

Pola Hasil Amplifikasi Partial Gen *BMP-15* dan *GDF-9* pada Sapi Bali

Sri Rahayu^{1)*}, M. Sasmito Djati¹⁾, Agatha Maria Dian Kusumawati²⁾, Oktavia Fitri Santika²⁾

¹⁾Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya

²⁾Program Sarjana Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang

Diterima tanggal 21 Maret 2012, direvisi tanggal 9 April 2012

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme gen *GDF-9* dan *BMP-15* pada sapi bali. Gen *GDF-9* dan *BMP-15* merupakan gen yang terkait dengan kemampuan reproduksi, dan kemampuan reproduksi tersebut berbeda pada setiap individu. DNA diisolasi dari darah 6 ekor sapi betina yang diperoleh dari RPH Sesetan, Denpasar. Untuk mengetahui keberhasilan isolasi DNA dilakukan analisa secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer dan analisa secara kualitatif dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1 %. Amplifikasi DNA untuk gen *BMP-15* menggunakan primer forward (5'- AGTTTGTACTGAGCCGGTCT -3') dan primer reverse (5'- CTGACACACGAAGCGGAGT -3'). Sedangkan amplifikasi gen *GDF-9* dilakukan dengan menggunakan forward primer (5'- CAAGGAGGGGACCCCTAAAT-3'), reverse primer (5'- ACCAGAGGCTCAAGAGGAGC- -3'). Hasil amplifikasi gen *BMP-15* dan gen *GDF-9* menunjukkan adanya 4 haplotip. Variasi hasil amplifikasi ini menunjukkan adanya polimorfisme gen *BMP-15* dan *GDF-9* pada keenam sampel sapi Bali.

Kata kunci: Gen *BMP-15*, Gen *GDF-9*, Polimorfisme, sapi Bali.

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the polymorphisms of *BMP-15* and *GDF-9* gene of Bali cattle. DNA was isolated from blood samples of six female cattles with salting out method. Quantitative and qualitative analysis of DNA was measured using spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. To get DNA fragment *BMP-15* gene was amplified using Forward (5'- AGTTTGTACTGAGCCGGTCT -3'), Reverse (5'- CTGACACACGAA GCGGAGT -3'), while to get DNA fragmen *GDF-9* gene was amplified using Forward primer (5'-CAAGGAGGGGACCCCTAAAT-3'), reverse primer (5'-ACCAGAGGCTCAAGAGGAGC- -3') for *GDF-9*. The results of amplification showed 4 haplotype for *BMP-15* and *GDF-9* gene. It was concluded that there are polymorphism of *BMP-15* and *GDF-9* gene of Bali cattle.

Key word: BMP-15 gene, GDF- 9 gene, Polymorphism, Bali cattle

PENDAHULUAN

Folikel merupakan unit fungsional suatu ovarium; didalam setiap folikel terdapat satu oosit yang dikelilingi oleh satu atau lebih lapisan sel somatik. Folikel berkembang

melalui beberapa tahapan yaitu folikel primordial, folikel primer, folikel preantral, dan antral [1]. Perkembangan folikel ditandai dengan adanya perubahan bentuk sel granulosa dan peningkatan ukuran oosit [2]. Perubahan ini dikendalikan oleh hormone yang dihasilkan hipofisa [3] dan parakrin [4]. Parakrin yang terlibat dalam perkembangan foilkel antara lain GDF-9 (Growth Differentiation Factor-9) dan BMP (Bone

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

Morphogenetic Protein) disekresi oleh oosit, sel granulosan dan sel teka [5,6]. Kedua protein tersebut telah terbukti memiliki peranan penting dalam mengatur perkembangan folikel pada rodensia, domba dan manusia [7,8,9]. Faktor-faktor pertumbuhan oosit ini merupakan faktor yang mempengaruhi fase awal dan fase akhir folikulogenesis [5], [10]. *BMP-15* dan *GDF-9* merupakan molekul peptide dari kelompok TGF- β superfamili dan disekresi oleh oosit [11]. Mutasi pada *GDF-9* [10] dan *BMP-15* [5,6] mengakibatkan folikulogenesis berhenti pada tahap folikel primer. *GDF-9* dan *BMP-15* bekerja sama untuk mengatur pematangan oosit dan perkembangan folikel [12].

Bone morphogenetic protein (BMPs) merupakan protein yang berperan dalam mengatur proliferasi/diferensiasi sel, deposisi matriks ekstraseluler dan apoptosis [13]. Terdapat 8 macam protein yang tergolong dalam BMPs yang berperan dalam folikulogenesis, yaitu *BMP-2*, *BMP-4*, *BMP-6*, *BMP-7*, *BMP-15* dan *GDF-9* [14], [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 [5]. *BMP-15* mengatur proliferasi dan diferensiasi sel granulosan, menahan ekspresi folikel stimulating hormon, dan menstimulasi ekspresi kit ligand, semua pengaturan yang penting dari kit ligand [16]. *BMP-15* berperan dalam pematangan oosit dan perkembangan folikular sebagai homodimer dan akan membentuk heterodimer dengan *GDF-9*. *BMP-15* terekspresi berlimpah pada folikel primer, yang menunjukkan bahwa transkripsi *BMP-15* telah ditranslasikan pada tahap awal folikulogenesis. Pada manusia, *BMP-15* terekspresi dalam konsentrasi yang rendah. [12].

Pada beberapa penelitian menemukan bahwa *GDF-9* berperan dalam proliferasi sel granulosan dan menekan ekspresi LH/CG receptor (*Lhcgr*) pada sel-sel granulosan. Ekspresi *GDF-9* ditemukan pada oosit tikus [17], sapi/domba [14], manusia [19] dan folikel ovarium babi [21]. Lebih lanjut dikatakan bahwa *GDF-9* memiliki peranan

untuk menstimulasi ekspresi gen hyaluronon synthetase 2 (*Has2*), prostaglandin synthetase 2 (*Ptgs2*) (juga dikenal sebagai cyclooxygenase 2, *Cox2*) yang ada didalam sel-sel cumulus oophorus. Enzim-enzim tersebut memiliki peranan dalam ekspansi sel-sel cumulus oophorus dan ovulasi [7]. Pada tikus knock out gen *GDF-9* didapatkan adanya penghambatan pada proses folikulogenesis pada tahap folikel primer. Hal ini menunjukkan bahwa *GDF-9* memiliki peranan penting pada awal folikulogenesis [10].

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

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian.

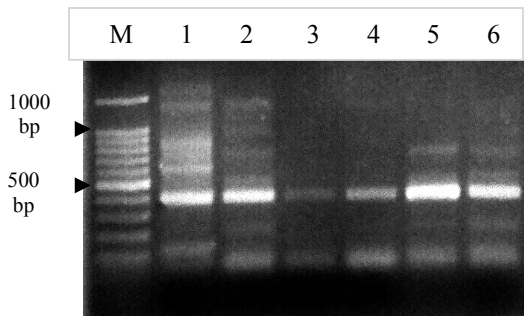
Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2010 sampai Juni 2011. Sampel darah 7 ekor sapi Bali betina diperoleh dari RPH Sasetan, Denpasar. Analisa molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

Amplifikasi gen *BMP-15* dan *GDF-9*.

DNA diisolasi dari sel limfosit darah. Amplifikasi gen *GDF-9* dan *BMP-15* sapi Bali dilakukan melalui metode PCR. Primer DNA yang digunakan untuk amplifikasi gen *GDF-9* adalah forward primer (5'-CAAGGAGGGGACCCCTAAAT-3'), reverse primer (5'ACCAGAGGCTCAAGA GGAGC 3'). Sedangkan primer DNA yang digunakan untuk amplifikasi gen *BMP-15* adalah forward primer 5'-AGTTTGTACTGAGCC GGTCT-3' dan reverse primer 5'-CTGACACACGAAGCGGAGT-3'. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan melakukan pengamatan profil pita DNA hasil PCR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi DNA pada gen *BMP-15* ditunjukkan pada Gambar 1. Amplifikasi pada keenam sampel DNA sapi bali menghasilkan 4 haplotip (Tabel 1).



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen *BMP-15*. M: DNA ladder 100 bp; lane 1-6: Fragmen DNA gen *BMP-15*

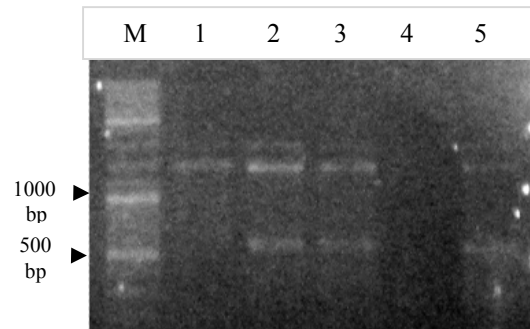
Tabel 1. Hasil Amplifikasi Gen *BMP-15* pada Sapi Bali

Haplotip	Sampe l	Fragmen DNA (bp)
1	1	150, 400, 600, 900, 1400, 1600
2	2	100, 200, 400, 500, 800, 1400
3	3 dan 4	100, 400
4	5 dan 6	100, 200, 400, 500, 800

Hasil amplifikasi gen *GDF-9* ditunjukkan pada Gambar 2. Amplifikasi pada kelima sampel DNA sapi bali menghasilkan 4 haplotip (Tabel 2).

Amplifikasi gen *BMP-15* pada sapi bali menghasilkan fragmen DNA yang berbeda pada setiap sampel (Gambar 1 dan Tabel 1). Pada semua sampel terdapat kesamaan fragmen DNA yang dihasilkan yaitu pada ukuran 400bp. Penelitian sebelumnya dengan menggunakan primer yang sama untuk mengamplifikasi gen *BMP-15* pada sapi dari berbagai breed diperoleh ukuran fragmen sebesar 389bp [20]. Adanya perbedaan hasil amplifikasi pada keenam sapi bali dengan penelitian kemungkinan disebabkan karena perbedaan bangsa sapi yang digunakan sebagai sampel. Amplifikasi gen *GDF-9* pada sapi Bali menghasilkan fragmen DNA yang berbeda pada setiap sampel (Gambar 2 dan

Tabel 2). Pada hasil amplifikasi gen *GDF-9* selalu memunculkan fragmen DNA dengan ukuran 1200bp pada setiap sampel. Hasil amplifikasi pada kedua gen tersebut menunjukkan adanya variasi sekuen pada gen *BMP-15* dan *GDF-9* sapi bali.



Gambar 2. Hasil Amplifikasi Gen *GDF-9*. M: DNA ladder 100 bp; lane 1-5: Fragmen gen *GDF-9*

Tabel 2. Hasil Amplifikasi Gen *GDF-9* pada Sapi Bali

Haplotip	Sampe l	Fragmen DNA (bp)
1	1	1200
2	2 dan 3	600, 1200, 1300
3	4	Tidak teramplifikasi
4	5	600 dan 1200

Polimorfisme dapat menjadi penanda adanya keragaman genetik suatu populasi. Polimorfismec merupakan variasi genetik yang biasanya muncul dengan persentase sedikitnya 1% dari suatu populasi. Munculnya polimorfisme dengan peluang 1% tersebut juga diakibatkan oleh adanya mutasi spontan, sehingga dalam suatu famili hal tersebut juga dapat diturunkan kepada keturunannya [22]. Secara umum keanekaragaman genetik dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen dari satu tempatke tempat lain.

Gen *BMP-15* dan dan gen *GDF-9* merupakan gen fekunditas yang mempunyai nilai ekonomi di bidang reproduksi domba dan ruminansia [3,10]. Diduga bahwa protein BMP-15 merupakan protein spesies-spesifik yang dihubungkan dengan perbedaan tingkat

ovulasi pada banyak spesies [12]. Secara alami adanya heterosigositas pada gen *BMP-15* karena adanya mutasi dapat meningkatkan ovulasi dan proliferasi pada domba. Sedangkan homosigositas pada gen *BMP-15* dapat menyebabkan terjadinya infertil pada domba [5],[6]. Mutasi alami pada gen *BMP-15* menjadi faktor yang berpengaruh terhadap ovarium dan dapat mengakibatkan peningkatan kecepatan ovulasi maupun fenotip infertil [12]. *BMP-15* meregulasi proliferasi dan differensiasi sel granulosa dengan cara mempromotori mitosis sel, menekan ekspresi reseptor FSH (*Follicle Stimulating Hormone*), dan menstimulasi ekspresi ligan Kit, dimana semua fungsi tersebut berperan pada kesuburan mamalia betina [22].

Gen *GDF-9* merupakan gen pengontrol esensial dibutuhkan dalam perkembangan folikel. *GDF-9* menstimulus protein pada proses perkembangan folikel primordial dan folikel primer sampai pengaturan sel granulosa dan sel teka. Mutasi (S395F) pada gen *GDF-9* yang berasosiasi dengan peningkatan kecepatan ovulasi dalam keadaan heterozigot dan akan mengakibatkan steril dalam keadaan homozigot pada domba *Cambridge* dan *Belclare* [6].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat polimorfisme (variasi genetik) gen *BMP-15* dan *GDF-9* pada 6 sampel sapi Bali

DAFTAR PUSTAKA

- [1] McGee, E.A., and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.*, 21: 200-214.
- [2] Anderson, L.D., and Hirshfield, A.N. (1992). An overview of follicular development in the ovary : from embryo to the fertilized ovum in vitro. *Md. Med. J.*, 41: 614-620
- [3] Zeleznik AJ. (2001). Modifications in gonadotropin signaling: a key to understanding cyclic ovarian function. *J Soc Gynecol Invest.* 8:24-25.
- [4] Adashi EY. (1992). Intraovarian peptides. Stimulators and inhibitors of follicular growth and differentiation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 21:1-17.
- [5] 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.
- [6] 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
- [7] Elvin, J.A., Yan, C.N., Matzuk, M.M., (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E-2/EP2 receptor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10288-10293
- [8] Di Pasquale E, Beck-Peccoz P & Personi L (2004) Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (*BMP15*) gene. *American Journal of Human Genetics* 75 106-111
- [9] Shimasaki S., Moore, R.K., Otsuka, F. & Erickson, G.F. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 25 72-101.
- [10] Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N & Matzuk MM. (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 383 : 531-535.

- [11] Erickson, a.F., and Shimasaki, S.(2000). The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.*, 11, 193-198.
- [12] 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
- [13] Massague J, Chen YG. (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14: 627-44.
- [14] Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. (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: 381-6.
- [15] Glister C, Kemp CF, Knight PG. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction.* 127: 239-54.
- [16] 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.
- [17] Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M & Hsueh AJ. (1999) Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles *Endocrinology.* 140: 1236–1244.
- [18] Shimizu Takashi, Yasunori Miyahayashi, Masaki Yokoo, Yumi Hoshino, Hiroshi Sasada and Eimei Sato. (2004). Molecular cloning of porcine growth differentiation factor 9 (GDF-9) cDNA and its role in early folliculogenesis: direct ovarian injection of GDF-9 gene fragments promotes early folliculogenesis. *Reproduction* : 128 537–543
- [19] Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L & Ritvos O. (1999). Human growth differentiation factor-9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 2744–2750.
- [20] Zhang, L.P, Q.F. Gan, X.H. Zhang, H.D. Li, G.Y. Hou, J.Y. Li, X.Gao, H.Y. Ren, J.B. Chen, S.Z. Xu. (2009). Detecting a Deletion in The Coding Region of The Bovine Bone Morphogenetic Protein 15 Gene (*BMP15*). *J Appl Genet* 50(2): 145–148.
- [21] Kimbal, J. W. (2007). Polimorphism. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Polymorphisms.html>. Tanggal akses 12 Desember 2010.
- [22] Otsuka, F., Z. Yao, T. Lee, S. Yamamoto, G. F. Erickson, and S. Shimasaki. (2000). Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J. Biol.Chem.* 275:39523–39528.