yang mencapai tahap perkembangan blastokista lanjut pada hari ke 7 ($P < 0,07$) dan pada hari ke 8 ($P < 0,001$) setelah inseminasi. Perlakuan IGF-1 pada kultur embrio juga cenderung meningkatkan proporsi sapi resipien menjadi bunting ($P < 0,07$), serta proporsi resipien melahirkan anak sapi hidup ($P < 0,06$) (Block *at al.*, 2003).

Sapi melahirkan kembar ($n = 14$) memiliki konsentrasi IGF-1 dalam serum lebih besar 47% ($P < 0,05$) dibanding sapi kontrol ($n = 12$) (436 vs. 297 ng/ml). Sapi kembar juga mempunyai konsentrasi IGF-1 43% lebih

besar ($P < 0,05$) dalam 2 folikel besar dibanding sapi kontrol (327 vs 243 ng/ml). Konsentrasi IGF-1 dalam sampel yang dikumpulkan dari sampel folikel kecil (≤ 4 mm) pada sapi kembar dan sapi kontrol tidak berbeda nyata (238 ± 38 vs 177 ± 43 ng/ml). Persentase konsentrasi IGF-1 cairan folikel dan IGF-1 serum rata-rata $74,4 \pm 3,1\%$ untuk semua sampel, dan lebih rendah ($p < 0,01$) pada folikel kecil dibanding folikel besar. Persentase cairan folikel signifikan lebih rendah dibanding IGF-1 serum yang terdapat pada folikel besar (≥ 4 mm) tetapi tidak pada folikel kecil pada sapi kembar (76,2%) dibanding sapi kontrol (93,2%). Demikian pula, konsentrasi IGF-1 serum dibanding cairan folikel pada folikel kecil ≤ 4 mm berkorelasi positif ($r = 0,691$, $p = 0,001$) (Echternkamp, *et al.*, 1990).

Menurut Ge, *et al.* (2001); Siadkowska, *et al.* (2006); Mehmannaavaz, *et al.* (2010) dan Szewczuk, *et al.* (2012) bahwa hasil PCR gen IGF-1 SnaB1 menghasilkan panjang fragmen 249 pb, dan hasil restriksi menggunakan enzim SnaB1 menghasilkan 3 ukuran fragmen, yaitu 249 pb (tidak terpotong), 223 pb dan 26 pb (terpotong). Berdasarkan hasil PCR-RFLP gen IGF-1 dapat dapat digenotip. Genotipe gen IGF-1 SnaB1 menurut Ge, *et al.* (2001); Siadkowska, *et al.* (2006); Mehmannaavaz, *et al.* (2010) dan Szewczuk, *et al.* (2012) fragmen dengan panjang 223 dan 26 sebagai genotip TT, panjang fragmen 223, 26 dan 249 sebagai genotip CT dan panjang fragmen 249 sebagai genotip CC.

Beberapa polimorphisme urutan nukleotida telah diidentifikasi pada gen IGF I sapi, Ge, *et al.*, (2001) melaporkan polimorphisme gen IGF-1

SnaB1 pada sapi Angus di Amerika; Siadkowska, *et al.* (2006) melaporkan polimorphisme gen IGF-1 SnaB1 pada sapi perah FH Polandia; Mehmannaavaz, *et al.* (2010) melaporkan polimorphisme gen IGF-1 SnaB1 pada sapi perah FH Iran; Szewczuk, *et al.* (2011) melaporkan polimorphisme gen IGF-1 SnaB1 pada sapi perah FH Polandia; Mirzaei, *et al.* (2012) melaporkan polimorphisme gen IGF-1 SnaB1 pada sapi Perah FH Iran.

Transisi C / T pada posisi 512 dari 5'-UTR pada gen IGF I terbukti berhubungan dengan konsentrasi IGF I darah pada sapi Holsteion-Friesion Polandia. Konsentrasi serum IGF-1 tertinggi ditemukan sapi dengan genotipe CC (1024 ng / mL), sedangkan sapi genotipe TT dan CT memiliki konsentrasi hormon IGF-1 dalam serum 698 dan 859 ng / mL. Jadi, disimpulkan bahwa transisi C / T pada wilayah 512 dari gen IGF I dapat mempengaruhi ekspresi gen tersebut (Maj A, *et al.*, 2008). Mirzaei, *et al.* (2012) melaporkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara mutasi C ke T gen IGF-1 pada posisi 512 dan konsentrasi serum pada sapi perah di Iran. Konsentrasi serum IGF-1 tertinggi ditemukan pada sapi dengan genotipe CC dibandingkan dengan sapi yang memiliki genotip TT. Selain itu, rata-rata konsentrasi IGF-1 selama periode periparturasi (14 hari sebelum melahirkan sampai 45 hari pasca melahirkan) juga lebih tinggi pada sapi dengan genotip CC dibandingkan dengan sapi dengan genotipe TT. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa efek kuadrat dari transisi C / T konsentrasi IGF-1 antara genotipe CC dan TT cenderung berbeda nyata

selama 14 hari sebelum melahirkan hingga 45 hari pasca melahirkan ($P = 0,01$).

Anggraeni (2010), melaporkan bahwa tidak terdapat perbedaan pola gen IGF-1 SnaB1 pada sapi FH kembar dan tidak kembar dan sapi PO kembar dan tidak kembar, yaitu hanya diperoleh genotipe CC dengan panjang basa 249 pb. Sedangkan Kustono, dkk. (2010) melaporkan adanya perbedaan panjang basa gen IGF-1 pada induk sapi PO dengan riwayat kembar (450-1110 pb) dengan induk sapi PO tunggal (460-560 pb).

Penelitian pengaruh polimorfisme gen IGF-1 SnaB1 terhadap performa produksi ternak sapi juga telah dilakukan pada beberapa breed sapi. Mirzaei, *et al* (2012) melaporkan adanya pengaruh genotip gen IGF-1 SnaB1 dimana sapi dengan genotip CC memiliki konsentrasi hormon IGF-1 dalam serum dan cairan folikel selama periode kelahiran (14 hari sebelum – 45 hari setelah melahirkan) lebih tinggi dibanding sapi dengan genotip CT dan TT. Ge, *et al.* (2001) melaporkan pengaruh polymorfisme gen IGF-1 SnaB1 pada periode pembiasaan pasca penyapihan anak sapi di mana diperoleh genotip CC dan CT memiliki pertambahan berat badan lebih tinggi dibanding genotip TT. Siadkowska, *et al.* (2006) juga melaporkan hubungan genotip gen IGF-1 SnaB1 dengan tingkat konsumsi dan konfersi pakan serta pertambahan berat badan harian ternak sapi. Sapi dengan genotip CC memiliki tingkat konfersi pakan lebih tinggi dibanding sapi dengan genotip CT dan TT, tingkat

pertumbuhan sapi dengan genotip CC lebih tinggi dibanding genotip CT dan TT, namun tidak terdapat perbedaan produksi susu antara ketiga genotip tersebut pada induk sapi. Sweszuk, *et al.* (2012) juga melaporkan bahwa polymorphisme gen IGF-1 SnaB1 tidak menyebabkan perbedaan produksi susu pada sapi FH Polandia, sedangkan Mehmannaavaz, *et al.* (2010) melaporkan terdapat hubungan genotip gen IGF-1 SnaB1 dengan produksi susu, dimana sapi perah dengan genotip CT memiliki produksi susu lebih tinggi dibanding sapi perah dengan genotip CC dan TT.

E. Analisa DNA dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Semua benda hidup, baik tumbuhan maupun hewan, disusun oleh satuan terkecil yang disebut sel. Sel terdiri dari tiga bagian utama, yaitu : sitoplasma, nukleus dan membran sel. Nucleus mengandung bahan genetik sel, yang disebut kromatin pada sel yang tidak membelah, dan disebut kromosom pada sel yang sedang membelah. Pada nucleus sel somatik terdapat informasi yang diperlukan untuk menentukan bentuk serta struktur sel-sel baru, sedangkan nucleus sel-sel kelamin mengandung informasi-informasi yang diperlukan untuk menentukan karakteristik individu baru (Frandsen, 1996). Fungsi dari inti sel adalah mengatur semua aktivitas (kegiatan) sel. Hal ini karena di dalam inti sel terdapat kromosom yang berisi DNA (Deoksiribo Nucleic Acid) yang mengatur sintesis protein (Anonim¹, 2012).

Di dalam kromosom terdapat suatu bentukan yang disebut gen. Gen tersebut berjajar sepanjang kromosom, sehingga kromosom

merupakan suatu jajaran gen yang berderet secara linier seperti kalung manik-manik. Gen merupakan unit pewaris sifat yang keberadaannya dapat diketahui dari pengaruhnya terhadap sifat fenotipiknya. Posisi gen di dalam kromosom adalah tertentu, sehingga dapat dikatakan bahwa gen membentuk suatu pola tertentu sepanjang kromosom. Gen menentukan urutan-urutan pertama dari susunan asam amino yang akan membentuk protein. Ada hubungan secara linier antara susunan sebuah gen dengan susunan polipeptida yang disusunnya, atau dengan kata lain bahwa struktur primer dari protein sebuah sel merupakan cerminan langsung dari struktur linier dari gen yang ada pada sel tersebut (Hardjesubroto, 1998).

Komponen utama dari gen adalah asam deoksiribo nukleat (deoxyribo nucleic acid / DNA) dan histon, suatu protein bermuatan positif yang biasanya dinetralkan oleh keasaman DNA. DNA merupakan kandungan utama inti. Apabila asam nukleat dipisahkan dari proteinnya, akan terpisah menjadi komponen yang lebih kecil, yang disebut sebagai nukleotida (*nucleotides*). Setiap nukleotida terdiri atas tiga komponen yaitu basa nitrogen yang merupakan turunan purin dan pirimidin, gula pentose dan satu sampai tiga gugus fosfat. Gula pentose mengandung lima karbon dan disebut ribose. Apabila salah satu karbonnya tidak ada, disebut deoksiribosa. Akibat ada dua macam asam nukleat, yaitu ribonukleat (RNA) yang terdapat di dalam sitoplasma, dan deoksiribonukleat (DNA) yang terutama terdapat di dalam inti sel. Turunan pirimidin yang terdapat di dalam DNA adalah sitosin (C) dan timin (T),

sedangkan di dalam RNA adalah sitosin (C) dan Urasil (U). RNA mengandung derivat pirimidin urasil (U) sebagai pengganti timin (T), yang mempunyai sifat kimia dan fisik mirip dengan timin. Adapun turunan purin yang utama adalah adenine (A) dan guanine (G) (Hardjesubroto, 1998).

Raksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro* (Yuwono, 2006). Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik yang kuat yang telah dengan cepat menjadi salah satu teknik yang paling banyak digunakan dalam biologi molekular karena cepat, murah dan sederhana. Teknik ini menguatkan fragmen DNA spesifik pada waktu beberapa menit dari materi sumber DNA, bahkan ketika kualitas sumber DNA relatif buruk (Erich, 1989).

Prinsip dasar dari teknik PCR adalah amplifikasi materi genetik yang terkandung dalam setiap organisme hidup. PCR dapat dilakukan dalam waktu kurang dari satu hari dan jutaan DNA dapat berhasil dibuat. Karena DNA setiap organisme adalah spesifik, maka dengan menggunakan teknik PCR dapat diidentifikasi secara akurat organisme asalnya. Pada identifikasi virus, proses ini sangat membantu karena dalam proses isolasi virus sangatlah rumit dan membutuhkan waktu yang lama, tetapi dengan teknik PCR akan lebih sensitif dan spesifik (Muladno, 2001; Lestari 2003).

PCR adalah proses interaktif, terdiri dari tiga elemen : denaturasi template dengan pemanasan, annealing primer oligonucleotide pada sekuen fragmen tunggal target (s), dan *ekstention primer anil* dengan *thermostable DNA polymerase* (Sambrook and Russell, 1989) :

1. **Denaturasi.** Denaturasi template DNA fragmen ganda pada temperatur yang telah ditentukan sebagian dengan kandungan G+C-nya. Semakin tinggi proporsi G+C, semakin tinggi temperatur yang dibutuhkan untuk memisahkan fragmen template DNA. Semakin panjang molekul DNA, waktu terbaik dibutuhkan saat memilih temperatur denaturasi untuk memisahkan dua fragmen secara sempurna. Jika temperatur untuk denaturasi terlalu rendah atau jika waktu terlalu pendek, hanya wilayah AT pada template DNA yang terdenaturasi. Pada PCR dengan katalis Taq DNA polymerase, denaturasi dilakukan pada 94-95⁰C, pada temperatur yang tinggi enzim tersebut dapat bertahan selama 30 siklus atau lebih tanpa kerusakan yang berlebihan. Pada siklus PCR pertama, denaturasi kadang-kadang dilakukan 5 menit untuk meningkatkan kemungkinan bahwa molekul panjang template DNA terdenaturasi sempurna.
2. **Annealing Primer template DNA.** Temperature yang digunakan untuk tahap *annealing* (T_a) sangat penting. Jika temperature *annealing* terlalu tinggi, anneal primer oligonucleotide kurang baik, template dan hasil amplifikasi DNA sangat rendah. Jika temperature *annealing* terlalu rendah, *annealing* tidak spesifik pada primer dapat terjadi,

menghasilkan amplifikasi segmen DNA yang tidak diinginkan. Annealing biasanya dilakukan 3-5⁰C lebih rendah dari pada perhitungan temperature leleh pada hybrid antara primer oligonucleotide memisahkan dari templatnya.

3. **Ekstensi oligonucleotide primer** dilakukan pada atau mendekati temperature optimal untuk katalis sintesis DNA dengan thermostabil, dimana pada kasus Taq DNA polymerase adalah 72-78⁰C. Pada dua siklus pertama, ekstensi dari satu primer dilanjutkan mengeluarkan sekuen komplementer untuk menahan situs dari primer lain. Pada siklus berikutnya, molekul yang diproduksi pertama yang panjangnya setara dengan fragmen DNA yang dibatasi dengan ikatan situs primer. Mulai siklus ketiga dan seterusnya, segmen DNA diamplifikasi secara geometri, sedangkan pemanjangan produk amplifikasi dihitung secara aritmetika. Tingkat polymerisasi pada polymerase Taq adalah 2.000 nukleotida/menit pada temperature optimal (72-78⁰C) dan sebagai panduan praktis, ekstensi dilakukan setiap selama satu menit menghasilkan 1.000 bp.
4. **Jumlah siklus.** Jumlah siklus yang diperlukan untuk amplifikasi bergantung pada jumlah salinan template DNA yang terlihat pada permulaan reaksi dan efisiensi ekstensi dan amplifikasi primer. Setelah dibentuk dalam fase geometri, reaksi berjalan sampai satu komponen menjadi pembatas. Pada bagian ini, produk hasil amplifikasi harus maksimal, sedangkan produk amplifikasi tidak

spesifik tidak dapat dideteksi. Umumnya dilakukan dengan 30 siklus PCR mengandung 10^5 salinan pada sekuen target dan Taq DNA polymerase (efisiensi 0,7). Sedikitnya 25 siklus diperlukan untuk mencapai level dapat diterima pada amplifikasi salinan tunggal sekuen target pada template DNA mamalia.

Ada beberapa macam PCR, berdasarkan jenis dan kegunaannya, yaitu :

1. *Long Distance PCR* merupakan jenis PCR yang berguna untuk mengamplifikasi dan mendeteksi produk PCR dengan ukuran 50 kb atau lebih.
2. *AP-PCR Genom (arbitrarily primed – PCR)* merupakan jenis PCR yang dapat digunakan untuk mendeteksi polymorphisme sehubungan dengan pemetaan gen, filogenetik dan populasi biologi.
3. *AP-PCR RNA* merupakan PCR yang digunakan untuk mendeteksi ekspresi gen yang berbeda dan dapat langsung diklon dengan mengisolasi produk amplifikasi.
4. *RT-PCR (Reverse Transcription –PCR/ transkripsi balik)* berguna untuk mendeteksi dan mengamplifikasi RNA.
5. *Multiplex PCR* adalah PCR yang menggunakan dua atau lebih urutan DNA target yang spesifik dari specimen yang sama dan kemudian diamplifikasi secara simultan. Umumnya digunakan dua set primer pertama digunakan untuk mengamplifikasi kontrol internal dan set primer kedua digunakan untuk mengamplifikasi urutan DNA target.

6. *QC-PCR (quantitative Comparative –PCR)*, menggunakan tambahan eksogen internal. Tambahan tersebut terdiri dari fragmen DNA dimana pada kedua sisinya terdapat urutan DNA target dan urutan primer spesifik.
7. *RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphisme)* merupakan jenis PCR yang mendeteksi mutasi yang terdapat pada genom DNA. RFLP-PCR ini mampu mengamplifikasi DNA termasuk urutan yang termutasi dengan menggunakan primer pengapit dan diikuti enzim restriksi terhadap produk PCR. Teknik RFLP diidentifikasi menggunakan enzim yang memotong DNA hanya pada sisi yang sesuai, misal EcoRI memotong sisi yang terdefinisi oleh palindrome sekuen GAATTC. Pada saat ini, pemakaian paling sering dari RFLP yang diturunkan dari PCR atau dikenal sebagai PCR-RFLP untuk mendeteksi alel berbeda dalam sekuen DNA dari satu sisi restriksi yang tertentu. Satu potongan gen pertama diamplifikasi dengan PCR, kemudian diekspos terhadap suatu enzim restriksi spesifik yang memotong hanya satu bentuk alelik, amplicon yang dipotong umumnya diselesaikan dengan elektroforesis (Anggraeini dkk., 2010).
8. *Nested PCR* dibutuhkan dua amplifikasi secara terpisah dan menggunakan dua set primer amplifikasi. Satu set primer digunakan untuk mengamplifikasi produk amplifikasi dari satu set primer sebelumnya dan produk amplifikasi kedua lebih pendek dari produk amplifikasi pertama. Sensitivitas dan spesifitas *Nested PCR* ini terletak

pada primer yang hanya menempel pada amplikon sesuai dengan urutannya (Jamilah, 2002).

Informasi genetik pada suatu organisme tingkat tinggi tersimpan dalam sekuen DNA pada kromosom yang ada dalam nucleus maupun organel. Pergantian basa dapat terjadi pada sekuen DNA tersebut, selain perubahan dalam skala besar sebagai hasil dari proses substitusi, inverse, translokasi, insersi, delesi atau transposisi. Perubahan ini mengakibatkan pergeseran distribusi relatif dari situs restriksi untuk sejumlah enzim pemotong. DNA yang telah mengalami perbedaan satu sama lain dalam skuennya akan menghasilkan fragmen yang berbeda setelah dipotong oleh enzim restriksi (Anggraeini dkk., 2010).

Hasil PCR dapat dilihat dengan melakukan elektroforesis pada gel agarose. Elektroforesis merupakan metode standar untuk memisahkan dan mengidentifikasi fragmen DNA sesuai dengan ukurannya. Prinsip dasarnya adalah jika molekul DNA yang bermuatan negative ditempatkan pada penghantar listrik (buffer), molekul tersebut akan bergerak menuju ke muatan positif. Molekul DNA yang bermuatan kecil akan bergerak lebih cepat dari pada yang berukuran besar. Ukuran fragmen DNA hasil elektroforesis dapat diketahui dengan menggunakan penanda ukuran (*marker*) yang salah satunya didapat dari lambda yang telah dipotong oleh enzim restriksi (Dawson *at al.*, 1996; dalam Muladno, 2001).

Selanjutnya untuk dapat melihat dan menganalisa hasil elektroforesis, DNA di dalam gel agarose diwarnai (*staining*) dengan

menggunakan ethidium bromide (EtBr), yaitu zat pewarna yang dapat berfluoresensi di bawah sinar ultraviolet. EtBr dapat menyisip di antara basa-basa DNA serta membuat rantai DNA menjadi kaku. DNA hasil amplifikasi tampak sebagai fragmen yang jelas dan terang apabila gel agarose yang membawa DNA tersebut ditempatkan di atas sinar ultraviolet (Sambrook *at al.*, dalam Muladno, 2001).

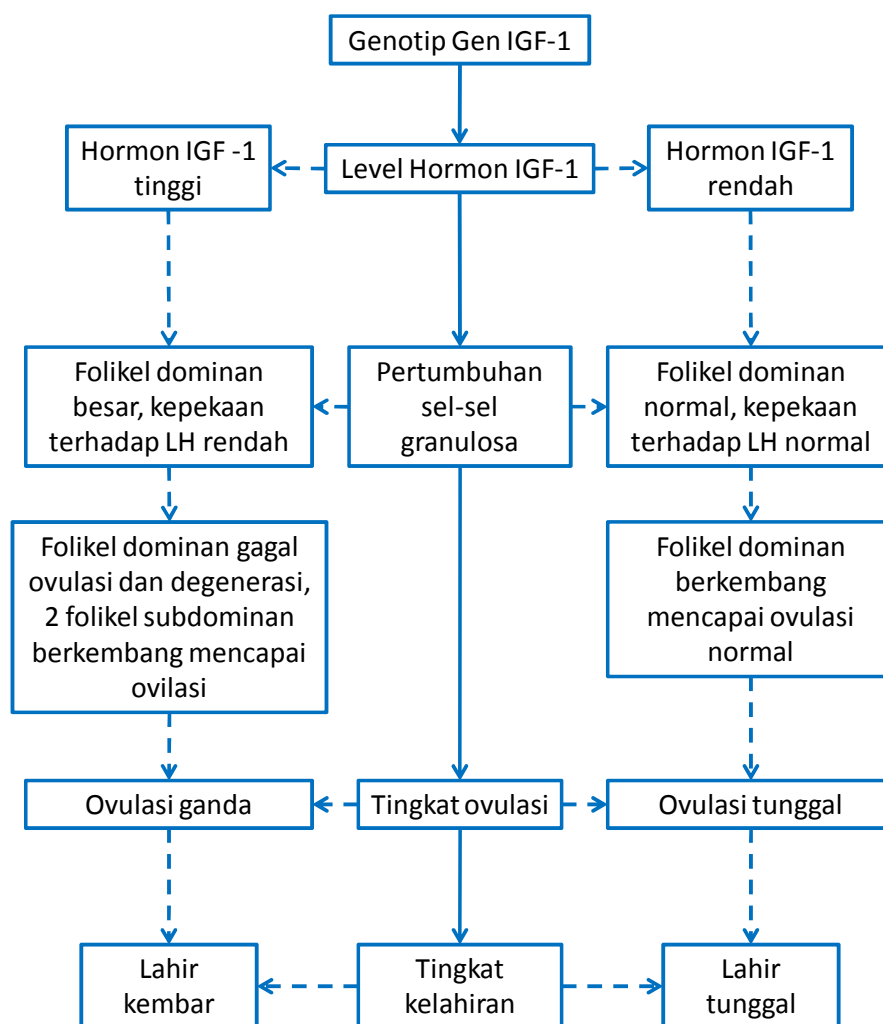
Pemanfaatan PCR dalam bidang peternakan yaitu :

1. Membantu dalam proses pemetaan gen, terutama gen terkait sifat kuantitatif (*Quantitative Trait Loci*; QTL),
2. Membantu dalam mengidentifikasi penyakit ternak secara cepat dan tepat,
3. Membantu dalam mengidentifikasi adanya mutasi genetik pada individu ternak,
4. Membantu dalam mengetahui frekuensi gen tertentu dalam populasi ternak dan mengetahui adanya variasi genetik dalam populasi atau antar populasi ternak,
5. Membantu dalam mengidentifikasi adanya kontaminasi produk lain dalam bahan makanan atau makanan olahan hasil ternak.

F. Kerangka Konsep

Berdasarkan landasan teori yang mendukung penelitian ini, maka dapat digambarkan skematis kerangka konsep penelitian ini sebagai berikut :

Kerangka Konsep



Gambar 1. Kerangka Konsep

G. Hipotesis

Adapun hipotesis penelitian ini adalah :

1. Diduga terdapat polymorphisme gen IGF-1 SnaB1 pada sapi Bali dan Bali persilangan dengan riwayat kelahiran kembar dan tunggal.
2. Diduga gen IGF-1 SnaB 1 pada sapi Bali dan Bali persilangan dengan riwayat kelahiran tunggal dan kembar berada dalam keseimbangan hukum *Hardy-Weinberg*.
3. Diduga terdapat perbedaan genotip gen IGF-1 SnaB1 pada sapi Bali dan Bali persilangan dengan riwayat kelahiran kembar dan tunggal.
4. Diduga gen IGF-1 SnaB1 dapat dijadikan sebagai penanda kelahiran kembar pada sapi Bali dan Bali persilangan.