

Profil Gen Reseptor *Follicle Stimulating Hormone* (rFSH) pada Sapi Silangan Madrasin

Genetic Profile of Follicle Stimulating Hormone Receptor (rFSH) in Madrasin Crossbreed Cattle

Aisyah Shaumanur Artha Hidayah^{1*}, Budi Utomo², Imam Mustofa²

¹Proram Studi Biologi Reproduksi, ²Departemen Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya 60115, Indonesia,

*Corresponding author: aisyahshaumanur@gmail.com

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui profil gen reseptor *Follicle Stimulating Hormone* (rFSH) pada sapi silangan antara bangsa Madura dengan bangsa Limousin (Madrasin). Penelitian ini menggunakan sampel darah utuh dari satu sapi Madura, satu sapi Limousin, dan satu sapi silangan Madrasin. Sampel darah sapi Madura dan sapi silangan Madrasin diambil dari Galis, Pamekasan, Jawa Timur dan sampel sapi Limousin diambil dari Balai Embrio Ternak (BET) Cipelang, Bogor, Jawa Barat. Sampel darah diambil dan digunakan untuk analisis profil gen yang meliputi amplifikasi DNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan sekuensing DNA di Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fragmen DNA rFSH berukuran 211bp. Kesimpulannya PCR dapat mendeteksi gen rFSH sapi silangan Madrasin yang bersifat polimorfik.

Kata kunci: Madrasin, PCR, gen, rFSH, sapi silangan

Abstract

The aim of this study was to know about genetic profile of *Follicle Stimulating Hormone Receptor* (rFSH) in Madrasin crossbreed between Madura breed and Limousin breed (Madrasin). The research are using whole blood samples from Madura breed, Limousin breed, and Madrasin crossbreed. Madura breed and Madrasin crossbreed sample were taken from Galis, Pamekasan, East Java and Limousin breed is taken from Balai Embrio Ternak (BET) Cipelang, Bogor, West Java. Samples were used for genetic profile analysis such as DNA amplification with *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method and DNA sequencing in Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga. The result showed that DNA fragment of rFSH is 211bp. In conclusion, this study can detect rFSH gene Madrasin crossbreed which is polymorphism.

Keywords: Madrasin, PCR, gene, rFSH, crossbreed cattle

Received: 1 Oktober 2020

Revised: 15 Oktober 2020

Accepted: 4 Desember 2020

PENDAHULUAN

Indonesia dikenal sebagai negara yang kaya akan keanekaragaman hayati dan salah satunya adalah kekayaan berbagai macam ternak, termasuk sapi (Woolliams *et al.*, 2008). Salah satu jenis atau bangsa sapi potong lokal yang mempunyai potensi besar untuk dikembangkan adalah persilangan Sapi Madura dengan Limousin (Madrasin). Sapi silangan Madrasin sendiri baru masuk ke pulau Madura sekitar tahun 2000. Introduksi sapi Limousin masuk ke

pulau Madura melalui inseminasi buatan (IB) (Huitema, 1982).

Sapi silangan Madrasin memiliki penampilan eksterior tubuh dan berat badan lebih baik dibanding sapi Madura, namun penampilan reproduksi sapi Madura lebih baik dari persilangannya (Kutsiyah *et al.*, 2003), sapi Madura memiliki kinerja reproduksi yang lebih baik dibandingkan dengan sapi silangan Madrasin (Hartatik *et al.*, 2009) dan indeks fertilitas sapi Madura lebih baik dari pada sapi Madrasin (Omitasari, 2017).

Upaya yang harus dilakukan untuk mengantisipasi hal tersebut adalah meningkatkan produktivitas dan kapasitas reproduksi sapi lokal yang ada di Indonesia melalui perbaikan mutu genetik (Sudjana, 2009). Meningkatkan fertilitas dengan cara seleksi genetik cenderung menjadi semakin penting karena sekarang sudah diketahui bahwa penurunan fertilitas tidak dapat sepenuhnya oleh manajemen yang lebih baik (Omer *et al.*, 2016). Perbaikan mutu genetik diupayakan melalui seleksi terhadap sifat reproduksi. Perkembangan terakhir dalam biologi molekuler dan statistik telah memfasilitasi penggunaan variasi dan seleksi genom untuk gen terutama dalam perbaikan genetik ternak.

Pemanfaatan penerapan teknologi molekuler dapat digunakan sebagai metode seleksi pada tingkat DNA, dalam hal ini DNA yang berperan dalam sifat reproduksi. Gen yang memiliki peranan penting dalam reproduksi adalah gen reseptor *Follicle Stimulating Hormone* (rFSH) (Fan and Hendrickson, 2005). Gen rFSH diperlukan untuk memproduksi reseptor FSH yang membawa FSH ke target jaringan sehingga dapat berfungsi untuk spermatogenesis pada jantan dan oogenesis pada betina. FSH reseptor terekspresi pada sel-sel granulosa di ovarium dan sel-sel sertoli di testis. Gen rFSH sangat penting dalam proses pembentukan sperma pada sapi jantan dan ovum pada sapi betina (Aguirre and Timossi, 1998). Yang *et al.*, (2010) mengusulkan bahwa gen rFSH sebagai penanda molekuler yang sesuai karena pengaruhnya terhadap variabel superovulasi. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui profil gen rFSH pada sapi silangan Madrasin.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah darah utuh (*whole blood*) yang berasal dari sapi Madura, sapi silangan Madrasin, dan sapi Limousin. Sampel darah sapi Madura dan sapi silangan Madrasin berasal dari Galis, Pamekasan, Jawa Timur sedangkan sampel

darah sapi Limousin berasal dari Balai Embrio Ternak (BET) Cipelang, Bogor, Jawa Barat dengan rentang umur 2 – 6 tahun, berat badan 200 – 400 kg.

Ekstraksi DNA

DNA dari sample darah sapi Madura, sapi Limousin, dan sapi hasil persilangan Madura dan Limousin di ekstraksi dengan cara memasukan 10 ml sampel darah ke dalam tabung *ependorf* steril kemudian ditambahkan dengan 180 uL *tissue lysis buffer* (ATL) dan 20 uL protease yang kemudian vortex 5 detik dan inkubasi pada suhu 56°C selama 1 – 3 jam, selama inkubasi *tube* diangkat dan digoyangkan 5 detik. Vortex kembali selama 15 detik kemudian ditambahkan 200 uL *lysis buffer* (AL), lalu vortex 5 detik. Tambahkan ethanol 96 - 100% lalu vortex 5 detik. Semua campuran diatas dimasukan ke dalam *tube* DNeasy Mini Spin Column (QIAGEN®) yang disangga oleh *tube* 2 ml, kemudian ditambah 500 uL larutan *wash buffer* 1 (AW 1) lalu *centrifuge* dengan kecepatan 8000 rpm dalam waktu 1 menit. Campuran yang berada dalam *tube* DNeasy Mini Spin Column (QIAGEN®) dipindahkan ke *tube* 2 ml yang baru, kemudian ditambahkan 500 uL *wash buffer* 2 (AW 2) dan *centrifuge* kembali dengan kecepatan 1400 rpm selama 3 menit, kemudian *tube* 2 ml yang digunakan sebagai penyangga dibuang dan diganti oleh *tube* 1,5 ml yang baru. Campuran yang berada di dalam *tube* DneasyMini Spin Column ditambahkan 200 uL buffer AE kemudian diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruangan, untuk langkah terakhir dilakukan *centrifuge* dengan kecepatan 8000 rpm dalam waktu 1 menit.

Pembuatan PCR Mix

Diambil masing-masing 10uL Primer rFSH *forward* dan *reverse* dan dimasukkan kedalam tabung *ependorf* steril, *Forward*: 5' TCC CTG CCC TTC AGT GAC GAA 3', *Reverse*: 5' AGA TAC GCC GTC CCT TTA CCT 3' (Sharifiyazdi *et al.*, 2018) kemudian sebanyak 100 uL GoTaq Green MasterMix (Promega Corp.) dimasukkan kedalam tabung *ependorf* steril dan dicampurkan dengan primer serta ditambahkan H₂O sebanyak

90µL. Sebanyak 20µL Mix Primer dan GoTaq Green Mastermix (Promega Corp.) dimasukkan kedalam tabung PCR lalu ditambahkan DNA 5 uL pada masing-masing tabung PCR.

Deteksi Amplifikasi DNA metode PCR

Tabung PCR yang berisi PCR Mix dan DNA dimasukkan kedalam mesin *Thermal Cycler* Veriti Aplied Biosystem setelah itu mesin *Thermal Cycler* dijalankan dengan kondisi PCR : Predenaturasi 95°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus, Denaturasi 95°C selama 45 detik, Annealing 60°C selama 45 detik, Extension 72°C selama 1 menit, post extensi 72°C selama 5 menit sebanyak 35 siklus.Selanjutnya hasil PCR gen rFSH dielektroforesis untuk melihat band hasil amplifikasi.

Pembuatan Agarose 2%

Serbuk agarose ditimbang, sebanyak 2 gr dan ditambahkan 100 mL Tris-asetate-EDTA buffer (TAE) 0,5x selanjutnya dipanasi hingga semua larutan terlarut sempurna, lalu ditambahkan Ethidium Bromida 8 uL kemudian dilakukan pencampuran hingga larutan menjadi homogen. Selanjutnya larutan tersebut dituang kedalam cetakan agarosa, didiamkan sampai larutan menjadi memadat.

Elektroforesis

Gel Agarosa 2% yang telah dibuat kedalam dimasukkan ke dalam elenmeyer yang telah berisi Tris-asetate-EDTA buffer (TAE) 0,5x sebanyak 100 ml, kemudian dipanaskan ke dalam *microwave* selama 2 menit hingga mendidih, lalu ditambahkan 8µL Ethidium Bromida. Cairan gel lalu didinginkan pada suhu kamar dan setelah agak dingin, gel dituang ke cetakan gel elektorforesis dengan menggunakan sisir gel dengan jumlah sisir 17 sumur. Diambil 2 uL *loading dye* dan dicampurkan ke dalam 5 uL PCR produk setiap sampel, selanjutnya dimasukkan kedalam sumur yang ada pada gel agarose. Diambil 5 ul ladder 100 bp dan dimasukkan dalam sumur paling ujung dari gel agarose selanjutnya *power supply* dinyalakan dengan pengaturan 100 volt selama 50 menit, setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dan

gel agarose diangkat untuk diamati dibawah sinar UV dan dimasukkan dalam *Gel Documentation* untuk melihat band hasil amplifikasi gen rFSH.

Sekuensing DNA

Sekuensing nukleotida ini dilakukan tiga tahap, tahap pertama adalah melakukan tahap labelling yaitu DNA yang sudah murni dilabel dengan *Big Dye Terminator* kit versi 3.1 Penambahan reagen ini bertujuan untuk memberikan fluoresensi yang digunakan untuk membedakan urutan nukleotida. Pada tahap ini mesin *Thermal Cycler* diprogram dalam keadaan suhu denaturasi awal 96°C selama 1 menit, kemudian sebanyak 5 siklus pada suhu 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik dan 60°C selama 4 menit. Tahap kedua yaitu melakukan purifikasi menggunakan Big Dye X Terminator yang bertujuan untuk memurnikan nukleotida dan menghilangkan *Big Dye Label* yang tersisa. Tahap terakhir yaitu melakukan sekuensing dengan menggunakan mesin *sequenser* ABI 310 xL GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems, Inc).

Analisis Data

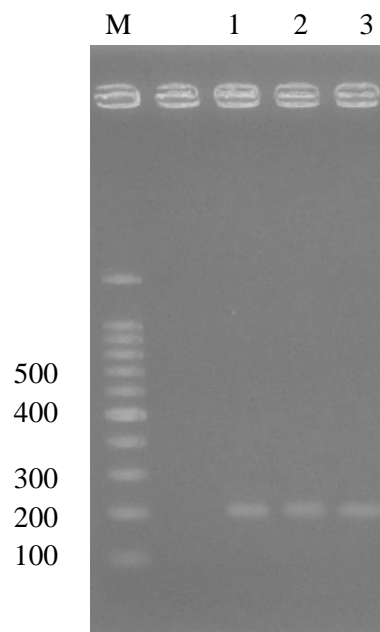
Nukleotida hasil sekuensing yang diperoleh dilakukan *alignment* menggunakan *software* ClustalW yang ada dalam *software* BioEdit ver. 8.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil PCR rFSH

Hasil elektroforesis dari darah sapi Madrasin dan sapi Madura di Kabupaten Pamekasan, dan sapi Limousin di Balai Embrio Transfer Cipelang Bogor yang dilakukan dengan metode PCR dengan menggunakan primer gen pengkode hormon rFSH menunjukkan hasil yang baik dibuktikan dengan terdeteksinya fragmen berupa DNA pada ketiga sampel dengan panjang 211 bp. Hasil positif visualisasi dari elektroforesis dapat dilihat dalam Gambar 1.

Pada penelitian ini, kondisi PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 95°C selama 5



Gambar 1. Hasil elektroforesis PCR pada darah (1) Sapi Madura, (2) Sapi silangan Madrasin, dan (3) sapi Limousin. Keterangan M=Marker DNA: produk PCR (211bp).

	10	20	30	40	50	60
REFSEQ	TCCCTGCCCT	TCAGTGACGA	ATTCCCAACC	TCCGATATCT	GTTACTATCC	AACACAGGTA
rFSH 1
rFSH 2
rFSH 3
	70	80	90	100	110	120
REFSEQ	TTAAGCACTT	GCCAGCTGTG	CCTTCACAAG	ATTCAGTCTC	TCCAAAAGGT	TITACTAGAT
rFSH 1
rFSH 2
rFSH 3
	130	140	150	160	170	180
REFSEQ	ATTCAAGATA	ATATCGAAAC	ATCCACACAG	TTGAAAGAAA	TTCITTCATG	GGGCTACCGT
rFSH 1	TCG...AG..	T.CC....G	GGG.T.C.CA	G.....C.	C..C...TCC	..TAC.....
rFSH 2	C....AG.G	.C.C...G.T	GA.G....A	..TC....	AG.CCC..A.	TA..ATG...
rFSH 3	CCA...AT	G.C.GA.C.G	.ATG..C.G.	.G.TGC..TG	GC.CCCA.A.	T.C.AT.GC.
	190	200	210			
REFSEQ	TTTGAAAGTA	AGGTAAAGGG	ACGGCGTATC	T		
rFSH 1	...TCTTCC		
rFSH 2	..CTGGTT.G		
rFSH 3	C....GITCC		

Gambar 2. Urutan nukleotida gen rFSH. Refseq = Genbank, rFSH 1 = sapi Madura, rFSH 2 = sapi silangan Madrasin, rFSH 3 = sapi Limousin.

menit, denaturasi 95°C selama 45 detik, penempelan primer (annealing) 60°C selama 45 detik, suhu pemanjangan DNA baru 72°C selama 1 menit dan suhu pemanjangan akhir 72°C selama 5 menit, namun pada penelitian ini menggunakan suhu *annealing* 60°C selama 45 detik.

Suhu *annealing* merupakan suhu yang memungkinkan terjadinya penempelan primer pada DNA yang merupakan proses paling penting dalam amplifikasi. Viljoen *et al.*, (2005) menyatakan jika keberhasilan amplifikasi gen

ditentukan oleh keberhasilan penempelan primer pada gen target. Loss *et al.*, (2008); Marson *et al.*, (2008); dan Hernandez *et al.*, (2009) menggunakan suhu *annealing* 58°C selama 30 detik dalam mengamplifikasi ruas gen rFSH dan menghasilkan produk PCR yang baik. Muladno (2002) menambahkan bahwa suhu penempelan primer (*annealing*) berkisar antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa digunakan 50-60°C. Perbedaan suhu *annealing* dengan hasil penelitian ini dapat disebabkan adanya perbedaan komposisi mix sebagai komponen

PCR. Faktor-faktor yang menentukan keberhasilan penempelan primer pada gen target yakni kondisi suhu PCR (denaturasi, *annealing*, dan ekstensi) serta interaksi antar komponen pereaksi PCR. Purnami, (2009) menambahkan jika keberhasilan amplifikasi DNA dengan PCR ditentukan oleh beberapa faktor yaitu, kemurnian dan konsentrasi komponen dalam larutan premix PCR, primer oligonukleotida gen, jumlah dan kemurnian DNA sampel, faktor teknis dan non-teknis misalnya kontaminasi.

Gen rFSH merupakan gen yang berperan dalam proses reproduksi. Produk dari gen rFSH yaitu rFSH berperan untuk membawa hormon FSH menuju sel target sehingga dapat melakukan fungsi pembentukan ovum pada betina dan sperma pada jantan. Gen rFSH pada sapi terletak di kromosom 11 dan terdiri atas 10 ekson dan 9 intron (Aguirre dan Timossi, 1998). Gen rFSH berperan dalam fungsi reproduksi sangat menentukan kualitas sperma sapi pada sapi jantan. Huhtaniemi dan Kristiina (1998) menyatakan jika rFSH yang merupakan produk dari gen rFSH sangat menentukan ukuran testis, jumlah sperma, dan motilitas sperma bagi pejantan, serta keberhasilan fungsi ovarium pada betina.

Gambar 1 menunjukkan hasil pita DNA dengan panjang 211bp yang merupakan pita spesifik gen rFSH. Dapat dilihat dari hasil elektroforesis bahwa pada semua sampel penelitian memiliki gen rFSH dalam selnya. Namun untuk melihat adanya perubahan atau mutasi urutan nukleotida sampel maka dilakukan Sekuensing DNA.

Hasil Sekuensing DNA rFSH

Produk PCR yang didapatkan dari sampel satu sapi Madrasin, satu sapi Madura, dan satu sapi Limousin dipurifikasi dengan menggunakan *QIAquick gel extraction kit* untuk selanjutnya dilakukan sekuensing.

Hasil PCR selanjutnya disekuensing dengan menggunakan ABI 310xL *Genetic Analyzer* sehingga dapat diketahui susunan nukleotida dari rFSH yang diuji. Nukleotida hasil sekuensing selanjutnya dianalisis menggunakan *software BioEdit ver 8.0* untuk melakukan *multiple*

alignment menggunakan *software ClustalW* yang ada dalam *software BioEdit Ver 8.0* selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 2.

Adanya varian alel dalam gen rFSH yang dilaporkan pada sampel sapi silangan Madrasin diatas menunjukkan bahwa gen rFSH bersifat polimorfik. Perubahan dalam struktur molekul gen rFSH ini menyebabkan desensitisasi rFSH dalam membran sel, yang menyebabkan transmisi sinyal hormon yang kurang efisien (Gromoll, et al., 1996). Gen rFSH memiliki peran penting dalam stimulasi ovarium dan pengetahuan fisiologinya dapat digunakan untuk memprediksi perbedaan fungsi rFSH dan respon ovarium terhadap FSH. Latronico dan Arnhold (2006) melaporkan bahwa perubahan urutan DNA dapat mempengaruhi aktivasi gen rFSH dan mereka juga menunjukkan bahwa genotipe tersebut memainkan peran penting dalam fisiologi ovarium.

KESIMPULAN

Hasil PCR dari gen rFSH sapi Madura, sapi silangan Madrasin, dan sapi Limousin mendapatkan panjang fragmen 211 bp, sedangkan hasil sekuensing DNA menunjukkan gen rFSH sapi silangan Madrasin bersifat polimorfik. Penelitian ini memberikan informasi tentang struktur genetik dari gen rFSH yang dapat digunakan untuk penanda seleksi dan program breeding di masa depan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Dinas Ketahanan Pangan dan Peternakan Kabupaten Pamekasan serta Balai Embrio Ternak Cipelang Bogor, atas izin pengambilan sampel pada daerah tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Aguirre, U. A., & Timossi, C. (1998). Structure-function relationship of follicle stimulating hormone and its receptor. *Journal Human Reproduction*, 4, 260-283.

- Dai, L., Zhao, Z., Zhao, R., Xiao, S., Jiang, H., Yue, X., Li, Z., Gao, Y., Liu, J., & Zhang, J. (2009). Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH beta-subunit gene on semen quality and fertility in bulls. *Animal Reproduction Science*, 114, 14 – 22.
- Fan, Q. R., & Hendrickson, W. A. (2005). Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 433, 269–277.
- Gromoll, J., Simoni, M., Nordhoff, V., Behre, H.M., De, Geyter C., & Nieschlag, E. (1996). Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor. *Molecular Cell Endocrinology*, 125, 177 – 182.
- Hartatik, T., Mahardika, D., Azharinto, Widi, T. S., Mastuti, & Baliarti, E. (2009). Karakteristik dan Kinerja Induk Sapi Silangan Limousin-Madura dan Madura Di Kabupaten Sumenep dan Pamekasan. *Buletin Peternakan*, 33(3), 143-147.
- Hernandez, B. C., Cevrantes, P., Montiel, F., Canseco, R., & Carrasco, A. (2009). Allelic variants of fshr gene in cow of different genotypes in mexico. *Journal of Animal Veterinary Advance*, 8, 2489-2494.
- Huhtaniemi, I. T., & Aittomaki, K. (1998). Mutations of follicle-stimulating hormone and its receptor; effects on gonadal function. *Journal European Endocrinology*, 138, 473–481.
- Huitema, H. (1982). *Peternakan di Daerah Tropis Arti Ekonomi dan Kemampuannya, Penelitian di Beberapa Daerah Indonesia. Yayasan Obor Indonesia dan PT Gramedia, Jakarta.*
- Kutsiyah, F., Kusmartono, & Trinil, S. (2003). Comparative study of the productivity of Madura Cattle and Its crossbreed with Limousin in Madura island. *JITV*, 8(2), 98-106.
- Latronico, A., & Arnhold, I. (2006). Inactivating mutations of LH and FSH receptors from genotype to phenotype. *Pediatric Endocrinology*, 4, 28-31.
- Loss, P. R. A., Silveira, J. C., Glanzer, W. G., Moraes, J. C. F., & Weimer, T. A. (2008). Diversidade genetic de doadoras de embrioes das racas Nelore e Aberdeen angus. *Veterinaria em foco*, 5, 85-92.
- Marson, E. P., Ferraz, J. B. S., Meirelles, F. V., Balieiro, J. C. C., & Eler, J. P. (2008). Effects of polymorphism of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos Taurus* X *Bos Indicus* beef composite population. *Genetic Molecular*, 7, 243-25.
- Muladno. (2002). *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika. Pustaka Wirausaha Muda dan USESE Foundation, Bogor, pp: 73-75.*
- Omer, N. N., Gornas, N., Rahmatalla, S. A., & Ahmed, M. A. (2016). Genetic Characterization of Indigenous Sudanese Cattle Using FSHR and LHR Genes. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 24, 1 – 9.
- Omitasari, A. (2017). *Perbedaan Performans Reproduksi Sapi Madura dan Sapi Madrasin (Maduralimousin) Di Kabupaten Sumenep Pulau Madura. [Skripsi]. Universitas Brawijaya.*
- Sharifiyazdi, H., Mirzaei, A., & Ghanaatian, Z. (2018). Characterization of Polymorphism in The FSH Receptor Gene and Its Impact on Some Reproductive Indices in Diary Cows. *Animal Reproduction Science*, 188, 45 – 50.
- Sudjana, T. (2009). *Peranan Teknologi dalam Percepatan Peningkatan Populasi Sapi.*

- Makalah pada Seminar Nasional Percepatan Peningkatan Populasi Sapi di Indonesia. CENTRAS, Bogor.
- Viljoen, G. J., Nel, L. H., & Crowther, J.R. (2005). *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer, Dordrecht, Netherland, pp: 235-245.
- Woolliams, J. A., Matika, O., & Pattison, J. (2008). Conservation of animal genetic resources: approaches and technologies for *in situ* and *ex situ* conservation. *Animal Genetic Resources Information*, 5, 70 – 85.
- Yang, W. C., Li, S. J., Tang, K. Q., Hua, G. H., Zhang, C. Y., Yu, J. N., Han, L., Yang, L. G. (2010). Polymorphisms in the 5 upstream region of the FSH receptor gene, and their association with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 119, 172–177.
