

Deteksi Gen Reseptor *Luteinizing Hormone* (rLH) pada Sapi Madrasin dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

Detection Gene of Luteinizing Hormone Receptor (rLH) in Madrasin Cattle using Polymerase Chain Reaction

Ivo Febrina Prasetyo^{1*}, Budi Utomo², Sri Pantja Madyawati²

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

*Corresponding author: ivofebrinap@gmail.com

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini yakni mengetahui profil gen reseptor *Luteinizing Hormone* (rLH) pada sapi silangan Madrasin. Sampel penelitian ini yakni menggunakan sampel darah dari 3 jenis sapi yakni Sapi Madrasin dari Kabupaten Bangkalan, Sapi Madura dari Kabupaten Bangkalan dan Sapi Limousin dari BET Cipelang Bogor. Kriteria sampel dari ketiga jenis sapi yang digunakan yakni sapi betina yang berusia lebih dari 2,5 tahun dan pernah partus satu kali. Amplifikasi gen rLH dilakukan dengan teknik PCR, dilanjutkan dengan sekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotida. Hasil penelitian ini yakni pada ketiga sampel terdeteksi fragmen berupa DNA dengan panjang basa nukleotida 373 bp. Kesimpulannya metode PCR dapat digunakan untuk mendeteksi gen reseptor rLH pada Sapi Madrasin.

Kata kunci: gen, PCR, rLH, sapi Madrasin

Abstract

The aim of this study was to determine the profile of the *Luteinizing Hormone Receptor* (rLH) gene in Madrasin cross breed cattle. The sample of this study used blood samples from 3 breeds of cattle. There were Madrasin from Bangkalan City, Madura from Bangkalan City and Limousin from BET Cipelang Bogor. The sample criteria were used female cattle around 2,5 years old and ever partus (once). The genomic DNA was extracted for polymerase chain reaction (PCR), followed by sequencing with software BioEdit Vers. 8.0 to determine the sequence of nucleotide bases. The results of this study were that three samples detected fragments in the form of DNA with nucleotide base of 373 bp. The conclusion, gene rLH in Madrasin Cattle can detected using PCR.

Keywords: gene, PCR, rLH, Madrasin cattle

Received: 1 Oktober 2020

Revised: 17 Oktober 2020

Accepted: 4 Desember 2020

PENDAHULUAN

Salah satu jenis sapi potong lokal Indonesia yaitu Sapi Madura (Kutsiyah *et al.*, 2017). Keunggulan Sapi Madura yaitu mampu memanfaatkan pakan berkualitas rendah, memiliki persentase karkas tinggi dengan kualitas daging yang baik dan memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan tropis (Sutarno dan Setyawan, 2015). Sapi Madura memiliki nilai *Calving Interval* yang pendek dan *Service per Conception* yang rendah (Hartatik *et al.*, 2009).

Sapi Madura dikategorikan dalam jenis sapi potong kecil hingga sedang (Setiadi dan Diwyanto, 1997) dan memiliki peetambahan bobot badan yang rendah (Komarudin, 1993). Banyak peternak yang mengawinkan Sapi Madura dengan Sapi Limousin dengan metode Inseminasi Buatan dimana hasilnya adalah bibit sapi baru yang dikenal dengan Sapi Madrasin (Nurgiartiningsih, 2011). Perkawinan silang diyakini sebagai ancaman paling berbahaya bagi *breed* sapi lokal di Indonesia dengan konsekuensi hilangnya daya adaptasi (Widi *et al.*, 2013). Sapi Madrasin memiliki kesuburan

yang rendah dibandingkan Sapi Madura (Omitasari, 2017).

Sifat reproduksi berperan penting dalam meningkatkan populasi ternak. Potensi reproduksi Sapi Madrasin perlu dikaji lebih mendalam melalui pendekatan molekuler yang merupakan metode moderen dalam memilih bibit unggul (Dani, 2018). Perbaikan mutu genetik diperlukan untuk meningkatkan produktivitas dan kapasitas reproduksi dari sapi lokal (Sudjana, 2009). Huhtaniemi (2002) menyatakan salah satu pendekatan dalam meningkatkan informasi genetik adalah dengan mengidentifikasi marka genetik yang memiliki efek langsung pada aspek tertentu dari fertilitas seperti reseptor *Luteinizing Hormone* (rLH).

Gen rLH bersifat spesifik yang berinteraksi dengan LH yang terletak pada membran plasma (Kawate, 2004) terutama di ovarium, testis dan uterus (Mc Farland *et al.*, 1989). Gen ini yang mempengaruhi sistem endokrin yang memainkan peran utama dalam mengontrol fungsi reproduksi yang diatur melalui hipotalamus hipofisis-gonad. Mutasi pada gen rLH, mempengaruhi regulasi hormon gonadotropin yang berpotensi terkait dengan fenotipe reproduksi seperti *Calving Interval* (Milazzotto *et al.*, 2008). Gen rLH pada sel teka folikel sangat penting untuk efek fisiologis LH dimediasi pada tahap akhir pertumbuhan folikel, pematangan akhir oosit, ovulasi dan luteinisasi dinding folikel (Nawal *et al.*, 2016).

Teknik untuk mengetahui profil gen rLH ialah dengan cara PCR. Analisa sekuensing DNA yaitu proses penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA untuk mengetahui informasi paling mendasar dari suatu gen (Muladno, 2002). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengenal profil gen reseptor LH pada Sapi Madrasin.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel darah sapi. Sampel Sapi yang digunakan yakni 1 ekor Sapi Madrasin yang berasal dari Kabupaten Bangkalan, 1 ekor Sapi Madura yang berasal

dari Kabupaten Bangkalan dan 1 ekor Sapi Limousin yang berasal dari BET Cipelang, Bogor. Semua sampel merupakan sapi betina dengan usia sekitar 2,5 tahun dan pernah partus sekali.

Ekstraksi DNA

Sampel darah sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam *effendorf tube* steril kemudian ditambahkan 180 uL *tissue lysis buffer* (ATL) dan 20 proteinase uL, kemudian di *vortex* selama 15 detik. Inkubasi sampel tersebut pada suhu 56°C selama 1-3 jam kemudian *vortex* kembali. Tambahkan 200 uL *lysis buffer* (AL) ke dalam sampel, *vortex* kembali. Terakhir tambahkan ethanol 96%-100%, *vortex* kembali (Othman *et al.*, 2013).

Semua campuran di atas dimasukkan ke dalam *DNeasy Mini Spin Column tube* (*QiaGen*) yang disangga 2 ml *tube*, kemudian sentrifus sampel dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Pindahkan *DNeasy Mini Spin Column tube* (*QiaGen*) di atas 2 ml *tube* yang baru, tambahkan 500 uL *wash buffer* (AW1) lalu sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Pindahkan lagi *DNeasy Mini Spin Column tube* (*QiaGen*) di atas 2 ml *tube* yang baru, tambahkan 500 uL *wash buffer* (AW2) lalu sentrifus dengan kecepatan 1400 rpm selama 3 menit, buang 2 ml *tube* yang dipakai sebagai penyangga, pindahkan *DNeasy Mini Spin Column tube* (*QiaGen*) di atas 1,5 ml *tube* steril. Tambahkan 200 uL *tris-acetat-EDTA* (TAE) *buffer* tepat di atas *DNeasy Mini Spin Column tube* (*QiaGen*), kemudian inkubasi selama 1 menit pada suhu ruangan. Terakhir sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit (Othman *et al.*, 2013).

Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR

Proses amplifikasi dimulai dengan pembuatan *master mix* dimana sebanyak 10uL Primer rLH *forward* dan *reverse* seperti pada Tabel 1 dimasukkan kedalam *effendorf tube* steril (Othman *et al.*, 2013). Kemudian sebanyak 100 uL *GoTaq Mastermix Green* (*Promega*) dimasukkan kedalam *effendorf tube* steril dan dicampurkan dengan primer serta ditambahkan

H₂O sebanyak 90 µL, sebanyak 20 µL *Mix Primer* dan *GoTaq Mastermix Green (Promega)* dimasukkan kedalam tabung PCR lalu ditambahkan DNA 5 µL pada masing-masing tabung PCR. Primer gen rLH menggunakan forward: 5'- TTT ACC AAC CTC CTG GAT GC- '3 dan reverse: 5'- GTT AGG CAC ATC AGG CAA AAA -'3 dengan panjang 373 bp.

Tabung PCR yang berisi PCR Mix dan DNA dimasukkan kedalam mesin *thermocycler*, setelah itu mesin *thermocycler* dijalankan dengan kondisi predenaturasi 95°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus, denaturasi 95°C selama 45 detik, annealing 57°C selama 45 detik, Extension 72°C selama 1 menit, post extensi 72°C selama 5 menit sebanyak 35 siklus. Selanjutnya hasil PCR gen rLH dielektroforesis untuk melihat band hasil amplifikasi.

Elektroforesis

Produk hasil amplifikasi selanjutnya divisualisasikan dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel agarose 2% yang mengandung ethidium bromide dengan menggunakan *buffer TBE*. Marker yang digunakan 100bp DNA *leader*. Tahap elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama 20-30 menit, selanjutnya untuk visualisasi dengan UV-transluminator. Hasil positif jika terdapat pita DNA yang sejajar dengan marker 373 bp untuk gen rLH dan negatif jika tidak terdapat pita pada gel.

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. Tahap ini mesin *thermocycler* program dalam keadaan suhu *initial denaturation* 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 *cycle sequencing* menggunakan Big Dye X

Terminator yang bertujuan untuk memurnikan nukleotida dan menghilangkan *Big Dye Label* yang tersisa. Setelah itu, tahap terakhir yaitu melakukan sekuensing dengan menggunakan mesin sequenser ABI 310 xL *Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Inc).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil PCR Gen rLH

Hasil amplifikasi dari darah sapi satu ekor Sapi Madrasin di Kabupaten Bangkalan, satu ekor Sapi Madura di Kabupaten Bangkalan, dan satu ekor Sapi Limousin di Balai Embrio Transfer Cipelang Bogor yang dilakukan dengan metode PCR, menghasilkan 3 pita sampel DNA yang positif dengan menggunakan primer gen rLH. Hasil positif visualisasi dari elektroforesis dapat dilihat dalam Gambar 1.

Gambar 1. Menunjukkan hasil elektroforesis menggunakan primer gen pengkode rLH menunjukkan hasil yang baik dibuktikan dengan terdeteksinya fragmen berupa DNA pada ketiga sampel dengan panjang basa nukleotida 373bp. Hasil positif pada sampel sapi Madrasin menunjukkan bahwa gen rLH dapat dideteksi dengan menggunakan metode PCR, sama halnya dengan penelitian sebelumnya oleh Nawal *et al.*, (2016) yang menyatakan bahwa terdeteksi gen rLH pada sapi Sudan.

Terdeteksinya gen rLH menunjukkan bahwa sapi Madrasin kemungkinan tidak infertil hal ini dikarenakan rLH merupakan reseptor transmembran yang berperan penting dalam fungsi hormonal selama di sel granulosa folikel. Fungsinya sangat penting dalam mengatur efek fisiologis LH pada pertumbuhan folikel, pematangan oosit, ovulasi, luteinisasi dinding folikel atau pembentukan korpus luteum (Nawal *et al.*, 2016).

Gen rLH memberikan sinyal pada LH untuk merangsang korpus luteum memproduksi hormon progesteron sebagai penopang kebuntingan, ketika terjadi fertilisasi (Dani, 2018). Hormon ini berperan dalam mengendalikan ovarium untuk merangsang produksi ovum (Li *et al.*, 2011).

Hasil Sekuensing DNA

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 gen rLH 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.

Gambar 2 Menunjukkan urutan nukleotida dari gen rLH sepanjang 373bp. Berdasarkan hasil terdapat varian alel pada gen rLH pada sampel sapi Madrasin diatas menunjukkan bahwa gen rLH bersifat polimorfik. Ada beberapa perubahan sekuen dari gen rLH sampel sapi Madrasin terhadap refseq. Pada penelitian sebelumnya oleh Sun *et al.*, (2013) polimorfisme yang terjadi pada gen rLH di sapi FH jantan dapat mempengaruhi kualitas semen, motilitas semen dan abnormalitas semen.

Gen rLH yang memiliki peran penting untuk membantu efek fisiologis LH melalui transduksi sinyal lonjakan LH pada pertengahan siklus yang mengarah ke ovulasi dan selanjutnya pemeliharaan produksi progesteron oleh korpus luteum (Djura *et al.*, 2007). Kadar LH yang terlalu tinggi dapat menyebabkan sindrom ovarium polikistik sehingga infertil, sedangkan tingkat LH yang rendah juga bisa menyebabkan infertilitas, karena kadar yang tidak mencukupi akan menghambat proses ovulasi bahkan menghentikan ovulasi (Dani, 2018).

KESIMPULAN

Gen rLH pada Sapi Madrasin dapat dideteksi dengan menggunakan metode dimana memiliki panjang basa nukleotida 373bp. Penelitian ini memberikan informasi tentang struktur genetik dari gen rLH yang ada pada Sapi Madrasin sehingga dapat digunakan sebagai

penanda seleksi dan program pemuliaan di masa depan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Dinas Peternakan Kabupaten Bangkalan dan Balai Embrio Transfer Cipelang, Bogor atas izin pengambilan sampel pada daerah tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Dani, N. A. (2018). Polimorfisme Gen Luteinizing Hormone Receptor dan Evaluasi Sifat Reproduksi pada Sapi Pasundan. [Tesis]. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Djura, P., Miriam, V., Maxime, P. L., Andre, G., Uitterlinden, H. A. P, Pols, E. M. J. J., & Berns, A. P. N. T. (2007). Polymorphic variations in exon 10 of the Luteinizing Hormone Receptor: Functional consequences and associations with breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 276, 1-2.
- Hartatik, T., Mahardika, D., Azharinto, Widi, T. S., & Mastuti, B. E. (2009). Karakteristik dan Kinerja Induk Sapi Silangan Limousin-Madura dan Madura Di Kabupaten Sumenep dan Pamekasan. *Buletin Peternakan*. Universitas Gajah Mada. Hal. 143-147.
- Huhtaniemi, I. P. (2002). The role of mutations affecting gonadotropin secretion and action in disorders of pubertal development. *Best Practice and Research Clinical Endocrine and Metabolism*, 16, 123-38.
- Kawate, N. (2004). Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor on the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. *Journal Reproduction and Development*, 1, 50.

- Komarudin, M. (1993). Hasil Penelitian Sapi Madura di Sub Balai Penelitian Ternak Grati, Pasuruan. Pertemuan Ilmiah Hasil Penelitian dan Pengembangan Sapi Madura. Sub Balitnak Grati, Sumenep. Hal: 45–54.
- Kutsiyah, F., Zali, M., Nurlaila, S., & Rizqina. (2017). Skenario Pembibitan Sapi Madura di Pulau Madura. *Jurnal Ilmu Ternak*, 1, 1-2.
- Li, G., An, X., Hou, J., Li, L., Han, D., Yang, M., Wang, Y., Zhu, G., Wang, J., & Song, Y. (2011). Study on polymerization effect of polymbryony genes by SSCP marker and family trees in Chinese goats. *Molecular Biology Reproduction*, 38, 739-744.
- McFarland, K. C., Sprengel, R., Phillips, H. S., Kilher, M., & Rosembli, N. (1989). Lutropin-choriogonodotropin receptor an unusual member of the g-coupled receptor family. *Science*, 245, 494–99.
- Milazzotto, M. P., Rahal, P., Nichi, M., Miranda, N. T., Teixeira, L. A., Ferraz, J. B. S., Eler, J. P., Campagnari, F., & Garcia, J. F. (2008). New molecular variants of hypothalamus pituitary gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (nellore). *Livestock Science*, 114, 274-279.
- Muladno. (2002). Teknologi Rekayasa Genetika. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- Nawal, N. O., Nahid, G., Siham A. R., & Mohamed-Khair, A. 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.
- Nurgiatiningsih, V. M. A. (2011). Peta Potensi Sapi Madura Murni di Empat Kabupaten Madura. *Jurnal Ternak Tropika*, 67(3), 17-22.
- Omitasari, A. (2017). Perbedaan Performans Reproduksi Sapi Madura dan Sapi Madrasin (Maduralimousin) Di Kabupaten Sumenep Pulau Madura. [Tesis]. Universitas Brawijaya.
- Othman, E. O. (2013). RFL polymorphism of three fertility genes in Egyptian buffalo. *Journal of Applied Biological Sciences*, 7, 92-101.
- Setiadi, B., & Diwyanto, K. (1997). Karakterisasi Morfologis Sapi Madura. *JITV*, 2, 218-224.
- Sudjana, T. (2009). Peranan Teknologi dalam Percepatan Peningkatan Populasi Sapi. Makalah pada Seminar Nasional Percepatan Peningkatan Populasi Sapi di Indonesia. *CENTRAS*. Bogor.
- Sutarno, A. D., & Setyawan. (2015). Genetic deversity of lokal and exotic cattle and their crossbreeding impact on the quality of Indonesia cattle. Departemen of Biology. Fakultas of Mathematics and Natural Science. Universtas Sebelas Maret. *Biodiversitas*, 16(2), 327-354.
- Widi, T. S. M., Udo, H. M. J., Oldenbroek, K., Budisatria, I. G. S., Baliarti, E., & Van der Zijpp, A. J. (2013). Unique cultural values of Madura cattle: is Crossbreeding a threat?. *Animal Genetic Research*, 54, 1-12.
