

**ANALISIS POLIMORFISME GEN *GROWTH DIFFERENTIATION
FACTOR 9 (GDF-9)* DAN HUBUNGANNYA DENGAN
KEBERHASILAN INSEMINASI BUATAN PADA SAPI PO**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sains
dalam bidang Biologi**

oleh :
Pangesti Dimy Arta
0910913030



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

ANALISIS POLIMORFISME GEN *GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF-9)* DAN HUBUNGANNYA DENGAN KEBERHASILAN INSEMINASI BUATAN PADA SAPI PO

Oleh :

Pangesti Dimy Arta
0910913030

Pembimbing I

Dr. Sri Rahayu, M. Kes
NIP. 19620528 198701 2 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., MAg. Sc., Ph.D
NIP. 19700128-199412-2-001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Pangesti Dimy Arta
Nim : 0910913030
Jurusan : Biologi
Judul skripsi : Analisis Polimorfisme Gen *Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9)* dan Hubungannya dengan Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi PO

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Tugas Akhir ini adalah benar – benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. karya – karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini, semata – mata digunakan sebagai acuan / referensi
2. Apabila dikemudian hari diketahui isi Proposal TA saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,
Yang menyatakan

Pangesti Dimy Arta

Nim. 0910913030

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



ANALISIS POLIMORFISME GEN *GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF-9)* DAN HUBUNGANNYA DENGAN KEBERHASILAN INSEMINASI BUATAN pada SAPI PO

Pangesti Dimy Arta

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya polimorfisme gen *GDF-9* dan hubungannya dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO (*Bos indicus*). Sepuluh (10) sampel darah 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'). Amplifikasi DNA menghasilkan fragmen pita DNA dengan ukuran \pm 900 bp. Polimorfisme gen *GDF-9* dianalisis menggunakan teknik PCR-RFLP dengan enzim restriksi *HaeIII*. Berdasarkan hasil PCR-RFLP diperoleh dua tipe haplotip. Haplotip I terpotong dengan 4 ukuran fragmen DNA 70 bp, 100 bp, 290 bp dan 590 bp. Haplotip II terpotong dengan 5 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

POLYMORPHISM ANALYSIS OF *GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF-9)* GENE AND ASSOCIATION WITH SUCCESS OF ARTIFICIAL INSEMINATION PO CATTLE

Pangesti Dimy Arta, Sri Rahayu
Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science,
Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the polymorphism of *GDF-9* gene in PO cattle 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'GCCACCCACACACCTAAAGTTTA3') and *GDF-9* reverse (5'GCACACCAACAGCTGAAAGAGGTA3'). 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 *GDF-9* gene in PO cattle. However, no correlation between *GDF-9* gene polymorphism with success of artificial insemination of PO cattle.

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

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji bagi Allah SWT penguasa seluruh ilmu pengetahuan atas berkah, rahmat, kasih serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul “**ANALISIS POLIMORFISME GEN *Growth Differentiation Factor 9 (GDF 9)* dan HUBUNGANNYA DENGAN KEBERHASILAN INSEMINASI BUATAN PADA SAPI PO**”. Penelitian ini didanai oleh dana mandiri Dosen. Ucapan terima kasih ingin penulis sampaikan kepada:

1. Dr. Sri Rahayu, M.Kes sebagai dosen pembimbing I dan Ketua Laboratorium Biologi Molekuler atas segala bimbingan dan pengarahan untuk menyelesaikan skripsi ini.
2. Drs. Aris Soewondo M.Si selaku dosen penguji I atas segala pengarahan dan perbaikan untuk menyelesaikan skripsi ini.
3. Nia Kurniawan, S.Si, MP, D.Sc selaku dosen penguji II atas segala pengarahan dan perbaikan untuk menyelesaikan skripsi ini.
4. Widodo, S.Si., M.Si. PhD. Med.Sc selaku Ketua Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
5. Dr. Suharjono, M.Si Selaku dosen pembimbing akademik selama 6 semester.
6. Ayahanda Djono Sudiyono, Ibunda Marsumi Galuh Wati dan Adinda Pramesty N.D serta Ananda Arif S. atas doa dan dukungan yang luar biasa sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
7. Tim Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler, khususnya Susiati S.Si, M.Biomed, Melina Rubaeah S.Si dan Imam Fikri S.Si serta seluruh keluarga besar Laboratorium Biologi Molekuler atas arahan dan dukungan.
8. Teman-Teman Biologi 2009, M. Dwi Susan, Erni Usnia D., Siska Oktafina D., Dhike Ardian
9. Teman-Teman seperjuangan Kertoleksono 80
10. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu yang telah mendukung selesainya skripsi penulis.

Penulis menyadari penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran dari semua pihak sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Malang, Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRAC	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
.....	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	2
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Sapi PO	4
2.2. <i>GDF-9 (Growth Differentiation Factor 9)</i>	5
2.3. Performa Reproduksi Ternak	8
2.4. Polimorfisme.....	8
2.5. DNA (<i>Deoxyribonucleic acid</i>).....	10
BAB III METODE PENELITIAN	12
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	12
3.2. Cara Kerja.....	12
3.2.1. Pengambilan Sampel	12
3.2.2. Pengambilan Data Performans Reproduksi	12
3.2.3. Isolasi DNA	12
3.2.4. Uji Kuantitatif DNA dengan Spektrofotometri	13
3.2.5. Uji Kualitatif Gel Agarose.....	13
3.2.6. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	14
3.2.7. Pemotongan hasil PCR dengan enzim restriksi.....	14
3.2.8. Elektroforesis Gel Poliakrilamida 10% Hasil RFLP	14
3.2.9. Analisis Data.....	15

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	16
4.1. Isolasi DNA dengan menggunakan metode Salting Out	16
4.2 Hasil Amplifikasi Gen <i>GDF-9</i>	17
4.3 Analisis polimorfisme gen <i>GDF-9</i> dengan Enzim <i>HaeIII</i>	19
BAB V PENUTUP.....	24
5.1 Kesimpulan.....	24
5.2 Saran.....	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN.....	30



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Sapi PO	5
Gambar 2.2. Struktur DNA <i>double helix</i>	10
Gambar 2.3. Tahapan PCR	11
Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis DNA total Sapi PO	16
Gambar 4.2 Hasil Amplifikasi Gen <i>GDF-9</i> sapi PO	18
Gambar 4.3 Hasil PCR-RFLP menggunakan Enzim <i>Hae-III</i>	19
Gambar 4.4 Zimogram pola migrasi PCR-RFLP menggunakan Enzim <i>Hae-III</i>	20



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Konsentrasi DNA Total Sapi PO (<i>Bos indicus</i>)	17
Tabel 4.2 Haplotip gen <i>GDF-9</i> pada sapi PO menggunakan enzim restriksi <i>Hae</i> -III	20
Tabel 4.3 Hubungan Haplotip gen <i>GDF-9</i> dengan Performa Reproduksi sapi PO	21

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Komposisi Bahan 30

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Keterangan
Bp	<i>Base pair</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleid acid</i>
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EDTA	<i>Etilendiamine tetraasetat</i>
EtBr	<i>Ethidium Bromide</i>
EtOH	<i>Ethanol</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GDF-9	<i>Growth Differentiation Factor 9</i>
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptiusIII</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
NaCl	<i>Natrium klorida</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PO	Peranakan Ongole
RBC	<i>Red Blood Cell</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SDS	<i>Sodium dedocyl sulfate</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris Boric Acid EDTA</i>
TE buffer	<i>Tris EDTA buffer</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
UV	Ultraviolet

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Produksi daging sapi dalam negeri belum mencukupi kebutuhan daging sapi dalam negeri. Hal ini dapat dilihat bahwa pada tahun 2013 kebutuhan daging sapi sebanyak 500.000 ton, sedangkan total pasokan dalam negeri diperkirakan 420.000 ton, sehingga untuk mengatasi kekurangan tersebut, pemerintah melakukan impor daging sapi sebesar 80.000 ribu (Ditjenak, 2013). Salah satu upaya untuk meningkatkan produksi daging sapi lokal dapat dilakukan dengan meningkatkan jumlah populasi sapi lokal. Peningkatan populasi atau produksi ternak sangat tergantung pada keberhasilan reproduksinya. Apabila reproduksi tidak teratur dengan baik maka produksi akan rendah. Efisiensi reproduksi yang rendah dipengaruhi oleh beberapa faktor internal dan eksternal yang berkaitan dengan pengelolaan reproduksi (Iskandar, 2001). Indonesia memiliki banyak jenis sapi lokal, salah satunya adalah sapi PO. Sapi PO merupakan salah satu sapi potong yang memiliki kualitas baik (Pane, 1993).

Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap kualitas reproduksi adalah ovulasi. Ovulasi diawali dengan proses folikulogenesis, yaitu proses tumbuh dan berkembangnya folikel di dalam ovarium. Proses folikulogenesis dipengaruhi oleh beberapa faktor, baik faktor hormonal maupun genetik. Faktor hormonal meliputi beberapa hormone yaitu FSH dan LH sedangkan pengaturan genetik dari proses folikulogenesis melibatkan beberapa gen, salah satunya adalah Gen *Growth Differentiation Factor (GDF-9)* (Ghaffari *et al.*, 2009).

Secara alami oosit menghasilkan suatu molekul protein yaitu *GDF-9* yang digunakan untuk pendewasaan dan pematangan oosit. *GDF-9* merupakan molekul polipeptida famili dari TGF- β *Growth Factor*. Pada proses perkembangan oosit yang normal maka *GDF-9* sangat diperlukan sampai terjadi ovulasi. *Growth Differentiation Factor* berfungsi sebagai *stimulator* pada saat perkembangan folikel primer. *GDF-9* diekspresikan pada oosit dan sel-sel granulosa dan dapat bekerja merangsang proliferasi sel granulosa serta mengatur fungsi sel kumulus sejak masa preovulasi sampai terjadinya ovulasi (Tamer and David, 2005).

Protein *GDF-9* disandi oleh gen *GDF-9*. Gen *GDF-9* terdapat pada kromosom 5 pada domba, kambing dan sapi telah berhasil dipetakan yang terdiri atas dua ekson dan satu intron. Menurut Ghaffari *et al.*, (2009) gen *GDF-9* yang terletak pada kromosom 5 bersifat superovulasi.

Menurut Bodensteiner *et al.*, (1999) gen *GDF-9* sangat penting dalam tahap folikulogenesis yang meliputi beberapa tahap antara lain yaitu pengaturan folikel awal dan pertumbuhan oosit serta proliferasi dan diferensiasi sel granulosa. Delesi ekson 2 pada gen *GDF-9* menyebabkan terjadinya penghambatan proses folikulogenesis normal pada tahap folikel primer, sehingga dapat menimbulkan infertilitas. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi *GDF-9* di dalam ovarium memiliki peran pada perkembangan folikel primer dan pertumbuhan oosit.

Beberapa mutasi pada gen *GDF-9* dilaporkan berhubungan dengan peningkatan laju tingkat ovulasi dan *litter size* pada ternak (Gilchrist *et al.*, 2005). Polimorfisme gen *GDF-9* pada domba Cambridge dan Belclare menyebabkan perubahan susunan asam amino pada daerah protein yang dikode. Sehingga menyebabkan peningkatan ovulasi pada domba heterozigot dan infertilitas pada homozigot (Hanrahan *et al.*, 2004).

Polimorfisme adalah variasi alel dari satu gen homolog dalam satu kromosom. Polimorfisme tidak hanya terjadi antar populasi tetapi juga di dalam populasi. Salah satu metode yang digunakan dalam mengidentifikasi keanekaragaman genetik adalah dengan menggunakan metode PCR-RFLP (Guan *et al.*, 2007).

Hingga saat ini penelitian mengenai polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO belum pernah diteliti, oleh karena itu penelitian mengenai polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO ini perlu dilakukan yang dihubungkan dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat polimorfisme gen (*GDF-9*) pada sapi PO?
2. Bagaimanakah hubungan polimorfisme gen (*GDF-9*) dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO?

1.1 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui polimorfisme gen (*GDF-9*) pada sapi PO
2. Mengetahui hubungan polimorfisme gen (*GDF-9*) dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah memberikan informasi adanya polimorfisme gen (*GDF-9*) pada sapi PO serta sebagai database awal untuk penelitian yang terkait pengembangan marker seleksi sapi PO berdasarkan kualitas reproduksinya.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi PO (Peranakan Ongole)

Sapi PO merupakan hasil persilangan antara sapi pejantan Sumba Ongole dengan sapi betina Jawa berwarna putih. Sapi Ongole (*Bos indicus*) sebenarnya berasal dari India, termasuk tipe sapi pekerja dan pedaging yang disebarakan di Indonesia. Warna bulu sapi Ongole adalah putih abu-abu dengan warna hitam di sekeliling mata, mempunyai gumba dan gelambir yang besar menggelayung, saat mencapai umur dewasa yang jantan mempunyai berat badan kurang dari 600 kg dan yang betina kurang dari 450 kg. Bobot hidup Sapi Peranakan Ongole (PO) bervariasi mulai 220 kg hingga mencapai sekitar 600 kg. Saat ini sapi PO yang murni mulai sulit ditemukan, karena telah banyak disilangkan dengan sapi Brahman. Sapi PO mempunyai kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap perbedaan kondisi lingkungan, memiliki tenaga yang kuat dan aktivitas reproduksi induknya cepat kembali normal setelah beranak. Keunggulan sapi PO ini antara lain : Tahan terhadap panas, pertumbuhan relatif cepat dan kualitas daging baik. Sapi PO (*Bos indicus*) mempunyai sifat yang kurang baik dalam hal reproduksi dan kecepatan pertumbuhannya, tetapi sifat menyusui terhadap anaknya sangat bagus (Pane, 1993).

Populasi sapi potong di Indonesia pada tahun 1991 adalah sekitar 10 juta ekor, dari jumlah tersebut sekitar 4,6 juta ekor (46%) adalah sapi PO. Berdasarkan jumlah total sapi PO yang ada, sekitar 80% populasinya berada di Jawa Timur. Sementara itu, pada tahun 2001 diperkirakan jumlah sapi potong di Indonesia adalah 11,1 juta ekor, yang terdiri dari 5,4 juta ekor sapi asli dan sapi lokal serta 5,7 juta ekor dari sapi persilangan dengan sapi impor (Ditjenak, 2006). Hasil Pendataan Sapi Potong pada tahun 2011 mendata populasi sapi PO adalah 29,4% dari populasi sapi potong nasional, yang berarti populasi sapi PO tersebut telah mengalami penurunan sebesar 36% selama kurun waktu 20 tahun.

Peningkatan populasi ternak di Indonesia salah satunya dapat diupayakan dengan meningkatkan angka kelahiran pada ternak. Laju peningkatan populasi ternak akan menjadi cepat apabila efisiensi

reproduksinya lebih baik dan rendahnya angka gangguan reproduksi (Harjopranjoto, 1992).



Gambar 2.1 Sapi PO
(Dompi, 2012)

2.2 *GDF-9 (Growth Differentiation Factor 9)*

GDF-9 merupakan molekul polipeptida famili dari $TGF-\beta$ *Growth Factor* yang berperan dalam proses pendewasaan dan pematangan oosit. Pada proses perkembangan oosit yang normal maka *GDF-9* sangat diperlukan sampai terjadi ovulasi. (*GDF-9*) berfungsi sebagai *stimulator* pada saat perkembangan folikel primer. *GDF-9* diekspresikan pada oosit dan sel-sel granulosa dan dapat bekerja merangsang proliferasi sel granulosa serta mengatur fungsi sel kumulus sejak masa preovulasi sampai terjadinya ovulasi (Tamer and David, 2005).

Bodensteiner *et al.*, (2000) *GDF-9* memiliki peran penting dalam proses folikulogenesis. Hal ini dibuktikan dengan meningkatnya jumlah ekspresi protein *GDF-9* pada tahap folikel primer (Dong *et al.*, 1996). Folikulogenesis adalah tahapan perkembangan folikel dalam ovarium yang berakhir dengan ditandai terjadinya proses ovulasi, yang menghasilkan ovum yang siap untuk tahapan fertilisasi. Setiap tahapan reproduksi (oogenesis, folikulogenesis dan maturasi oosit) ternak terkait oleh pengaturan gen (Gwatkin, 1993).

Jumlah anak yang dilahirkan oleh seekor ternak sangat tergantung dari jumlah sel telur yang diovulasikan setiap siklusnya dan berkaitan dengan sekresi hormon *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) pada saat folikulogenesis (Campbell *et al.*,

1995). *GDF-9* dapat bekerja sinergis seperti FSH yang penting untuk perkembangan oosit dan reproduksi betina secara normal (Sophie *et al.*, 2004).

Growth Factor merupakan faktor lokal yang berperan dalam peningkatan proliferasi dan differensiasi sel granulosa, sehingga menyebabkan terjadinya ekspansi kumulus (Widjiati dkk., 2008). *Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9)* merupakan salah satu *growth factor* yang mempengaruhi berbagai fungsi sel ovarium termasuk sintesis DNA pada sel granulosa (Vitt *et al.*, 2000). *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 pada ovarium. (Mazerbourg *et al.*, 2003).

Penelitian McPherron *et al.*, (1993) melaporkan bahwa *GDF-9* diekspresikan secara eksklusif di dalam ovarium. Penelitian yang dilakukan oleh Bodensteiner *et al.*, (1999) dan Juengel *et al.*, (2002) pada domba serta penelitian oleh Biase *et al.*, (2012) pada sapi, mengatakan bahwa *GDF-9* berperan penting di dalam proses folikulogenesis. *GDF-9* telah terbukti penting untuk pertumbuhan folikel normal dan dapat membantu proses ovulasi (Juengel *et al.*, 2004). *GDF-9* mengatur jumlah folikel yang berovulasi pada domba dan mamalia lain yang memiliki tingkat ovulasi rendah (Juengel *et al.*, 2002). Pada tikus, *GDF-9* penting untuk perkembangan folikel normal, ditunjukkan dengan meningkatnya jumlah ekspresi protein *GDF-9* pada tahap folikel primer (Dong *et al.*, 1996).

Elvin *et al.*, (1999) menyatakan bahwa dengan penambahan *GDF-9* ke dalam media maturasi *in vitro* dapat memperbesar ukuran sel kumulus. *GDF-9* dapat berikatan dengan reseptor sel kumulus untuk meningkatkan sintesis progesteron meskipun tanpa pemberian FSH. Sehingga *GDF-9* dapat bekerja sinergis seperti FSH yang penting untuk perkembangan oosit secara normal. Sekresi *GDF-9* dari oosit mendorong sintesis androgen dan progesteron di dalam sel teka (Sophie *et al.*, 2004).

Gen *GDF-9* terletak pada kromosom autosomal, yakni kromosom 5 dan terdiri atas 2 exon dan 1 intron dengan panjang sekitar 5644 bp. Gen *GDF-9* berfungsi sebagai stimulus perkembangan folikel primer (Bodensteiner *et al.*, 1999). *GDF-9* memacu survival dan pertumbuhan folikel selama transisi dari periode pre-antral ke awal

antral dengan menekan apoptosis sel granulosa (Bodensteiner *et al.*, 2000)

Gen *GDF-9* dapat dijadikan sebagai gen kandidat yang dapat meningkatkan *litter size* (angka kelahiran) pada domba (Ghaffari *et al.*, 2009). Pada penelitian Hanrahan *et al.* (2004), mutasi gen *GDF-9* pada domba Belclare dan Cambridge menyebabkan peningkatan ovulasi pada organisme heterozigot dan infertilitas pada organisme homozigot. Hasil tersebut sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Nicol *et al.*, (2009) bahwa mutasi *GDF-9* memiliki efek besar pada produksi *GDF-9*. Sehingga mutasi gen *GDF-9* pada domba homozigot menyebabkan perkembangan folikel tidak sempurna.

Gilchrist *et al.*, (2005) melaporkan bahwa beberapa mutasi pada gen *GDF-9* berhubungan dengan peningkatan laju tingkat ovulasi dan *litter size* pada ternak. Gen *GDF-9* ini diekspresikan pada oosit dan sel-sel granulosa ovarium sejak tahap folikel primer sampai oosit diovulasikan. Delesi gen *GDF-9* pada ovarium tikus menunjukkan penghentian perkembangan pada stadium folikel primer, ditandai dengan gagalnya pembentukan lapisan sel teka pada folikel awal. Pengamatan ini memunculkan kemungkinan bahwa gen *GDF-9* juga menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel teka (Boni *et al.*, 2002). Delesi gen *GDF-9* pada oosit menyebabkan berkurangnya proliferasi sel granulosa, serta menyebabkan pertumbuhan oosit abnormal, dan kegagalan folikel untuk tumbuh melewati stadium primer (Orisaka *et al.*, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Batubara (2011) mengenai studi keragaman fenotipik dan genetik pada beberapa sub populasi kambing lokal di Indonesia, menunjukkan bahwa terdapat mutasi gen *GDF-9* di ruas promotor pada empat sub populasi kambing lokal yang bervariasi. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa ada tidaknya polimorfisme nukleotida gen-gen fekunditas pada kambing, masih sangat bervariasi antar rumpun-rumpun kambing dan hubungan gen tersebut dengan pengaturan tingkat proliferasi pada induk kambing. Adanya temuan alel-alel mutasi gen *GDF-9* di ruas promotor pada Kambing Kacang dan PE ini dapat digunakan sebagai salah satu parameter atau metode dalam upaya seleksi calon induk bibit kambing yang prolifrik untuk meningkatkan produktivitas dan efisiensi pemeliharaan ternak kambing (Batubara, 2011).

2.3 Performa Reproduksi Ternak

Menurut Toelihere, (1994) reproduksi adalah suatu fungsi tubuh yang secara fisiologis tidak vital bagi kehidupan suatu individu namun penting bagi kelanjutan keturunan suatu jenis atau bangsa hewan. Proses reproduksi dapat berlangsung setelah hewan mencapai masa pubertas. Salah satu faktor keberhasilan proses reproduksi pada suatu individu khususnya betina, terletak pada proses ovulasi dan estrus pada suatu individu tersebut (Bearden dan Fuquay, 1980). Beberapa parameter yang umum digunakan untuk menilai efisiensi atau performa reproduksi pada sapi antara lain adalah (*conception rate*), (*service per conception*) dan (*calving interval*) (Salisbury dan Vandemark 1985). Selain itu dapat dilihat dari tingkat produktivitasnya yang meliputi berat lahir, *litter size* dan pertambahan berat badan harian (Sutama, 1998).

Angka dari persentase sapi betina yang bunting pada inseminasi pertama disebut nilai *conception rate* (CR) atau angka konsepsi yang ditentukan berdasarkan hasil diagnosa kebuntingan dalam waktu 45 – 60 hari sesudah inseminasi. Nilai S/C diperoleh dari banyaknya servis atau pelayanan IB dibagi dengan jumlah sapi yang bunting. *Calving Interval* (CI) adalah jarak antara dua kelahiran berurutan yang dihitung dengan menjumlahkan lama kebuntingan dan jarak dari melahirkan sampai terjadi konsepsi kembali. Jarak optimum untuk CI sapi adalah 12 bulan (Partodihardjo 1987). Parameter reproduksi antara lain yaitu jumlah anak, kemampuan beranak, umur reproduksi, waktu reproduksi dan juga informasi data reproduksi seperti penggunaan pejantan dalam inseminasi buatan (IB) dan tanggal melahirkan (Aryogi, 2005).

Performa reproduksi sapi dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain yaitu faktor genetik, makanan dan lingkungan. Faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi performa reproduksi sapi PO adalah suhu dan kelembaban. Menurut Jaiunadeen dan Hafez (2000), lama kebuntingan dipengaruhi oleh bangsa sapi, jenis kelamin dan jumlah anak yang dikandung, umur induk, musim dan letak geografis.

2.4 Polimorfisme

Polimorfisme merupakan tampilan berbagai macam alel dari satu gen yang homolog dalam satu kromosom. Hal ini merupakan salah

satu penyebab terjadinya perbedaan struktur genetik suatu populasi karena terjadi perubahan sekuen DNA pada suatu individu dalam suatu populasi (Odeh, 2003).

Bidang genetik sangat membutuhkan peran dari polimorfisme, yaitu sebagai penanda genetik pemuliaan ternak. Hal ini didukung oleh beberapa studi yang telah dilakukan, yaitu studi yang lebih terfokus pada hubungan antara variasi genetik dan sifat produksi serta efisiensi reproduksi dan kualitas reproduksi (Chung *et al.*, 1998). Variasi genetik juga dapat dikatakan sebagai keadaan yang mana lebih dari satu alel terdapat pada satu lokus gen yang sebagian besar terjadi akibat adanya mutasi pada gen atau alel tertentu. Alel yang mengalami mutasi, mengkode satu protein yang mempunyai aktivitas lain (Romaino, 2009).

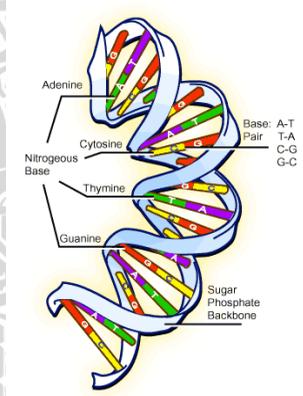
Polimorfisme tidak selalu terjadi pada satu titik. Pada ekson, polimorfisme dapat menghasilkan perubahan dalam urutan asam amino suatu protein yang disandi oleh gen itu, akibatnya dapat mengubah fungsi protein itu. Salah satu metode untuk mengidentifikasi daerah polimorfisme pada suatu DNA, yaitu melakukan pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi. Metode tersebut adalah *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Enzim yang digunakan bersifat spesifik, sehingga hanya akan memotong situs tertentu yang dikenali oleh enzim tersebut. Proses ini menyebabkan terbentuknya fragmen-fragmen DNA yang berbeda ukuran dari satu organisme ke organisme lainnya. Akibatnya ukuran fragmen hasil pemotongan akan berubah. Sehingga tidak ada individu identik karena pada dasarnya setiap orang membawa sejumlah polimorfisme DNA masing-masing, kecuali pada sepasang kembar satu telur. Oleh karena itu polimorfisme menjadi penting di bidang genetika dan molekuler. *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) merupakan teknik yang dapat menentukan dengan mudah bahwa organisme tersebut termasuk ke dalam homozigot atau heterozigot (Weaver, 2000).

Dalam analisa RFLP, dapat digunakan berbagai macam enzim restriksi. Ada beberapa jenis enzim restriksi yang digunakan untuk memotong urutan DNA. Salah satunya adalah enzim restriksi *HaeIII*. 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 yang tumpul karena pemotongannya bersifat simetris (Becker *et al.*, 2000).

2.5 DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

Setiap organisme mewarisi gen dari orang tuanya. Karena DNA direplikasi dari setiap generasi, setiap urutan yang diberikan dapat diturunkan ke generasi berikutnya. *Deoxyribose Nucleic Acid* merupakan suatu makromolekul beruntai ganda dan berbentuk heliks dengan basa yang menonjol ke bagian dalam molekul tersebut. Molekul DNA tersusun atas dua rantai nukleotida dan membentuk double heliks. Ikatan gula-phospat berada di bagian luar heliks dan basa berada diantara dua rantai gula-basa. Ikatan Nitrogen menggabungkan basa tersebut dan mempertahankan struktur *double heliks* (Albert dkk, 1994). Beberapa komponen penyusun DNA yaitu gula pentose (deoksiribosa), gugus fosfat dan pasangan basa nitrogen. Basa nitrogen pada DNA diantaranya adalah basa purin yang terdiri dari adenine (A) dan guanine (G) serta basa pirimidin yang terdiri dari cytosine (C), thymine (T) (Lodish,dkk., 2000).



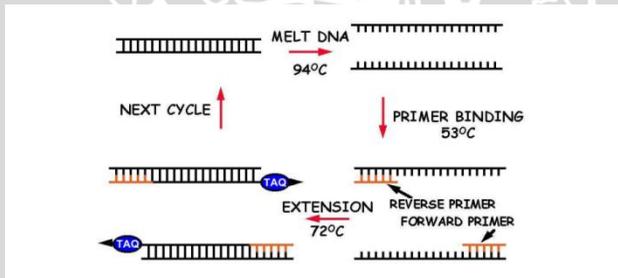
Gambar 2. 2 Struktur DNA *double helix* (Secko, 2003)

Deoxyribose Nucleic Acid diperoleh dari semua sel maupun jaringan yang memiliki nukleus. Metode untuk mendapatkan DNA murni yaitu dengan mengisolasi dari sel. Salah satunya yaitu dari sel darah (Lodish,dkk., 2000). Setelah DNA diisolasi dari darah, hasil dari isolasi DNA tersebut kemudian akan diuji menggunakan uji kualitatif dan uji kuantitatif. Uji kualitatif menggunakan

elektroforesis gel agarosa yang bertujuan untuk mengetahui keberadaan DNA hasil isolasi. Visualisasi DNA selanjutnya dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dahulu gel dalam pembuatannya ditambahkan larutan etidium bromid (Clark, 2005). Sedangkan uji kuantitatif dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm yang bertujuan untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA atau RNA (Fatchiyah, dkk., 2011).

DNA dapat diperbanyak menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Teknik PCR ini merupakan teknik pembuat salinan DNA secara *in vitro*. Komponen PCR yang dibutuhkan adalah DNA template, primer, dNTP (*deoxynucleoside triphosphate*), buffer, Taq DNA Polymerase dan PCR Thermal Cycler (Chiappini dkk, 2005).

Terdapat tiga tahap utama di dalam setiap siklusnya PCR, yaitu : *Denaturasi* pada suhu tinggi, yang menyebabkan double stranded DNA membuka menjadi single stranded DNA, *Annealing* yaitu proses pengenalan primer menuju daerah yang spesifik, dimana daerah tersebut memiliki komplemen dengan primernya dan *Extension* yaitu proses pemanjangan untai baru DNA pada suhu 72°C. Primer yang telah menempel akan mengalami perpanjangan dari ujung -5' menuju ujung -3' dari untai tunggal DNA (Fatchiyah dkk, 2011).



Gambar 2.3 Tahapan PCR (Griffith dkk, 1996)

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2012 sampai April 2013 di kota Pasuruan, Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler dan Laboratorium Fisiologi Kultur Jaringan dan Mikroteknik, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel darah 10 ekor sapi PO diambil secara acak di kota Pasuruan. Pengambilan sampel darah dilakukan pada bagian ekor sapi dengan menggunakan *tabung vacutainer* yang sudah berisi EDTA. Sampel disimpan pada suhu -20°C .

3.2.2 Pengambilan Data Performans Reproduksi

Pengambilan data performa reproduksi yaitu dilakukan dengan melakukan pendataan masing-masing sapi berdasarkan data inseminasi buatan yang pernah dilakukan. Data performa reproduksi pada diperoleh berdasarkan data inseminasi buatan atau nilai S/C (*service per conception*) pada masing-masing sampel sapi PO.

3.2.3 Isolasi DNA

Darah diambil sebanyak 500 μL ditambah 1 ml *RBC lysis solution* 1x dan di vortek dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Larutan disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit dalam suhu ruangan, lalu supernatan dibuang. Prosedur tersebut dilakukan sampai pelet berwarna putih. Setelah pelet berwarna putih, dipindahkan ke tabung *ependorf* kemudian ditambah dengan 750 μL *cell lysis solution* dan 20 μL SDS 10%, lalu divortex. Setelah itu sampel darah diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Larutan yang telah homogen kemudian ditambah 500 μL *protein precipitation*, kemudian divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit.

Supernatan yang telah diperoleh dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf steril dan ditambah Ethanol absolute sebanyak 2,5 kali

volume supernatant atau sampai leher tabung. Lalu disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Selanjutnya supernatan dibuang dan pelet ditambahkan Ethanol 70% sebanyak 500 µL, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan dalam incubator suhu 55 °C selama 10 menit. Selanjutnya DNA ditambahkan 20 µL *TE buffer* pH 7,6 Kemudian hasilnya disimpan pada suhu -20°C (*freezer*).

3.2.4 Uji Kuantitatif DNA dengan Spektrofotometri

Pada uji ini dilakukan dilakukan kalibrasi pada $\lambda 260$ nm dan $\lambda 280$ nm pada spektrofotometri menggunakan larutan blanko yang berisi 1000 µL *TE Buffer*. 998 µL *TE Buffer* dimasukkan dalam tabung *ependorf*, ditambah dengan 2 µL larutan DNA, lalu dihomogenkan dengan cara divortek. Setelah itu dimasukkan dalam kuvet untuk dihitung absorbansinya. Sehingga kemurnian DNA dapat dihitung dengan nilai perbandingan absorbansi $\lambda 260$ nm / $\lambda 280$ nm. Rumus untuk menentukan konsentrasi DNA :

$$[\text{DNA}] = \text{Å}260 \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan :

[DNA] = Konsentrasi DNA (µg/mL)

Å260 = Nilai absorbansi pada λ 260 nm

50 = larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 ug untai ganda DNA per mL

3.2.5 Uji Kualitatif Gel Agarose

Uji kualitatif menggunakan gel agarose 1%. Gel dimasukkan kedalam chamber dan dituang TBE buffer hingga gel tenggelam. Lalu 2 µL DNA dan 1 µL loading dye dicampur dan di masukkan pada masing-masing smuran. Kemudian elektroforesis dilakukan pada 100 v, selama \pm 20 menit. Hasil yang diperoleh diamati menggunakan UV-transluminator kemudian dilakukan dokumentasi.

3.2.6 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Pasangan primer yang digunakan untuk reaksi PCR gen *GDF 9* yang digunakan dalam penelitian ini mengacu kepada penelitian Biase *et al.*, (2012), yaitu sebagai berikut:

Forward primer (5' GCCCACCCACACACCTAAAGTTTA 3')

Reverse primer (5' GCACACCAACAGCTGAAAGAGGTA 3').

Pertama yaitu dilakukan *spindown* pada semua larutan, yaitu ddH₂O 8 µl, PCR mix 10 µl, primer forward dan reverse 0,5 µl (100 pmol). Penelitian ini menggunakan 1 µl DNA karena konsentrasi DNA yang didapat sangat rendah. Semua campuran PCR dipipetting lalu di *spindown* dengan kecepatan 3000rpm pada suhu ruang. Setelah itu dimasukkan pada *thermal cycler*. 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 ekstensi akhir 72°C, 10 menit. Setelah itu hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 1,5%, 100 v selama ± 20 menit.

3.2.7 Pemotongan hasil PCR dengan enzim restriksi

Analisis variasi gen *GDF-9* dengan menggunakan metode PCR-RFLP. Pemotongan hasil amplifikasi menggunakan enzim restriksi *HaeIII* yang mengacu pada *Bos taurus*. Simulasi pemotongan DNA hasil PCR gen *GDF-9* menggunakan website *nebcutter V 02*.

Sampel DNA hasil PCR dimasukkan *thinwall* sebanyak 2 µl kemudian ditambah 1 µl buffer enzim 10x, 1 µl (10 unit) enzim restriksi *HaeIII* dan 6 µl ddH₂O. Campuran larutan dihomogenisasi dengan cara *mix gentle*. kemudian diinkubasi selama 3 jam pada temperatur 37°C. lalu di stop reaksi dengan inkubasi pada temperature 70°C selama 10 menit dan disimpan pada suhu -20°C. Penelitian ini menggunakan enzim restriksi *HaeIII* untuk memotong sekuen spesifik DNA pada basa GG*CC.

3.2.8 Elektrofesis Gel Poliakrilamida 10% Hasil RFLP

Elektrofesis menggunakan gel poliakrilamida 10%. Membuat Gel Poliakrilamida 10% yaitu dengan mencampurkan beberapa bahan yang terdiri dari 4,617 ml ddH₂O, 2,833 ml poliakrilamida, 0,85 ml TBE 10x, 1,95 µl APS dan 5 µl TEMED. Setelah itu

campuran bahan gel tersebut diletakkan diantara dua *buffer chamber* sebagai sarana untuk menghubungkan kutub negatif dan kutub positif. Kemudian tuang running buffer hingga bagian atas dan bawah gel terendam. Masukkan sampel sebanyak 5 μ l dengan ditambah *loading dye* 2 μ l pada masing – masing sumuran. Kemudian perangkat elektroforesis dihubungkan dengan sumber listrik dengan voltase 100 V hingga *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Setelah selesai, running buffer dituang dan ambil gel dari plate. Kemudian dilanjutkan dengan proses pewarnaan menggunakan perak nitrat. Gel direndam dalam larutan fiksasi selama 20 menit dengan di *shaker*. Larutan fiksasi dituang dan gel dicuci dengan aquades selama 5 menit sebanyak 3 kali. Aquades dituang, gel direndam dalam larutan perak nitrat. Gel dicuci dengan aquades. Lalu gel direndam dalam larutan developing selama 1-3 menit (hingga nampak pita-pita DNA). Gel dicuci dengan aquades. Setelah itu gel diamati dengan cara scanning.

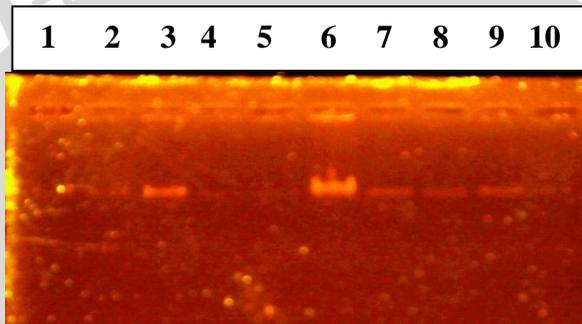
3.2.9 Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara deskriptif dengan cara mengamati pita-pita DNA hasil PCR-RFLP yang telah dilakukan dan dikorelasikan dengan keberhasilan inseminasi buatan Sapi PO.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi DNA dengan menggunakan metode Salting Out

Berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada gambar 4.1, diketahui bahwa DNA pada semua sampel telah berhasil diisolasi menggunakan metode salting out. Hal ini ditunjukkan dengan munculnya pita-pita DNA pada setiap sampel yang telah di amati dengan menggunakan uji kualitatif melalui dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% (gambar 4.1)



Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis DNA total Sapi PO (*Bos Indicus*)
1-10 : DNA total sapi PO

Isolasi DNA meliputi tiga tahapan utama, yaitu menghancurkan membran sel, disosiasi protein sel dan pemisahan DNA dari kontaminan atau komponen sel lain yang tidak diinginkan (Fatchiyah dkk, 2011). Berdasarkan hasil uji kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% pada DNA total sapi PO diatas dapat diketahui bahwa terdapat fragmen-fragmen pita DNA pada masing-masing sumuran. Pita DNA pada sampel nomer 3 dan 6 terlihat lebih tebal dibanding sampel lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa sampel 3 dan 6 memiliki konsentrasi DNA yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel lainnya. Tebal tipisnya fragmen DNA dipengaruhi oleh tinggi dan rendahnya konsentrasi DNA. Semakin tinggi konsentrasi DNA, maka pita yang terbentuk pada gel agarosa akan semakin tebal dan akan nampak lebih jelas pada visualisasi melalui penyinaran UV (Clark, 2005).

Berdasarkan hasil uji kuantitatif yang telah dilakukan, diketahui bahwa konsentrasi DNA total tertinggi terdapat pada sampel nomer 2 dengan nilai 1875 µg/mL dan konsentrasi DNA terendah terdapat pada sampel nomer 4 dan 7 dengan nilai 350 µg/mL (Tabel 1). Adanya perbedaan konsentrasi DNA pada setiap sampel yang dihasilkan, kemungkinan disebabkan karena jumlah sel yang mengalami kerusakan selama penyimpanan berbeda.

Tabel 1. Konsentrasi DNA Total Sapi PO (*Bos indicus*)
Hasil uji kuantitatif menggunakan spektrofotometri

Sampel	Konsentrasi (µg/ml)
1	1125
2	1875
3	950
4	350
5	450
6	675
7	350
8	650
9	450
10	400

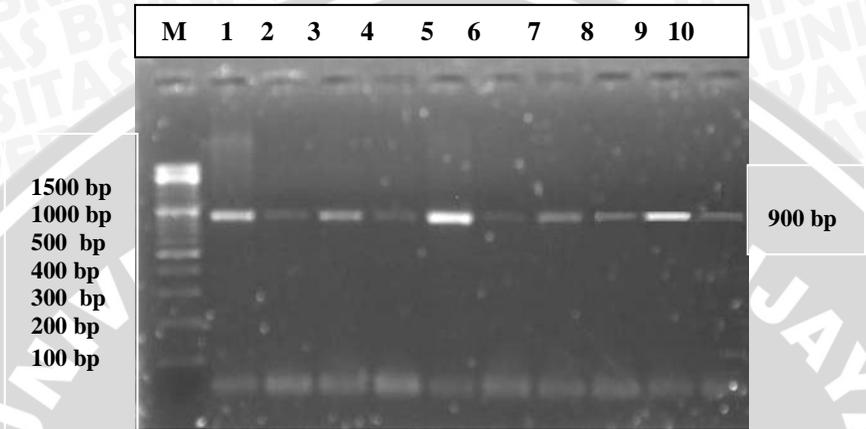
Konsentrasi DNA digunakan untuk mengetahui seberapa besar volume DNA yang akan digunakan untuk proses amplifikasi. Karena jumlah konsentrasi template DNA akan mempengaruhi proses dan hasil amplifikasi (PCR). Template DNA merupakan salah satu komponen dari proses PCR (Fatchiyah dkk, 2011)

4.2 Hasil Amplifikasi Gen *GDF-9*

Hasil Amplifikasi gen *GDF-9* melalui teknik PCR pada 10 sampel sapi PO diperoleh 1 pita DNA yang spesifik dengan ukuran ± 900 bp (gambar 4.2), terbentuknya satu pita spesifik, menunjukkan bahwa primer yang digunakan tersebut spesifik untuk gen *GDF-9* sapi PO.

Pita DNA non target yang berukuran dibawah 100 bp. Kemungkinan adalah sejenis pengotor PCR dikarenakan primer oligonukleotida yang tidak digunakan pada saat proses PCR. Proses

amplifikasi dapat terganggu jika terdapat residu dNTPs yang bergabung dengan residu DNA polimerase (Chou *et al*, 1992).



Gambar 4.2. Hasil Amplifikasi Gen *GDF-9* sapi PO
M: DNA ladder 10000 bp.1-10: fragmen gen *GDF-9* hasil amplifikasi

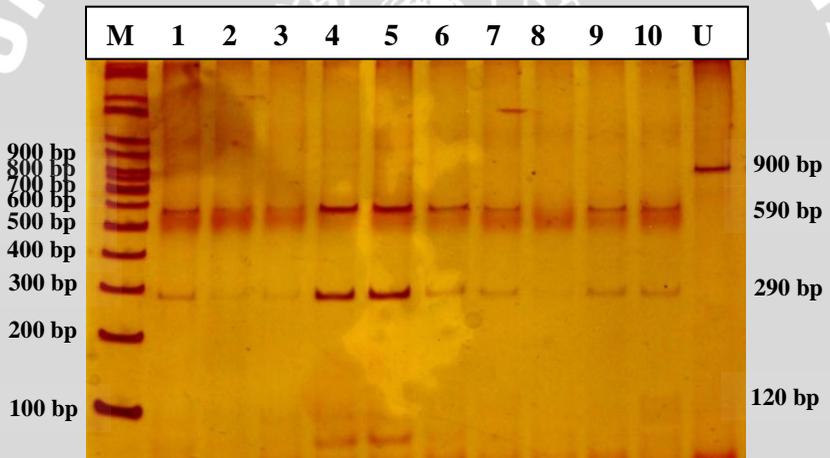
Primer memiliki peran penting dalam proses PCR, karena primer merupakan inisiator pada sintesis DNA target. Selain primer, beberapa faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan proses PCR juga harus diperhatikan, yaitu pengaturan suhu dan jumlah siklus yang digunakan. Penggunaan harus sesuai dengan aturan yang berlaku, sehingga hasil yang didapat benar-benar optimal dan DNA pun dapat teramplifikasi dengan baik (Fatchiyah dkk, 2011).

Perancangan primer dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database GenBank*. Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Konsentrasi primer yang terlalu rendah akan menghasilkan produk PCR yang rendah, sedangkan konsentrasi primer yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penempelan primer pada sekuen template DNA yang tidak spesifik (Muladno, 2002).

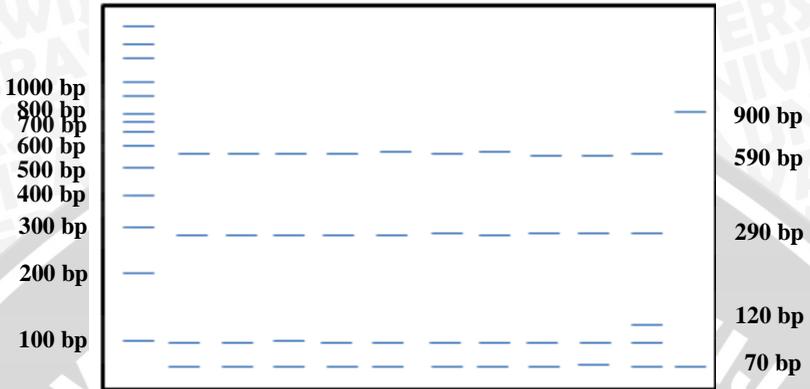
4.3 Analisis polimorfisme gen *GDF-9* dengan enzim *Hae-III*

Untuk melihat adanya polimorfisme pada gen *GDF-9* sapi PO, maka dilakukan PCR-RFLP dengan menggunakan enzim *HaeIII*, yang hasilnya ditunjukkan pada gambar 4.3, 4.4 dan tabel 2.

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 4.3, 4.4 dan Tabel 2). Pada sampel nomer 1-10 nampak bahwa semua DNA hasil amplifikasi terpotong oleh enzim *HaeIII*. Haplotip 1 terpotong dengan 4 ukuran fragmen DNA 70 bp, 100 bp, 290 bp dan 590 bp. Haplotip 2 terpotong dengan ukuran 5 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 4.3 Hasil PCR-RFLP menggunakan Enzim *HaeIII*
M: DNA ladder 10000 bp. 1-10 : DNA hasil PCR-RFLP. U: uncut



Gambar 4.4 Zimogram pola migrasi PCR-RFLP menggunakan Enzim *Hae-III*

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 (Becker, dkk., 2000)

Tabel 2. 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 dan 590 bp	10

Beberapa penelitian mengenai polimorfisme gen *GDF-9* juga pernah dilakukan pada hewan lain, seperti penelitian pada mencit yang dilakukan oleh McGrath *et al.*, (1995) dan penelitian pada domba yang dilakukan oleh Bodensteiner *et al.*, (1999). Penelitian

Dong *et al.*, (1996), 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 folikulogenesis. Pada penelitian Ghaffari *et al.*, (2009), diketahui bahwa Gen *GDF-9* dapat dijadikan sebagai gen kandidat yang memungkinkan untuk meningkatkan *litter size* (angka kelahiran) pada domba.

Polimorfisme gen terjadi karena adanya perubahan susunan nukleotida pada suatu gen. Perubahan susunan nukleotida tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain yaitu perkawinan, mutasi dan seleksi alam maupun buatan. Terjadinya perubahan susunan nukleotida tersebut juga sangat berpengaruh terhadap perubahan fenotip suatu organisme (Frankham *et al.*, 2002).

Terjadinya polimorfisme pada suatu gen, menandakan adanya perbedaan sekuen DNA pada hewan dengan spesies yang berbeda maupun sama. Munculnya perbedaan sekuen DNA tersebut dapat disebabkan oleh peristiwa delesi, insersi, rekombinasi, perkawinan acak yang rendah dan seleksi dalam populasi tersebut (Schleif, 1993). Pada penelitian Hanrahan *et al.*, (2004) adanya mutasi gen *GDF-9* menyebabkan peningkatan pertumbuhan oosit pada domba heterozigot dan menyebabkan infertil pada domba homozigot karena perkembangan folikel yang tidak sempurna.

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 3).

Tabel 3. Hubungan Haplotip gen *GDF-9* dengan Keberhasilan Inseminasi Buatan sapi PO

No Sampel	Haplotip	Keberhasilan Inseminasi Buatan
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 keberhasilan inseminasi buatan diperoleh berdasarkan data atau nilai S/C (service per conception) pada masing-masing sampel sapi PO. Berdasarkan tabel 2 terdapat dua sampel Sapi PO yang memiliki performa reproduksi kurang baik ditunjukkan dengan data keterangan tidak bunting dan delapan sapi PO memiliki performa reproduksi baik yang ditunjukkan dengan data keterangan 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.

Berdasarkan hasil tersebut, diketahui bahwa terdapat variasi pita DNA yang ditunjukkan dengan adanya ukuran 120 bp pada haplotip dua. Sehingga terbentuk polimorfisme gen *GDF-9* pada sapi PO. Polimorfisme pada sapi PO ternyata tidak memiliki hubungan dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO. Performa reproduksi sapi akan dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain yaitu faktor genetik, dan untuk mempermudah mengetahui kualitas sapi baik secara morfologi maupun fisiologi mulai dari kecil, diperlukan peran beberapa gen reproduksi lain (Aryogi, 2005).

Penelitian yang dilakukan oleh Bodensteiner *et al.*, (1999) pada domba dan penelitian oleh Juengel *et al.*, (2002) pada sapi, menunjukkan bahwa *GDF-9* terdeteksi lebih awal pada tahap folikel primordial. Selain pada sapi dan domba, *GDF-9* ternyata juga diekspresikan di dalam ovarium tikus (McGrath *et al.*, 1995). Pada tikus, *GDF-9* sangat penting untuk perkembangan folikel normal dan kemungkinan terlibat dalam pengembangan sel kumulus Dong *et al.*, (1996). Penelitian Hanrahan *et al.*, (2004), pada domba Cambridge

dan Belclare melaporkan bahwa terdapat polimorfisme gen *GDF-9* pada domba Cambridge dan Belclare yang menyebabkan adanya perubahan susunan asam amino pada daerah protein yang dikode. Sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan ovulasi pada heterozigot dan infertilitas pada homozigot.

Menurut Bodensteiner *et al.*, (1999) 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. 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 (Batubara, 2011).

Keanekaragaman genetika dapat terjadi karena adanya perubahan basa nukleotida penyusun DNA. Perubahan ini mungkin dapat mempengaruhi fenotipe suatu organisme yang dapat diketahui dengan mata telanjang atau mempengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu. Secara umum keanekaragaman genetik dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain (Romano, 2009).



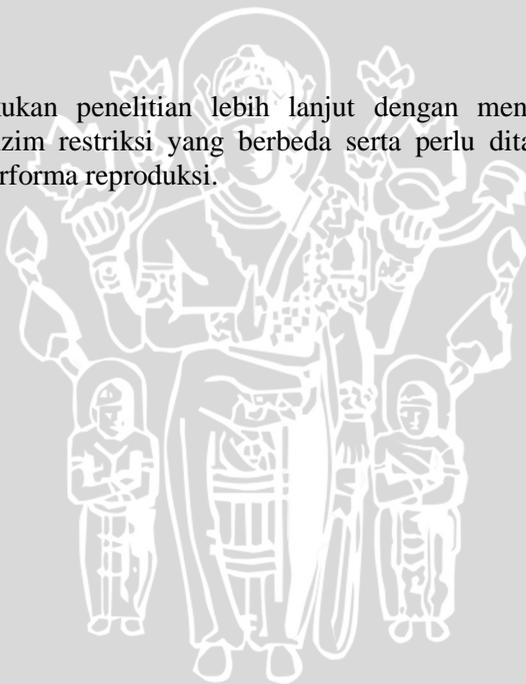
BAB V PENUTUP

5.1 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 berhubungan dengan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi PO.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan primer dan enzim restriksi yang berbeda serta perlu ditambahkan data fenotip performa reproduksi.



DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson. 1994. **Molecular biology Of The Cell**. Third Edition. Garland Publishing. New York
- Aryogi. 2005. **Kemungkinan Timbulnya Interaksi Genetik dan Ketinggian Lokasi Terhadap Performan Sapi Potong Silangan Peranakan Ongole di Jawa Timur**. Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Tesis S2.
- Batubara, A. 2011. **Studi keragaman fenotipik dan genetik pada beberapa sub populasi kambing lokal di Indonesia**. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. Disertasi.
- Bearden, H.J. dan J.W. Fuquay. 1980. Applied Animal Reproduction. *Reston Publishing Company Inc., A Prentice Hall Company*, Reston.
- Becker, W.M and L.J. Kleinsonth. 2000. The World of The Cell fourth edition. *The Benjamins Cummings Publishing Company*. New York.
- Biase W.K.F.S, F.H. Biase, J. Buratini Jr, 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*. 134 : 141– 149.
- Bodensteiner, K.J., Clay, C.M., Moeller, C.L. & Sawyer, H.R., 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.
- Bodensteiner, K.J., McNatty K.P., Clay, C.M., Moeller, C.L. & Sawyer, H.R. 2000. Expression of Growth and Differentiation Factor-9 in the Ovaries of Fetal Sheep Homozygous or Heterozygous for the Inverdale Prolificacy Gene (FecXI)¹. *Biol. Reprod.* 62: 1479–1485.
- Boni, R and A. Cuomo. 2002. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biol. Reprod.* 66 (3): 836-42.

- Campbell, B.K., R.J. Scaramuzzi, and R. Webb. 1995. The control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49:335-350.
- Chou, Q., Marion R.B., David E., Jonathan R., Will B. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20 (7): 1717-23.
- Chung, E.R., W.T. Kim and C.S Lee. 1998. DNA polymorphism of casein, lactoglobulin, growth hormone and prolactin genes in Korean Cattle. *J. Dairy Sci.* 11: 422-427.
- Clark, D.P. 2005. Molecular Biology Understanding The Genetic Revolution. *Elsevier, Inc.* China. Halaman 51-591.
- DITJENNAK. 2006. Statistik Peternakan. Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Jakarta.
- DITJENNAK. 2013. Statistik Peternakan. Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Jakarta.
- Dompi. 2012. Sapi PO Peranakan Ongole. [http://dompi.co.id/ dompi/ galeri/ besar/sapi-po-peranakan-ongole1.jpg](http://dompi.co.id/dompi/galeri/besar/sapi-po-peranakan-ongole1.jpg). Tanggal Akses 16 Januari 2013.
- Dong, J.W., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N. & Matzuk, M.M., 1996. Growth differentiation factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 383: 531-535.
- Elvin J.A., Clark A.T., Wang P., Wolfman N.M., and Matzuk M.M. 1999. Paracrine actions of Growth Differentiation Factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13: 1035-1048.
- Fatchiyah, Arumingtyas E.L., Widyarti, S., dan Rahayu, S. 2011. **Prinsip Dasar Analisis Biologi Molekuler.** Erlangga. Jakarta
- Frankham, R., J.D. Ballou dan D.A. Briscoe. 2002. **Introduction to conservation genetics.** Cambridge University Press. 100-105p.
- Ghaffari M, A. N Javaremi dan 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* 2009, 39 (4).
- Gilchrist RB, Ritter RJ, Armstrong DT. 2005. Oocyte-somatic cell interaction during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 82:341-377.

- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart. 1996. **An introduction to genetic analysis (6th edn.)**. W.H. Freeman Company. New York.
- Guan, F., Shou-ren, L., Shi, G-Q. & Yang, L-G., 2007. Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 44-52.
- Gwatkin. R.B.L. 1993. **Gene In Mammalian Reproduction**. Wiley-Lissa Publication. Ohio.
- Hanrahan. J.P, Gregan. S.M, Mulsant. P, Mullen. M, Davis. G.H, Powell. R, and Galloway. S.M. 2004. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors *GDF-9* and *BMP15* Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology Of Reproduction* 70:900–909.
- Hardjopranyoto, S. 1992. **Ilmu Kemajiran pada Ternak**. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Iskandar. 2011. **Perbandingan Performans Reproduksi Sapi Po Di Kecamatan Sekernan (Dataran Rendah) Dengan Kecamatan Kayu Aro (Dataran Tinggi) Provinsi Jambi**. Pascasarjana. Universitas Andalas Padang. Padang. Tesis
- Jainudeen, M. R., H. Wahid and E. S. E, Hafez. 2000. Sheep and Goats. In : E.S.E, Hafez (Ed.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Lea and Febiger. *Philadelphia*. Hal. 172-191.
- Juengel, J.L., Hudson, N.L., Heath, D.A., Smith, P., Reader, K.L., Lawrence, S.B., O’Connell. A.R., Laitinen, M.P., Cranfield, M., Groome, N.P., Ritvos, O. & McNatty, K.P., 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* 67, 1777-1789.
- Juengel, J.L., Hudson, N.L., Whiting, L. & McNatty, K.P., 2004. Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* 70, 557-561.
- Nicol L, Bishop SC, Pong-Wong R, Bendixen C, Holm LE, Rhind SM, McNeilly AS. 2009. Homozygosity for a single basepair mutation in the oocyte-specific *GDF9* gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction* 138 (6) : 921–933

- Lodish, H., Arnold B., S. Lawrence Z., Paul M., David B. James D. 2000. **Molecular Cell Biology**. Wh Freeman Company
- Mazerbourg, S., C. Klein, A. J. Hsueh, N. Kaivo-Oja, O. Ritvos, D. G. Motterhead and 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
- McGrath, S.A., Esquela, A.F. & Lee, S.J., 1995. Oocyte specific expression of growth differentiation factor 9. *Mol. Endocrinol.* 9: 131-36.
- McPherron, A.C. & Lee, S.J., 1993. GDF-3 and *GDF-9*: two new members of the transforming growth factor b-superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J. Biol. Chem.* 268: 3444-3449.
- Muladno. 2002. **Seputar Teknologi Rekayasa Genetika**. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.
- Murtidjo, B.A. 1993. **Beternak Sapi Potong**. Kanisius. Yogyakarta.
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. PCR. UK: *Bios Scientific Publisher*.
- Odeh, F.M.T. 2003. **Quantitative Inheritance of Calpastatin Activity as an Assesment Measure for Meat Tenderness in Brahman Steers**. A Dessertation. M. S Lousiana State University.
- Orisaka., M., K. Tajima, B.K. Tsang. F. Kotsuji. 2009. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research.* 2 : 9.
- Pane, I. 1993. **Pemulia biakan Ternak Sapi**. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Partodihardjo, 1987. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Mutiara Sumber Widya, Jakarta.
- Romano, S. 2009. Penilaian Jenis dan Frekuensi Polimorfisme Gen Reseptor Adrenergik BETA-2 (β 2AR) di Malaysia. [http://eprints.usm.my/10337/1/Penilaian Jenis Dan Frekuensi.pdf](http://eprints.usm.my/10337/1/Penilaian_Jenis_Dan_Frekuensi.pdf). Tanggal Akses 22 November 2012.
- Salisbury, GW. Dan N. L., Vandemark. 1985. **Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi**. Diterjemahkan oleh Djanuar (1985). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Schleif, R. 1993. **Genetics and Molecular Biologi**. 2thedition. The John Hopkins Press Ltd. London.

- Secko, D., 2003. A Monk's Flourishing Garden: The Basics of Molecular Biology Explained. <http://www.scq.ubc.ca/amonks-flourishing-garden-the-basics-of-molecular-biologyexplained/>. Tanggal akses 9 November 2012.
- Sophie P., Uzbekova S., Perreau C., Papillier P., Mermillod P., and Dalbie's R. 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.
- Sutama, I.K., 1998. **Lama Berahi, Waktu Ovulasi dan Kadar LH pada Domba Ekor Pipih Setelah Perlakuan Progesteron-PMSG**. Ilmu dan Peternakan. Vol 8 No. 1 : 9-12.
- Tamer S.H. and David A. 2005. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Science* 10: 5257-5267.
- Toelihere, M. R. 1994. **Fisiologi Reproduksi Pada Ternak**. Angkasa Bandung.
- Vitt, U.A., McGee, E.A., Hayashi, M. & Hsueh, A.J., 2000. In vivo treatment with GDF 9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinol.* 141: 3814-3820.
- Weaver, R.F. 2000. **Molecular biology**. Mc-Graw Hill Companies Inc. Boston.
- Widjiati, Nur Z.H., Ismudiono dan Sukmanadi. 2008. **Identifikasi Protein Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) yang Diisolasi dari Oosit pada Folikel Dominan Ovarium Sapi**.

LAMPIRAN

Komposisi Beberapa Bahan Yang Digunakan Dalam Penelitian :

1. RBC (*Red Blood Cell*) Lysis (10x)
 - NH_4Cl = 7,75 gram
 - KHCO_3 = 1,002 gram
 - 5 Mm Na_2EDTA = 10 ml
 - dH_2O = 100 ml
2. TBE Buffer pH 8 (10x)
 - 1 M Tris Base = 6,05 gr
 - 20 mM Na_2EDTA = 0,372 gr
 - 1 M Boric Acid = 3,085 gr
3. Loading dye (1 ml)
 - 50% Gliserol = 0,5747 ml
 - 1mM Na_2EDTA = 0,0002 ml dari Na_2EDTA 0,5 M
 - Bromophenol Blue = 0,004 gr
 - dH_2O = hingga 1 ml
4. Cell Lysis Buffer
 - NaCl 100 mM \rightarrow 0,1 M = 100 μl \rightarrow 10 ml
 - TrisCl 10 mM \rightarrow 0,01 M = 100 μl \rightarrow 10 ml
 - EDTA 25 mM \rightarrow 0,25 M = 100 μl \rightarrow 10 ml
 - SDS 0,5% \rightarrow 20 μl \rightarrow 2 ml
5. TE Buffer Ph 7,6
 - 10 mM TrisCl pH 7,6
 - 1 M Na_2EDTA Ph 7,6
 - Aquades hingga 50 ml
6. Gel Agarose 1%
 - 0.3 gr Bubuk agarose
 - 30 ml TBE buffer
 - 1 μl EtBr
7. Larutan Developing
 - 1,5 gr NaOH
 - s/d 100 ml formaldehid 37%
8. Larutan Fiksatif
 - 10 ml Ethanol
 - 0,05 AAG
 - Aquades hingga 100 ml

9. Larutan Perak Nitrat

- 0,09 gr Bubuk perak nitrat
- 60 ml Aquades
- 500 μ l formaldehid 37%

10. Cell Lysis Solution

- 1 M Tris-Cl = 0,5 ml
- 0,5 M Na_2EDTA = 2,5 ml
- 20% SDS = 1,250 ml
- Aquades hingga 100 ml

11. Protein Presipitasi

- NH_4COOH = 3,854 gr
- Aquades hingga 10 ml

