Analisis Mutasi Gen *Pancreatic Duodenal Homeobox 1* (PDX-1) Berdasarkan pada Kadar Glukosa Darah Kucing Domestik (*Felis catus*) Post Ovariohisterektomy (OH)

The Analysis of Pancreatic Duodenal Homeobox 1 (PDX-1) Gene Mutation Based on Blood Glucose Level on Domestic Cats (Felis catus) Post Ovaryohisterectomy

Hana Mitsuki Putri¹, Aulanni'am¹, Ajeng Aeka¹, Dodik Prasetyo¹, Fajar Shodiq Permata^{1*}

¹Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

*Email : drh.fajar@ub.ac.id

ABSTRAK

Ovariohisterektomy (OH) pada kucing domestik menyebabkan beberapa efek samping, diantaranya yaitu obesitas. Obesitas berhubungan sangat erat dengan penyakit diabetes. Gen glukoregulator yang mungkin akan menjadi penyebab resistensi insulin jika mengalami mutasi gen adalah gen PDX-1. Resistensi insulin tersebut akan berpengaruh sangat erat dengan glukosa darah dalam tubuh. Tujuan penelitian adalah melihat hubungan antara polimorfisme gen PDX-1 dengan kadar glukosa darah pada kucing domestik yang mengalami OH. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah amplifikasi invitro PCR gen PDX-1 dengan primer *Forward* 'CCG AGC TGT CAA AGC TAG CG' dan *Reverse* 'GAA CCG GTA GAG GGT CTT GG' dan dilanjutkan dengan sekuensing terhadap produk PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan mendasar pada urutan basa dalam sekuen gen PDX-1 pada c.435G>A, c.927A>T, dan c.584A>G. Perbedaan mendasar pada urutan gen PDX-1 merupakan *silent mutation*.

Kata Kunci : gen PDX-1, glukosa darah, kucing, mutasi gen, ovariohisterektomy.

ABSTRACT

Ovariohysterectomy (OH) in domestic cats causes several side effects, including obesity. Obesity is closely related to diabetes. The glucoregulatory gene that will cause insulin resistance if there is a gene mutation is the PDX-1 gene. This insulin resistance will have a very immediate effect on blood glucose in the body. The study examined the relationship between PDX-1 gene polymorphisms and blood glucose levels in domestic cats with OH. The method used in this study was in vitro PCR amplification of the PDX-1 gene with Forward primers 'CCG AGC TGT CAA AGC TAG CG' and Reverse 'GAA CCG GTA GAG GGT CTT GG' and followed by sequencing of PCR products. The results showed fundamental differences in the base sequence in the PDX-1 gene sequences at c.435G>A, c.927A>T, and c.584A>G. The fundamental difference in the PDX1 gene sequence is a silent mutation.

Keywords : blood glucose, cat, gene mutation, ovariohysterectomy, PDX-1 gene

PENDAHULUAN

Jumlah populasi kucing di Indonesia sebesar 15 juta ekor, merupakan peringkat kedua sedunia (WSPA, 2007). Tingginya populasi kucing dapat meningkatkan risiko penyebaran penyakit baik kepada sesama bangsa kucing ataupun kepada manusia (Zoonosis). Pengendalian

populasi kucing tersebut dapat dilakukan melalui tindakan medis ovariohysterectomy (OH). Menurut WCPC (2009), ovariectomy adalah tindakan medis berupa amputasi, pengeluaran, dan pengangkatan ovarium dari dalam rongga abdomen. Sedangkan histerektomy merupakan tindakan

amputasi, pengeluaran, dan pengambilan uterus dari dalam rongga abdomen (WCPC, 2009). Selain sebagai upaya menekan populasi kucing, OH dapat digunakan untuk indikasi medis seperti tumor uterus, pyometra, endometritis, kista, dan penyakit organ reproduksi lainnya (Bright, 2011). Pada sisi lain, tindakan OH menyebabkan meningkatnya risiko penyakit-penyakit seperti kanker tulang, displasia pinggul, obesitas, dan diabetes (Hardie, 2007).

Diabetes dapat terjadi ketika kadar insulin yang dihasilkan oleh kelenjar pankreas kurang dari kebutuhan untuk transport glukosa darah ke dalam sel. Diabetes pada kucing sangat mirip dengan diabetes tipe 2 pada manusia. Faktor risiko penyakit ini diantaranya adalah obesitas dan gaya hidup yang tidak aktif (Öhlund, 2017). Kucing yang telah disterilisasi memiliki dua hingga sembilan kali lipat peningkatan risiko terkena diabetes mellitus (Kustritz, 2012), diduga karena penurunan sensitivitas insulin. Penurunan sensitivitas insulin dapat disebabkan oleh obesitas, sehingga menyebabkan berkurangnya aktifitas fisik hewan.

Terjangkitnya penyakit diabetes dapat dipengaruhi oleh gen pembentukan insulin, salah satunya adalah *Pancreatic Duodenal Homeobox 1* (PDX-1) yang merupakan gen faktor transkripsi yang berperan dalam proses terbentuknya pankreas pada masa organogenesis serta maturasi sel β pankreas. Penurunan ekspresi gen PDX-1 menyebabkan kegagalan maturasi sel β pankreas dan diabetes tipe 2. Defisiensi PDX-1 dapat menyebabkan disfungsi dan kematian sel β pankreas yang menyebabkan penyakit

diabetes. Kejadian ini dapat ditemui pada hewan pengerat maupun manusia (Fujimoto and Polonsky, 2009). Namun demikian, mutasi gen PDX-1 pada kucing belum pernah dilaporkan.

Penelitian ini bertujuan mendeteksi polimorfisme gen PDX-1 pada kucing dan menganalisis hubungan antara polimorfisme gen PDX-1 dan peningkatan risiko penyakit diabetes pada kucing domestik (*Felis catus*) setelah dilakukan tindakan ovariohisterektomi.

MATERI DAN METODE

Penelitian dikerjakan di laboratorium Animal Disease Diagnostic, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Sampel yang digunakan merupakan sampel darah dari tiga ekor kucing domestik pasca OH dan satu ekor kucing domestik belum OH yang telah dipuasakan selama 6 jam. Sampel darah diperoleh dari *vena cephalica antebrachii* sebanyak 1 mL menggunakan *disposable syringe* 1 mL. Karakteristik sampel ditampilkan dalam **Tabel 1**. Pemeriksaan kadar glukosa dikerjakan di Laboratorium Klinik Panglima Sudirman, Malang.

Tabel 1. Sampel kucing domestik

No	Kondisi	Kode
1	OH	KOH1
2	OH	KOH2
3	OH	KOH3
4	KNOH	KNOH

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan QiAmp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Darah dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 mL dan

ditambahkan 20 µL protease, 300 µL PBS dan 200 µL buffer AL (Lysis buffer)., Kemudian campuran larutan dihomogenkan dengan *vortex mixer* selama 15 detik lalu diinkubasi 30 menit pada suhu 56°C. Setelah diinkubasi, larutan ditambahkan 200 µL etanol absolut, kemudian divortex kembali 15 detik. Larutan kemudian dituangkan ke dalam *spin collum* yang terpasang pada *collection tube* dan disentrifuge selama satu menit pada 8.000 rpm. *Spin collum* dipindahkan pada *collection tube* baru, ditambah 500 µL buffer AW1 dan disentrifuge selama satu menit pada 8.000 rpm. Setelah itu, sampel dipindahkan ke dalam *collection tube* baru, ditambah 500 µL buffer AW2 dan disentrifuge pada 13.500 rpm selama 6 menit. Setelah *Spin collum* dipindahkan dalam *collection tube* yang baru, ditambahkan 100 µL buffer AE, diamkan 1 menit dalam suhu ruang dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 1 menit.

Uji Kuantitas DNA

Pengujian kuantitas DNA dilakukan dengan alat berupa nanophotometer (AE-Nano 200 Nucleic Acid Analyzer®, Pixel Lab Instrument Ltd., Guangdong, China) pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan pengukuran kemurnian DNA dikerjakan menggunakan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (Harahap, 2017). Batas nilai kemurnian DNA yang baik memiliki rasio 260/280 nm berkisar 1,7–2,0 dimana jika nilai absorbansi di luar batas normal dinyatakan bahwa adanya kontaminasi berlebih yang dapat mempengaruhi hasil pembacaan (Promega, 2017).

Uji Kualitas DNA

Uji kualitas DNA dilakukan terhadap hasil isolasi DNA total dengan elektroforensis menggunakan gel agarose untuk mengetahui panjang fragment DNA yang berhasil terisolasi. Elektroforesis (Biorad, CA, USA) dilakukan menggunakan gel agarose pada konsentrasi 1% yang dicampur EtBr 1 µL, pada tegangan 100 volt. DNA Ladder 1kb ditambahkan pada satu kolom terpisah sebagai penanda (*marker*) ukuran panjang basa DNA. Gel agarose elektroforensis 1% kemudian divisualisasi menggunakan UV-Trasnsilluminator (Bi-O-Vision™, New York, USA).

Desain Primer

Primer didesain berdasarkan sekuen DNA dari Ensembl data base Gen dengan nomor akses ENSFCAT00000044231.2. (Ensembl, 2019). Primer *forward* diperoleh dari bagian awal exon 1 dan primer *reverse* diperoleh dari bagian awal intron 1-2, sehingga target gen yang didapatkan merupakan bagian dari exon 1 (578bp). Primer *forward* dan primer *reverse* didesain menggunakan perangkat lunak Primer 3 plus (primer3plus, A. Untergasser, Germany). Sepasang sekuens primer yang didapatkan adalah primer *forward* (HN_F) 5'- CCG AGC TGT CAA AGC TAG CG-3' (20 bp; Tm: 58,5°C; GC: 60,0%) dan primer *reverse* (HN_R) 5'- GAA CCG GTA GAG GGT CTT GG -3' (length: 20 bp; Tm: 57,1°C; GC: 60,0%).

Ampifikasi DNA PDX-1 dengan PCR berlangsung sebanyak 35 siklus, menggunakan alat *Thermo Senso Quest* (Hannah-vogt-str.1, Goettingen,

Germany). Ukuran DNA target adalah 578 bp. Program PCR meliputi Pradenaturasi 4 menit pada 94°C, denaturasi 30 detik pada 94°C, *annealing* 30 detik pada 55,0°C, eksistensi 1 menit pada 72°C dan *post* eksistensi 7 menit pada 72°C (**Tabel 2**). Sekuensing produk PCR 578 bp dikerjakan menggunakan metode Sanger sequencing (Sanger *et al.*, 1977).

Tabel 2. Program PCR gen PDX-1

Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	4 menit	94°C
Denaturasi	30 detik	94°C
<i>Annealing</i>	30 detik	55,0°C
Eksistensi	1 menit	72°C
<i>Post</i> Eksistensi	7 menit	72°C

Analisis Data

Analisis obesitas dilakukan dengan perhitungan *Feline Body Mass Indeks* (FBMI) menggunakan metode Kawasumi dan Waltham (Waltham 2003; Kawasumi *et al.*, 2016). Penghitungan dilakukan dengan membagi berat badan dengan panjang kaki belakang dari atas os. Patella hingga ujung os. Calcaneus (LIM atau *Leg Index Measurement*) dan dibandingkan dengan standar FBMI pada kedua metode tersebut.

Data sekuense DNA dianalisis secara kualitatif dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen gen PDX-1 kucing domestik OH dan kucing domestik non OH serta menganalisa perbedaan sekuen asam amino menggunakan *software BioEdit* (*BioEdit, sequence alignment editor*) versi 7.2.5, (Informer Technologies Inc, Los Angeles, USA) dan BLAST NCBI. Tahapan analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuen

DNA. Skuen DNA yang digunakan berasal dari *database Ensembl genome: ENSFCAT00000044231.2*. menggunakan *software BioEdit* (Informer Technologies Inc, Los Angeles, USA)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Body Scoring Kucing

Hasil pengukuran FBMI ditampilkan pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil pengukuran *body scoring* kucing menggunakan *Feline Body Mass Index* (FBMI)

Sampel	Berat (kg)	LIM (cm)	Lingkar Dada (cm)	Hasil FBMI
KOH1	4	15	34	26,6
KOH2	4,5	12	38	37,5
KOH3	3,5	15	31,5	23,3
KNOH	2	13	29	15,3

Keterangan: KOH1: Kucing OH 1, KOH2: Kucing OH 2, KOH3: Kucing OH 3, KNOH: Kucing Non OH

Hasil pengukuran FBMI pada **Tabel 3** menunjukkan satu kucing OH mengalami obesitas, sedangkan kucing lainnya normal Kawasumi *et al.*, (2016). Sementara itu, berdasarkan kriteria yang dikembangkan oleh Waltham menunjukkan bahwa kucing tersebut mengalami kelebihan berat badan (*overweight*) (Waltham, 2003) (**Gambar 1**).

Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah Kucing

Hasil pemeriksaan kadar glukosa pada kucing OH dan non OH ditampilkan pada **Tabel 4**. Seluruh kucing memiliki kadar glukosa dalam kisaran nilai normal. Dua kucing OH memiliki kadar glukosa

normal tinggi, namun satu berada pada kadar yang rendah

Gambar 1. Tabel *Feline Body Mass Index* (FBMI) metode Waltham (2003).

Tabel 4. Kadar glukosa darah kucing

Sampel	Kadar Glukosa Darah (mg/dL)
KOH1	159
KOH2	81
KOH3	157
KNOH	103

Keterangan: KOH1: Kucing OH 1 (Ayam), KOH2: Kucing OH 2 (Mui), KOH3: Kucing OH 3 (MJ), KNOH: Kucing Non OH (Bodo)

Selain diabetes, stres akut dapat mengakibatkan hiperglikemia (Nelson, 2002), Kadar gula darah akibat stres akut dapat meningkat mencapai 300–400 mg/dL (Behrend *et al.*, 2018). Faktor lain yang meningkatkan kadar glukosa darah adalah keadaan hemolysis (Koseoglu *et al.*, 2010).

Uji Kuantitas dan Kualitas Hasil Isolasi DNA Darah Kucing Domestik Post OH

Hasil nilai konsentrasi dan kemurnian uji kuantitas DNA ditampilkan dalam **Tabel 5**, dimana hasil uji kuantitas sampel KOH1 menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 5,42 ng/μL, sampel KOH2

sebesar 5,80 ng/μL, sampel KOH3 sebesar 3,31 ng/μL, dan pada KNOH sebesar 28,67 ng/μL.

Tabel 5. Konsentrasi dan kemurnian kucing domestik (*Felis catus*)

Kode Sampel	Konsentrasi (ng/μL)	Kemurnian (nm) (Absorbansi 260/280)
KOH1	5,42	1,98
KOH2	5,80	8,48
KOH3	3,31	3,71
KNOH	28,67	1,68

Uji kemurnian DNA total didapatkan hasil yang ditunjukkan pada sampel KOH1 mendapatkan nilai kemurnian yang baik yaitu 1,98. Sampel KOH2 dan KOH3 menunjukkan nilai diatas 2,0, sedangkan pada sampel KNOH menunjukkan nilai dibawah 1,7. Menurut Santella (2006), jika rasio tersebut berada di atas kisaran nilai normal DNA murni maka terjadi kontaminasi RNA, sedangkan rasio di bawah 1,7 maka ditemukan adanya kontaminasi protein. Walaupun tiga sampel DNA menunjukkan hasil di luar batas nilai normal namun amplifikasi dengan PCR tetap dapat dilakukan, karena kontaminan tidak menghambat aktivitas kerja yang dimiliki oleh enzim polimerase (Chen and Janes, 2002).

Amplifikasi Gen PDX-1 dengan Metode PCR

Hasil elektroforesis ditunjukkan pada **Gambar 3**. Produk PCR gen PDX-1 berukuran 578 bp.

Gambar 2. Elektroforensis DNA total (agarose 1%)

Keterangan : M : Marker (1 kb), KOH (Kucing Ovariohisterektomi), KNOH (Kucing non Ovariohisterektomi), KOH1: Ayam, KOH2: Mui, KOH3: MJ, KNOH: Bodo

Gambar 3. Hasil elektroforensis produk PCR konsentrasi agarose 1,8%.
Keterangan : M: Marker (100bp), KOH1: Ayam, KOH2: Mui, KOH3: MJ, KNOH: Bodo.

Sekuensing Gen PDX-1 Kucing Domestik

Sekuens sampel KOH1 memiliki grafik elektroferogram yang kurang baik. Hal ini menyebabkan sampel KOH1 tidak dapat digunakan untuk proses analisis selanjutnya yaitu penyejajaran sekuens DNA. Sampel KOH2, KOH3 disejajarkan dengan KNOH dengan gen

PDX-1 dari sekuens DNA kromosom A1 *Felis catus* urutan 7559071-7566360.

Tabel 6. *Query Coverage* dan *Identity* sampel dibandingkan dengan database genebank DNA PDX-1 kucing dengan kode akses NCBI Genebank: XM 011281516.2.

Sampel	<i>Query Coverage</i>	<i>Identity</i>
KOH2	85%	99%
KOH3	85%	99%
KNOH	85%	99%

Pada **Tabel 6**, sampel kucing domestik KOH2, KOH3, dan KNOH memiliki nilai *query coverage* 85% dan *identity* 99% jika dibandingkan dengan DNA PDX-1 kucing dengan kode akses NCBI Genebank: XM 011281516.2. Persentase nilai *query coverage* menunjukkan persen panjang dari segmen DNA yang dilakukan penyejajaran. Nilai *identity* menunjukkan presentasi dari identitas dari satu segmen DNA. Hasil penyejajaran menunjukkan bahwa sekuens DNA sampel KOH2, KOH3, dan KNOH memiliki kemiripan dengan sekuens DNA yang diinginkan yaitu gen PDX-1 kucing domestik.

Analisa Sekuens DNA dan Asam Amino Gen PDX-1 Kucing Domestik OH

Analisa sekuens DNA gen PDX-1 dilakukan dengan melakukan penyejajaran sekuens DNA sampel KOH2, KOH3, dan KNOH serta database gen PDX-1 Ensembl genome: ENSFCAT00000044231.2 Urutan sekuens sampel yang disejajarkan dimulai dari basa 401 sampai 927 dengan total target gen yaitu 526 bp.

Tabel 7. Mutasi pada ketiga sekuen sampel dibandingkan dengan *database Genebank*

Sampel	Letak Basa	Substitusi	Jenis Mutasi
KOH2	435	G>A	Transversi
	927	A>T	Transisi
	584	G>A	Transversi
KOH3	435	G>A	Transversi
	927	A>T	Transisi
KNOH	435	G>A	Transversi
	927	A>T	Transisi

Berdasarkan **Tabel 7**, terdapat dua mutasi transversi G>A pada sampel KOH2 yaitu pada basa ke 435 dan 584 dan satu mutasi transversi pada KOH3 dan KNOH pada basa ke 435. Terdapat mutasi transisi A>T pada basa ke 927 pada KOH2, KOH3 dan KNOH. Transversi merupakan bergantinya basa purin dengan pirimidin, primidin dengan purin pada posisi yang sama, sedangkan transisi merupakan bergantinya basa pada purin dengan purin ataupun pirimidin dengan pirimidin (Warmadewi, 2017).

Analisa sekuen asam amino dilakukan dengan cara menerjemahkan sekuen gen bagian exon 1 gen PDX-1 dengan BLASTx. Hal ini bertujuan untuk menerjemahkan sekuen gen menjadi sekuen asam amino dan disejajarkan dengan database protein PDX-1 NCBI.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
189 bits(480)	1e-56	Compositional matrix adjust.	134/134(100%)	134/134(100%)	0/134(0%)	+3

Gambar 4. Hasil BLAST sekuen asam amino gen PDX-1

Hasil BLASTx sekuen asam amino ketiga sampel ditunjukkan pada **Gambar 4**. Asam amino mulai terekspresi dari basa ke 69 hingga 470. Sekuen asam amino sampel apabila dibandingkan dengan sekuen asam amino *database* NCBI memiliki nilai *identity* 100%. Hal ini mengindikasikan bahwa perubahan urutan sekuen DNA gen PDX-1 pada sampel KOH2, KOH3, dan KNOH merupakan *silent mutation* (Wariantio, 2011). *Silent mutation* adalah mutasi yang hanya terjadi pada genotif gen tapi tidak merubah ekspresi gen. Terjadinya perbedaan sekuen basa gen PDX-1 kucing domestik merupakan polimorfisme (Indrawan *et al.*, 2007). Polimorfisme disebabkan oleh faktor keturunan ataupun faktor lingkungan (tidak diwariskan) (Laimeheriwa, 2018).

Hubungan Gen PDX-1 dengan Obesitas pada Kucing

Gen PDX-1 merupakan gen glukoregulator tubuh yang secara tidak langsung berperan dalam pengaturan kadar glukosa darah. Polimorfisme gen PDX-1 diduga merupakan salah satu faktor yang hubungan dengan kejadian diabetes melitus tipe 2. Dalam penelitian ini, pada kucing OH yang mengalami obesitas (KOH2) ditemukan lebih banyak *silent mutation* pada gen PDX-1 dibandingkan dengan kucing OH yang tidak mengalami obesitas (KOH3) atau kucing non OH yang tidak mengalami obesitas (KNOH). Walaupun penelitian ini tidak dapat menyimpulkan peran gen PDX-1 pada obesitas kucing domestik OH karena jumlah sampel yang terbatas, tapi penelitian ini dapat menjadi dasar studi lanjutan dengan sampel yang lebih

banyak, untuk mengetahui peran gen PDX-1 dalam obesitas kucing pasca operasi OH.

Penyebab lain diabetes melitus akibat resistensi insulin adalah polimorfisme pada gen fosforilasi tyrosine reseptor insulin dan pada protein IRS yang menyebabkan abnormalitas dari fungsi reseptor GLUT4 (Wilcox, 2005; Sheperd and Kahn, 1999). Riset lanjutan tentang faktor risiko genetik diabetes melitus pada kucing OH dapat diarahkan pada analisis tentang peran gen-gen ini.

KESIMPULAN

Terjadi dua mutasi transversasi dan satu mutasi transisi pada gen PDX-1 dengan terjadi perubahan c.435G>A, c.927A>T, dan c.584G>A namun merupakan *silent mutation*.

DAFTAR PUSTAKA

- Behrend, E., Holford, A., Lathan, P., Rucinsky, R., Schulman, R. 2018. 2018 AAHA Diabetes Management Guidelines for Dogs and Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 54(1):1–21.
- Bright, R. M. 2011. *Sterilization of Female Cats*. Saunders: Elsevier. Inc.
- Chen, B. Y. and Janes, H. W. 2002. *Methods in Biomolecular Biology. PCR Cloning Protocols*. Ed ke-2. Rutgers University.
- Ensembl. 2019. Gene: ENSFCAG00000044231. [diunduh 2019 Agu 27]. Tersedia pada: https://asia.ensembl.org/Felis_catus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSFCAG00000044231;r=E2:53735938-53820705;t=ENSFCAT000000056838
- Fujimoto, K. and Polonsky, K. S. 2009. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β -cell survival. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 11:30–37.
- Harahap, A. S. 2017. Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Beberapa Populasi Pohon Kapur Sumatera. *Journal of Science and Agronomy Panca Budi*. 2(2):1-6.
- Hardie, E. 2007. *Pros and Cons of Neutering*. New York: International Veterinary Information Service.
- Indrawan, M., Primack, R. B., Supriatna, J. 2007. *Biologi: Konservasi*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Kawasumi, K., Iwazaki, E., Okada, Y., Arai, T. 2016. Effectiveness of feline body mass index (fBMI) as new diagnostic tool for obesity. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 64(1):51-55.
- Koseoglu, M., Hur, A., Atay, A., Çuhadar, S. 2010. Original professional article. *Biochemia Medica*. 2(1):79–85.
- Kustritz, M. V. 2012. *Effects of Surgical Sterilization on Canine and Feline Health and on Society*. Minnesota: Blackwell Verlag GmbH.
- Laimeheriwa, B. M. 2018. *Mekanisme Terjadinya Variasi Individu dalam Populasinya*. Universitas Pattimura.
- Nelson, R. 2002. Editorial: Stress Hyperglycemia and Diabetes Mellitus in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16(2):121–122.
- Öhlund, M. 2017. *Feline diabetes mellitus: Aspects on epidemiology and pathogenesis*. Uppsala: Faculty of Veterinary Medicine and Animal

- Science Department of Clinical Sciences.
- Promega. 2017. How I Determine the concentration, yield and purity of a DNA sample. [diunduh 2019 Mei 15]. Tersedia pada: [https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-DNA-sample/? activeTab=0](https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-DNA-sample/?activeTab=0)
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(12):5463–5467.
- Santella, R. M. 2006. *Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genome Amplification*. Cancer Epidemiol Biomarkers.
- Sheperd, P. R. and Kahn, B. B. 1999. *Glucose Transporter and Insulin Action*. The New England Journal of Medicine.
- Waltham. 2003. *Feline Body Mass Index (FBMI)*. Clinic Tools.
- Warianto, C. 2011. Mutasi Handout Kuliah.
- Warmadewi, D. A. 2017. *Buku Ajar Mutasi Genetik*. Denpasar: Universitas Udayana.
- WCPC. 2009. Ovariohysterectomy in Cats. [diunduh 2018 Okt 13]. Tersedia pada: [://www.willowcreekpet.com/wpcontent/uploads/Ovariohysterectomy-in-Cats.pdf](http://www.willowcreekpet.com/wpcontent/uploads/Ovariohysterectomy-in-Cats.pdf)
- Wilcox, G. 2005. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochemicsl Review*. 26(2):19–39.
- WSPA. 2007. Global Companion Animal Ownership and Trade: Project Summary. [diunduh 2018 Okt 13]. Tersedia pada: <http://www.wspainternational.org>