

Analisis Polimorfisme Gen *BMP-15* (*Bone Morphogenetic Protein-15*) dengan Metode PCR-RFLP dan Hubungannya dengan Performan Reproduksi Sapi Friesian Holstein (FH)

Lutfiatun Izzatul Lailiya¹, Sri Rahayu¹, Widya Ayu Pradini², Gatot Ciptadi³

1) Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

2) UPT. Balai Besar Pelatihan Peternakan, Songgoriti, Batu

3) Fakultas Peternakan

Universitas Brawijaya

Jl. Veteran n0.169 Malang, Email : llailiya@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya polimorfisme gen *BMP-15* (*Bone morphogenetic protein-15*) dengan menggunakan teknik PCR-RFLP dan hubungannya dengan performan reproduksi sapi Friesian Holstein (FH). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 sapi FH betina yang diambil dari UPT. Balai Besar Pelatihan Peternakan, Songgoriti, Batu. Isolasi DNA dari darah dengan menggunakan metode *salting out*. Amplifikasi gen *BMP-15* dilakukan dengan teknik PCR menggunakan primer forward 5'GCTCTGGAATCACAAGGGG3' dan Primer reverse 5'AGAGATGGGGAGCGAT GAT 3'. Polimorfisme gen *BMP-15* dianalisis dengan teknik PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *HaeIII*. Amplifikasi gen *BMP-15* menghasilkan amplicon dengan panjang 360bp. Analisis PCR-RFLP menghasilkan dua haplotip yang menunjukkan adanya polimorfisme. Haplotip I memiliki ukuran fragmen DNA 90bp dan 190bp. Haplotip II memiliki ukuran fragmen 90bp, 190bp, 290bp, dan 350bp. Data performan reproduksi 10 sapi fertil yang digunakan adalah 3 sapi bunting dan 7 sapi memiliki data *calving interval* pada range 13-16 bulan, *days open* pada range 3-7 bulan dan 2 sapi beranak kembar. Berdasarkan data yang ada, diketahui bahwa sapi yang termasuk dalam haplotip II memiliki data performan reproduksi yang bervariasi. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa polimorfisme gen *BMP-15* yang ada, tidak menunjukkan adanya hubungan dengan performan reproduksi sapi FH.

Kata Kunci : Gen *BMP-15*, Performan reproduksi, Polimorfisme

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the *BMP-15* gene polymorphism in FH cattle using PCR-RFLP method and it's correlation with performance reproduction. Samples of ten (10) FH cattle were taken randomly from UPT. Training Center of Animal Husbandry, Songgoriti, Batu. Whole genome DNA was isolated from blood using *salting out* method. *BMP-15* gene was amplified using specific primer of *BMP-15*, forward primer 5'GCTCTGGAATCACAAGGGG 3' and reverse primer 5' AGAGATGGG GAGCGATGAT 3'. The result of PCR was a specific single band with fragment size 360bp. The amplicon of *BMP-15* gene was digested by restriction enzyme *HaeIII*. The product of PCR-RFLP was two (2) haplotypes. Haplotype 1 with 2 fragment DNA (90bp and 190bp) and haplotype 2 with 4 fragment DNA (90bp, 190bp, 290bp and 350bp). Data of performance reproduction consist of 3 pregnancy cattles and 7 cattles have a *calving interval* about 13-16 months, *days open* about 3-7 months and 2 cattles left have twin offspring. This study show that there is polymorphism of FH cattle *BMP-15* gene. However, there is no correlation between *BMP-15* gene polymorphism with performance reproduction of FH cattle.

Keywords : *BMP-15* gene, Performance reproduction, Polymorphism

PENDAHULUAN

Kebutuhan susu di Indonesia setiap tahunnya mengalami peningkatan. Hal ini sejalan dengan pertambahan jumlah penduduk yang terus meningkat. Ditjennak [1], menginformasikan bahwa kebutuhan susu sejak tahun 2010 hingga 2012 belum tercukupi. Salah

satu upaya untuk mencukupi kebutuhan susu di Indonesia yaitu dengan meningkatkan jumlah populasi sapi perah. Peningkatan populasi ternak bergantung pada keberhasilan reproduksi. Keberhasilan proses reproduksi sapi dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya yaitu keberhasilan proses ovulasi yang diawali proses folikulogenesis. Pada proses folikulogenesis

terdapat beberapa protein yang berperan, antara lain *TGFβ superfamily* [2].

Bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) merupakan salah satu protein yang termasuk dalam kelompok *TGFβ superfamily*. Protein ini berperan dalam mengatur proliferasi dan differensiasi sel granulosa, menahan ekspresi FSH dan menstimulasi ekspresi kit ligand [3]. Pada mamalia, protein BMP-15 berperan sebagai faktor pertumbuhan sel granulosa dan berperan dalam menghambat sensitivitas folikel terhadap FSH [4].

Menurut Dube *dkk* [5], BMP-15 berperan dalam pematangan oosit dan perkembangan folikel sebagai homodimer dan membentuk heterodimer dengan GDF-9. BMP-15 yang terekspresi pada folikel primer dalam ovarium menunjukkan bahwa transkripsi *BMP-15* telah ditranslasikan pada tahapan awal folikulogenesis. BMP-15 yang terekspresi pada folikel berperan penting dalam rekrutmen folikel awal, menstimulasi proliferasi sel-sel granulosa dalam folikel-folikel preantral melalui mekanisme yang tergantung pada FSH [6].

Pada mencit, berdasarkan penelitian Yan *dkk*[7], dengan menginaktivasi gen *BPM-15* menunjukkan hasil bahwa tikus tidak menjadi steril, namun menurunkan laju ovulasinya saja. Adanya mutasi gen *BMP-15* menjadi faktor yang berpengaruh pada fisiologis ovarium, selain itu juga dapat mengakibatkan peningkatan laju ovulasi. Pada domba, mutasi gen *BMP-15* pada betina heterozigot dapat menyebabkan kenaikan laju ovulasi, sedangkan mutasi pada betina homozigot dapat menyebabkan kegagalan proses folikulogenesis yang dikarenakan kerusakan ovarium [8].

Sampai saat ini, penelitian tentang polimorfisme gen *BMP-15* pada sapi FH belum diteliti. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui polimorfisme gen *BMP-15* yang dihubungkan dengan data performan reproduksi sapi yang digunakan.

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 10 sapi betina FH. Pengambilan data performan reproduksi sapi dilakukan secara deskriptif antara lain *calving interval*, *days open*, dan keterangan anak kembar pada masing-masing sapi FH. DNA dari darah diisolasi dengan metode *salting out*. Kuantitas DNA hasil

isolasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer, sedangkan kualitas DNA hasil isolasi diketahui dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 0.8%.

PCR-RFLP

DNA diamplifikasi dengan menggunakan primer yang di adopsi dari Zhang *dkk* [9], yaitu *primer forward*: 5'-GCTCTGGAATCA CAAGGGG-3' dan *Primer reverse* 5'-AGA GATGGGGAGCGATGAT-3'. Program PCR meliputi beberapa tahapan, yaitu denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, selanjutnya diikuti dengan amplifikasi 34 siklus. Setiap siklus terdiri dari tahap denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 58°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama 30 detik, dan diikuti dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR dielektroforesis dengan gel agarosa 1.5%. PCR-RFLP dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII*. Hasil PCR-RFLP dielektroforesis dengan gel agarosa 2%.

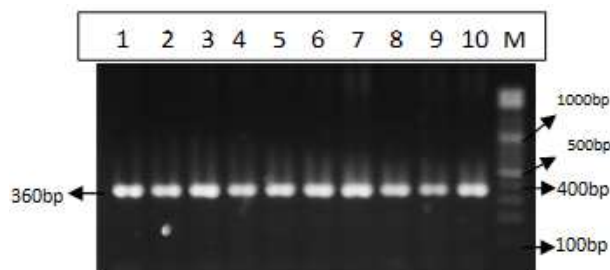
Analisis data

Data hasil PCR-RFLP di analisis secara deskriptif berdasarkan pola pita DNA yang didapatkan dan dikorelasikan dengan data performan reproduksi sapi FH.

HASIL DAN PEMBAHASAN

PRC-RFLP gen *BMP-15*

Hasil amplifikasi gen *BMP-15* pada 10 sampel sapi FH diperoleh 1 pita DNA yang spesifik dengan ukuran 360bp (Gambar 1).

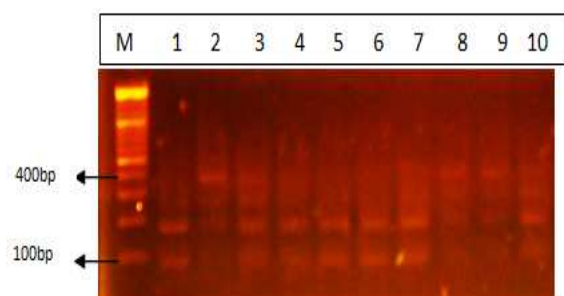


Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen *BMP-15*. M:DNA ladder 10.000bp. 1-10: fragmen DNA hasil amplifikasi Gen *BMP-15*.

Ukuran pita DNA hasil amplifikasi gen *BMP-15* yang diperoleh pada penelitian ini mendekati ukuran amplicon pada penelitian Zhang *dkk* [9]

yakni sebesar 371bp. Hal ini dikarenakan penggunaan primer yang sama dan sampel penelitian yang termasuk dalam satu spesies. Sapi FH tergolong dalam sapi eropa yang merupakan kelompok *Bos taurus* [12].

PCR-RFLP gen *BMP-15* dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII* menunjukkan bahwa semua fragmen gen *BMP-15* hasil amplifikasi terpotong dan diperoleh dua tipe haplotip. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat sisi pengenalan restriksi pada DNA hasil amplifikasi (Gambar 2 dan Tabel 1). Adanya variasi haplotip menunjukkan adanya polimorfisme gen *BMP-15* pada sapi FH.



Gambar 2. Hasil PCR-RFLP gen *BMP-15* menggunakan enzim restriksi *HaeIII*. M: DNA ladder 10.000bp. 1-10 DNA hasil PCR-RFLP.

Penelitian tentang polimorfisme gen *BMP-15* juga dilakukan pada sapi PO. Pada penelitian Damayanti & Sri Rahayu [10] yang berjudul Analisis polimorfisme gen *BMP-15* (*Bone Morphogenetic Protein*) Sapi PO (*Bos indicus*) dan hubungannya dengan keberhasilan inseminasi buatan, mengatakan bahwa polimorfisme gen *BMP-15* yang terjadi pada sapi PO tidak menunjukkan adanya hubungan dengan keberhasilan Inseminasi Buatan. Polimorfisme gen dapat terjadi akibat adanya perubahan susunan nukleotida pada gen yang dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, misalnya adanya seleksi alam atau buatan dan pengaruh perkawinan. Adanya perubahan susunan nukleotida, dapat berpengaruh terhadap perubahan fenotip suatu organisme [11].

Tabel 1. Haplotip gen *BMP-15* Sapi FH dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII*

Haplotip	Jumlah restriksi	Ukuran fragmen	Nomor Sampel
1	2	90bp, 190bp	1
2	4	90bp, 190bp,	2,3,4,5, 6,7,8,9,

		290bp, 350bp	10
--	--	--------------	----

Menurut Galloway *dkk* [14], bahwa gen *BMP-15* dianggap sebagai gen penting yang memiliki peran dalam fekunditas domba, yang terletak pada kromosom X dengan panjang sekuens 6648 nukleotida dengan 2 exon. Pada penelitian Nawas *dkk* [16] menjelaskan bahwa terjadinya polimorfisme gen *BMP-15* pada domba Balochi berkaitan dengan fekunditas. Hal lain juga ditemukan pada keturunan kambing Balochi yaitu terjadinya delesi dan insersi yang berhubungan dengan fekunditas.

PERFORMAN REPRODUKSI DAN POLIMORFISME Gen *BMP-15*

Data performan reproduksi dari sepuluh sapi FH yang digunakan antara lain *calving interval*, *days open*, dan keterangan anak kembar (Tabel 2 dan Tabel 3). Berdasarkan data performan reproduksi terdapat 3 sapi bunting dan 7 sapi memiliki data *calving interval* dan *days open* yang bervariasi. Sepuluh sapi yang digunakan hanya satu sapi yang termasuk dalam tipe haplotip 1 dengan nilai *days open* 5 bulan dan *calving interval* 15 bulan, sedangkan sapi yang termasuk dalam tipe haplotip 2 memiliki data *days open* dan *calving interval* yang bervariasi (Tabel 2).

Tabel 2. Hubungan haplotip gen *BMP-15* dengan performan reproduksi sapi FH

Sampel	Haplotip	Performan reproduksi	
		DO (bulan)	CI(bulan)
3	2	3	13
4	2	4	13
5	2	5	14
1	1	5	15
9	2	6	15
2	2	6	16
10	2	7	16
6	2	Bunting	
7	2	Bunting	
8	2	Bunting	

Sebanyak 7 ekor sapi yang digunakan sebagai sampel, pernah melahirkan anak kembar dan anak tidak kembar (Tabel 3). Pada tipe haplotip 2 terdapat 2 sapi yang beranak kembar dan 4 sapi tidak beranak kembar. Data tersebut belum konsisten, hal ini dilihat dari tipe haplotip 2

dengan data performan reproduksi yang bervariasi. Sehingga adanya variasi tersebut menunjukkan bahwa polimorfisme gen *BMP-15* tidak berhubungan dengan performan reproduksi sapi FH.

Pada domba, mutasi gen *BMP-15* pada betina heterozigot dapat berpengaruh pada laju ovulasi dan jumlah anak sekelahiran, sedangkan mutasi pada betina homozigot dapat menyebabkan infertil [8]. Menurut Hanrahan *dkk* [13], bahwa mutasi pada gen *BMP-15* berasosiasi dengan laju ovulasi dan *litter size* pada Domba Cambridge dan Berclare.

Tabel 3. Hubungan haplotip dengan peristiwa beranak kembar

Sampel	Haplotip	Keterangan
1	1	Tidak beranak kembar
2	2	Tidak beranak kembar
3	2	Beranak kembar
4	2	Tidak beranak kembar
5	2	Beranak kembar
9	2	Tidak beranak kembar
10	2	Tidak beranak kembar

Zhang *dkk* [9] melaporkan bahwa 8 jenis sapi yang diteliti menunjukkan adanya polimorfisme. Dua genotip (AA dan AB) ditemukan pada sapi jenis Luxi, Qinchuan, Nanyang, Jinnan dan Bohai Black, sementara hanya terdapat satu genotip (AA) pada sapi Menggolian, Holstein, dan Simmental. Pada sapi genotip AB tidak menunjukkan adanya penurunan kesuburan. Selain itu, tidak menunjukkan bahwa kromosom X berhubungan dengan kelahiran anak kembar atau tingkat ovulasi pada sapi [9]. Menurut Maskur & Chairussyuhur [15], bahwa *BMP-15* merupakan gen overdominan yang terpaut pada kromosom X yang menyebabkan sifat infertil pada individu homozigot. Adanya mutasi pada gen *BMP-15* dapat menyebabkan meningkatnya laju ovulasi dan jumlah anak sekelahiran pada ternak domba.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat polimorfisme pada gen *BMP-15* sapi FH. Polimorfisme gen *BMP-15* ini tidak ada hubungannya dengan performan reproduksi pada sapi FH.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada penyandang dana untuk penelitian. Terima kasih pada UPT. Balai Besar Pelatihan Peternakan, Songgoriti, Batu sebagai lokasi pengambilan sampel penelitian. Pada seluruh staff Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ditjennak. 2013. Statistic Peternakan dan Kesehatan Hewan 2013. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian RI. Jakarta.
- [2] Chang, H., C.W. Brown., & M.M. Matzuk. 2002. Genetic Analysis of The Mammalian *Transforming Growth Factor-Beta Superfamily*. *Endocr Rev*. 23 (6) : 787-823.
- [3] Ireland, J.J. & G.W. Smith. 2007. *BMP-15* An Oocyte-Specific Gene, Play a Role in Oocyte and Follicular Development in Cattle. *PNAS*. Vol 104.
- [4] Otsuka F., Z. Yao., T. Lee., S. Yamamoto., G.F. Erickson., & S. Shimasaki. 2000. *Bone Morphogenetic Protein-15* Identification of Target Cells and Biological Functions. *J Biol Chem*. 275(50).
- [5] Dube, J.L., P. Wang., J. Elvin., K.M. Lyons., A.J. Celest., & M.M. Matzuk. 1998. The *Bone Morphogenetic Protein-15* Gene Is X-Linked and Expressed on Oocytes. *Molec. Endocr*. 12:1809-1817.
- [6] Shimasaki, S., R.K. Moore., F. Otsuka., & G.F. Erickson. 2004. The *Bone Morphogenetic Protein* System in Mammalian Reproduction. *Endocrine Reviews*. 25: 72-101.
- [7] Yan, C., P. Wang., J. DeMayo., F.J. DeMayo., J.A. Elvin., C. Carino. 2001. Synergistic Roles of *Bone Morphogenetic Protein-15* and *Growth Differentiation Factor-9* in Ovarian Function. *Mol Endocrinol*. 15: 854-866.

- [8] Davis, G.H. 2005. Major Genes Affecting Ovulation Rate in Sheep. *Genet sel evol.* 37: S11-S23.
- [9] 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 (BMP-15)*. *J appl genet.* 50(2): 145-148.
- [10] Damayanti. E.U. dan S. Rahayu. 2013. Analisa Polimorfisme Gen *BMP-15(Bone Morphogenetic Protein)* Sapi PO (*Bos indicus*) dan Hubungannya dengan Keberhasilan Inseminasi Buatan. *Jurnal Biotropika*. Vol.1(5): 216-220.
- [11] Frankham, R., J.D. Ballou., & D.A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Hal: 100-105.
- [12] Guntoro, suprio. 2002. Membudidayakan sapi bali. Kanisius. Yogyakarta.
- [13] Hanrahan, J.P. & J.B. Owen. 2004. Variation and Repeatability of Ovulation Rate in Cambridge Ewes. *Anim Prod.* 40:529.
- [14] Galloway, S.M., K.P. McNatty., L.M. Cambridge., M.P. Laitinen., S. Jennifer., R.J. Jokiranta., K. McLaren., K.G. Luiro., G.W. Dodds., J.L. Montgomery., A.E. Beattie., G.H. Davis., & O. Ritvos. 2000. Mutations on an Oocyte-Derived Growth Factor Gene *BMP-15* Cause Increased Ovulation Rate and Infertility on A Dosage-Sensitive Manner. *Nat.Genet.* 25: 279-283.
- [15] Maskur dan Chairussyuhur Arman. 2010. Identifikasi Mutasi gen *BMPR-1b* dan *BMP-15* pada Domba Ekor gemuk. *JITV*. Vol 15 (1): 16-21.
- [16] Nawaz, A.K., E.B. Masroor., N. Asif., H. Tanveer., B. Farah., J. Khalid., & M. Khushi. 2013. Identification of Molecular Markers in *Bone Morphogenetic Protein-15(BMP-15)* Gene of Balochi Sheep. *Pakistan J.Zool.* Vol.45(5): 1351-1357.