

THE SECOND KISS DAN GPR54: AMPLIFIKASI DAN SEKUENSING GEN PENYANDI FAKTOR REPRODUKSI IKAN NILA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Ricky Febrinaldy Simanjuntak

Staff Pengajar Jurusan Budidaya Perairan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Borneo Tarakan
Jalan Amal Lama No. 1, Tarakan. Kalimantan Utara. 77123
rickfebrinald@engineer.com

ABSTRACT

Several years ago since it was first found to play a role in metastasis, Kisspeptin (encoded by Kiss1) that has GPR54 cognitive receptors is known to act as a regulator to initiating reproductive factors, involving GnRH secretion in some vertebrates, including fish. However, each of the other vertebrates will express different kinds of Kisspeptin based on the types and its evolutionary line. The aims of this research is to confirm the Kiss2 type along with the GPR54 receptor on Tilapia. RNA isolation, cDNA cloning and DNA amplification was made from samples of tilapia testes. The DNA amplification result will then be sequenced by MACROGEN. Inc. The amplified results of the Kiss2, GPR54 and β -Actin (positive control) genes observed using agarose gel electrophoresis show the product size of each gene is 199 bp, 155 bp and 197 bp. Confirmation of sequencing results by the BLAST method for Kiss2, GPR54 and β -Actin genes were: 100%, 97% and 100%, respectively. Based on the research, it can be concluded that the results of each target isolated from the gonad of tilapia indicate the homology/similarity of the sample of each target nucleotide sequence with the world database sequence (gene bank).

Keywords: Kiss2, GPR54, Reproduction, Nile Tilapia

PENDAHULUAN

Sejak pertama kali ditemukan, *Kisspeptin* (dikodekan dengan *Kiss1*) dikenal sebagai *metastin* (*metastasis suppressor gene*), berperan menekan penyebaran kanker baik kanker melanoma maupun kanker payudara (Lee, 1996). Namun saat ini, *Kiss1* diketahui berperan sebagai regulator dalam menginisiasi tingkat kematangan reproduksi dengan melibatkan sekresi GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*), baik perkembangan gonad maupun *sex steroid* pada mamalia dan vertebrata lainnya. *Kisspeptin* bekerja aktif dengan cara berikatan dengan reseptor kognitif *G-Protein Couple*

Receptor 54 (GPR54) (Messenger *et al.*, 2005).

Kisspeptin digolongkan kedalam berbagai tipe peptida pada vertebrata. Studi terbaru menunjukkan bahwa *Kisspeptin* diduga memiliki pengaruh terhadap perkembangan gonad dan berinteraksi pada jalur metabolisme (Sjahdan *et al.*, 2014; Clarke *et al.*, 2015). Peran, *Kisspeptin* diduga menjadi prekursor terhadap tingkat kematangan reproduksi, pembentukan seks steroid melalui sumbu Hipotalamus – Pituitari – Gonad (HPG) serta metabolisme energi (Simanjuntak, 2015). Penelitian ini bertujuan untuk mengkonfirmasi gen pengkode *Kisspeptin* pada ikan Nila

melalui metode sekuensing dan memberikan informasi terbaru mengenai profil *Kisspeptin* sebagai prekursor faktor reproduksi pada golongan ikan.

METODE PENELITIAN

Ikan nila yang digunakan adalah ikan nila jantan yang telah matang gonad (± 4 bulan setelah *hatching*) dengan berat badan awal $30 \pm 0,2$ gr. Ikan nila diperoleh dari Balai Benih Ikan (BBI) Air Tawar Ciparay, Kabupaten Bandung. Ikan yang akan digunakan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 2 minggu kemudian dipelihara sistem resirkulasi tertutup dan diberi pakan 2 kali sehari. Parameter abiotik seperti suhu, pH, *dissolved oxygen* (DO) dikontrol selama pemeliharaan.

Isolasi Gonad Ikan Nila

Isolasi gonad ikan nila dilakukan dengan cara melakukan pembedahan pada bagian perut sisi dalam dengan menggunakan seperangkat *dissecting set*. Sebelum dibedah, ikan nila dipingsankan dahulu dengan menggunakan metode *cold shock*. Testis ikan nila yang di isolasi kemudian di rendam dalam larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) selama 1 menit sebelum di simpan didalam *liquid nitrogen* hingga sampel gonad siap di isolasi RNA nya.

Isolasi RNA Total

Isolasi RNA total dari gonad ikan nila dilakukan dengan menggunakan *Pure Link RNA Mini Kit* (Ambion) dan dilanjutkan dengan pengukuran kuantitas dan kualitas RNA total. Pengukuran kuantitas RNA total ini dilakukan dengan mengukur absorbansi RNA pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm menggunakan Spektrofotometer (*Ultraspec 2000, Pharmacia, Biotech*). Pengukuran kualitas RNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1.5%

yang mengandung *Gel Red* dalam larutan buffer elektroforesis TAE (*Tris-Acetate EDTA*). Hasil Elektroforesis menunjukkan 2 larik gen: 18s dan 28s RNA total bebas kontaminasi, tidak terdegradasi dan siap digunakan untuk sintesis cDNA (*Reverse Transcriptase*).

Kloning cDNA - Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA total yang telah diisolasi dan diketahui konsentrasinya, kemudian disintesis menjadi cDNA (*complementary DNA*) melalui proses *Reverse Transcription* (RT) PCR menggunakan *RevertAidtm First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Thermo Scientific*) dengan Oligo dT primer 1µl dan enzim *Reverse Transcriptase* 1µl. Hasil sintesis cDNA siap digunakan sebagai template untuk amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR (Polymerase Chain Reaction)

Sebanyak 1µl template cDNA akan di amplifikasi dengan menggunakan *Gotaq Green Master Mix Kit* (*Promega*) sesuai protokol yang berlaku dengan bantuan *Thermalcycler T100* (*Bio-Rad*). Penempelan gen target *Kiss2* beserta GPR54 dilakukan dengan menggunakan primer spesifik yang didesain menggunakan Primer3 Plus berbasis web (www.Primer3plus.ut) (Tabel 1)

Sekuensing Amplikon

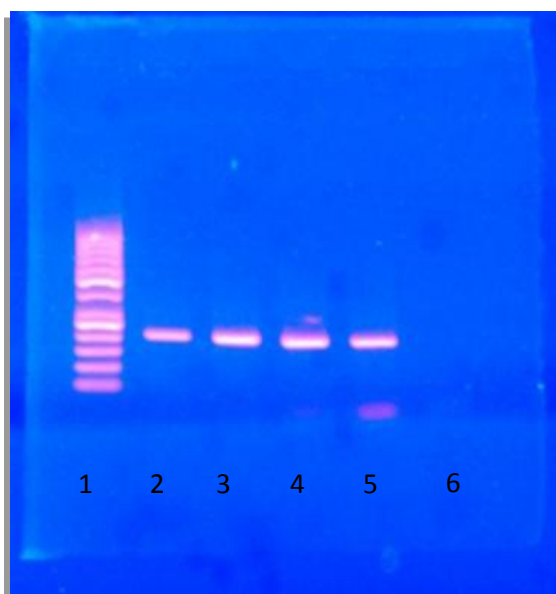
Hasil amplifikasi PCR kemudian akan disekuensing. Proses sekuensing dilakukan oleh MACROGEN.Inc (Korea Selatan). Hasil sekuensing kemudian akan di BLAST dengan menggunakan BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabel 1. Urutan sekuens primer

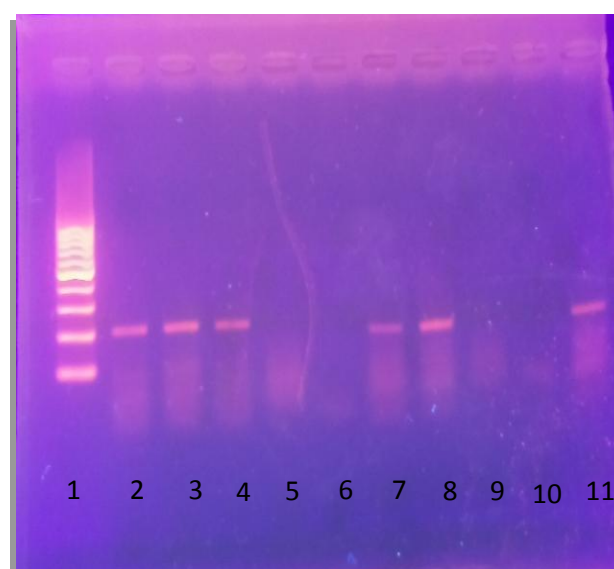
Primer	Product Size	Sekuens
Kiss2	199 bp	F: 5'CTACTGGCTTTGGCTGTGG- R: 5'-CTGCTCCTGTTGCATGTGTT-
GPR54	155 bp	F: 5'-GATGGTGGTAGTGATTGTGCTT- R: 5'-CAGAGGAGTTGGCGTAGGA-3'
β -Actin	197 bp	F: 5'-AGCATCCCGTCCTGCTCACA-3' R: 5'-AGCACAGCCTGGATGGCAAC-

HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara umum, profil amplikon gen target *Kiss2*, *GPR54* dan β -actin dari berbagai suhu *temperatur melting* yang di isolasi dari testis ikan nila dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Elektroforesis gel agarosa. (1). *Ladder*; (2), *Kiss2* 58°C; (3), *Kiss2* 59°C; (4), *Kiss2* 60°C; (5), *Kiss2* 61°C; (6), NTC



Gambar 2. Elektroforesis gel agarosa. (1) *Ladder*; (2) *Actin* 58°C; (3) *Actin* 59°C. (4) *Actin* 60°C, (5). *Actin* 61°C, (6) NTC *Actin*; (7) *GPR54* 59°C; (8) *GPR54* 60°C (9) *GPR54* 63°C (10) NTC *GPR54*; (11) *GPR54* 61°C

Optimasi awal *temperatur melting* primer didasarkan pada jumlah masing-masing basa nukleotida. Hasil amplifikasi yang diamati secara kualitatif dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa, amplikon yang diduga gen *Kiss2*, *GPR54* dan β -Actin teramplifikasi di masing-masing suhu uji. Dimana, gen *Kiss2*, *GPR54* dan β -

Actin yang berhasil teramplifikasi memiliki *product size* berturut-turut 199 bp, 155 bp dan 197 bp disemua suhu yang teramati.

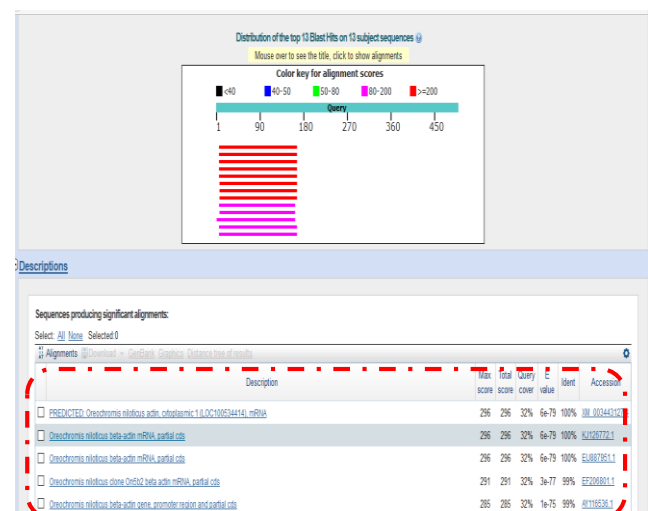
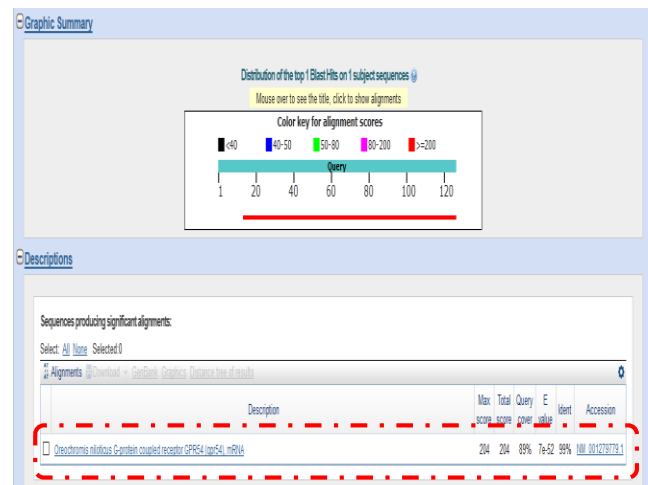
Hasil amplifikasi dari dugaan gen target *Kiss2*, *GPR54* dan β -*Actin* kemudian dianalisis sekuens nukleotidanya dengan menggunakan metode sekuensing. Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan sekuens nukleotida dari hasil amplifikasi PCR. Urutan hasil sekuens nukleotida dapat dilihat dibawah ini

>150604-02_K13_Kiss2_Kiss2_forward.ab1 504
 AAAGGGGCCTTACTGCATCTGCATGGAGGTAGTGGG
 AGCTCTGTGCC
 AGGAGTCGACCCTGCACAGAGAACACATGCAACAGGAG
 CAGTGTCTCTG
 CATTGAGGAGAACAGCAGGCGACTTCTCTGGCAGAGGATC
 CCAGCCTCTGC
 TTTTCCTGAGAGAGAACGAGGACCAGAAAGTTCATAATA
 ATATATATCTT
 CTCATTATATCATAATTTCTTTTCAATATCAATTTTATAATC
 TATCATTC
 TATTGATTAATACTTTATCATTTTTTATATATATTCTTCAT
 CACATATT
 CCTTTTTTTTTTTTTTCAAATATTTCTTCTGGACCAATTACT
 ACAACCAA
 ACATATTTCTTCTCCCTTTTCCAATTCTCCACACCTTCTTC
 TTATGCCC
 CCACGCTCAATCCCCCTCTCTACCTCTACCCTCAGTCCA
 TCTGTTCTC
 TTTACTTACCTACTTCTCTCTTTTCTTTTCCCTCTTTCT
 TTTTCTTAT

>1st_BASE_1913473_GPR54_GPR54_F
 CAGCGAGACAGCTGGGCCATCCAGATCTTTGTCTCTTC
 CAGTCTTTCTATCCTAACTACCAGCCTAACTACGCCACAT
 ACAAGATCAAGACGTGGGCCAACTGCATGTCTACGCC
 AACTCCTCT

>150623-16_L24_Actin_AF.ab1 498
 CCTCCTCGTTGGTGATGAGGCCAGAGCAAGAGAGGTATC
 CTGACCCTGA
 AGTACCCATTGAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGATGA
 CATGGAGAAG
 ATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGAGAGTTGCCCC
 TGAGGAGCA
 TCCCGTCTGCTCACAAAAACCTTTTTTTATCCTTACCTTTT
 TTTTTTT
 TTTTTTTTTTCCCTCTTTCTTTTCTTTCTTTCTTTT
 TTTT
 TTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTCTTTCTTTTCTTTTTTTT
 TTTT
 TTTTTTTTTTCTTTCTTTTTTTTTTCTTTTTTCTTTTTT
 TTTT
 CTTCCTTTTTCTTTTTCTTTTTTTTTCTTTTTTTTTCTTTTT
 TTTT
 TTCTTCTTTTCTTTCTCTTTTCTTTTTTTCTTTTCTTTTTT
 TTTT
 TCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTCTTTTTCTTTT
 TT

Hasil urutan sekuens nukleotida dugaan gen target *Kiss2*, *GPR54* dan β -*Actin* kemudian di BLAST. BLAST dilakukan untuk mengkonfirmasi homologi dua sekuens sampel dengan sekuens database dunia (*Gene Bank*) yang tersedia. Hasil analisis BLAST dari dugaan gen target dapat dilihat pada Gambar 3.



Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa hasil amplifikasi PCR dan elektroforesis gel agarosa dari gen target *Kiss2* teridentifikasi 100% memiliki homologi/kemiripan dengan gen target *Kiss2* Ikan Nila (*O. niloticus*) yang berasal dari gene bank. Hasil amplifikasi PCR dan elektroforesis gel agarosa berdasarkan Gambar 1 menunjukkan bahwa pita DNA yang terbentuk dari keempat suhu yang diujikan menandakan sepenuhnya adalah gen target *Kiss2* dari gonad ikan nila (*O. niloticus*).

Kisspeptin digolongkan kedalam berbagai tipe pada vertebrata. Pada golongan mamalia, *Kisspeptin* hanya dikodekan satu tipe gen, yakni *Kiss-1* (Pinilla *et al.*, 2012). Pada beberapa golongan ikan, *Kisspeptin* dikodekan oleh dua tipe gen, yaitu: *Kiss-1* dan *Kiss-2* beserta reseptor kognitifnya *GPR54* (Kitahashi dkk., 2009; Li dkk., 2009).

Beberapa golongan ikan hanya mengekspresikan salah satu dari kedua tipe gen *Kisspeptin*, namun beberapa golongan ikan lainnya mengekspresikan kedua tipe gen tersebut. Ikan air tawar seperti: *Zebrafish* (*Danio rerio*; Van Aerle *et al.*, 2008), *Medaka* (*Oryzias latipes*; Kanda dkk., 2008; Kitahashi dkk., 2008), *Goldfish* (*Carassius auratus*; Li *et al.*, 2009) dan ikan air laut seperti *Seabass* (*Dicentrarchus labrax*; Felip *et al.*, 2009) mengekspreskan *Kiss1* dan *Kiss2*. Pada Fugu (*Fugu rubripes*), the green spotted puffer fish (*Tetraodon nigroviridis*), *Stickleback* (*Gasterosteus aculeatus*) (Felipe *et al.*, 2009), dan *Nile tilapia* (*O. niloticus*; Martinez-Chavez *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012) hanya mengekspresikan *Kiss2*.

Tidak terekspresinya salah satu tipe gen dari *Kisspeptin* pada beberapa spesies ikan menandakan dugaan gen tersebut hilang seiring berjalannya evolusi (Mechaly *et al.*, 2010). *Kiss-2*

merupakan peptida yang disekresikan pada gonad beberapa jenis ikan, termasuk ikan nila (Martinez Chavez *et al.*, 2008; Park dkk., 2012; Pinilla *et al.*, 2012). *Kiss2* memainkan peranan penting dalam meregulasi reproduksi dan perkembangan gonad melalui stimulasi GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) (Przekop dan Ciechanowska., 2012). Disamping itu *Kisspeptin-2* berperan penting dalam menstimulasi sekresi GTH (*Gonadotropin*), FSH (*Folicle Stimulating Hormone*), LH (*Leutinizing Hormone*) dan GH (*Growth Hormone*) pada pituitari (Ahmed *et al.*, 2009) serta ekspresinya tinggi pada sel *Leydig* yang berperan terhadap produksi testosteron (Selvaraj *et al.*, 2010).

Kisspeptin ditemukan pada bagian sistem saraf pusat dan sistem perifer. Pada vertebrat Pada sistem saraf pusat, ekspresi *Kisspeptin* ditemukan tinggi pada bagian hipotalamus, terutama pada bagian *Arcuate nucleus* (ARC) dan *Antroventral periventricular nucleus* (AVPV) (Gottsche dkk., 2004; Roseweir dan Millar, 2009; Pinilla *et al.*, 2012). Pada sistem perifer, ekspresi *Kisspeptin* ditemukan pada bagian testis, ovarium, pituitary, pankreas, usus halus dan plasenta (Ohtaki *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2009; Gaytan *et al.*, 2009; Selvaraj *et al.*, 2010).

Pada sumbu HPG, *Kisspeptin* dan GnRH menunjukkan korelasi dalam meregulasi tingkat kematangan reproduksi. Korelasi ini ditandai dengan peningkatan ekspresi mRNA *Kisspeptin* dan GnRH (*GnRH1*, *GnRH2*, *GnRH3*) pada awal masa pubertas pada beberapa spesies ikan (Sjahdan *et al.*, 2014).

KESIMPULAN

Hasil amplifikasi menunjukkan pita DNA yang terbentuk dari kedua gen

target, yakni: *Kiss2* dan *GPR54*. Hasil amplifikasi diperkuat dengan konfirmasi sekuensing yang menunjukkan kemiripan/homologi dari sekuens nukleotida target dengan sekuens database dunia (*Gene Bank*).

DAFAR PUSTAKA

- Ahmed. H, Saito., T, Sawada., T, Yaegashi., T, Yamashita., TI, Hirata., K, dan Sawai., T, Hashizume. 2009. Characteristics of the Stimulatory Effect of Kisspeptin-10 the Secretion of Luteinizing Hormone, Folicle Stimulating Hormone, and Growth Hormone in Prepubertasl Male and Female Cattle. *Journal of Reproduction and Development*. Volume 55 (6): pp 650-654.
- Clarke H, Waljit S. Dhilllo, dan Channa N. Jayasena. 2015. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrine and Metabolism*. Korean Endocrine Society. 2093-596X. Pp; 124-141.
- Felipe. A, Zanuy S, Pineda R, dan Pinilla L, Carrillo M. 2009. Evidence for Two Distinct KiSS Genes in Non-Placental Vertebrates that Encode Kisspeptins with Different Gonadotropin Releasing Activities in Fish and Mammals. *Molecular Cell Endocrinology* 312.
- Gaytan, F., Gaytan, M., Castellano, JM., Romero, M., Roa, J., Aparicio, B., Garrido, N., Sanchez Criado, JE., Millar, RP., Pellicer, A, Fraser, HM., dan Tena-Sempere, M. 2009. KISS-1 in the Mammalian Ovary: Distribution of Kisspeptin in Human and Marmoset and Alterations in KiSS-1 mRNA Levels in a Rat Model of Ovulatory Dysfunction. *Journal Endocrinology Metabolism*. Volume 296: pp 520-531.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, dan Steiner RA. 2004. A Role For Kisspeptins In The Regulation Of Gonadotropin Secretion In The Mouse. *Endocrinology* 145 (9). pP: 073–4077.
- Kanda, S., Y, dan Oka. 2008. Structure, Synthesis, and Phylogeny of Kisspeptin and its Receptor. *Advances in Experimental Medicine and Biology* volume 784: pp 9-26.
- Kitahashi., dan Parhar, I.S.,. 2013. Comparative Aspects of Kisspeptin Gene Regulation. *General and Comparative Endocrinology* 181 (2013): 197-202.
- Lee J.H, Miele M.E, Hicks D.J, Phillips K.K, Trent J.M, dan Weissman B.E. 1996. Kiss-1, A Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene". *Journal of the National Cancer Institute* 88 (23): pp 1731–7.
- Li, S., Zhang, Y., Liu, Y., Huang, X., Huang, W., Lu, D., Zhu, P., Shi, Y., Cheng, C.H.K., Liu, X., dan Lin, H., 2009. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in

- goldfish (*Carassius auratus*).
Journal Endocrinology.
Volume 201 (3): pp 407–418.
- Martinez Chavez, C.C., dan Minghetti, M., Migaud, H. 2008. GPR54 and rGnRH Gene Expression during the Onset of Puberty in Nile tilapia. General and Comparative Endocrinology. Volume 156 (2008): pp 224-233.
- Mechaly, A., Vinas, J., Murphy, C., Reith, M., dan Piferrer, F. 2010. Gene Structure of the Kiss1 Receptor-2 (Kiss1r-2) in the Atlantic Halibut: Insights into the Evolution and Regulation of Kiss1r Genes. Molecular and Cellular Endocrinology 317 (2010): pp 78-89.
- Messenger S, Chatzidaki E.E, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, dan Dixon J. 2005. Kisspeptin Directly Stimulates Gonadotropin-Releasing Hormone Release Via G Protein-Coupled Receptor 54. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (5): pp 1761–1766.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H.I., , Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada. C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., dan Fujino, M. 2001. Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Peptide Ligand of a G-Protein Coupled Receptor. Nature Volume 414: pp 613-616.
- Park, J.W., Kim, J.H., Jin, H.Y., dan Kwoon, J.Y. 2012. Expression Profiles Of Kiss2, GPR54 andGnRH Receptors I mRNAs In the Early Life Stage of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Dev, Reprod. Volume 18 (1): pp 31-38.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, RP, dan Tena-Sempere, M. 2012. Kisspeptin and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanism. Physiological Volume 92: pp 1235-1316.
- Roseweir A.K., dan Millar. 2009. The Role of Kisspeptin In The Control Of Gonadotrophin Secretion. Human Reproduction Update, Vol.15, No.2. pP: 203–212.
- Selvaraj, S., Kitano, H., Fujinaga, Y., Ohga, H., Yoneda, M., Yamaguchi, A., Shimizu, A., dan Matsuyama, M. 2010. Molecular Characterization, Tissue Distribution, and mRNA Expression Profiles Of Two Kiss Genes In The Adult Male and Female Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) During Different Gonadal Stages.General Comparative Endocrinology. Volume 169 (2010): pp 28-38.
- Simanjuntak, R.F. 2015. Hubungan Ekspresi Gen *Kisspeptin-2* Dan *Orexin* Terhadap Peningkatan Pertumbuhan Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*) Yang Diberi Pakan Dengan Penambahan Tepung Biji

- Pepaya. Tesis (Tidak Dipublikasi)
- Sjahdan, M.D., Kitahashi, T., Parhar, I.S. 2014. Central Pathways Integrating Metabolism and Reproduction in Teleosts. *Frontier in Endocrinology*. Volume 5 (36): pp 1-17.
- Van Aerle., Kille, P., Lange, A., dan Tyler, C.R. 2007. Evidence for the Existence Functional Kiss1/Kiss1 Receptor Pathway in Fish. *Peptides* 2 9 (2008): pp 57 – 64.