

ANALISIS POLIMORFISME GEN *Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9)* dan HUBUNGANNYA DENGAN KEBERHASILAN INSEMINASI BUATAN pada SAPI PO

Pangesti Dimy Arta¹, Sri Rahayu¹

1) Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Jl. Veteran no. 169 Malang, Email : Pangesti10@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO (*Bos indicus*) dan hubungannya dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO. Sampel Sapi PO diambil dari Pasuruan secara acak. DNA diisolasi dari darah menggunakan metode *Salting out*. Gen *GDF-9* diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer *GDF-9 forward* (5'- GCCCA CCCACACACCTAAAGTTTA-3') dan *GDF-9 reverse* (5' GCACA CCAACAGCTGAAAGAGGTA-3'). Polimorfisme gen *GDF-9* dianalisis menggunakan teknik PCR-RFLP dengan enzim restriksi *HaeIII*. Berdasarkan hasil RFLP diperoleh dua tipe haplotip. Haplotip I terpotong dengan ukuran fragmen DNA 70 bp, 100 bp, 290 bp dan 590 bp. Haplotip II terpotong dengan ukuran fragmen DNA 70 bp, 100 bp, 120 bp, 290 bp dan 590 bp. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO. Namun, tidak terdapat hubungan antara polimorfisme gen *GDF-9* tersebut dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO.

Kata kunci : gen *GDF-9*, polimorfisme, Sapi PO

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the polymorphism of PO cattle *GDF-9* gene and association with success of artificial insemination. Ten PO cattles were taken randomly from Pasuruan. DNA was isolated from blood by salting out method. DNA was amplified using primer *GDF-9 forward* (5' GCCCA CCCACACACCTAAAGTTTA 3') and *GDF-9 reverse* (5' GCACA CCAAC AGCTG AAA GAGGTA 3'). The result of PCR was a specific single band with fragment DNA size of ± 900 bp. The PCR products was digested by restriction enzyme *HaeIII*. The products of PCR-RFLP was two (2) haplotypes. Haplotype 1 with 4 fragment DNA (70 bp, 100 bp, 290 bp and 590 bp) and haplotype 2 with 5 fragment DNA (70 bp, 100 bp, 120 bp, 290 bp, 590 bp). This study indicate there is polymorphism of PO cattle *GDF-9* gene. However, no correlation between *GDF-9* polymorphisms gene with success of artificial insemination of PO cattle.

Key words : *GDF-9* gene , polymorphism, PO cattle

PENDAHULUAN

Produksi daging sapi dalam negeri perlu ditingkatkan. Salah satu upayanya yaitu dengan meningkatkan jumlah populasi sapi lokal. Peningkatan populasi atau produksi ternak bergantung pada keberhasilan reproduksi. Jika reproduksi tidak teratur dengan baik maka produksi akan rendah [1].

Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap kualitas reproduksi adalah ovulasi, ovulasi diawali dengan proses folikulogenesis, yang melibatkan beberapa hormon dan gen didalamnya, salah satunya yaitu gen *GDF-9* [2].

Growth Differentiation Factor (GDF-9) terletak pada kromosom autosomal, yakni kromosom 5 dan terdiri atas 2 exon dan 1 intron

dengan panjang sekitar 5644 bp [3]. *GDF-9* merupakan molekul polipeptida famili dari TGF- β *Growth Factor*. *GDF-9* berperan dalam pendewasaan dan pematangan oosit [4]. *Growth Differentiation Factor* juga berfungsi sebagai *stimulator* pada saat perkembangan folikel primer. *GDF-9* diekspresikan pada oosit dan sel-sel granulosa, dapat merangsang proliferasi sel granulosa serta mengatur fungsi sel kumulus sejak masa preovulasi sampai terjadinya ovulasi [5]. Gen *GDF-9* berhubungan dengan peningkatan laju tingkat ovulasi dan *litter size* pada ternak [6].

Menurut penelitian Dong dkk., [7] diketahui bahwa jumlah gen *GDF-9* dalam proses folikulogenesis pada tahap folikel primer

semakin besar, dibuktikan karena adanya blok dalam tahap folikel primer tersebut.

GDF-9 disintesis oleh sel somatik ovum yang berperan pada pertumbuhan dan fungsi oosit. Keberadaan dan peran *GDF-9* pada oosit sangat dibutuhkan pada proses maturasi dan folikulogenesis [8].

GDF-9 dapat berikatan dengan reseptor sel kumulus untuk meningkatkan sintesis progesterone tanpa pemberian FSH. Sehingga *GDF-9* dapat bekerja sinergis seperti FSH untuk perkembangan oosit [9]. Adanya mutasi gen *GDF-9* pada pertumbuhan oosit dapat meningkatkan ovulasi pada domba heterozigot dan menyebabkan kemandulan pada domba homozigot [2].

Sapi PO merupakan salah satu sapi potong yang memiliki kualitas baik. Namun sampai saat ini penelitian tentang polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO belum dilakukan [10].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO serta mengetahui hubungan polimorfisme *GDF-9* terhadap performa reproduksi sapi PO.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Sampel darah diambil secara acak dari 10 ekor sapi PO pada bagian ekor. Darah dimasukkan tabung *vacutainer* berisi EDTA. Data keberhasilan inseminasi buatan (IB) diperoleh secara deskriptif berdasarkan inseminasi buatan atau nilai *service per conception* (S/C) yang dimiliki oleh masing-masing sapi PO. DNA diisolasi menggunakan metode *Salting out*. Kuantitas DNA hasil isolasi diukur dengan menggunakan spektrofotometri, sedangkan kualitas DNA hasil isolasi dapat diketahui dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 1%.

PCR-RFLP

DNA diamplifikasi dengan menggunakan pasangan primer yaitu: primer *GDF-9 forward* (5' GCCCAC CCACAC ACCTAA AGTTTA 3'). Primer *GDF-9 reverse* (5' GCACAC CAACAG CTGAAA GAGGTA 3'). Program PCR meliputi beberapa tahap, yaitu denaturasi awal 95°C selama 5 menit, diikuti dengan amplifikasi 34 siklus, yang setiap siklusnya terdiri dari tahap denaturasi 95°C, 45 detik, annealing 61°C, 45 detik dan ekstensi 72°C, 45

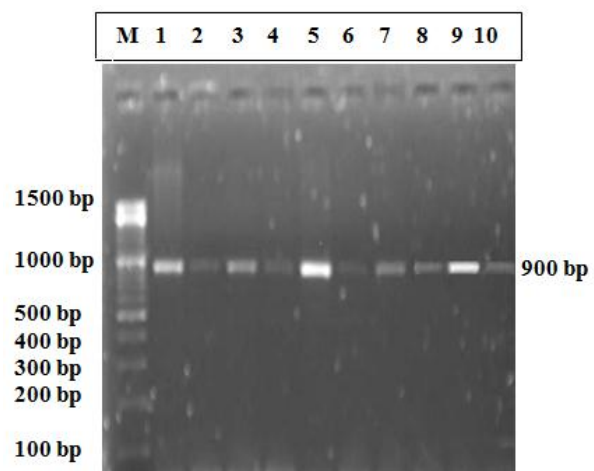
detik lalu dilanjutkan dengan ekstensi akhir 72°C, 10 menit. Hasil PCR dielektroforesis dengan 1,5% gel agarosa. PCR-RFLP dilakukan menggunakan enzim restriksi *HaeIII*. Hasil PCR-RFLP dielektroforesis menggunakan Gel Poliakrilamida 10% dan dilakukan pewarnaan menggunakan metode perak nitrat.

Analisis Data

Data hasil PCR-RFLP dianalisis secara deskriptif berdasarkan pola pita DNA yang didapatkan dan dikorelasikan dengan performa reproduksi sapi PO.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Amplifikasi gen *GDF-9* pada 10 sampel sapi PO diperoleh 1 pita DNA yang spesifik dengan ukuran ± 900 bp (gambar 1).



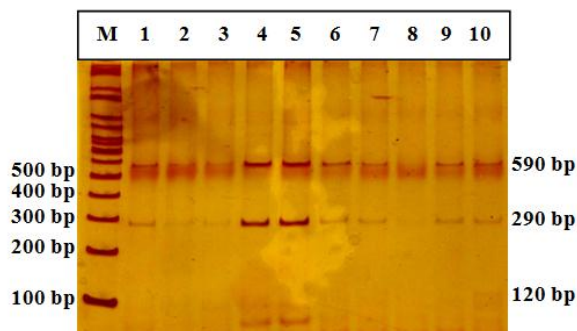
Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen *GDF-9* sapi PO; M: DNA ladder 10000 bp.1-10: sampel dengan fragmen DNA gen *GDF-9* hasil amplifikasi.

Ukuran pita DNA hasil amplifikasi gen *GDF-9* yang diperoleh pada penelitian ini mendekati ukuran gen *GDF-9* pada Bovidae yang terdapat di GenBank (nomor akses AF078545.2). Primer *GDF-9* yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Santos dkk., [11] yang diperoleh dari *Bos taurus*. Posisi primer yang digunakan pada penelitian ini terletak pada urutan basa sekitar 1671 bp – 2557 bp. Sehingga diperoleh amplikon berupa fragmen gen *GDF-9* yang berukuran ± 886 bp. Adanya perbedaan ukuran fragmen DNA pada penelitian yang telah dilakukan dengan penelitian Santos dkk., [11] adalah karena jenis sapi yang digunakan dalam

kedua penelitian tersebut berbeda, pada penelitian yang telah dilakukan menggunakan sapi PO. Sedangkan pada penelitian Santos dkk., [11] menggunakan sapi Holstein.

Berdasarkan hasil PCR-RFLP gen *GDF-9* menggunakan enzim *HaeIII*, didapatkan dua tipe haplotip, yaitu haplotip 1 dan haplotip 2. Tipe haplotip tersebut ditentukan berdasarkan jumlah situs restriksi dan ukuran fragmen DNA (Gambar 2 dan Tabel 1).

Pada sampel nomer 1-10 nampak bahwa semua DNA hasil amplifikasi terpotong oleh enzim *HaeIII*. Haplotip 1 dengan ukuran fragmen DNA 70 bp, 100 bp, 290 bp dan 590 bp. Haplotip 2 dengan ukuran fragmen DNA 70 bp, 100 bp, 120 bp, 290 bp dan 590 bp. Variasi haplotip tersebut menunjukkan adanya polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO (Gambar 2 dan Tabel 1).



Gambar 2. Hasil PCR-RFLP gen *GDF-9* menggunakan Enzim *HaeIII*; M: DNA ladder 10000 bp. 1-10 : DNA hasil PCR-RFLP.

Enzim *HaeIII* merupakan enzim yang mengenali sisi pemotongan pada sekuen GG*CC dengan tipe pemotongan *blunt end*, yaitu tipe pemotongan yang menghasilkan sekuen dengan ujung tumpul karena pemotongannya bersifat simetris [12].

Terjadinya polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO, dikarenakan adanya perbedaan susunan gen *GDF-9* pada sapi PO, yang ditunjukkan dengan ukuran fragmen DNA pada haplotip kedua.

Polimorfisme gen terjadi karena adanya perubahan susunan nukleotida pada suatu gen. Perubahan susunan tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain yaitu perkawinan, mutasi dan seleksi alam maupun buatan. Perubahan tersebut juga sangat berpengaruh

terhadap perubahan fenotip suatu organisme [13].

Tabel 1. Haplotip gen *GDF-9* pada sapi PO menggunakan enzim restriksi *Hae-III*

Haplotip	Jumlah Situs Restriksi	Ukuran Fragmen	No Sampel
1	4	70 bp 100 bp 290 bp 590 bp	1,2,3,4,5,6,7,8,9
2	5	70 bp 100 bp 120 bp 290 bp 590 bp	10

Beberapa penelitian mengenai polimorfisme gen *GDF-9* juga pernah dilakukan pada hewan lain, seperti mencit dan kerbau. Penelitian Dong dkk., [7] yang berjudul Growth differentiation factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis mengatakan bahwa adanya mutasi gen *GDF-9* pada tikus memiliki efek besar pada produksi *GDF-9*. Hal ini sangat berpengaruh dalam reproduksi, karena *GDF-9* diperlukan untuk proses follikulogenesis. Pada penelitian Ghaffari dkk., [2] gen *GDF-9* dapat dijadikan sebagai gen kandidat yang memungkinkan untuk meningkatkan litter size (angka kelahiran) pada domba. *GDF-9* juga dapat mengatur jumlah folikel yang berovulasi pada domba dan pada mamalia yang memiliki tingkat ovulasi rendah [14].

Terjadinya polimorfisme pada suatu gen, menandakan adanya perbedaan sekuen DNA pada hewan dengan spesies yang berbeda maupun sama. Perbedaan sekuen DNA tersebut disebabkan oleh adanya peristiwa delesi, insersi, rekombinasi, perkawinan acak yang rendah dan seleksi dalam populasi tersebut [15].

Hubungan haplotip gen *GDF-9* dengan performa reproduksi menunjukkan bahwa polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO tidak berhubungan dengan performa reproduksi sapi PO (tabel 2).

Tabel 2. Hubungan Haplotip gen *GDF-9* dengan Performa Reproduksi sapi PO

No Sampel	Haplotip	Performa Reproduksi
1	1	Bunting
2	1	Bunting
3	1	Tidak Bunting
4	1	Tidak Bunting
5	1	Bunting
6	1	Bunting
7	1	Bunting
8	1	Bunting
9	1	Bunting
10	2	Bunting

Data performa reproduksi (tabel 2) diperoleh berdasarkan data inseminasi buatan atau nilai S/C (service per conception) pada masing-masing sampel sapi PO. Berdasarkan tabel 2 terdapat dua sampel Sapi PO yang tidak bunting dan delapan sapi PO yang bunting. Data tersebut belum konsisten, ditunjukkan adanya tipe haplotip 1 dengan performa reproduksi yang bervariasi. Sehingga adanya variasi tersebut tidak berhubungan dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO.

Performa reproduksi sapi akan dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain yaitu faktor genetik [16]. Salah satu faktor keberhasilan proses reproduksi pada suatu individu khususnya betina, yaitu terletak pada performa reproduksi yang akan ditentukan oleh proses ovulasi pada suatu individu tersebut [17]. Ekspresi *GDF-9* berpengaruh terhadap perkembangan sel-sel spesifik pada ovarium dalam tahapan folikuler normal, perkembangan sel granulosa dan

perkembangan oosit. Adanya *GDF-9* dapat meningkatkan proses ovulasi pada individu betina [2].

Gilchrist dkk., [6] melaporkan bahwa beberapa mutasi pada gen *GDF-9* berhubungan dengan peningkatan laju tingkat ovulasi dan *litter size* (angka kelahiran) pada ternak. Ghaffari dkk., [2] juga mengatakan bahwa gen *GDF-9* dapat dijadikan sebagai gen kandidat yang memungkinkan untuk meningkatkan *litter size* pada domba. Mutasi gen *GDF-9* pada (S395F) terkait dengan peningkatan ovulasi pada domba heterozigot sedangkan kemandulan pada homozigot pada domba Cambridge dan Belclare. Karena mutasi gen *GDF-9* pada domba homozigot menyebabkan perkembangan folikel tidak sempurna [18].

GDF-9 pertama kali terdeteksi pada awal tahap folikel primer, sedangkan pada ovarium domba dan sapi, *GDF-9* terdeteksi lebih awal pada tahap folikel primordial. *GDF-9* juga diekspresikan di dalam ovarium tikus. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sophie dkk., [9] ditemukan bahwa tikus betina yang kekurangan *GDF-9* mengalami infertilitas akibat adanya sebuah blok dalam proses folikulogenesis pada tahap folikel primer. Pada tikus, *GDF-9* sangat penting untuk perkembangan folikel normal dan kemungkinan terlibat dalam pengembangan sel kumulus [7].

Menurut Bodensteiner dkk., [3] gen *GDF-9* sangat penting dalam tahap folikulogenesis. Gen *GDF-9* ini diekspresikan pada oosit dan sel-sel granulosa ovarium sejak tahap folikel primer sampai oosit diovulasikan.

GDF-9 telah terbukti penting untuk pertumbuhan folikel normal. Hal ini ditunjukkan oleh peran gen *GDF-9* dalam pengaturan jumlah folikel yang berovulasi pada mamalia yang memiliki tingkat ovulasi rendah [14].

Adanya alel-alel mutasi gen *GDF-9* di ruas promotor pada Kambing Kacang dan PE dapat menambah temuan identifikasi keragaman gen *GDF-9* untuk keperluan seleksi calon induk yang lebih baik pada ternak [19].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa terdapat 2 haplotip gen *GDF-9* pada sapi PO berdasarkan analisis dengan metode PCR-RFLP menggunakan enzim *HaeIII*, yang menunjukkan

adanya polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO. Namun, polimorfisme tersebut tidak ada hubungannya dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada penyandang dana penelitian juga fasilitas yang telah diberikan oleh Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang yang telah sangat membantu dalam proses pengerjaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Putra, E.E. 2009. Performans Reproduksi Sapi Pesisir dan Sapi Bali.
- [2] Ghaffari, M., A. N. Javaremi & G. R. Mianji. 2009. Lack of polymorphism in the oocyte derived growth factor (*GDF-9*) gene in the Shal breed of sheep. *South African Journal of Animal Science*, 39:4.
- [3] Bodensteiner, K.J., C.M. Clay, C.L. Moeller & H.R. Sawyer. 1999. Molecular cloning of the ovine growth differentiation factor 9 gene and expression of growth differentiation factor 9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* 60:381-386.
- [4] McGrath, S.A., A.F. Esquela & S.J. Lee. 1995. Oocyte specific expression of growth differentiation factor 9. *Mol. Endocrinol.* 9:131-36.
- [5] Tamer, S.H. & A. David. 2005. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Science.* 10:5257-5267.
- [6] Gilchrist, R.B., R.J. Ritter & D.T. Armstrong. 2005. Oocyte-somatic cell interaction during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 82:341-377.
- [7] Dong, J.W., D.F. Albertini, K. Nishimori, T.R. Kumar, N. Lu & M.M. Matzuk. 1996. Growth differentiation factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 383:531-535.
- [8] Mazerbourg, S., C. Klein, A. J. Hsueh, N. Kaivo-Oja, O. Ritvos, D. G. Motterhead & O. Korchynsky. 2003. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *J. Mol. Endoc.* 18:653-655.
- [9] Sophie P., S. Uzbekova, C. Perreau, P. Papillier, P. Mermillod & R. Dalbie's. 2004. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *MATER*, *ZAR 1*, *GDF-9*, *BMP 15*, and *VASA* in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos 1. *Science Direct.* 71:1359-1366.
- [10] Murtidjo, B.A. 1993. Beternak Sapi Potong. *Kanisius*. Yogyakarta.
- [11] Santos-Biase, W.K.F., J. Buratini, J. Balieiro, Y.F. Watanabe, M.F. Accorsi, C.R. Ferreira, P. Stranieri, A.R. Caetano & F.V. Meirelles. 2012. Single nucleotide polymorphisms in the bovine genome are associated with the number of oocytes collected during ovum pick up. *Elsevier. Animal Reproduction Science.* Brazil. 134:141-149.
- [12] Becker, W.M & L.J. Kleinsonth. 2000. The World of The Cell fourth edition. *The Benjamins Cummings Publishing Company.* New York.
- [13] Frankham, R., J.D. Ballou & D.A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. *Cambridge University Press.* 100-105p.
- [14] Juengel, J.L., N.L. Hudson, D.A. Heath, P. Smith, K.L. Reader, S.B. Lawrence, A.R. O'Connell, M.P. Laitinen, M. Cranfield, N.P. Groome, O. Ritvos & K.P. McNatty. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* 67:1777-1789.
- [15] Schleif, R. 1993. Genetics and Molecular Biologi 2thedition. *The John Hopkins Press Ltd.* London.
- [16] Aryogi. 2005. Kemungkinan Timbulnya In genetik dan Ketinggian Lokasi Terhadap Performans Sapi Potong Peranakan Ongole di Jawa. Yogyakarta.
- [17] Bearden, H.J & J.W. Fuquay. 1980. *Applied animal reproduction.* Reston publishing company, inc. A prentice hall company. Reston. Virginia. 286-290.
- [18] Hanrahan, J.P., S.M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G.H. Davis, R. Powell & S.M. Galloway. 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge

- and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* 70:900-909.
- [19] He, Y.Q. 2010. Candidate genes polymorphism and its association to prolificacy in Chinese goats. *J Agric Sci.* 2:1.