

Identifikasi Polimorfisme Gen *GDF-9* dan *BMP-15* pada Kambing Kacang

Sri Rahayu^{1)*}

¹⁾ Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

Diterima tanggal 11 September 2011, direvisi tanggal 7 Oktober 2011

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme gen *GDF-9* dan *BMP-15* pada kambing Kacang. Kambing Kacang merupakan ternak tropis unggul yang sangat adaptif dan memiliki kemampuan reproduksi tinggi. Gen *GDF-9* dan *BMP-15* merupakan gen yang terkait dengan kemampuan reproduksi, dan kemampuan reproduksi tersebut berbeda pada setiap individu. Sampel darah sebagai sumber DNA dikoleksi dari vena jugularis dengan menggunakan tabung venoject yang mengandung bahan antikoagulan, EDTA sebanyak 5 – 6 ml setiap ekor kambing. DNA diisolasi dari darah 5 ekor kambing Kacang betina yang diperoleh dari RPH Sukun, Malang. Untuk mengetahui keberhasilan isolasi DNA dilakukan pengamatan secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer dan pengamatan secara kualitatif dengan menggunakan elektroforesis agarosa 1 %. Amplifikasi DNA gen *GDF-9* dilakukan dengan menggunakan primer *forward* 5'-CAAGGAGGGGACCCCTAAAT-3', primer *reverse* 5'-ACCAGAGGCTCAAGAGGAGC-3'. Sedangkan amplifikasi DNA untuk gen *BMP-15* menggunakan primer *Forward* 5'-AGTTTGTACTGAGCAGGTCT-3', *Reverse* 5'-ACTCCGCTTCGTATGTCAG-3'. Hasil PCR yang diperoleh adalah pita DNA spesifik dengan ukuran 1400 bp untuk gen *GDF-9* dan 400 bp untuk gen *BMP-15*. Hasil PCR-RFLP menggunakan enzim *HaeIII* pada fragmen DNA gen *GDF-9* didapatkan 1 macam haplotip yang terdiri dari 3 fragmen DNA dengan ukuran 1000 bp, 300 bp dan 100 bp. Sedangkan PCR-RFLP untuk gen *BMP-15* dengan menggunakan enzim restriksi *AluI* didapatkan 1 macam haplotip yang terdiri dari 2 fragmen dengan ukuran ± 180 bp dan ± 120 bp. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat polimorfisme pada gen *BMP-15* dan *GDF-9* pada kambing kacang.

Kata kunci: Gen *BMP-15*, PCR-RFLP, sapi Bali.

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the polymorphisms of *BMP-15* and *GDF-9* gene of Kacang goat. DNA was isolated from blood samples of five female goats with salting out method. Quantitative and qualitative analysis of DNA was measured using spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. To get DNA fragment *GDF-9* gene was amplified using Forward 5'-AGTTTGTACTGAGCAGGTCT-3', Reverse 5'-ACTCCGCTTCGTATGTCAG-3', while to get DNA fragmen *BMP-15* gene was amplified using Forward primer 5'-CAAGGAGGGGACCCCTAAAT-3', reverse primer 5'-ACCAGAGGCTCAAGAGGAGC-3' for *GDF-9*. The results of amplification was a specific DNA band with the length of 1400 bp for *GDF-9* gene and 400 bp for *BMP-15* gene. Restriction with *HaeIII* enzyme of *GDF-9* PCR product was resulted a haplotype with fragment size 1100 bp, 300 bp, and 100 bp. While, restriction with *AluI* enzymes of *BMP-15* PCR product was resulted a haplotype which consist of two fragments with sizes 180 bp and 120 bp. It was concluded that there are no polymorphism of *GDF-9* and *BMP-15* gene of Kacang goat.

Key word: *BMP-15* gene, *GDF-9* gene, Kacang goat, PCR-RFLP, Polymorphism.

*Corresponding author :
E-mail: srihayu@ub.ac.id

PENDAHULUAN

Konsumsi daging sapi sebagai protein hewani di Indonesia terus mengalami peningkatan sebanding dengan penambahan jumlah penduduk. Namun penambahan produksi belum mengimbangi peningkatan jumlah penduduk, sehingga impor daging dilakukan sebagai upaya mencukupi kekurangan tersebut. Diperkirakan impor daging sapi akan naik hingga 37% dari 28% pada tahun 2010 [1]. Mengingat pentingnya pemenuhan protein hewani nasional yang bersumber dari sapi lokal, Dirjen Peternakan dari Departemen Pertanian menggalakkan sosialisasi program percepatan pencapaian swasembada daging sapi untuk menekan laju impor daging sapi hingga 10% dan selebihnya diupayakan terpenuhi dari sapi lokal [2].

Saat ini produktivitas sapi di Indonesia berada pada tingkatan yang cukup rendah bila dibandingkan dengan negara lain. Dalam menanggapi masalah tersebut maka pengembangbiakan ternak memerlukan perhatian yang sangat serius, khususnya pada bidang reproduksi. Untuk meningkatkan produktivitas ternak, salah satu hal yang perlu diperhatikan adalah tingkat ovulasi dari ternak tersebut. Keberhasilan kebuntingan pada ternak sangat dipengaruhi oleh keberhasilan sel telur diovulasikan.

Tingkat ovulasi pada suatu individu dipengaruhi secara genetik. Sampai saat ini diketahui bahwa *Growth Differentiation Factor* (GDF) dan *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) mempunyai peranan penting di dalam pertumbuhan folikel [3],[4]. Faktor-faktor pertumbuhan oosit ini merupakan faktor yang mempengaruhi fase awal dan fase akhir folikulogenesis [3],[5].

Bone morphogenetic protein 15 (*BMP-15*) adalah sebuah faktor pertumbuhan dan anggota dari TGF β superfamili yang mempunyai ekspresi yang spesifik terhadap oosit. *BMP-15* domba berada pada kromosom X [3]. *BMP-15* mengatur prolifirasi sel granulosa dan diferensiasi oleh mitosis sel granulosa, menahan ekspresi folikel stimulating hormon, dan menstimulasi ekspresi kit ligand, semua

pengaturan yang penting dari fertilitas betina mamalia [6].

BMP-15 protein disandikan oleh 2 exons, exon yang pertama menyandi 17-asam amino sinyal peptida dan bagian yang pertama daerah propeptide, dan exon yang kedua menyandi sisa daerah propeptide dan keseluruhan 125-asam amino diramalkan pada domain mature [7].

Bone Morphogenetic Protein-15 berperan dalam pematangan oosit dan perkembangan folikular sebagai homodimer dan akan membentuk heterodimer dengan *GDF-9*. *BMP-15* tidak terekspresi pada folikel primer yang kecil tepi lebih terekspresi pada folikel primer akhir, sehingga diketahui bahwa :1) *BMP-15* terekspresi berlimpah pada folikel primer oosit dalam ovarium, yang menunjukkan bahwa transkripsi *BMP-15* telah ditranslasikan pada tahap awal follikulogenesis; 2) *BMP-15* manusia terekspresi pada gonad dalam konsentrasi yang rendah; 3) ekspresi mRNA *GDF-9* terjadi lebih awal daripada *BMP-15* di dalam oosit manusia selama perkembangan folikel dan 4) *GDF-9* dan *BMP-15* mengatur follikulogenesis pada manusia [7].

Oosit dan sel granulosa bersinergis pada perkembangan folikel. KL (Kit Ligand) dan c-Kit berpengaruh pada *BMP-15*, ekspresi tersebut terlihat pada sel granulosa murine (tikus). KL mengatur ekspresi *BMP-15*, menyebabkan feedback negative antara oosit dan sel granulosa [8]. *BMP-15* diproduksi dengan ditandai adanya penurunan FSH yang menginduksi produksi Progesteron tetapi tidak menstimulasi produksi estradiol, di mana *BMP-15* adalah suatu modulator selektif untuk fungsi FSH [6].

Berdasarkan hal tersebut di atas maka perlu dilakukan analisa polimorfisme gen *BMP-15* dan *GDF-9* pada kambing kacang sehingga dapat memberikan informasi tentang data genetis kambing kacang terutama yang terkait dengan reproduksi.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian. Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2010 sampai

Juli 2011. Sampel darah 5 ekor kambing Kacang betina diperoleh dari RPH Sukun, Malang. Analisa molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

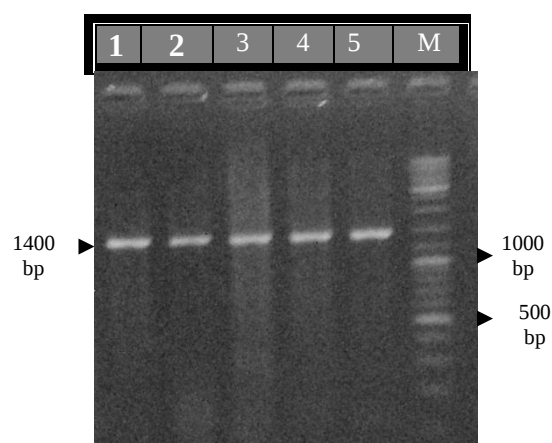
PCR-RFLP. DNA diisolasi dari sel limfosit darah. Amplifikasi gen *GDF-9* dan *BMP-15* kambing Kacang dilakukan melalui metode PCR. Primer DNA yang digunakan untuk amplifikasi gen *GDF-9* adalah *forward* 5'-CAAGGAGGGGACCCCTAAAT-3', *reverse* 5'-ACCAGAGGCTCAAGAGGAGC-3'. Sedangkan primer DNA yang digunakan untuk amplifikasi gen *BMP-15* adalah *forward* 5'-AGTTTGTACTGAGCCGGTCT-3' dan *reverse* 5'-CTGACACACGAAGCGGAGT-3'. Pemotongan hasil amplifikasi gen *GDF-9* menggunakan enzim restriksi *HaeIII*, sedangkan pemotongan hasil amplifikasi gen *BMP-15* dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *AluI*. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan melakukan pengamatan profil pita DNA hasil PCR-RFLP masing-masing sampel pada gel elektroforesis. Selanjutnya dari profil pita DNA hasil PCR-RFLP dianalisis apakah terdapat variasi gen *GDF-9* dan *BMP-15* pada Kambing kacang.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi DNA menunjukkan hasil pita DNA yang spesifik yaitu terdapat satu pita DNA untuk gen *GDF-9* dengan ukuran 1400 bp (Gambar 1) dan *BMP-15* dengan ukuran 400 bp (Gambar 2).

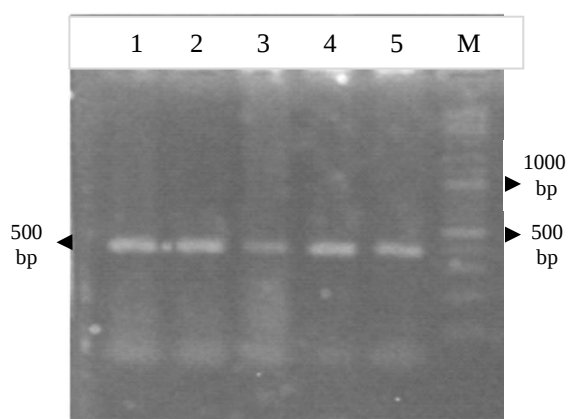
Gambar 1 dan 2 menunjukkan bahwa semua sampel berhasil teramplifikasi. Berdasarkan informasi yang diperoleh dari GenBank (NCBI, 2011) sekuens gen *GDF-9* pada *Capra hircus* (*complete cds*) memiliki panjang sebesar 5508 bp. Primer forward yang digunakan dalam proses amplifikasi gen *GDF-9* berada pada urutan basa ke 2067-2086 bp, sedangkan untuk primer reverse berada pada urutan basa ke-3548-3567 bp. Berdasarkan letak primer forward dan reverse tersebut dapat diperkirakan ukuran fragmen hasil amplifikasi sebesar 1462 bp. Besarnya ampikon tersebut

tidak jauh berbeda dengan besarnya ampikon gen *GDF-9* pada kambing Kacang yakni sebesar 1400 bp. Hal ini menunjukkan bahwa hasil PCR tersebut sesuai dengan yang diharapkan. Sedangkan untuk gen *BMP-15* pada *Capra hircus* (*complete cds*), berdasarkan informasi yang diperoleh dari Genebank (2011), memiliki ukuran sebesar 6648 bp.



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen *GDF-9* M: DNA ladder 10 kb; lane 1-5: Fragmen gen *GDF-9*

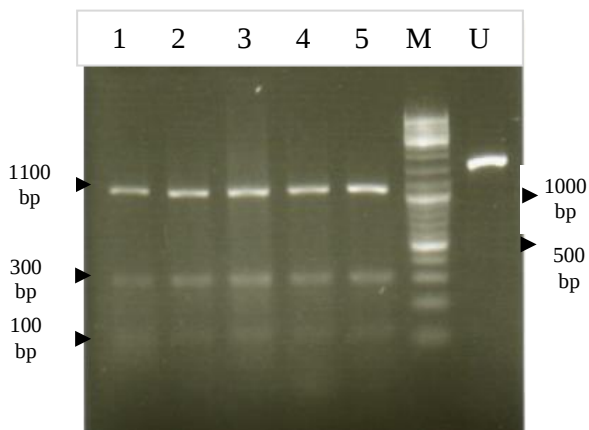
Primer forward yang digunakan dalam proses amplifikasi gen *BMP-15* terletak pada urutan basa ke 5694-5713 bp, sedangkan untuk primer reverse pada urutan basa ke- 6064-6082 bp.



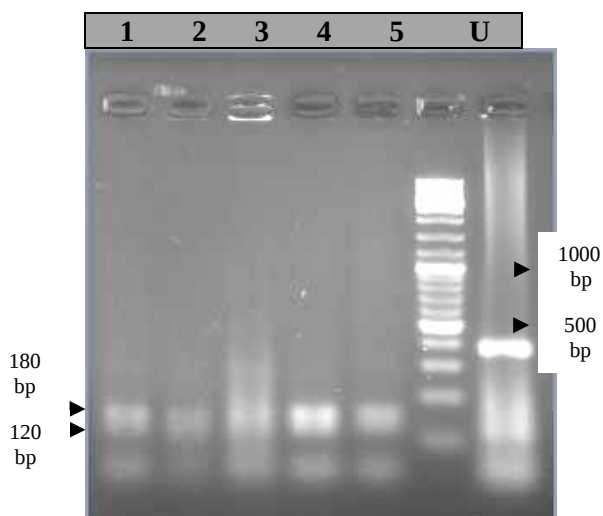
Gambar 2. Hasil Amplifikasi Gen *BMP-15*. M: DNA ladder 10 kb; lane 1-5: Fragmen gen *BMP-15*

Berdasarkan letak primer forward dan reverse tersebut dapat diperkirakan ukuran fragmen hasil amplifikasi sebesar 389 bp. Besarnya

amplikon tersebut memiliki kesamaan dengan besarnya amplikon gen *BMP-15* pada kambing Kacang yakni sekitar 380-400 bp. Hal ini menunjukkan bahwa hasil PCR sesuai dengan *database* yang telah diperoleh *Genebank*, yaitu data sekuen gen *BMP-15* pada spesies *Capra hircus*.



Gambar 3. Genotip Gen *GDF-9* pada Kambing Kacang setelah dipotong menggunakan enzim *HaeIII*; M: DNA ladder 10kb; lane 1-5: DNA hasil PCR-RFLP; U: Uncut (DNA PCR yang tidak dipotong *HaeIII*).



Gambar 4. Genotip Gen *BMP15* pada Kambing Kacang setelah dipotong dengan menggunakan enzim *AluI*; M: DNA ladder mix 10.000 bp; line 1-5: DNA hasil PCR-RFLP; U: Uncut (DNA PCR yang tidak dipotong *AluI*).

Hasil PCR-RFLP menggunakan enzim *HaeIII* pada fragmen DNA gen *GDF-9* didapatkan satu macam haplotip yang terdiri dari 3 fragmen DNA dengan ukuran 1100 bp, 300 bp dan 100 bp (Gambar 3). Sedangkan PCR-RFLP untuk gen *BMP-15* dengan menggunakan enzim restriksi *AluI* didapatkan

satu macam haplotip yang terdiri dari 2 fragmen dengan ukuran 180 bp dan 120 bp (Gambar 4)

Secara alami adanya heterosigositas pada gen *BMP-15* meningkatkan kecepatan ovulasi pada domba, lebih jauh didapatkan bahwa homosigositas akan menyebabkan terjadinya infertil pada domba [3,4]. Domba China yang tidak mengalami mutasi pada gen *FecB* memiliki tingkat fertilitas yang tinggi [10,11].

Adanya mutasi pada gen *BMP-15* dihubungkan dengan terjadinya *prolificacy* pada beberapa domba [10]. Gen *BMP-15* dan gen *GDF-9* merupakan gen fekunditas yang mempunyai nilai ekonomi di bidang reproduksi domba dan ruminansia [3,4,12]. Diduga bahwa protein BMP-15 merupakan protein spesies-spesifik yang dihubungkan dengan perbedaan tingkat ovulasi pada banyak spesies [13].

Beberapa jenis kambing yang telah diuji polimorfisme dengan SSCP menunjukkan bahwa pada gen *BMP-15* tidak terdapat polimorfisme [14]. Mutasi pada lima nukleotida berbeda di dalam exon 2 gen *BMP-15* dihubungkan dengan *prolificacy* dalam beberapa keturunan domba [10].

Hasil PCR-RFLP yang diperoleh pada penelitian ini tidak menunjukkan adanya polimorfisme gen *GDF-9* pada kambing Kacang. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang mendapatkan tidak adanya polimorfisme gen *GDF-9* pada sampel domba Tunisia melalui teknik SSCP [15]. Hal yang berbeda ditemukan pada analisis polimorfisme gen *GDF-9* pada ekson 2 pada kambing Putih di Provinsi Guizhou. Kambing tersebut memiliki genotip heterozigot yang mengalami mutasi pada 791 bp (G/A) yang menghasilkan substitusi valine menjadi isoleusin pada residu 79 *mature peptide* gen *GDF-9*. Akibat termutasinya valin menjadi isoleusin maka akan meningkatkan gugus metil pada rantai asam amino [16]

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat polimorfisme (variasi genetik) gen

BMP-15 dan GDF-9 pada 5 sampel kambing Kacang.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Muchtadi, T.R. 2010. *Riset Unggulan Strategi nasional Peningkatan Produk Pangan Hewani*. http://www.litbang.deptan.go.id/spesial/HPS/riset_produk_pangan_hewani.pdf. Tanggal akses 10 Februari 2010
- [2] Disnak. 2010. *Sosialisasi Program Percepatan Pencapaian Swasembada Daging Sapi (P2SDS)*. <http://www.disnak.jabarprov.go.id/index.php?mod=detilBerita&idMenuKiri=334&idBerita=182&lang=0>. Tanggal akses 10 Februari 2010.
- [3] Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., McLaren, R. J., Luro, K., Dodds, K. G., Montgomery, G. W., Beattie, A. E., Davis, G. H., Ritvos, O. 2000. *Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner*. *Nature Genet.* vol. 25, 279-283.
- [4] Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM (2004). *Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF-9 and BMP-15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (Ovis aries)*. *Biol. Reprod.* 70: 900-909
- [5] Dong J, Altertini DF, Nishimori K, Rajendra Kumar T, Lu N, Matzuk MM. 1996. *Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis*. *Nature*, 383: 531-535.
- [6] Ireland. J.J, and Smith. G.W. 2007. *BMP15, An Oocyte-Specific Gene, Play A Role In Oocyte And Follicular Development In Cattle*. *PNAS*. Vol. 104.
- [7] Dube, J. L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K. M., Celeste, A. J., Matzuk, M. M. 1998. *The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes*. *Molec. Endocr.* vol. 12, 1809-1817
- [8] Doneda L, Klinger FG, Larizza L dan De Felici M. 2002. *KL/KIT Co-expression in Mouse Fetal Oocytes*. *Int J Dev Biol* 46,1015–1021.
- [9] Arefnezhad B (2007). *Molecular analysis of BMP-15 (Bone Morphogenetic Protein-15) gene in Markhoz goats*. M.Sc. Thesis, Department of Animal Science, Shiraz University, Shiraz, Iran. p. 133.
- [10] Guan F, Liu SR, Shi GQ, Ai JT, Mao DG, Yang LG (2006). *Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development*. *Acta. Genet. Sinic.* 33: 117-124
- [11] He YQ, Chu MX, Wang JY, Fang L, Ye SC (2006). *Polymorphism on BMP-15 as a candidate gene for prolificacy in six goat breeds Chinese*. *J. Anhui. Agric. Univ.* 33: 61-64.
- [12] McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL (2005). *Oocyte expressed genes affecting ovulation rate*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 234: 57-66.
- [13] Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S (2005). *Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 5426-5431.
- [14] Ma, X., Xiaoyong L., Cunxia Z. dan Jun Li. 2010. *Candidate Genes Polymorphism and Its Association to Prolificacy in Chinese Goats*. *Journal of Agricultural Science*. Vol.2, No. 1
- [15] Dhaoudi. A. 2009. *Investigation on The BMPR 1B, BMP 15, and GDF9 Genes Polymorphism and Its Association With Prolificacy in Five Sheep Breeds Reared in Tunisia*. *Universita degli Studi Di Sassari*.
- [16] Xue-qin, R., L. Jian-bin., D. Zhi-young., Q. Cheng., dan W. Jia-fu. 2009. *Diversity of BMP15 and GDF9 Genes in White Goat of Guizhou Province and Evolution of Encoded Proteins*. *Guizhou University*. 30