

Polimorfisme Gen *Oviductal Glycoprotein-1* pada Oviduk Kambing Peranakan Etawa Penderita Kista Ovarium

*(OVIDUCTAL GLYCOPROTEIN-1 GENE POLYMORPHISM
IN THE OVIDUCT OF ETTAWA CROSSBREED GOATS
SUFFERING FROM OVARIAN CYST)*

**Herawati, Febry Sysdityawan Ramadhan,
Dyah Ayu Oktavianie, Yudit Oktanella**

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
Puncak Dieng Eksklusif, Kalisongo, Kecamatan Dau,
Kabupaten Malang, Jawa Timur, Indonesia 65151
Telepon: (0341) 5029152, Email: yuditoktanella@gmail.com

ABSTRAK

Kista ovarium merupakan gangguan yang ditandai dengan adanya pertumbuhan sel-sel pada ovarium membentuk seperti balon yang berisi cairan. *Oviductal Glycoprotein* (OVGP1) disekresikan pada oviduk dan berperan dalam perkembangan embrio awal. Kejadian kista ovarium diduga dapat memengaruhi tingkat ekspresi dari gen OVGP1. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi gen OVGP1 sebagai *biomarker* untuk deteksi kista ovarium pada kambing dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sampel yang digunakan yaitu DNA yang diisolasi dari dua ekor oviduk kambing PE betina normal dan dua ekor kambing dengan kista ovarium folikuler yang diperoleh dari RPH. Identifikasi gen OVGP1 dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer *forward* (OVN1_F) 5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3' dan primer *reverse* (OVN1_R) 5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3'. Sekuensing hasil PCR dilakukan dengan metode *Sanger*. Analisis sekuen gen menggunakan program *Bioedit* dan NCBI BLAST dengan membandingkan sekuen hasil PCR pada kista ovarium folikuler dan normal ovarium dengan gen OVGP1 dari gene bank (NM_001285584.1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dua sampel normal dan dua sampel kista folikuler memiliki kemiripan di atas 90% dengan gen OVGP1 dari genebank NM_001285584.1. Sampel yang mengalami kista ovarium folikuler menunjukkan adanya perubahan susunan basa nukleotida berupa delesi, insersi, transisi dan transversi sehingga memengaruhi susunan asam amino. Susunan asam amino pada sampel yang mengalami kista ovarium folikuler didapatkan adanya peningkatan jumlah proline (P), threonine (T) dan serine (S). Kesimpulannya terdapat perbedaan sekuen gen OVGP1 pada sampel kista ovarium folikuler dibandingkan dengan sampel ovarium normal. Gen OVGP1 berpotensi digunakan sebagai penanda kista ovarium folikuler.

Kata-kata kunci: kambing peranakan etawa (PE); kista ovarium; OVGP1; PCR

ABSTRACT

Ovarian cysts are a disorder characterized by the growth of smooth muscle cells in the ovaries forming like fluid-filled balloons. *Oviductal Glycoprotein* (OVGP1) is secreted in the oviduct and plays a role in early embryonic development. The incidence of ovarian cysts is thought to affect the level of expression of the OVGP1 gene. The purpose of this study was to determine the potent role of OVGP1 gene as biomarker for detection of ovarian cyst on goats by *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method. The samples used were DNA isolated from normal female PE goat oviduct and goat with follicular ovarian cyst obtained from RPH. The OVGP1 gene identification was performed by PCR method using 5'-GACTGCAACCCACACAAGGA-3 forward primer (OVN1_F) and reverse primer (OVN1_R) 5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3'. The sequencing of PCR results is done by *Sanger* method. The gene sequence analysis used the *Bioedit* and NCBI BLAST programs by comparing the PCR sequence on the follicular ovarian cyst and the normal ovary with the OVGP1 gene of the gene bank NM_001285584.1. The

results showed that two normal samples and two samples of follicular cysts had similarities above 90% with OVGP1 gene bank NM_001285584.1. Samples with follicular ovarian cysts indicate a change in nucleotide base sequence due to deletions, insertions, transitions and transversions that affect the amino acid sequence. The arrangement of amino acids on samples with follicular ovarian cysts found an increase in the number of proline (P), threonine (T) and serine (S). In conclusion there is a difference in OVGP1 gene sequences in sample follicular ovarian cysts compared with sample normal ovaries. So the OVGP1 gene potentially can be used as a marker of follicular ovarian cysts.

Keywords: PE goats; ovarian cysts; OVGP1; PCR

PENDAHULUAN

Kambing peranakan etawa (PE) merupakan ternak dwiguna, yang dipelihara untuk menghasilkan susu dan daging. Kambing peranakan etawa memiliki kemampuan menghasilkan susu yang lebih baik dibandingkan dengan kambing lokal lainnya, dengan produksi susu antara 1,0-1,5 L/hari. Berdasarkan data Kementerian Pertanian RI (2017), populasi kambing di Indonesia sebanyak 18.410.379 ekor dan domba 16.462.274 ekor atau total sekitar 34,8 juta ekor. Populasi tersebut bila dibandingkan dengan penduduk Indonesia masih sangat kecil yaitu baru sekitar 13,60% dari jumlah penduduk. Salah satu permasalahan sektor peternakan kambing adalah gangguan pada alat reproduksi. Reproduksi sangat penting dalam bidang peternakan, dan ketika reproduksi terganggu akan memengaruhi sistem peranakannya. Salah satu penyakitnya adalah kista ovarium.

Oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) juga disebut oviductin adalah protein spesifik oviduk dan berperan dalam proses pembuahan. Senyawa OVGP1 telah terbukti diekspresikan secara eksklusif oleh oviduk (Herawati *et al.*, 2017). Namun, baru-baru ini penelitian telah menunjukkan ekspresinya pada beberapa jenis kanker. Pengamatan ini berhipotesis bahwa mungkin OVGP1 memiliki ekspresi ekstra-oviduktal. Di dalam ovarium, OVGP1 dan protein terdeteksi di permukaan epitel, sel granulosa dan korpus luteum. Ekspresi OVGP1 ditemukan kadarnya lebih tinggi pada tahap estrus daripada pada tahap diestrus pada ovarium dan oviduk (Herawati *et al.*, 2018; Saniya, 2017).

Kista ovarium merupakan perbesaran ukuran ovarium normal, folikel de Graf atau korpus luteum atau kista ovarium yang dapat timbul akibat pertumbuhan abnormal dari epitel ovarium. Pada kambing ada empat jenis kista yang sering terjadi yaitu, *para-*

ovarian cyst, follicular cystic ovary, cystic corpus luteum, dan luteal cystic ovary (Karim, 2017). Pada penelitian ini kista ovarium yang digunakan yaitu *follicular cystic ovary*. Gejala klinis hewan yang menderita kista folikel adalah nimfomania (birahi terus-menerus) dalam satu siklus birahi tapi tidak terjadi ovulasi. Hal ini terjadi karena kista yang terbentuk terdiri dari banyak folikel sehingga terjadi akumulasi hormon estrogen dalam darah.

Selama ini pemeriksaan untuk mendeteksi adanya kista folikuler yaitu dengan menggunakan metode ultrasonografi (USG). Kista folikuler dalam gambaran USG bersifat unilocular, mempunyai dinding yang tipis dan gambaran isi kista bersifat *anechoic* karena berisi cairan. Kejadian kista ovarium tidak bisa diduga karena tidak menunjukkan gejala klinis khusus seperti penyakit lainnya dan kebanyakan kasus baru terdeteksi saat kasusnya sudah parah. Tindakan melakukan deteksi secara dini sangat penting untuk dilakukan. Salah satunya dengan menggunakan *screening* secara genetik. Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengurangi presentasi kambing terkena kista ovarium dengan mendeteksi gen OVGP1 sebagai penanda kista ovarium.

METODE PENELITIAN

Sampel Oviduk Kambing

Sampel oviduk dikoleksi dari limbah RPH Sukun, Malang sebanyak empat pasang, dengan kondisi dua pasang mengalami kista ovarium folikuler dan dua pasang ovarium normal. Kualifikasi kista ovarium folikuler adalah ovarium yang pada bagian permukaannya ada bentukan seperti balon yang berisi cairan dan mempunyai diameter lebih dari 1,5 cm (Isnaini *et al.*, 2018). Pada sampel normal tampak adanya folikel folikel pada bagian

permukaan dan masih sesuai dengan ukuran normalnya.

Isolasi DNA

Isolasi DNA dari sampel oviduk kambing menggunakan kit isolasi dari Geneaid yaitu *Genomic DNA mini kit tissue*. Mengikuti protokol untuk isolasi DNA.

Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

Uji kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan mesin Nano-200 Micro-asam nukleat spektrofotometer. Blanko yang digunakan yaitu TE Buffer yang diperoleh dari kit geneaid, TE buffer diteteskan langsung di atas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1 μ L, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutupkan. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 260 nm dan 280 nm menggunakan volume sampel 1 μ L.

Uji kualitas hasil isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen OVGP1. Uji kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan mesin Mupid-Exu *Electrophoresis*. Cetakan agarose dibersihkan dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 30 mL dan gel agarosa 1% (0,3 g). Elektroforesis dilakukan menggunakan 100 volt selama 35 menit. Setelah elektroforesis, gel dipindahkan ke rak UV-transilluminator untuk dapat dianalisis dengan menggunakan Gel doc Imaging, Biorad® USA (Gati, 2012).

Desain Primer

Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) didesain menggunakan NCBI *Genebank*: NM_001285584.1. Primer *forward* dan primer *reverse* didapatkan melalui *primer3plus* dengan menggunakan data NM_001285584.1 dengan 1952 bp DNA linear. Sepasang sekuen primer yang didapatkan adalah primer *forward* (OVN1_F) 5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3' (*start*: 1347; *length*: 20 bp; *Tm*: 59,3°C; *GC*: 55%) dan primer *reverse* (OVN1_R) 5'-GAGAGCAG CACCCACTTTTC-3' (*start*: 1695; *length*: 20 bp; *Tm*: 59,1°C; *GC*: 55%).

Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sampel DNA dari kambing betina

diampifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (OVN1_F) dan *reverse* (OVN1_R). Amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1 μ L DNA, 1 μ L primer *forward* 10 pmol, 1 μ L primer *reverse* 10 pmol, 5 μ L PCR mix dan 2 μ L ddH₂O ke dalam mikrotube 200 μ L. Tahapan amplifikasi disajikan pada Tabel 3.

Uji Kualitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA. Untuk memvisualisasikan produk PCR gen OVGP1 dari organ oviduk kambing PE betina, kemudian dilanjutkan dengan *running* elektroforesis gel agarosa. Produk PCR tersebut dipipet ke dalam sumuran gel agarosa 2% dengan TBE 1x dan digunakan voltase 100 v, selama 30 menit. Data kualitas DNA hasil elektroforesis dianalisis dan didokumentasikan dengan UV-*transilluminator scanner*.

Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen OVGP1 dilakukan secara dua arah yaitu dengan menggunakan primer OVN1_F 10 pmol dan OVN1_R 10 pmol untuk melihat sekuen Gen OVGP1 sebesar 393 bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *dye terminator*. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs.

Analisis Data

Analisis data yang digunakan yaitu NCBI Blast, Bioedit dan MEGA 7.0. Melalui program NCBI Blast dapat diketahui persentase homologi dan variasi molekuler pada isolat sampel berupa SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) seperti insersi, delesi, maupun substitusi (transisi atau transversasi) dengan mensejajarkan hasil sekuen keempat sampel dengan dengan database NCBI *Genebank*: NM_001285584.1. Penyejajaran menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment*. Analisis lanjutan terhadap variasi molekuler isolat sampel adalah dengan menggunakan program Bioedit untuk melihat jenis mutasi yang terjadi, jenis asam amino yang dihasilkan dan posisi nukleotida yang mengalami mutasi pada isolat sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA dari Sampel Oviduk Kambing PE

Isolasi DNA sampel oviduk dilakukan dengan menggunakan Genomic DNA Mini Kit Tissue sesuai dengan prosedur. Hasil yang didapatkan berupa DNA total yang selanjutnya dilakukan uji kuantitas dan kualitas. Uji kuantitas dengan menggunakan mesin UV-Vis spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Senyawa DNA total hasil dari isolasi tersebut (Tabel 1.) selanjutnya digunakan untuk proses amplifikasi gen OVGP1 dari kambing PE betina dengan teknik PCR untuk mengetahui sekuen gen OVGP1 dari normal ovarium dan kista ovarium folikuler.

Berdasarkan hasil uji kuantitas tersebut diketahui bahwa keempat sampel dari kambing PE betina memiliki tingkat kemurnian yang baik yaitu masih dalam rentang 1,8-2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/ μ L. Menurut Fatchiyah (2011), nilai kemurnian DNA diukur pada λ 260/ λ 280 dan nilai konsentrasi DNA. DNA berkualitas baik apabila nilai OD 1,8-2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/ μ L.

Hasil gel elektroforesis agarose 1% disajikan pada Gambar 1. Hasil gel elektroforesis 1% menunjukkan adanya *band* di atas marker 10.000 bp, hal ini menunjukkan bahwa DNA total memiliki ukuran di atas 10.000 bp.

Tabel 1. Konsentrasi dan kemurnian DNA total kambing peranakan etawa (PE) betina

Sampel	Konsentrasi ng/ μ L	Kemurnian (260/280)
N2	308,35	1,94
NN1	190,53	1,91
AA2	254,90	1,87
AA3	223,32	1,81

Keterangan : N2: normal 1, NN1: normal 2, AA2: kista ovarium folikuler 1, AA3: kista ovarium folikuler 2

Amplifikasi Gen OVGP1 dengan Metode PCR

Amplifikasi gen OVGP1 dilakukan untuk memperbanyak fragmen gen OVGP1 sebelum dilakukan sekuensing sehingga dapat digunakan untuk mengetahui sekuen gen OVGP1 kambing PE betina dengan ovarium normal dan yang menderita kista ovarium folikuler. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen OVGP1 diambil dari *genebank* dengan nomor sekuen NM_001285584.1 dan didesain menggunakan program primer3plus (Tabel 2) Metode PCR yang digunakan pada penelitian ini meliputi tahap pradenaturasi, denaturasi, *annealing*, *extension* dan *post extension* (Tabel 3).

Hasil produk PCR dilakukan uji kualitatif dengan agarose 2% adalah pita DNA gen OVGP1 dengan ukuran 393 bp sesuai dengan target. Hasil dari elektroforesis agarose 2% dari produk PCR gen OVGP1 disajikan pada Gambar 2.

Hasil Analisis Sekuen Gen OVGP1

Hasil sekuensing berupa grafik, menunjukkan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA. Keempat sampel dimasukkan ke dalam program NCBI BLAST untuk penyejajaran hasil sekuensing dengan *genebank* NCBI NM_001285584.1. Hasil penyejajaran tersebut untuk melihat kesejajaran pada basa sampel dengan database NCBI (Gambar 3).

Hasil penyejajaran sekuensing keempat sampel dihomogenkan dengan database *genebank* NCBI didapatkan adanya delesi pada semua sampel, yaitu pada nukleotida ke-1402 sampai 1404, sedangkan untuk insersi ditemukan pada semua sampel nukleotida ke-1617 sampai 1619. Adanya transisi untuk semua sampel (C-T) nukleotida ke-1504, transisi pada sampel AA2 dan AA3 nukleotida ke-1547 (T-C), ke 1621-1622 (T-C), ke-1624 (G-A) dan ke-1628 (T-C) dan transisi pada sampel AA2 nukleotida ke-1636 (G-A). Ditemukan adanya transversi pada sampel AA2 dan AA3 nukleotida ke-1456 (T-A), ke-1625 (A-C), ke-1627 (C-A), ke-1629 (C-A), ke-1635 (T-A), transversi pada sampel AA3 nukleotida ke 1636-1637 (G-C) dan

Tabel 2. Urutan nukleotida primer gen OVGP1 kambing peranakan etawa (PE)

Primer	Urutan sekuens nukleotida
Forward (OVN1_F)	5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3'
Reverse (OVN1_R)	5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3'

Penelitian oleh Anwar (2007) menganalisa protein yang berasal dari cairan kista ovarium, kemudian dianalisis kadar asam aminonya, ternyata yang mendominasi adalah proline (P), threonine (T) dan serine (S). Secara spesifik pada kista ovarium folikuler belum pernah dilakukan penelitian terkait kandungan asam amino yang mendominasi. Serine dan threonine merupakan salah satu faktor pertumbuhan dan pematangan folikel-folikel di ovarium, saat dibuahi ekspresinya akan berkurang (Han-li *et al.*, 2017). Proline berperan penting dalam perkembangan jaringan kolagen di ovarium dan kolagen merupakan penyusun utama dinding ovarium (Sinjai, 2010). Kejadian kista ovarium folikuler akan menyebabkan adanya benjolan pada korteks ovarium dan terjadi penumpukan kolagen stroma ovarium sebagai dasar permukaan epitel yang terkait dengan kista ovarium folikuler (Marisa *et al.*, 2009). Adanya penumpukan kolagen di ovarium menyebabkan peningkatan jumlah proline, karena proline berperan dalam perkembangan kolagen di ovarium.

SIMPULAN

Hasil sekuens gen OVGP1 pada sampel kista ovarium folikuler yang dibandingkan dengan sampel ovarium normal menunjukkan adanya polimorfisme basa nukleotida. Berdasarkan hasil penelitian ini maka polimorfisme pada sekuens basa nukleotida gen OVGP1 berpotensi digunakan sebagai penanda kista ovarium folikuler.

SARAN

Gen OVGP1 memiliki panjang basa 1952bp namun target potongan pita pada penelitian ini tidak mencakup seluruh *active site* dari gen OVGP1, maka dari itu perlu dilakukan eksplorasi lebih lanjut terkait regio *active site* gen OVGP1 untuk memperoleh nilai polimorfisme total.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan riset yang didanai oleh Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia melalui program Penelitian Desentralisasi. Terima kasih kepada Institut

Biosains dan Laboratorium *Animal Disease Diagnostic*, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya Malang yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Fatchiyah EL, Arumningtyas S, Widyarti, Permana S. 201. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Malang. Erlangga. Hlm. ?
- Gati W. 2012. *Metode Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa*. Surabaya. Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan Surabaya.
- Han-Li, Ri-Cheng. 2017. *Follicular Development and Oocyte Growth*. Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes. Springer International Publishing AG.
- Herawati, Oktanella Y, Firmawati A, Isnaini N. 2017. Comparing Oviductal Expression During Oestrous Cycle of Epithelial Oviductin (OVGP1) in Peranakan Ettawah (PE) Goat. Banda Aceh, Indonesia. Proceedings the 7th AIC-ICMR on Health and Life Sciences, Syiah Kuala University.
- Herawati, Oktanella Y, Isnaini N. 2018. Profiling Glycoprotein of epithelial cell of oviduct at two stages estrous cycle on Peranakan Ettawah (PE) Goat. *International Journal of Chemtech Research* 11: 177-182.
- Isnaini N, Oktanella Y, Herawati. 2018. Identification of TGF β -1 receptor expression in abnormal ovary: the case of ovarian hypofunction. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* 20: 208-213.
- Karim MR, Faraidoon A, Muhammad S. 2017. *Gross and Histopathological Study of The Genitalia In Goats: 1. Ovaries*. *J Vet Sci Med* 5(1): 4.
- Kementerian Pertanian RI. 2017. *Statistik Peternakan Dan Kesehatan Hewan*. Jakarta. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan.
- Marisa R, Esther O. 2009. *Gynecologic Pathology. Sex Cord-Stromal Tumor of the Ovary*. Churchill Livingstone. Elsevier. Chapter 15. Hlm. 643-707.

Saniya L. 2017. Extra-Ovidukal Expression of Ovidukal Glycoprotein 1 in Mouse: Detection in Testis, Epididymis and Ovary. *J Biosci* 42(1): 69–80.

Sinjai H. 2010. Kandungan vitamin C pada ovarium ikan lele saat siklus reproduksi. *Jurnal Perikanan dan Kelautan Tropis* 6(3): 120-124