

OPTIMASI SUHU *ANNEALING* PROSES PCR AMPLIFIKASI GEN ATP1 A1 SAPI JABRES DAN GALEKAN

Optimization of Annealing Temperature PCR Process ATP1 A1 Gene Amplification in Jabres and Galekan Cows

Dewi Khosiya Robba^{1*}, Dyah Tuwi Ramsiati¹, Wahyuni Indah Wulansari¹, Mochammad Chanafi¹, Asepriyadi¹, Rina Ariyanti¹, Ullin Nihaya²

¹Pusat Riset Peternakan, Organisasi Riset Pertanian dan Pangan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Raya Jakarta-Bogor, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16915

²Tatung University, No. 40, Sec.3, Zhongshan N Rd, Zhongshan District, Taipei City, Taiwan, 10452

*Corresponding author: dewi059@brin.go.id

ABSTRACT

An increase in temperature in the environment surrounding local Jabres and Galekan cattle has a negative effect on their development, growth, productivity and reproduction. For this reason, a method is needed to determine the adaptability of cows to heat stress. In this study, the samples used were DNA from local Jabres cattle and Galekan cattle using in-vitro molecular research methods such as DNA isolation, amplification of the ATP1 A1 gene with PCR optimization, electrophoresis and visualization of the results. DNA isolation from 8 blood samples from Jabres and Madurese cattle showed that DNA isolation results were correct and consistent with the appearance of bright and thick DNA bands. Meanwhile, the annealing temperature in the PCR optimization process used to attach the forward primer ATP1 A1 5'- TCC CCA AGC TAG TGA CCA AG -3' and the reverse primer ATP1 A1 5'- TCT GTG GCT CTG ATT CTC CC -3' is 57°C, 57.3°C, 58.1°C, 59.3°C, 60.7°C, 61.9°C, 62.7°C, 63°C. The PCR optimization results were electrophoresed at 100 volts for 35 minutes, then the agarose gel electrophoresis results were visualized using a UV transilluminator to obtain optimal annealing temperature results at 57°C.

Keywords: Cow, PCR, ATP1A1 gene, Annealing

ABSTRAK

Adanya kenaikan suhu pada lingkungan sekitar ternak sapi lokal Jabres dan sapi Galekan memiliki efek negatif terhadap perkembangan, pertumbuhan, produktivitas dan reproduksi-nya. Untuk itu, diperlukan metode untuk mengetahui kemampuan adaptasi sapi terhadap cekaman panas. Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah DNA sapi lokal Jabres dan sapi Galekan dengan menggunakan metode penelitian molekuler *in-vitro* seperti isolasi DNA, Amplifikasi gen ATP1 A1 dengan Optimasi PCR, elektroforesis dan hasil visualisasinya. Isolasi DNA pada 8 sampel darah sapi Jabres dan sapi Galekan menunjukkan hasil isolasi DNA yang tepat dan sesuai dengan ditandai munculnya pita DNA yang terang dan tebal. Sedangkan, suhu *annealing* pada proses optimasi PCR yang digunakan untuk menempelkan primer *forward* ATP1 A1 5'- TCC CCA AGC TAG TGA CCA AG -3' dan primer *reverse* ATP1 A1 5'- TCT GTG GCT CTG ATT CTC CC -3' adalah 57°C, 57,3°C, 58,1°C, 59,3°C, 60,7°C, 61,9°C, 62,7°C, 63°C. Hasil optimasi PCR dielektroforesis dengan 100 volt selama 35 menit kemudian gel agarose hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan UV transilluminator sehingga didapatkan hasil suhu *annealing* yang optimal pada suhu 57 °C.

Kata Kunci : Sapi, PCR, gen ATP1A1, *Annealing*

PENDAHULUAN

Permasalahan cekaman panas pada ternak sapi potong yang disebabkan oleh meningkatnya suhu lingkungan berpotensi

memberikan efek negatif pada ternak (Sutedjo, 2016). Efek negatif cekaman atau toleransi panas yang rendah pada sapi potong menyebabkan *heat stress* pada sapi, menurunnya produktivitas sapi potong, menghambat pertumbuhan, dan reproduksi (Chen *et al.*, 2023). Untuk itu, sangat penting dalam memahami kesehatan dan produksi ternak dengan memperhatikan ketahanan mereka pada suhu lingkungan sekitar. Namun, masih sulit untuk mendefinisikan hewan ternak yang tahan terhadap suhu tertentu khususnya panas.

Beberapa penelitian melakukan eksperimen untuk mengetahui situasi dan kondisi yang mempengaruhi cekaman panas pada ternak (Klabnik *et al.*, 2022; Osei-Amponsah *et al.*, 2020). Untuk mengurangi dampak negatifnya, penggunaan alat siram dan kipas pendingin umum dilakukan untuk mengurangi cekaman panas (Chen *et al.*, 2013; Tresoldi *et al.*, 2018). Penggunaan sensor panas pada sistem penyiraman dengan ventilasi juga dilakukan untuk meningkatkan efektivitasnya (Liberati, 2023). Namun, penggunaan strategi tersebut dapat mempengaruhi produktivitas dari hewan ternak apabila tidak diperhatikan dengan baik (Macavoray *et al.*, 2023a, 2023b) dan dapat menjadi sumber infeksi oleh bakteri patogen (Shpigel *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian melakukan penelitian pada gen hewan ternak untuk melihat toleransi mereka pada cekaman panas (Li *et al.*, 2023; Zamorano-Algandar *et al.*, 2023). Pada beberapa kondisi, strategi ini terbukti memberikan hasil yang memuaskan (Prasanna *et al.*, 2022). Untuk itu, pada penelitian ini program genetik untuk memilih sapi potong yang memiliki kemampuan termotoleran terhadap cekaman panas. Salah satu program genetik yang dilakukan adalah dengan menggunakan ekspresi gen ATP1 A1 dengan metode optimasi PCR (*Polymerase*

Chain Reaction) untuk mengetahui kemampuan adaptasi ternak sapi potong.

Gen ATP1 A1 salah satu gen yang dapat mengidentifikasi kemampuan adaptasi sapi potong terhadap suhu panas atau cekaman panas. Gen ATP1 A1 dapat mengendalikan Na^+ atau K^+ adenosin trifosfatase (Na^+ atau K^+ ATPase), protein membran sel yang mengontrol permeabilitas membran dengan menggabungkan transpor tiga Na^+ ion keluar dan dua K^+ ke dalam sel (Rajamanickam *et al.*, 2017). Penggabungan ion melintasi membran plasma ini dicapai dengan menggunakan energi yang dilepaskan dari hidrolisis ATP (Mavrogonatou *et al.*, 2015). Kemampuan sapi untuk mengatur aktivitas fisiologis dan suhu tubuh di bawah respons cekaman panas sebagian berada di bawah kendali genetik yang relevan dengan gen ATP1 A1 (Imran *et al.*, 2021)

Metode yang mungkin untuk menemukan *heat stress* (penyakit yang berhubungan dengan tekanan dan suhu panas) secara molekuler yaitu metode *Polymerase Chain Reaction*. Amplifikasi DNA *in-vitro* dapat dilakukan melalui PCR. Proses PCR mendeteksi munculnya gen yang akan dianalisa selanjutnya akan melipat gandakan jumlah DNA gen tersebut sehingga analisa lebih optimal dan jelas (Zeitoun *et al.*, 2015). Proses PCR memiliki langkah-langkah di antaranya pradenaturasi, denaturasi, *annealing*, *extension*, dan *post extension*. Proses *annealing* adalah penempelan awal DNA template pada suhu terbaik. Tingkat keberhasilan amplifikasi DNA dengan PCR diukur oleh suhu optimal pada proses *annealing*. Penelitian molekuler optimasi PCR dapat dilakukan dengan menentukan suhu *annealing* yang sesuai dan optimal untuk mengamplifikasi gen ATP1 A1 pada sapi potong.

Pada penelitian ini, penggunaan sampel sapi lokal Jabres dan Galekan

dilakukan karena mereka merupakan sapi yang sangat ideal untuk dikembangkan di Indonesia sesuai dengan potensi pengembangannya (Romjali, 2018). Permasalahan peningkatan suhu lingkungan yang menjadi hambatan bagi para peternak dikarenakan iklim tempat budidaya sapi tersebut yakni sapi Jabres yang berasal dari Kabupaten Brebes, Provinsi Jawa Tengah dan sapi Galekan yang banyak dibudidayakan di Kabupaten Trenggalek, Provinsi Jawa Timur umumnya memiliki iklim panas. Sedangkan, penggunaan program genetik menggunakan ekspresi gen ATP1 A1 yang dilakukan pada penelitian ini dikarenakan sedikitnya studi yang membahas metode tersebut pada permasalahan cekaman panas pada sapi lokal di Indonesia.

MATERI DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kebun Raya Purwodadi Badan Riset dan Inovasi Nasional di kawasan Purwodadi, Kabupaten Pasuruan, Provinsi Jawa Timur, dari Februari hingga Agustus 2023.

Alat dan Bahan

Pada penelitian ini, metode yang dilakukan adalah isolasi DNA darah sapi Jabres dan Galekan yang kemudian hasil ekstrak DNA dioptimasi PCR dengan menggunakan beberapa peralatan seperti neraca analitik, vortex, sentrifuge, mesin *polymerase chain reaction*, *beaker glass*, gelas ukur, mikropipet, inkubator, elektroforesis unit, UV transilluminator, tip 10 µl, tip 200 µl, tip 1000 µl, *tube* 1,5 ml, *tube eppendof* 0,2 ml, Erlenmeyer, *microwave*, dan botol duran. Bahan yang digunakan pada penelitian optimasi PCR ini di antaranya darah sapi Jabres, darah sapi

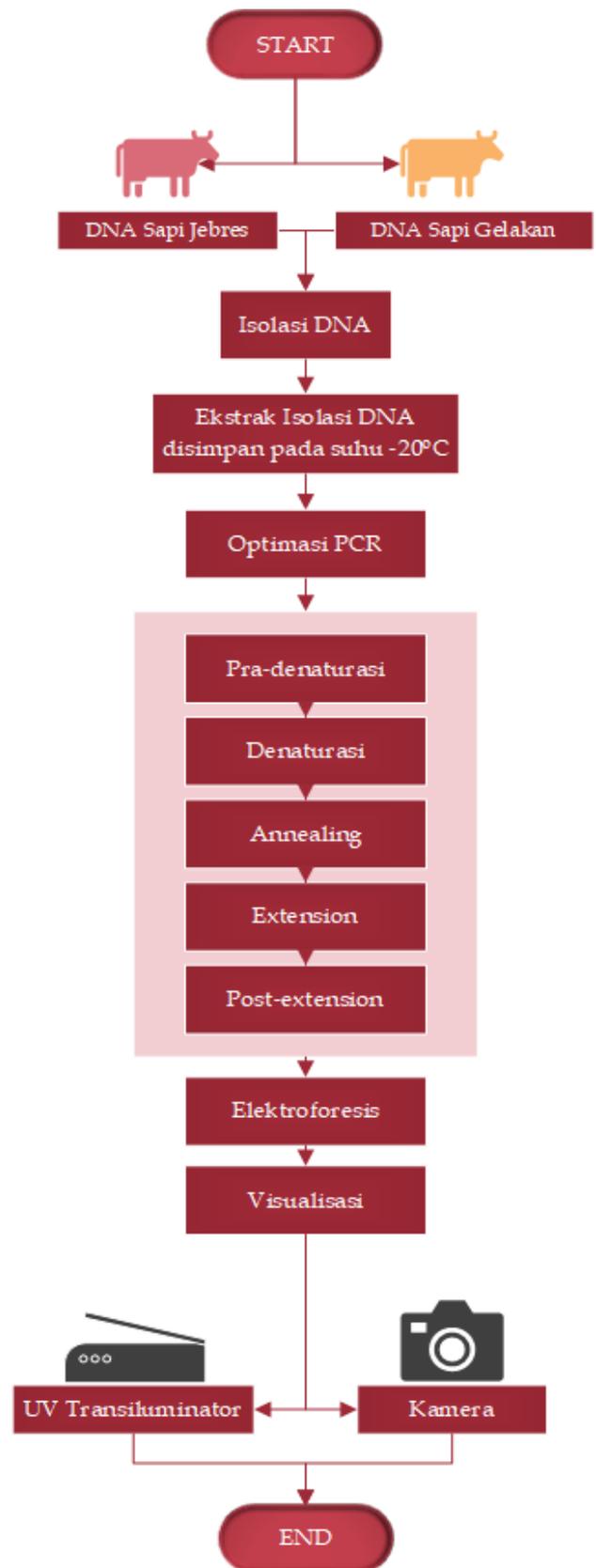
Galekan, primer *forward* ATP1 A1 5'- TCC CCA AGC TAG TGA CCA AG -3', primer *reverse* ATP1 A1 5'- TCT GTG GCT CTG ATT CTC CC -3', gSYNCTM DNA Extraction KIT, gel agarose, hyperladder 100 bp, *loading dye*, flourosafe DNA stain, Mytaq HS Red MIX 2x 200 reaction, aquades, double destilate water, Etanol absolute, buffer TBE 1x. Gambar 1 merupakan tahapan metode pada kegiatan penelitian ini.

Metode Penelitian

1. Isolasi DNA Sapi Jabres dan Galekan

Prinsip isolasi DNA ada beberapa bagian di antaranya proses penghancuran, memisahkan DNA dari protein dan selulosa, dan pengikatan DNA (Yuwono, 2005). Proses isolasi atau ekstraksi DNA menggunakan gSYNCTM DNA Extraction KIT dengan Tahapan pertama yang dilakukan memipet sampel darah sapi Jabres dan sapi Galekan sebanyak 200 µl ke dalam tube eppendof 1,5 ml dengan menambahkan 20 µl Proteinase K. setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu 60°C, 630 rpm selama 5 menit. Tahap selanjutnya proses *lisis* dengan menambahkan 200µl Buffer GSB yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 60°C, 630 rpm selama 5 menit. Tahapan berikutnya penambahan 200 µl etanol absolute (alcohol 96-100%) kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Sampel isolasi kemudian dipindahkan ke GS Columns yang kemudian disentrifuge dengan 12.000 xg selama 2 menit pada suhu 24°C. Tahap selanjutnya penambahan 400 µl Buffer W1 kemudian dilakukan sentrifuge dengan 12.000 xg selama 30 detik pada suhu 24°C. Tahap selanjutnya penambahan 600 µl Wash Buffer kemudian dilakukan sentrifuge dengan 12.000 xg selama 30 detik pada suhu 24°C. selanjutnya dilakukan sentrifuge ulang dengan 12.000

xg selama 3 menit pada suhu 24°C. Hasil isolasi pada GS column ditaruh di atas tube eppendorf 1,5 ml dan kemudian menambahkan 150 µl elution buffer dan didiamkan selama 5 menit yang selanjutnya disentrifuge dengan 12.000 xg selama 30 detik pada suhu 24°C. Ekstrak hasil isolasi DNA bisa disimpan disuhu -20°C atau difreezer.



Gambar 1. Tahapan kegiatan penelitian

2. Isolasi DNA Sapi Jabres dan Galekan

Prinsip isolasi DNA ada beberapa bagian di antaranya proses penghancuran, memisahkan DNA dari protein dan selulosa, dan pengikatan DNA (Yuwono, 2005). Proses isolasi atau ekstraksi DNA menggunakan gSYNCTM DNA Extraction KIT dengan Tahapan pertama yang dilakukan memipet sampel darah sapi Jabres dan sapi Galekan sebanyak 200 µl ke dalam tube eppendorf 1,5 ml dengan menambahkan 20 µl Proteinase K. Setelah itu, dilakukan inkubasi pada suhu 60°C, 630 rpm selama 5 menit. Tahap selanjutnya proses *lisis* dengan menambahkan 200µl Buffer GSB yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 60°C, 630 rpm selama 5 menit. Tahapan berikutnya penambahan 200 µl etanol absolute (alkohol 96–100%) kemudian dihomogenkan menggunakan vortex.

Sampel isolasi kemudian dipindahkan ke GS Columns yang kemudian disentrifuge dengan 12.000 xg selama 2 menit pada suhu 24°C. Tahap selanjutnya penambahan 400 µl Buffer W1 kemudian dilakukan sentrifuge dengan 12.000 xg selama 30 detik pada suhu 24°C. Tahap selanjutnya penambahan 600 µl Wash Buffer kemudian dilakukan sentrifuge dengan 12.000 xg selama 30 detik pada suhu 24°C. selanjutnya dilakukan sentrifuge ulang dengan 12.000 xg selama 3 menit pada suhu 24°C. Hasil isolasi pada GS column ditaruh di atas tube eppendorf 1,5 ml dan kemudian menambahkan 150 µl elution buffer dan didiamkan selama 5 menit yang selanjutnya disentrifuge dengan 12.000 xg selama 30 detik pada suhu 24°C. Ekstrak hasil isolasi DNA bisa disimpan di suhu -20°C atau di *freezer*.

3. Amplifikasi Gen ATP1 A1 dengan Optimasi PCR

Amplifikasi gen ATP1 A1 menggunakan primer *forward* ATP1 A1 5'–

TCC CCA AGC TAG TGA CCA AG -3', primer *reverse* ATP1 A1 5'- TCT GTG GCT CTG ATT CTC CC -3'. Tahapan yang dilakukan dengan mencampurkan Mytaq HS Red MIX 2x sebanyak 12,5 µl, double destilate water sebanyak 9,5 µl, primer *forward* sebanyak 0,5 µl, primer *reverse* sebanyak 0,5 µl dan ekstrak DNA 2 µl sehingga didapatkan total produk optimasi PCR sebanyak 25 µl. Proses optimasi PCR dilakukan dengan tahapan *pra denaturasi* pada suhu 94 °C dengan waktu 5 menit, *denaturasi* dengan suhu 94 °C selama 45 detik, *annealing* dengan suhu masing-masing 57 °C, 57,3 °C, 58,1 °C, 59,3 °C, 60,7 °C, 61,9 °C, 62,7 °C, 63 °C selama 45 detik, *extension* dengan suhu 72 °C selama 1 menit dan *post-extension* dengan suhu 72 °C selama 5 menit. Pada proses *denaturasi* sampai *extension* dengan siklus 34x.

4. Elektroforesis dan Visualisasi

Tahapan elektroforesis yang pertama dilakukan menggunakan gel agarose konsentrasi 2% dengan menimbang agarose sebanyak 1 gram dan ditambahkan 50 ml 1x TBE buffer. Kemudian dipanaskan dengan suhu 100°C selama 2 menit, kemudian ditunggu hingga hangat dan ditambahkan 4 µl florou safe DNA. Tahap selanjutnya agarose yang sudah dicampur florou safe DNA stain dituang ke *tray* elektroforesis dengan memasang sisir, Pada wadah elektroforesis unit ditambahkan 1x *buffer* TBE. Kemudian tahap selanjutnya mencampurkan 0,5 µl *loading dye* dan 3,5 µl produk amplifikasi atau PCR ke dalam sumuran gel agarose dan mencampurkan 0,5 µl *loading dye* dan 3,5 µl hyperladder 100 bp kedalam sumuran gel agarose. Proses elektroforesis dilakukan selama 35 menit dengan 100 volt. Hasil elektroforesis dapat divisualisasi dengan menggunakan UV Transiluminator dan difoto menggunakan kamera.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi DNA Sapi Jabres dan Galekan

Sampel darah sapi yang digunakan pada proses isolasi DNA terdiri dari sapi jabres dan sapi galekan. Daftar sampel isolasi DNA pada Tabel 1.

Dari delapan sampel darah sapi Jabres dan Galekan dilakukan proses isolasi DNA dengan prosedur gSYNCTM DNA Extraction KIT. Selama proses isolasi, proteinase K ditambahkan untuk menghancurkan protein dalam sampel darah sapi, menghasilkan DNA yang murni (Robba *et al.*, 2022). Selanjutnya ditambahkan buffer GSB yang berfungsi menghancurkan membran sel. Kemudian ditambahkan etanol absolute (alkohol 96-

100%). Etanol absolut atau alkohol 96-100% memiliki fungsi dapat mempertahankan kondisi DNA dalam sel dalam waktu yang lama (Marwayana, 2015). Kemudian ditambahkan W1 buffer untuk membuang sisa protein yang masih menempel dan dilanjut dengan penambahan Wash buffer untuk membawa semua pengotor. Dan pada tahap terakhir ada sentrifugasi selama 3 menit yang bertujuan untuk memastikan tidak ada residu pengotor yang selanjutnya dilakukan penambahan elution buffer untuk memisahkan DNA dari kontaminan atau pengotor secara sempurna. Ekstrak DNA sapi Jabres dan Galekan dari hasil isolasi berupa cairan bening yang selanjutnya disimpan di suhu -20 °C agar tahan penyimpanan dalam waktu lama.

Tabel 1. Daftar sampel isolasi DNA

Nomor Tube	Kode Sampel	Jenis Kelamin	Bangsa Sapi
1	Tarmin I	Betina	Jabres
2	Tarmin II	Jantan	Jabres
3	Kasjo I	Jantan	Jabres
4	Kasjo II	Betina	Jabres
5	210501	Betina	Galekan
6	210502	Betina	Galekan
7	210503	Jantan	Galekan
8	210504	Jantan	Galekan

2. Amplifikasi gen ATP1 A1 dengan Optimasi PCR

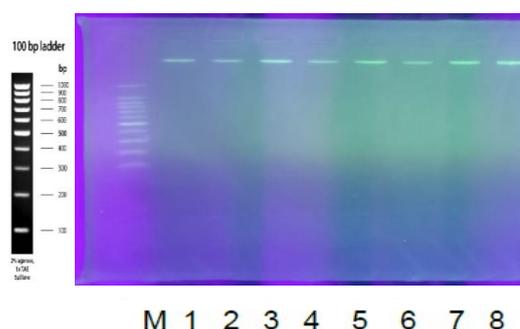
Metode Polymerase Chain Reaction menggunakan primer khusus untuk mengamplifikasi gen ATP1 A1 pada sapi Jabres dan Galekan. Untuk mendapatkan hasil PCR terbaik dengan suhu *annealing* yang sesuai, optimalisasi PCR sangat penting. Tahapan optimasi PCR dilakukan dengan memvariasikan kondisi yang dapat digunakan pada proses PCR. Hasil amplifikasi gen ATP1 A1 berhasil dilakukan dengan ditandai munculnya pita DNA pada ukuran 996 bp. Tahapan pada optimasi PCR terdiri dari tahapan *pradenaturasi*, *denaturasi*, *annealing*, *extension*, *post extension*. Tujuan denaturasi adalah untuk memastikan molekul DNA dengan target yang akan dilipat gandakan jumlahnya sudah terdenaturasi. Tahap denaturasi terjadi pada suhu 94 hingga 96 derajat Celcius, dan proses *annealing* adalah penempelan primer pada bagian template DNA. *Extension* merupakan tahapan pemanjangan primer. Dan *post-extension* merupakan tahapan akhir dan pematangan. Tahapan *denaturasi* sampai tahap *extension* merupakan tahapan berulang dengan setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA.

Pemilihan suhu *annealing* merupakan tahapan yang sangat penting. Menurut Prakoso et al. (2016), mispriming dapat menyebabkan sensitivitas antara primer dan template DNA, yang dapat memengaruhi hasil PCR. Zein dan Prawiradilaga (2013), masalah ini bisa diselesaikan secara bertahap dengan menurunkan suhu *annealing* pada setiap 1°C untuk mendapatkan target bp yang diharapkan. Pemilihan suhu *annealing* dapat dilakukan dengan memperhatikan T_m (suhu leleh) dari primer. Suhu T_m pada primer *forward* 57 °C dan primer *reverse* 59 °C. suhu *annealing* dilakukan optimasi diantara 57 °C sampai 63 °C. optimasi suhu *annealing* yang digunakan diantaranya

pada suhu 57 °C, 57,3 °C, 58,1 °C, 59,3 °C, 60,7 °C, 61,9 °C, 62,7 °C, 63 °C.

3. Elektroforesis dan Visualisasi

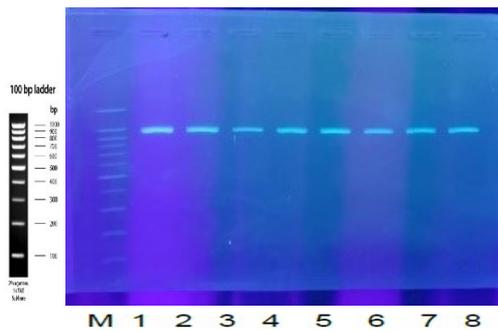
Hasil amplifikasi gen ATP1 A1 dengan optimasi PCR dilakukan menggunakan teknik elektroforesis. Elektroforesis merupakan proses memisahkan molekul dalam gel menggunakan medan listrik. Hasil elektroforesis dapat divisualisasi dengan UV transiluminator. Prinsip kerja UV transiluminator dengan menggunakan sinar UV yang dipancarkan akan memendarkan flouresafe DNA stain yang menempel pada DNA.



Gambar 2. Elektroforesis hasil isolasi DNA (M : marker 100bp, 1 : sampel nomor tube 1, 2 : sampel nomor tube 2, 3 : sampel nomor tube 3, 4 : sampel nomor tube 4, 5 : sampel nomor tube 5, 6 : sampel nomor tube 6, 7 : sampel nomor tube 7, 8 : sampel nomor tube 8)

Hasil elektroforesis agarose pada isolasi DNA menunjukkan DNA pada 8 sampel dapat diisolasi DNA dengan baik. Hasil isolasi menunjukkan munculnya pita yang tebal dan jelas pada seluruh sampel. Sebagaimana dinyatakan oleh Hidayati et al. (2016), hasil isolasi DNA yang menunjukkan pita DNA yang tebal dan terangnya secara kualitatif menjelaskan bahwa konsentrasi hasil isolasi DNA yang baik dan tinggi, sedangkan pita DNA tipis menjelaskan bahwa konsentrasi DNA yang

dihasilkan yang rendah atau kurang maksimal.



Gambar 3. Elektroforesis hasil optimasi PCR DNA (M : marker 100bp, 1 : DNA Tarmin I, 2 : DNA Tarmin II , 3 : DNA Kasjo I, 4 : Kasjo II, 5 : DNA 210501, 6 : s DNA 210502, 7 : DNA 210503, 8 : DNA 210504)

Sampel yang digunakan untuk proses Optimasi PCR adalah sampel hasil isolasi DNA atau ekstrak DNA yang sesuai dengan nomor urut tube pada sampel. Optimasi suhu *annealing* pada sampel nomor 1 disuhu 57 °C, sampel nomor 2 disuhu 57,3 °C, sampel nomor 3 disuhu 58,1 °C, sampel nomor 4 disuhu 59,3 °C, sampel nomor 5 disuhu 60,7 °C, sampel nomor 6 disuhu 61,9 °C, sampel nomor 7 disuhu 62,7 °C dan sampel nomor 8 disuhu 63 °C. Hasil visualisasi elektroforesis tersebut menunjukkan seluruh sampel dapat mengamplifikasi gen ATP1 A1 pada ukuran 996 bp. Pada sampel nomor 1 dengan suhu *annealing* 57 °C menunjukkan pita yang sangat tebal dan jelas jika dibandingkan dengan yang lainnya dan sesuai dengan T_m primer sehingga dapat digunakan sebagai suhu *annealing* yang optimum.

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwasanya pada semua sampel sapi Jabres dan Galekan bisa terisolasi dengan baik pada hasil elektroferesis yang ditandai dengan munculnya pita DNA terang dan tebal. Di

sisi lain, penggunaan metode optimasi PCR gen ATP1 A1 pada sapi lokal Jabres dan Galekan menunjukkan bahwa tahapan *suhu annealing* pada optimasi PCR sangatlah penting untuk menghindari *mispriming*. Pada penelitian ini, hasil optimasi suhu *annealing* pada seluruh sampel dapat mengamplifikasi gen ATP1 A1 pada ukuran 996 bp. Yang mana, menunjukkan bahwasanya pada proses optimasi PCR didapatkan suhu *annealing* yang optimum pada suhu 57 °C untuk mengidentifikasi gen ATP1 A1 pada sapi lokal Jabres dan Galekan yang tahan terhadap panas atau *heat stress*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Bantuan, motivasi, dukungan, dan kolaborasi dari berbagai pihak dan instansi terkait sangat penting untuk keberhasilan penelitian ini. Penulis berterima kasih kepada Kepala Pusat Riset Peternakan, Organisasi Riset Pertanian dan Pangan, dan Badan Riset dan Inovasi Nasional karena telah mendukung dan mendorongnya. Selain itu, kami berterima kasih kepada Universitas Tatung dan Universitas Tulang Bawang Lampung atas kolaborasi dan dukungannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, J. M., Schütz, K. E., & Tucker, C. B. (2013). Dairy cows use and prefer feed bunks fitted with sprinklers. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 5035–5045. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6282>
- Chen, X., Shu, H., Sun, F., Yao, J., & Gu, X. (2023). Impact of Heat Stress on Blood, Production, and Physiological Indicators in Heat-Tolerant and Heat-Sensitive Dairy Cows. *Animals*, 13(16). <https://doi.org/10.3390/ani13162562>

- Hidayati, H., Saleh, E., & Aulawi, T. (2016). Identifikasi keragaman gen *bmpr-1b* (bone morphogenetic protein receptor *ib*) pada ayam arab, ayam kampung dan ayam ras petelur menggunakan *pcr-rflp*. *Jurnal Peternakan*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.24014/jupet.v13i1.2383>
- Imran, S., Khan, M. S., Hassan, F. U., & Qureshi, Z. I. (2021). Genetic characterization of 38 cholistani breed of cattle for *atp1a1* gene and its association to heat tolerance traits. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 58(1), 229–234. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/21.11>
- Klabnik, J. L., Christenson, L. K., Gunewardena, S. S. A., Pohler, K. G., Rispoli, L. A., Payton, R. R., Moorey, S. E., Neal Schrick, F., & Edwards, J. L. (2022). Heat-induced increases in body temperature in lactating dairy cows: impact on the cumulus and granulosa cell transcriptome of the periovulatory follicle. *Journal of Animal Science*, 100(7). <https://doi.org/10.1093/jas/skac121>
- Li, R., Ahmad, M. J., Hou, M., Wang, X., Liu, S., Li, J., Jiang, Q., Huang, J., & Yang, L. (2023). Identification of target genes and pathways related to heat tolerance in Chinese Holstein cows. *Livestock Science*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105213>
- Liberati, P. (2023). An Active Drying Sensor to Drive Dairy Cow Sprinkling Cooling Systems. *Sustainability (Switzerland)*, 15(12). <https://doi.org/10.3390/su15129384>
- Macavoray, A., Rashid, M. A., Rahman, H., & Shahid, M. Q. (2023a). On-Farm Water Use Efficiency: Impact of Sprinkler Cycle and Flow Rate to Cool Holstein Cows during Semi-Arid Summer. *Sustainability (Switzerland)*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/su15043774>
- Macavoray, A., Rashid, M. A., Rahman, H., & Shahid, M. Q. (2023b). Sustainable Management of Dairy Cows in Semi-Arid Summers: Additional Early Nighttime Sprinkler Cooling for Heat Stress Mitigation. *Sustainability (Switzerland)*, 15(15). <https://doi.org/10.3390/su151511665>
- Marwayana, O. (2015). Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) dari Sampel Jaringan Otot. *OSEANA*, XI, 1–9.
- Mavrogonatou, E., Papadimitriou, K., Urban, J., Papadopoulos, V., & Kletsas, D. (2015). Deficiency in the $\alpha 1$ Subunit of Na^+/K^+ -ATPase Enhances the Anti-Proliferative Effect of High Osmolality in Nucleus Pulposus Intervertebral Disc Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 230. <https://doi.org/10.1002/jcp.25040>
- Osei-Amponsah, R., Dunshea, F. R., Leury, B. J., Cheng, L., Cullen, B., Joy, A., Abhijith, A., Zhang, M. H., & Chauhan, S. S. (2020). Heat stress impacts on lactating cows grazing australian summer pastures on an automatic robotic dairy. *Animals*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/ani10050869>
- Prasanna, J. S., Rao, S. T. V., Prakash, M. G., Rathod, S., Kalyani, P., & Reddy, B. R. (2022). Association of SSCP Polymorphisms of HSP70 Gene with Physiological, Production and Reproduction Performance in Sahiwal and Crossbred Cows. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 41(2), 150–155. <https://doi.org/10.18805/ajdfr.DR-1796>
- Prakoso, S. P., Wirajana, I. N., & Suarsa, I. W. (2016). Amplifikasi fragmen gen 18s rRNA pada dna metagenomik

- madu dengan teknik PCR (polymerase chain reaction). *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences (IJLFS)*, 7(3), 1. <https://doi.org/10.24843/ijlfs.2017.v07.i01.p03>
- Rajamanickam, G. D., Kastelic, J. P., & Thundathil, J. C. (2017). Na/K-ATPase regulates bovine sperm capacitation through raft- and non-raft-mediated signaling mechanisms. *Molecular Reproduction and Development*, 84(11), 1168–1182. <https://doi.org/10.1002/mrd.22879>
- Robba, D.K., Ramsiati, D.T., Wulansari, W.i. Isolasi DNA Darah Sapi Madura dengan Modifikasi Metode KIT. Seminar Nasional IV Hasil-hasil Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat. Fakultas Peternakan Universitas Jambi. 7 November 2022. 4(1), 58-63.
- Romjali, E. (2018). Program pembibitan sapi potong lokal Indonesia. *Wartazoa*, 28(4), 199–210.
- Shpigel, N. Y., Pasternak, Z., Factor, G., & Gottlieb, Y. (2015). Diversity of bacterial biofilm communities on sprinklers from dairy farm cooling systems in Israel. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139111>
- Sutedjo, H. (2016). Dampak fisiologis dari cekaman panas pada ternak (physiology effect of heat stress on animal). 3(1), 93–105.
- Tresoldi, G., Schütz, K. E., & Tucker, C. B. (2018). Cooling cows with sprinklers: Timing strategy affects physiological responses to heat load. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 11237–11246. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14917>
- Yuwono. 2005. Teori dan Aplikasi PCR. Yogyakarta: Erlangga.
- Zamorano-Algandar, R., Medrano, J. F., Thomas, M. G., Enns, R. M., Speidel, S. E., Sánchez-Castro, M. A., Luna-Nevárez, G., Leyva-Corona, J. C., & Luna-Nevárez, P. (2023). Genetic Markers Associated with Milk Production and Thermotolerance in Holstein Dairy Cows Managed in a Heat-Stressed Environment. *Biology*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/biology12050679>