

# Keragaman Grup Gen Hormon Pertumbuhan (GH, GHR, GHRH dan Pit-1) dan Hubungannya dengan Respon Superovulasi, Tingkat Ovulasi, Tingkat Fertilisasi dan Kualitas Embrio Sapi di Balai Embrio Ternak (BET) Cipelang

CECE SUMANTRI<sup>1</sup>, M. IMRON<sup>2</sup>, SUGYONO<sup>2</sup>, E. ANDREAS<sup>3</sup>, R. MISRIANTI<sup>3</sup> dan A.B.L. ISHAK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2</sup>Balai Embrio Ternak, Cipelang

<sup>3</sup>Mayor Ilmu Produksi Ternak, Sekolah Pascasarjana, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

(Diterima Dewan Redaksi 17 Maret 2011)

## ABSTRACT

SUMANTRI, C., M. IMRON, SUGYONO, E. ANDREAS, R. MISRIANTI and A.B.L. ISHAK. 2011. Growth hormone gene family (GH, GHR, GHRH and Pit-1) polymorphisms and its association with superovulation response, ovulation rate, fertilization rate and embryo quality in Embryo Transfer Station (BET) of Cipelang. *JITV* 16(2): 126-139.

The decrease in fertility is considered to be the main cause of reproductive loss in dairy cattle and beef industry. Many candidate genes that play an important role in fertility and embryonic development. The purpose of this study was to detect genetic variations of the growth hormone gene family (GH|*MspI*, GH|*AluI*, GHR|*AluI*, GHRH|*HaeIII* and Pit-1|*HinfI*) and its association with superovulation response, ovulation, fertilization and transferable embryos rate. A total of 45 blood samples taken from cows that have been superovulated Angus, Brahman, HF, Limousin and Simmental. DNA was extracted with phenol-chloroform protocol followed by polymerase chain reaction technique (PCR) using specific primers for GH, GHR, GHRH and Pit-1 gene. PCR product was cut with restriction enzyme *MspI*, *AluI*, *HaeIII* and *HinfI* and electrophoresed on agarose gel and stained with ethidium bromide (EtBr). Superovulation is done by injecting a totally of 20 ml FSH for 4 days. Injecting the prostaglandin hormone (PGF2 $\alpha$ ) was performed on the eleventh day of CIDR implantation. Artificial insemination (AI) performed two or three days after the injection of PGF2 $\alpha$  and Flushing was done on the seventh day after the AI. The results showed that the Angus, Limousin, Brahman and Simental GH loci diversity of GH|*MspI*, GH|*AluI*, GHR|*AluI*, GHRH|*HaeIII* and Pit-1|*HinfI* was not associated with superovulation response, ovulation, fertilization and transferable embryo rate. In HF dairy cattle, genotype on Pit-1|*HinfI* AA has higher percentage of superovulation response ( $P < 0.05$ ) when compared to AB genotype, but did not differ to BB genotype. Dairy cattle HF AA genotype also had higher ovulation rate ( $P < 0.05$ ) when compared to AB and BB genotypes, but AB and BB have the same ovulation rate.

**Key Words:** Polymorphisms, Growth Hormone Genes, Reproduction Traits

## ABSTRAK

SUMANTRI, C., M. IMRON, SUGYONO, E. ANDREAS, M. RESTU dan A.B.L. ISHAK. 2011. Keragaman grup gen hormon pertumbuhan (GH, GHR, GHRH dan Pit-1) dan hubungannya dengan respon superovulasi, tingkat ovulasi, tingkat fertilisasi dan kualitas embrio sapi di Balai Embrio Ternak (BET) Cipelang. *JITV* 16(2): 126-139.

Penurunan daya reproduksi menjadi penyebab utama kerugian pada industri sapi perah dan pedaging. Banyak gen kandidat yang berperan penting dalam fertilitas dan perkembangan embrio. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi variasi genetik dari grup gen hormon pertumbuhan (GH|*MspI*, GH|*AluI*, GHR|*AluI*, GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI*) dan hubungannya dengan respon superovulasi, tingkat ovulasi, tingkat fertilisasi dan embrio layak transfer pada berbagai bangsa sapi. Sebanyak 45 sampel darah diambil dari sapi yang telah disuperovulasi yaitu Angus, Brahman, FH, Limousin dan Simmental. DNA diekstraksi dengan fenol-kloroform protokol dan dilanjutkan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dengan menggunakan primer spesifik untuk GH, GHR, GHRH dan Gen Pit-1. Produk PCR dipotong dengan enzim restriksi *MspI*, *AluI*, *HaeIII* dan *HinfI* dan dielektroforesis pada gel agarose dengan pewarnaan Etidium Bromida (EtBr). Superovulasi dilakukan dengan menyuntikan total 20 ml FSH selama 4 hari pagi dan sore berturut-turut dengan dosis menurun. Penyuntikan hormon prostaglandin (PGF2 $\alpha$ ) dilakukan pada hari kesebelas implantasi CIDR. Inseminasi Buatan (IB) dilakukan dua atau tiga hari setelah penyuntikan PGF2 $\alpha$  Flushing dilakukan pada hari ketujuh setelah IB. Hasil menunjukkan pada bangsa sapi Angus, Limousin, Brahman dan Simental keragaman lokus GH|*MspI*, GHR|*AluI*, GHRH|*HaeIII*, Pit-1|*HinfI* dan GH|*AluI* tidak berasosiasi dengan respon superovulasi (RS), tingkat ovulasi (TO), persentase tingkat fertilisasi (TF) dan persentase embrio layak transfer (ELT). Pada sapi FH bergenotipe Pit-1|*HinfI* AA mempunyai persentase respon superovulasi (RS) yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan genotipe AB, tetapi tidak berbeda dengan genotipe BB. Sapi FH bergenotipe AA juga mempunyai tingkat ovulasi lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan genotipe AB dan BB, tetapi AB dan BB mempunyai tingkat ovulasi yang sama.

**Kata Kunci:** Keragaman, Gen Hormon Pertumbuhan, Sifat Reproduksi

## PENDAHULUAN

Kematian embrio merupakan kegagalan utama dalam reproduksi, terutama pada sapi akan mengakibatkan tertundanya kebuntingan, menurunnya kelahiran anak, penurunan produksi susu, memperlambat kemajuan seleksi dan secara ekonomik mengakibatkan kerugian yang besar. BILODEAU-GOESELS dan KASTELIC (2003) menyatakan sebagian besar kegagalan dalam kebuntingan disebabkan oleh kematian pada tahap embrional, penyebab utama diantaranya faktor ketidakseimbangan komposisi hormonal dalam cairan folikel yang mengakibatkan menurunnya kualitas oosit. Produksi embrio secara *in vivo* dan *in vitro* merupakan salah satu alternatif untuk meningkatkan populasi secara cepat pada sapi. Produksi embrio secara *in vivo* mempunyai kualitas yang lebih baik bila dibandingkan dengan *in vitro* seperti jumlah sel, morfologi, kemampuan tumbuh kembang, dan ketahanan setelah pembekuan (BONI *et al.*, 1999). Frekuensi kejadian abnormalitas kromosom pada embrio hasil *in vivo* lebih rendah dari *in vitro* (DE LOOS *et al.*, 1992), konsekuensinya hanya 30-40% dari oosit hasil maturasi *in vitro* berkembang menjadi blastosis setelah di fertilisasi *in vitro* (LONERGAN, 2007), dan tingkat kebuntingan embrio hasil *in vitro* lebih rendah bila dibandingkan dengan *in vivo* (PETER *et al.*, 2009). Superovulasi sudah umum digunakan dalam produksi embrio secara *in vivo* terutama di industri peternakan sapi, dengan tujuan memproduksi embrio layak transfer secara massal dan menghasilkan keturunan yang sehat. Keberhasilan superovulasi sangat tergantung pada perkembangan oosit selama pertumbuhan folikel (SIRARD *et al.*, 2006). Faktor yang dapat mengatur pertumbuhan folikel dan pertumbuhan embrio diantaranya *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) dilaporkan oleh (DISKIN *et al.*, 2003; FORTUNE, 2003; WOLF *et al.*, 2003; dan WEBB *et al.*, 2004). Kualitas oosit dan embrio hasil superovulasi pada ruminansia sangat tergantung pada konsentrasi IGF-1 (O'CALLAGHAN *et al.*, 2000; VELAZQUEZ *et al.*, 2005). Konsentrasi IGF1 pada cairan folikel pada sapi superovulasi dapat meningkatkan jumlah embrio secara *in vivo* (CUSHMAN *et al.*, 2001). JOUSAN dan HANSEN (2007) dan BLOCK *et al.* (2008) menyatakan penambahan (IGF-1) ke dalam kultur medium, sangat berperan penting dalam peningkatan prosentase blastosis dan ketahanan embrio pada cekaman panas dan meningkatkan kebuntingan pada sapi laktasi.

Pengaruh genetik terhadap performa reproduksi telah dilaporkan KHATIB *et al.* (2008) keragaman pada gen *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) SNP11646 tidak berpengaruh terhadap laju fertilisasi tetapi berpengaruh nyata pada daya hidup embrio. Embrio bergenotipe GG mempunyai daya hidup lebih tinggi bila dibandingkan dengan yang bergenotipe AG dan AA (37 vs 28 dan

29%). Hal yang sama dilaporkan WANG *et al.* (2009) *Fibroblast growth factor 2* (FGF-2) berperan penting dalam pengaturan fertilisasi dan pertumbuhan embrio sebelum implantasi. Oosit yang mengalami mutasi (23G>T dan 11646A>G) yaitu alel T menyebabkan terjadi penurunan laju fertilisasi sehingga embrio bergenotipe TT sangat jarang ditemukan pada populasi sapi FH. KHATIB *et al.* (2007) menyatakan gen *signal transducer and activator of transcription 5A* (STAT5A) sangat berpengaruh terhadap sifat-sifat reproduksi, variasi pada SNP153137 (G/C) dalam ekson 8 dari STAT5A berhubungan langsung secara nyata dengan laju fertilisasi dan daya hidup blastosis. Selanjutnya KHATIB *et al.* (2009) melaporkan single-SNP analisis menunjukkan hubungan yang signifikan secara statistik antara SNP25402 STAT3 dengan laju fertilisasi. Oosit yang dihasilkan dari ovarium dengan genotipe AA menunjukkan laju fertilisasi masing-masing 70,1 vs 66,6 dan 66,3% bila dibandingkan dengan oosit bergenotipe AC dan CC. Interaksi antara genotipe SNP25402 dengan SNP19069 sangat nyata berpengaruh terhadap daya hidup blastosis tetapi tidak berpengaruh terhadap laju fertilisasi. DRIVER *et al.* (2009) melaporkan keragaman pada gen reseptor progesterone (PGR), yaitu mutasi G ke C (G/C) dalam intron SNP 3 berpengaruh terhadap laju fertilisasi dan daya hidup embrio. Oosit yang berasal dari ovarium bergenotipe CC menunjukkan tingkat fertilisasi 61% lebih rendah bila dibandingkan dengan genotipe GC (68%) dan GG (69%), oosit dari ovarium bergenotipe GG mempunyai tingkat daya hidup embrio lebih tinggi 5 dan 6% dari pada oosit dari ovarium bergenotipe GC dan CC. Hasil ini menunjukkan bahwa PGR SNP dapat digunakan dalam program seleksi *marker-assisted* untuk sifat reproduksi pada sapi perah Holstein. *Growth Differentiation Factors-9* (GDF-9) merupakan gen pengontrol yang esensial dibutuhkan dalam perkembangan folikel. GDF-9 menstimulus protein pada proses perkembangan folikel primordial dan folikel primer sampai pengaturan sel granulosa dan sel teka (HANRAHAN, 2004). *Bone morphogenetic protein 15* (BMP-15) adalah sebuah faktor pertumbuhan dan anggota dari TGF $\beta$  superfamili yang mempunyai ekspresi yang spesifik terhadap oosit. BMP-15 domba berada pada kromosom X (GALLOWAY *et al.*, 2000). BMP-15 mengatur proliferasi sel granulosa dan diferensiasi oleh mitosis sel granulosa, menahan ekspresi folikel stimulating hormon, dan menstimulasi ekspresi kit ligand, semua pengaturan yang penting dari fertilitas betina mamalia (OTSUKA *et al.*, 2000; JUENGL *et al.*, 2002; MOORE dan SHIMASAKI, 2005). Mutasi *FecX<sup>G</sup>* pada BMP-15 berasosiasi dengan peningkatan ovulasi dan sterilitas pada domba Cambridge dan Belclare (HANRAHAN *et al.*, 2004).

Gen hormon pertumbuhan (GH) mempunyai peranan yang sangat penting pada proses reproduksi

pada mamalia (HULL dan HARVEY, 2001). Pada sapi gen GH sudah ditranskripsikan pada tahap oosit dan tahap embrio (MARTAL *et al.*, 1997), dan gen hormon pertumbuhan reseptor (GHR) berperan dalam pertumbuhan preimplantasi (IZADYAR *et al.*, 2000). Beberapa mutasi titik pada gen GH Leu127Val pada embrio sapi sudah dilaporkan oleh (MURPHY *et al.*, 2008). Informasi pengaruh gen pada aspek reproduksi terutama masalah kualitas embrio untuk kondisi di Indonesia masih dirasakan sangat kurang. Penelitian tentang pengaruh induk bergenotipe tertentu pada grup gen hormon pertumbuhan seperti (GH, GHR, GHRH dan Pit-1) pada performa reproduksi seperti respon superovulasi, tingkat ovulasi, tingkat fertilisasi dan persentase embrio layak transfer sangat perlu dilakukan terutama pada sapi lokal maupun sapi impor pada kondisi lingkungan Indonesia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan informasi tentang kandidat gen untuk seleksi perbaikan kualitas embrio di Indonesia.

## MATERI DAN METODE

### Pengambilan sampel darah

Sampel darah diambil dari sapi yang telah disuperovulasi. Sampel yang digunakan sebanyak 45 ekor sapi terdiri atas bangsa Angus (5), Brahman (5), FH (9), Limousin (13) dan Simmental (13) dari Balai Embrio Ternak Cipelang (BET). Pengambilan sampel darah sebanyak 2 ml dilakukan melalui *vena jugularis* dengan menggunakan jarum *venoject* dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* dan ditambahkan 4 ml etanol 95%, kemudian disimpan pada suhu kamar.

### Ekstraksi DNA

DNA diisolasi menggunakan metode fenol kloroform (SAMBROOK dan RUSSELL, 2001). Sebanyak 45 sampel darah total yang disimpan dalam etanol 95% disentrifugasi 3500 rpm selama 5 menit. Endapan dicuci dengan buffer TE kemudian disuspensikan dengan 1xSTE dan dilisis dengan 20 µl proteinase K (10 mg/ml) dan 40 µl 10% SDS. Pemurnian DNA dengan menambahkan 1/10 volume 5 M NaCl, 1 x volume larutan fenol, dan 1 x volume kloroform:isoamil alkohol (24:1), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 5 menit. Molekul DNA diendapkan dengan menambahkan 1/10 x volume 5 M NaCl dan 2 x volume etanol absolut. Endapan DNA dicuci dengan etanol 70% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit dan DNA selanjutnya dilarutkan dengan 80 µl *buffer* TE 80%.

### Identifikasi keragaman gen GH|*MspI*, GH|*AluI*, GHR|*AluI*, GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI*

Amplifikasi DNA dilakukan pada total volume 25 µl terdiri dari 2 µl (10-100 ng) DNA, 15,75 µl air bebas ion steril; 2,5 µl 10 × buffer tanpa Mg<sup>2+</sup>; 2 µl MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µl 10mM dNTP; 0,25 µl *Taq* polimerase; 2 µl (25 pmol) primer. Tahap I dilakukan dengan 1 x siklus, meliputi proses denaturasi awal pada suhu 94°C selama 4 menit. Tahap II dilakukan dengan 30 x siklus, meliputi denaturasi pada suhu 94°C selama 10 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 60°C masing-masing untuk primer GH|*AluI* GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI* dan pada suhu 62°C untuk primer GH|*MspI* dan GHR|*AluI* selama 1 menit, pemanjangan molekul DNA pada suhu 72°C selama 2 menit. Tahap III dilakukan dengan 1 x siklus, meliputi pemanjangan akhir molekul DNA pada suhu 72°C selama 7 menit. Inkubasi pada 4°C hingga digunakan untuk analisis lebih lanjut. Informasi primer yang digunakan pada penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 1.

Produk PCR selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi yang spesifik dengan gen tersebut. Enzim restriksi yang digunakan untuk gen GH, GHR, GHRH dan Pit-1 secara berurutan yaitu *MspI*, *AluI*, *HaeIII* dan *HinfI*. Enzim restriksi *MspI* mengenali situs restriksi C\*CGG, enzim *AluI* mengenali situs restriksi AG\*CT, sedangkan enzim restriksi *HaeIII* dan *HinfI* masing-masing mengenali situs GG\*CC dan G\*ANTC. Sebanyak 2 µl produk PCR dicampur dengan 1 sampai 2 unit enzim restriksi dalam 1xBufer (New England Biolabs) dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama minimal 4 jam. Visualisasi pola pita hasil RFLP menggunakan elektroforesis gel agarose 2% w/v dalam 0,5 x TBE dan diwarnai dengan Etidium Bromida.

### Produksi embrio *in vivo*

Sebanyak 32 ekor sapi donor terdiri atas bangsa Angus, Brahman, FH, Limousin dan Simmental, masing-masing 3, 3, 9, 10 dan 8 ekor digunakan untuk memproduksi embrio *in vivo*. Seleksi dilakukan dengan cara palpasi rektal calon donor untuk diperiksa status reproduksinya dalam kondisi sehat dan tidak dalam kondisi bunting, selanjutnya dilakukan implantasi CIDR secara transvaginal (hari ke-0). Superovulasi dilakukan dengan menyuntikkan hormon FSH (*Foltropin*) pagi dan sore selama 4 hari berturut-turut dengan dosis menurun sebagai berikut: (4-4, 3-3, 2-2, dan 1-1 ml). Penyuntikan FSH dimulai pada hari ke-9 setelah pemasangan CIDR. Pada hari kesebelas diberikan penyuntikan hormon Prostaglandin (PGF<sub>2</sub>α). Pada hari ke-12 CIDR dikeluarkan dari vagina sapi donor. Inseminasi Buatan (IB) dilaksanakan pada hari ketiga

**Tabel 1.** Informasi sekuen primer yang digunakan dalam penelitian

Lokus	Sekuen primer	Annealing	Pustaka
GH  <i>MspI</i>	F: 5'-CCCACGGGCAAGAATGAGGC-3' R: 5'-TGAGGAAGTGCAGGGGCCCA-3'	62 °C	MITRA <i>et al.</i> (1995)
GH  <i>AluI</i>	F: 5'-CGGACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAG-3' R: 5'-GTTCTTGAGCAGCGCTCGTCA-3'	60 °C	BALOGH <i>et al.</i> (2008)
GHR  <i>AluI</i>	F: 5'-CGCTTACTTCTGCGAGGTAGACGC-3' R: 5'-GTCTGTGCTCACATAGCCAC-3'	62 °C	ANDREAS <i>et al.</i> (2010)
GHRH  <i>HaeIII</i>	F: 5'-TGAAGGATGCTGCTCTGGGT-3' R: 5'-TGCCTGTTCATGATATCCTGGA-3'	60 °C	MOODY <i>et al.</i> (1995)
Pit1  <i>HinfI</i>	F: 5'-AAACCATCATCTCCCTTCTTCT-3' R: 5'-AATGTACAATGTGCCTTCTTCTG-3'	60 °C	WOLLARD <i>et al.</i> (1994)

belas dan empat belas (48-72 jam) setelah pemberian PGF<sub>2</sub> $\alpha$  atau setelah donor tersebut memperlihatkan gejala berahi. IB dilakukan sebanyak tiga kali (pagi, sore dan pagi). Flushing dilakukan pada hari ketujuh setelah estrus/IB pertama, media flushing (Lactated Ringer + Calf serum 20% + Antibiotik). Epidural anestesi dilakukan sebelum di flushing dengan cara menyuntikan 2-5 ml Lidocaine HCl 2% atau Xylocaine 2% diantara tulang sakral-tulang ekor I atau diantara tulang ekor I-II. Evaluasi embrio dilakukan menurut kriteria (GORDON, 1994) berdasarkan morfologi embrio dengan melihat permukaan/dinding zona pellucida yang rata, kebeningan warnanya, kekompakan sel, banyaknya sel yang mengalami degenerasi. Embrio diklasifikasikan ke dalam klas A, B, C, D dan degeneratif embrio layak transfer hanya klas A, B dan C. Pengulangan superovulasi pada individu yang sama dilakukan 2 sampai 5 kali dengan jarak 1 sampai 2 bulan. Keberhasilan superovulasi ditunjukkan dengan jumlah embrio dan ovum  $\geq 2$  per flushing per ekor.

#### Parameter embrio *in vivo* yang diamati

Parameter embrio *in vivo* yang diamati dalam penelitian ini meliputi:

1. Respon superovulasi (RS) merupakan persentase keberhasilan superovulasi per ekor yang dihitung berdasarkan jumlah berapa kali respon dari total perlakuan superovulasi (SO) pada individu yang sama dikalikan 100% ( $(\Sigma \text{ respon superovulasi} / \Sigma \text{ total perlakuan superovulasi}) \times 100\%$ ).
2. Tingkat ovulasi (TO) dihitung berdasarkan jumlah sel telur tak terbuahi dan embrio yang dihasilkan per ekor per respon superovulasi ( $(\Sigma \text{ sel telur tak terbuahi} + \Sigma \text{ total embrio}) / \text{respon superovulasi}$ ).

3. Persentase tingkat fertilisasi (TF) dihitung berdasarkan jumlah embrio dibagi dengan jumlah embrio dan sel telur tak terbuahi yang dihasilkan per ekor per respon superovulasi ( $(\Sigma \text{ embrio} / (\Sigma \text{ embrio} + \Sigma \text{ sel telur tak terbuahi})) \times 100\%$ ).
4. Persentase embrio layak transfer (ELT) dihitung berdasarkan jumlah embrio tahap blastosis kualitas ABC dibagi dengan jumlah embrio yang dihasilkan per ekor per respon superovulasi [ $(\Sigma \text{ blastosis berkualitas ABC} / \Sigma \text{ embrio}) \times 100\%$ ].

#### Analisis data

Analisis data molekuler lokus GH|*MspI*, GH|*AluI*, GHR|*AluI*, GHRH|*HaeIII* dan Pit-1|*HinfI* pada populasi sapi di BET meliputi frekuensi alel, keseimbangan Hardy-Weinberg, nilai heterosigositas meliputi heterosigositas pengamatan ( $H_o$ ) dan heterosigositas harapan ( $H_e$ ).

#### Frekuensi alel

Frekuensi alel untuk setiap lokus dihitung menurut NEI dan KUMAR (2000) dengan formula sebagai berikut:

$$x_1 = \frac{(2N_{11} + N_{12})}{2N}$$

Keterangan:

$x_1$  = frekuensi alel ke-1,

$N_{11}$  = jumlah genotipe  $A_1A_1$

$N_{12}$  = jumlah genotipe  $A_1A_2$

#### Keseimbangan Hardy-Weinberg

Keseimbangan Hardy-Weinberg diuji dengan *chi-square* ( $\chi^2$ ) menurut HARTL (1988), sebagai berikut:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Keterangan:

$\chi^2$  = nilai chi-square uji

$O_i$  = jumlah pengamatan genotipe ke-i

$E_i$  = jumlah harapan genotipe ke-i

### Nilai heterozigositas pengamatan ( $H_o$ )

Nilai heterosigositas teramati ( $H_o$ ) dan heterosigositas harapan ( $H_e$ ) dapat digunakan untuk menduga nilai koefisien *inbreeding* pada suatu kelompok ternak. Perhitungan nilai  $H_o$  dan  $H_e$  dilakukan menurut HARTL (1988) dengan formula sebagai berikut:

$$H_o = \frac{\sum_{i \neq j} N_{ij}}{N}$$

Keterangan:

$H_o$  = heterosigositas pengamatan

$N_{ij}$  = jumlah individu heterosigot pada lokus ke-1

$N$  = jumlah individu yang diamati

### Hubungan bangsa dan genotipe dengan parameter produksi embrio *in vivo*

Hubungan antara bangsa yang memiliki genotipe yang sama dengan nilai rata-rata parameter respon super ovulasi, tingkat ovulasi, tingkat fertilisasi dan kualitas embrio layak transfer dianalisis menggunakan model analisis ragam (KHATIB *et al.*, 2009) dengan model matematika sebagai berikut:

$$\text{Log } e(Y_{ijk}) = \mu + \beta_i + \gamma_j + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan:

$\text{Log } e(Y_{ijk})$  = nilai logaritma alami dari pengamatan pada bangsa ke-i, genotipe ke-j dan ternak ke-k

$\mu$  = nilai rata-rata tengah

$\beta_i$  = nilai pengaruh tetap bangsa ke-i

$\gamma_j$  = nilai pengaruh tetap dari genotipe ke-j

$\varepsilon_{ijk}$  = nilai galat pengamatan

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Keragaman lokus *GH|MspI*, *GHR|AluI*, *GHRH|HaeIII* *Pit-1|HinfI* dan *GH|AluI* pada sapi Angus, Brahman, FH, Limousin dan Simental

Hasil visualisasi PCR-RFLP lokus *GH|MspI*, *GHR|AluI*, *GHRH|HaeIII*, *Pit-1|HinfI*, dan *GH|AluI* masing-masing diperlihatkan pada Gambar (1, 2, 3, 4 dan 5). Frekuensi genotipe *GH|MspI*, *GHR|AluI*,

*GHRH|HaeIII*, *Pit-1|HinfI*, dan *GH|AluI* diperlihatkan pada Tabel 2 dan frekuensi alelnya pada Tabel 3. Lokus *GH|MspI* bersifat monomorfik pada sapi Angus dan Simental dengan genotipe ++ (100%) dan polimorfik pada sapi Brahman, FH dan Limousin dengan genotipe +/- masing-masing (20,0; 11,1 dan 46,2%). Rata-rata total alel GH (+) untuk kelima bangsa sebesar (0,72) dengan nilai  $\chi^2$  (11,32) nyata menunjukkan adanya ketidak setimbangan gen GH (+) populasi dan rata-rata total heteroigositas (0,20). Tingginya frekuensi alel GH (+) ini juga ditemukan pada beberapa populasi sapi perah (FALAKI *et al.*, 1996; LAGZIEL *et al.*, 2000). Keragaman pada lokus *GH|MspI* dapat digunakan untuk mengetahui pola distribusi alel antara bangsa sapi tidak berpunuk (*Bos taurus*) dan bangsa sapi berpunuk (*Bos indicus*). Pada bangsa sapi *Bos indicus*, dijumpai frekuensi alel GH (-) yang lebih tinggi dibandingkan dengan frekuensi alel GH (+) (LAGZIEL *et al.*, 2000). Lokus *GHR|AluI* bersifat monorfik pada sapi Brahman dan FH dengan genotipe AA (100%), tetapi polimorfik pada sapi Angus, Limousin dan Simental dengan masing-masing genotipe AA sebesar (40,0; 53,8 dan 15,4%). Total alel A untuk kelima bangsa sebesar (0,70) dan nilai  $\chi^2$  (4,39) nyata menunjukkan adanya ketidak setimbangan gen pada populasi dan heteroigositas (0,29). Frekuensi alel (A) yang tinggi juga ditemukan pada bangsa sapi Bali ZULKHARNAIM *et al.* (2010) melaporkan pada sapi Bali genotipe AA (0,988), Limousin (0,238), Simental (0,00) dan sapi Pesisir (0,604). Lokus *GHRH|HaeIII* bersifat monomorfik pada sapi Brahman dengan genotipe BB (100%) dan polimorfik pada sapi Angus, FH, Limousin dan Simental dengan frekuensi genotipe AA masing-masing sebesar (60,0; 11,1; 7,7 dan 7,7%). Total alel A untuk kelima bangsa sebesar (0,37), nilai  $\chi^2$  (1,95) menunjukkan adanya kesetimbangan gen dalam populasi dan heterozigositas (0,47). Tabel 3 menunjukkan nilai rata-rata heterozigositas dari kelima lokus *GH|MspI*, *GHR|AluI*, *GHRH|HaeIII* *Pit-1|HinfI* dan *GH|AluI* sebesar 0,31 dengan variasi terendah pada FH (0,16) dan tertinggi pada Limousin (0,43). Beberapa penelitian mengenai keragaman gen *GHRH* telah dilakukan pada ternak sapi oleh KMIEC *et al.* (2007), keragaman lokus *GHRH|HaeIII* pada sapi perah *Polish Red and White* dengan frekuensi alel A dan B masing-masing 0,28 dan 0,72, serta frekuensi genotipe AA, AB dan BB masing-masing 0,09; 0,38 dan 0,53. Lokus *Pit-1|HinfI* mempunyai keragaman paling tinggi dengan nilai heterozigositas (0,49) dengan komposisi genotipe AA, AB dan BB masing-masing sebesar (22,2; 48,9 dan 28,9), dengan alel B (0,47). Pada bangsa sapi *Bos taurus*, laporan mengenai keragaman gen *Pit-1* dilaporkan oleh WOLLARD *et al.* (1994). Frekuensi alel A gen *Pit-1* pada sapi bervariasi mulai dari 0,25 (DI STASIO *et al.*, 2002), 0,45 (MOODY

**Tabel 2.** Frekuensi (dalam %) genotipe gen GH|MspI, GH|AluI, GHR|AluI, GHRH|HaeIII dan Pit-1|HinfI pada Angus, Brahman, FH, Limousin dan Simental

Bangsa	GH MspI			GHR AluI			GHRH HaeIII			Pit-1 HinfI			GH AluI		
	-/-	+/-	+/+	AA	AG	GG	AA	AB	BB	AA	AB	BB	LL	LV	VV
Angus	0,0	0,0	100,0	40,0	60,0	0,0	60,0	40,0	0,0	80,0	0,0	20,0	100,0	0,0	0,0
Brahman	20,0	80,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
FH	11,1	0,0	88,9	100,0	0,0	0,0	11,1	44,4	44,4	33,3	33,3	33,3	100,0	0,0	0,0
Limousin	46,2	38,5	15,4	53,8	38,5	7,7	7,7	61,5	30,8	7,7	61,5	30,8	76,9	15,4	7,7
Simental	0,0	0,0	100,0	15,4	38,5	46,2	7,7	53,8	38,5	15,4	46,2	38,5	84,6	15,4	0,0
Total	17,8	20,0	62,2	55,6	28,9	15,6	13,3	46,7	40,0	22,2	48,9	28,9	88,9	8,9	2,2

*et al.*, 1995), dan 0,53 (RENAVILLE *et al.*, 1997). Lokus GH|AluI bersifat monomorfik untuk bangsa Angus, Brahman dan FH dengan alel L (1,00) dan polimorfik untuk Limousin dan Simental dengan alel L masing-masing sebesar (0,85 dan 0,92), derajat heterosigot rata-rata total untuk alel L (0,93).

#### Pengaruh keragaman gen group GH dengan produksi embrio *in vivo*

Pengaruh keragaman lokus GH|MspI, GHR|AluI, GHRH|HaeIII, Pit-1|HinfI dan GH|AluI dengan respon superovulasi (RS), tingkat ovulasi (TO), persentase tingkat fertilisasi (TF) dan persentase embrio layak transfer (ELT) pada sapi Angus, Brahman, FH, Limousin dan Simental diperlihatkan pada Tabel 4. Pada sapi FH individu bergenotipe Pit-1|HinfI AA mempunyai persentase respon superovulasi (RS) yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan individu bergenotipe Pit-1|HinfI AB, tetapi hampir sama dengan yang bergenotipe BB. Individu bergenotipe Pit-1|HinfI AA juga mempunyai tingkat ovulasi lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan individu bergenotipe AB dan BB, tetapi AB dan BB mempunyai tingkat ovulasi yang sama. Hubungan keragaman gen Pit-1 sering dipakai sebagai kandidat gen untuk sifat-sifat reproduksi telah dilaporkan oleh KHATIB *et al.* (2009) telah mengidentifikasi 8 gen melalui gen POU1F1 (Pit-1) signal, gen secara tunggal menunjukkan terdapat hubungan yang nyata antara gen of GHR, PRLR, STAT5A, dan UTMP dengan laju daya tahan hidup embrio dan gen POU1F1, GHR, STAT5A, dan OPN dengan laju fertilisasi.

Pada bangsa sapi Angus, Limousin, Brahman dan Simental tidak ada pengaruh jelas antara keragaman Lokus GH|MspI, GHR|AluI, GHRH|HaeIII, Pit-1|HinfI dan GH|AluI dengan parameter respon superovulasi (RS), tingkat ovulasi (TO), persentase tingkat fertilisasi (TF) dan persentase embrio layak transfer (ELT). Hal

ini kemungkinan pada sapi pedaging seleksi terhadap pertumbuhan belum begitu berdampak pada performa reproduksi seperti pada sapi perah. Seleksi peningkatan produksi susu yang tinggi berdampak pada ketidak seimbangan hormon reproduksi yang secara otomatis menurunkan performa reproduksi dan berpengaruh terhadap keragaman gen khususnya gen GH famili. WASHBURN *et al.* (2002) telah menganalisis hubungan laju fertilisasi dengan produksi susu selama 23 tahun lebih (1976-1999) pada industri peternakan sapi perah di Amerika Serikat. Seleksi peningkatan terhadap produksi susu menyebabkan terjadinya tingkat penurunan laju fertilisasi. Lebih jauh LOPEZ-GATIUS (2003) melaporkan bahwa pada sapi setiap peningkatan 1.000 kg produksi susu per induk berhubungan langsung dengan penurunan tingkat kebuntingan (3,2-6%), penurunan jumlah siklus estrus (4,4-7,6%) dan peningkatan kejadian ovarium tidak aktif (4,6-8%). DOBSON *et al.* (2008) menyimpulkan bahwa seleksi intensif selama 30 sampai 50 tahun terhadap produksi susu telah menyebabkan penurunan tingkat kebuntingan dari 70 menjadi 40% pada *service per conception* pertama. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh MURPHY *et al.* (2008) yang menyatakan gen hormone pertumbuhan (GH1) dan produk proteinnya hormone pertumbuhan GH sangat berperan penting dalam reproduksi dan embryogenesis dan pertumbuhan lainnya. Polimorfisme pada exon ke-5 (GH1 p Leu127Val) berhubungan langsung dengan sekresi hormone pertumbuhan dan produksi susu. Proporsi embrio bergenotipe Leu127/Leu127 homozigot pada *in vitro* lebih tinggi bila dibandingkan dengan hasil embrio *in vivo*, kemungkinan disebabkan oleh perbedaan lingkungan media kultur.

VIITALA *et al.* (2006) melaporkan genotipe AA dan AG dari PRLR (*prolactin receptor*) dikaitkan dengan protein yang lebih tinggi, lemak, dan produksi susu lebih tinggi bila dibandingkan dengan genotipe GG, tetapi genotipe AA dan AG mempunyai daya tahan embrio lebih rendah dibandingkan dengan genotipe GG.

Genotipe GG dari gen UTMP mempunyai daya tahan hidup embrio secara signifikan lebih rendah bila dibandingkan dengan genotipe lainnya (KHATIB *et al.*, 2007). Genotipe AA dari GHR telah dilaporkan berpengaruh terhadap produksi susu yang tinggi, tetapi mempunyai daya hidup embrio lebih rendah (BLOTT *et al.*, 2003). Alel G dari STAT5A berpengaruh terhadap produksi susu tinggi, tetapi tingkat fertilisasi dan daya tahan hidup embrionya rendah (KHATIB *et al.*, 2008). Pengaruh bangsa sapi terhadap kualitas embrio telah dilaporkan oleh PAULA-LOPES *et al.* (2003) yang menyatakan embrio yang berasal dari sapi Brahman lebih tahan terhadap cekaman panas bila dibandingkan

dengan embrio yang berasal dari Holstein dan Angus. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan dalam thermo toleran. ANGGRAENI (2006) telah melakukan penelitian pada sapi FH lokal bibit elit mempunyai produksi tinggi tetapi daya reproduksinya sangat rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya gen yang bersifat *pleitrophy* yaitu sekelompok gen yang mempunyai pengaruh terhadap beberapa sifat sekaligus terhadap sifat produksi dan reproduksi tetapi berkorelasi negatif. Maka perlu dicari titik optimalnya agar seleksi peningkatan kualitas reproduksi tidak menurunkan performa produksi atau sebaliknya. Pada sapi FH pejantan elit yang mempunyai potensi produksi susu

**Tabel 3.** Frekuensi Alel, Nilai  $\chi^2$ , dan Heterozigositas GH|MspI, GHR|AluI, GHRH|HaeIII, Pit-1|HinfI dan GH|AluI pada Angus, Brahman, FH, Limousin dan Simental

	Bangsa					Total
	Angus	Brahman	FH	Limousin	Simental	
<b>GH MspI</b>						
-	0,00	0,60	0,11	0,65	0,00	0,28
+	1,00	0,40	0,89	0,35	1,00	0,72
$\chi^2$	-	2,22	9,00	0,29	-	11,52
$\hat{h}$	0,00	0,80	0,00	0,38	0,00	0,20
<b>GHR AluI</b>						
A	0,70	1,00	1,00	0,73	0,35	0,70
G	0,30	0,00	0,00	0,27	0,65	0,30
$\chi^2$	0,92	-	-	0,01	0,29	1,22
$\hat{h}$	0,60	0,00	0,00	0,38	0,38	0,29
<b>GHRH HaeIII</b>						
A	0,80	0,00	0,33	0,38	0,35	0,37
B	0,20	1,00	0,67	0,62	0,65	0,63
$\chi^2$	0,31	-	0,00	1,17	0,47	1,95
$\hat{h}$	0,40	0,00	0,44	0,62	0,54	0,47
<b>Pit-1 HinfI</b>						
A	0,80	0,50	0,50	0,38	0,38	0,47
B	0,20	0,50	0,50	0,62	0,62	0,53
$\chi^2$	5,00	5,00	1,00	1,17	0,01	12,18
$\hat{h}$	0,00	1,00	0,33	0,62	0,46	0,49
<b>GH AluI</b>						
L	1,00	1,00	1,00	0,85	0,92	0,93
V	0,00	0,00	0,00	0,15	0,08	0,07
$\chi^2$	-	-	-	2,18	0,09	2,27
$\hat{h}$	0,00	0,00	0,00	0,15	0,15	0,09
$\hat{H}$	0,20	0,36	0,16	0,43	0,31	0,31

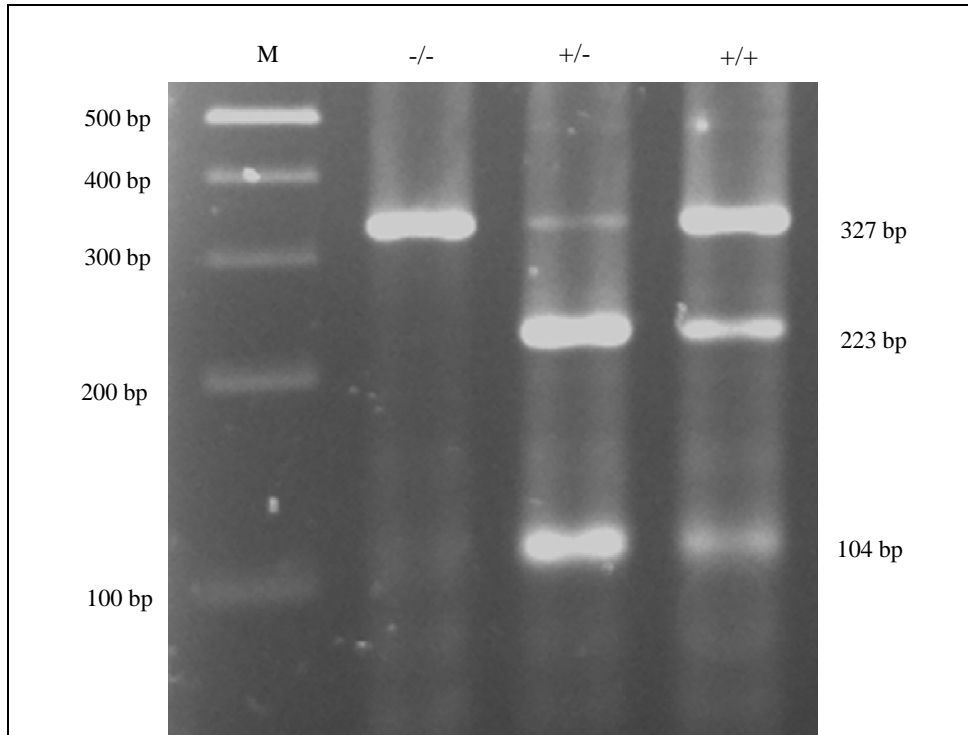
**Tabel 4.** Hubungan genotipe lokus GH|MspI, GHR|AluI, GHRH|HaeIII, Pit-1|HinfI dan GH|AluI dengan respon superovulasi, tingkat ovulasi, % fertilisasi dan % embrio Layak transfer pada Angus, Brahman, FH, Limousin dan Simental

Bangsa	Lokus	Genotipe	n	ΣSO	%K/E/SO	ΣE/E/SO	%F/E/SO	%ELT/E/SO		
Angus (3)	GH MspI	BB	3	8	50,0	7,83	55,2	53,6		
		GHR AluI	AA	2	7	25,0	5,25	40,5	38,1	
		AB	1	1	100,0	13,00	84,6	84,6		
	GHRH HaeIII	AA	1	4	50,0	10,50	81,0	76,2		
		AB	2	4	50,0	6,50	42,3	42,3		
	Pit-1 HinfI	AA	2	5	75,0	11,75	82,8	80,4		
		BB	1	3	0,0	0,00	0,0	0,0		
	Brahman (3)	GH AluI	LL	3	8	50,0	7,83	55,2	53,6	
			GHR MspI	AB	3	9	75,0	5,00	100,0	79,7
GHR AluI			AA	3	9	75,0	5,00	100,0	79,7	
GHRH HaeIII		BB	3	9	75,0	5,00	100,0	79,7		
		Pit-1 HinfI	AB	3	9	75,0	5,00	100,0	79,7	
FH (9)		GH AluI	LL	3	9	75,0	5,00	100,0	79,7	
			GHR MspI	AA	1	4	75,0	2,30	71,4	71,4
			BB	8	19	58,3	4,97	66,4	57,9	
Limousin (10)		GHR AluI	AA	9	23	60,2	4,68	67,0	59,4	
	GHRH HaeIII		AA	1	3	33,3	3,00	33,3	33,3	
	AB		4	9	56,3	3,33	55,4	40,1		
	Pit-1 HinfI	BB	4	11	70,8	6,45	87,0	85,2		
		AA	3	11	77,8 <sup>A</sup>	10,60 <sup>A</sup>	82,7	76,6		
		AB	3	6	11,1 <sup>B</sup>	1,00 <sup>B</sup>	44,4	44,4		
	Simental (8)	GH AluI	BB	3	6	91,7 <sup>A</sup>	2,43 <sup>B</sup>	73,8	57,1	
			LL	9	23	60,2	4,68	67,0	59,4	
			GHR MspI	AA	4	12	87,5	8,50	78,5	60,3
GHR AluI		AB	4	16	77,5	6,75	74,2	68,3		
		BB	2	6	50,0	2,25	50,0	38,9		
		AA	5	19	72,0	7,40	85,8	72,1		
Simental (10)		GHRH HaeIII	AG	4	11	75,0	5,68	65,0	52,5	
			GG	1	4	100,0	5,80	21,7	21,7	
			AA	1	2	100,0	4,50	100,0	77,8	
	Pit-1 HinfI	AB	7	24	65,7	6,50	64,6	54,8		
		BB	2	8	100,0	7,75	79,4	65,3		
		AA	1	4	100,0	5,80	21,7	21,7		
	GH AluI	AB	7	26	72,9	7,03	72,0	60,9		
		BB	2	4	75,0	5,25	91,7	72,3		
		LL	7	21	85,7	7,39	84,1	69,6		
Simental (8)	GHR AluI	LV	2	9	80,0	6,90	60,9	52,5		
		VV	1	4	0,0	0,00	0,0	0,0		
		BB	8	34	77,9	7,90	65,3	49,1		
	GHRH HaeIII	GHR MspI	AG	4	14	91,7	10,15	75,4	50,4	
		GG	4	20	64,2	5,65	55,1	47,7		
		AA	1	4	100,0	6,50	73,1	38,5		
	Pit-1 HinfI	AB	3	12	80,0	10,20	70,9	58,1		
		BB	4	18	70,8	6,53	59,1	44,9		
		AA	1	6	100,0	10,30	61,3	51,6		
GH AluI	AB	3	13	83,3	6,37	59,6	34,3			
	BB	3	12	68,9	9,43	63,7	58,1			
	LL	8	34	77,9	7,90	65,3	49,1			

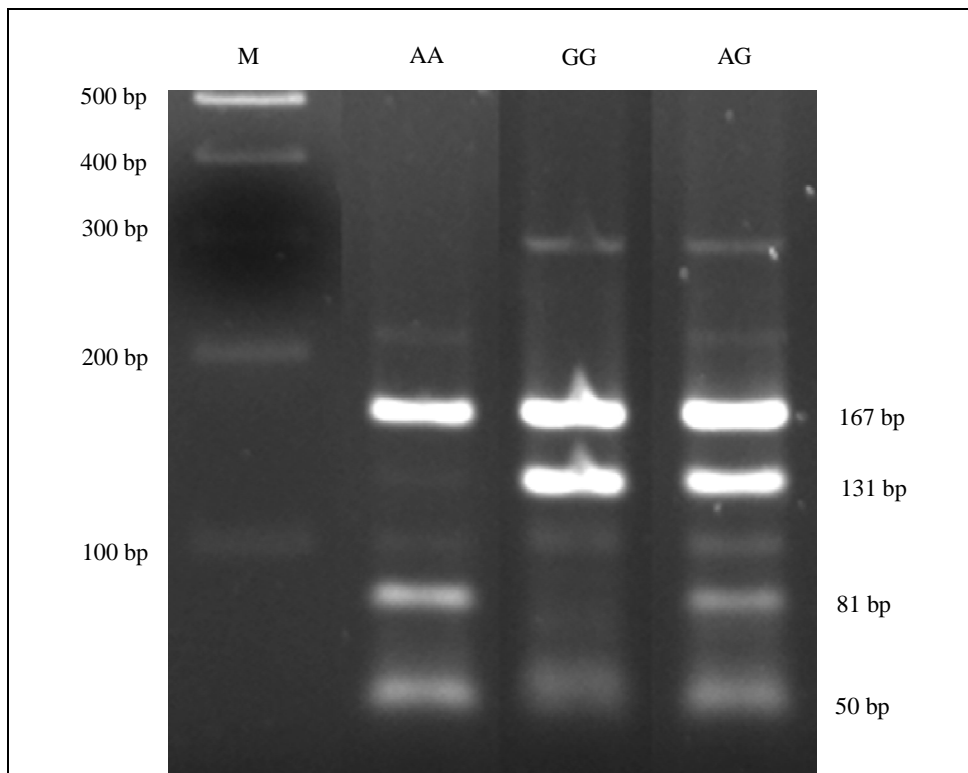
Pada lajur yang sama superskrip berbeda menunjukkan perbedaan ( $P < 0,05$ )

n: Jumlah sampel; RS: Respon superovulasi; TO: Tingkat ovulasi; TF: Tingkat fertilisasi; ELT: Embrio layak transfer

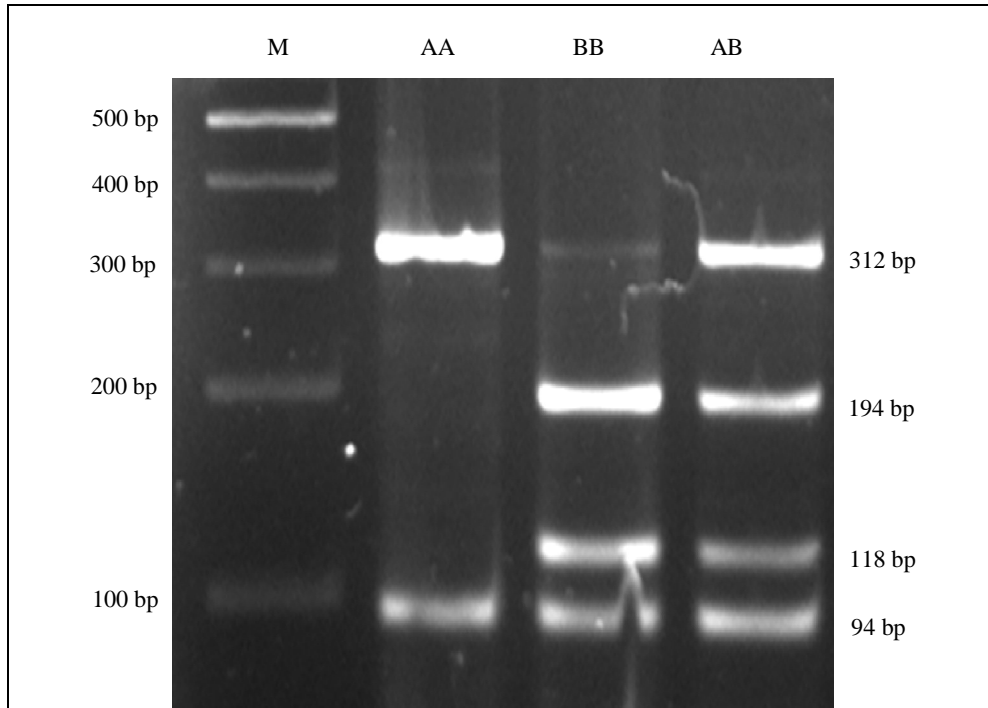




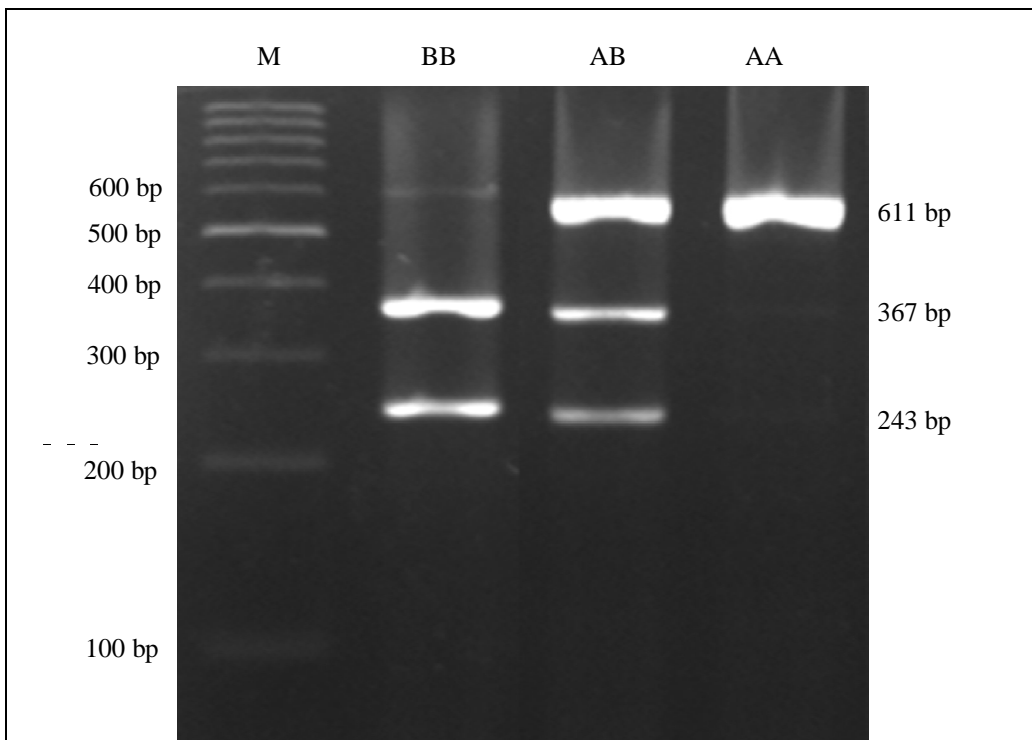
**Gambar 1.** Pola pita pemotongan lokus GH|*Msp*I pada gel agarosa 2%



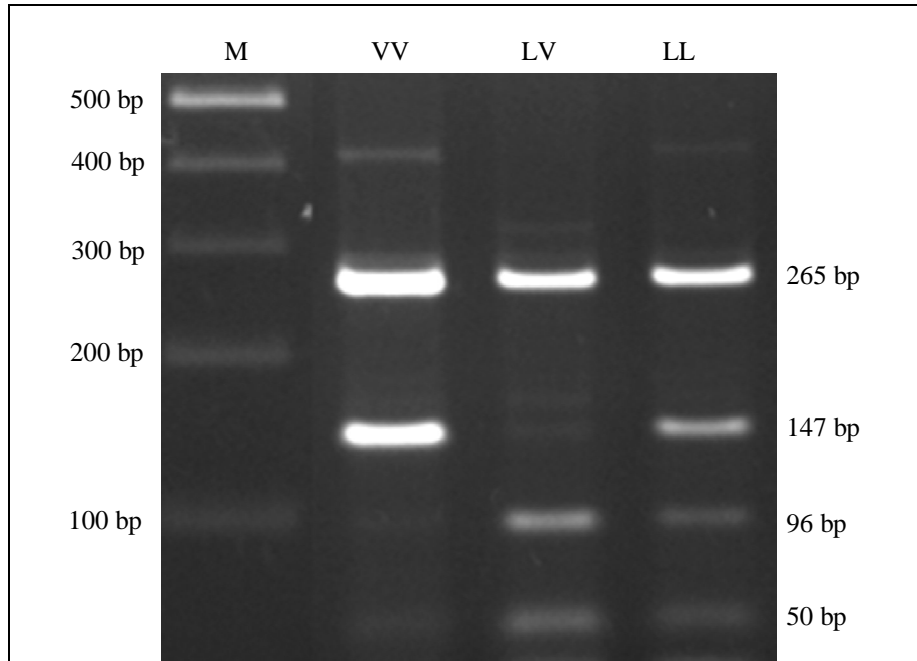
**Gambar 2.** Pola pita pemotongan lokus GHR|*A**u*I pada gel agarosa 2%



**Gambar 3.** Pola pita pemotongan lokus *GHRH/HaeIII* pada gel agarosa 2%



**Gambar 4.** Pola pita pemotongan lokus *Pit-1/HinfI* pada gel agarosa 2%



Gambar 5. Pola pita pemotongan lokus GH|AluI pada gel agarosa 2%

tinggi berasosiasi dengan rendahnya fertilitas, dan gen FGF-2 dan STAT5A bisa dipakai sebagai kandidat gen untuk seleksi reproduksi pada pejantan FH (KHATIB *et al.*, 2010).

Penelitian ini meskipun masih bersifat pendahuluan dengan data yang digunakan masih relatif terbatas, tetapi lokus Pit-1|HinfI kemungkinan bisa dipakai sebagai kandidat gen untuk seleksi peningkatan kualitas embrio pada sapi perah. Penelitian dengan skala yang lebih luas melalui genotyping gen Pit-1 perlu dilakukan di sumber bibit betina (BET Cipelang, BPTU Sapi Perah Cikole dan Baturraden) dan sumber bibit pejantan (BIB Lembang dan BBIB Singosari).

### KESIMPULAN

Pada bangsa sapi Angus, Limousin, Brahman dan Simental tidak ada pengaruh jelas antara keragaman lokus GH|MspI, GHR|AluI, GHRH|HaeIII, Pit-1|HinfI dan GH|AluI dengan parameter respon superovulasi (RS), tingkat ovulasi (TO), persentase tingkat fertilisasi (TF) dan persentase embrio layak transfer (ELT).

Pada sapi FH bergenotipe Pit-1|HinfI AA mempunyai persentase respon superovulasi (RS) yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan individu bergenotipe Pit-1|HinfI AB, tetapi hampir sama dengan yang bergenotipe BB. Individu bergenotipe Pit-1|HinfI AA juga mempunyai tingkat ovulasi lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan individu

bergenotipe AB dan BB, tetapi AB dan BB mempunyai tingkat ovulasi yang sama.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kepala Balai Embrio Ternak (BET) Cipelang yang telah memberi izin pengambilan sampel darah, dan kepada para teknisi yang telah membantu memperlancar proses terlaksananya penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- ANDREAS, E., C. SUMANTRI, H. NURAINI dan A. FARAJALLAH 2010. Identification of GH|AluI and GHR|AluI genes polymorphism in Indonesian buffalo. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 35: 215-221.
- ANGGRAENI, A. 2006. Productivity of Holstein-Friesian dairy cattle maintained under two systems in Central Java Indonesia. *Doctor Disertasion.* Department of Agriculture, University of Newcastle, Upon Tyne United Kingdom.
- BALOGH, O., K. KOVACS, M. KULCSAR, A. GASPARDY, H. FEBEL, A. ZSOLNAI, L. FESUS, C. DELAUAUD, Y. CHILLIARD, R.O. GILBERT and G.Y. HUSZENICZA. 2009. Interrelationship of growth hormone AluI polymorphism and hyperketonemia with plasma hormones and metabolites in the beginning of lactation in dairy cows. *Livest. Sci.* 123: 180-186.

- BILODEAU-GOESELS, S. and J.P. KASTELIC. 2003. Factors affecting embryo survival and strategies to reduce embryonic mortality in cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 659-671.
- BONI, R., E. TOSTI, S. ROVIELLO and B. DALE. 1999. Intracellular communication in *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. *Biol. Reprod.* 61: 1050-1055.
- BLOCK, J., C. WRENZYCKI, H. NIEMANN, D. HERRMANN and P.J. HANSEN. 2008. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocyst produced *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 895-903.
- BLOTT, S., J.J. KIM, S. MOISIO, A. SCHMIDT-KUNTZEL, A. CORNET, P. BERZI, N. CAMBISANO, C. FORD, B. GRISART, D. JOHNSON, L. KARIM, P. SIMON, R. SNELL, R. SPELMAN, J. WONG, J. VILKKI, M. GEORGES, F. FARNIR, and W. COPPIETERS. 2003. Molecular dissection of a quantitative trait locus: A phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genet.* 163: 253-266.
- CUSHMAN, R.A., V.S. HEDGPETH, S.E. ECHTERNKAMP and J.H. BRITT. 2000. Evaluation of numbers of microscopic and macroscopic follicles in cattle selected for twinning. *J. Anim. Sci.* 78: 1564-1567.
- DE LOOS, F., T. VAN BENEDEN, T.A.M. KRUIP and P. VAN MAURIK. 1992. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 208-214.
- DI STASIO, L., A. BRUGIAPAGLIA, G. DESTEFANIS, A. ALBERA and S. SARTORE. 2002. GH1 as candidate gene for variability of meat production traits in Piedmontese cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 120: 358-361.
- DISKIN, M.G., D.R. MACKAY, J.F. ROCHE and J.M. SREENAN. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 345-370.
- DOBSON, H., S.L. WALKER, M.J. MORRIS, J.E. ROUTLY and R.F. SMITH. 2008. Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows? *Animal* 2: 1104-1111.
- DRIVER, A.M., W. HUANG, S. GAJIC, R.L. MONSON, G.J.M. ROSA, and H. KHATIB. 2009. Effects of the progesterone receptor variants on fertility traits in cattle. Short communication. *J. Dairy Sci.* 92: 4082-4085.
- FALAKI, M., N. GENGLER, M. SNEYERS, A. PRANDI, S. MASSART, A. FORMIGONI, A. BURNY, D. PORTETELLE and R. RENAVILLE. 1996. Relationships of polymorphism for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.* 79: 1446-1453.
- FORTUNE, J.E. 2003. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 135-163.
- GALLOWAY, S.M., K.P. MCNATTY, L.M. CAMBRIDGE, M.P. LAITINEN, J.L. JUENGL, T.S. JOKIRANTA, R.J. MCLAREN, K. LUIRO, K.G. DODDS, G.W. MONTGOMERY, A.E. BEATTIE, G.H. DAVIS and O. RITVOS. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (bmp15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25: 279-283.
- GORDON, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International. Wallingford, UK.
- HANRAHAN, J.P., S.M. GREGAN, P. MULSANT, M. MULLEN, G.H. DAVIS, R. POWELL and S.M. GALLOWAY. 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* 70: 900-909.
- HARTL, D.L. 1988. Principle of Population Genetic. Sinauer Associates, Inc. Publisher. Sunderland.
- HULL, K.L. and S. HARVEY. 2001. Growth hormone: Roles in female reproduction. *J. Endocrinol.* 168: 1-23.
- IZADYAR, F., H.T. VAN TOL, W.G. HAGE and M.M. BEVERS. 2000. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during *in vitro* development. *Mol. Reprod. Dev.* 57: 247-255.
- JOUSAN, F.D. and P.J. HANSEN. 2007. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 189-196.
- JUENGL, J.L., N.L. HUDSON, D.A. HEATH, P. SMITH, K.L. READER, S.B. LAWRENCE, A.R. O'CONNELL, M.P. LAITINEN, M. CRANFIELD, N.P. GROOME, O. RITVOS and K.P. MCNATTY. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* 67: 1777-1789.
- KHATIB, H., R.L. MONSON, V. SCHUTZKUS, D.M. KOHL, G.J.M. ROSA and J.J. RUTLEDGE. 2007. Mutations in the *STAT5A* gene are associated with embryonic survival and milk composition in cattle. *J. Dairy Sci.* 91: 784-793.
- KHATIB, H., C. MALTECCA, R.L. MONSON, V. SCHUTZKUS, X. WANG and J.J. RUTLEDGE. 2008. The fibroblast growth factor 2 gene is associated with embryonic mortality in cattle. *J. Anim. Sci.* 86: 2063-2067.
- KHATIB, H., W. HUANG, X. WANG, A.H. TRAN, A.B. BINDRIM, V. SCHUTZKUS, R.L. MONSON and B.S. YANDELL. 2009. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. *J. Dairy Sci.* 92: 2238-2247.
- KHATIB, H., R.L. MONSON, W. HUANG, R. KHATIB, V. SCHUTZKUS, H. KHATEEB and J.J. PARRISH. 2010. Short communication: Validation of *in vitro* fertility genes in Holstein bull population. *J. Dairy Sci.* 93: 2244-2249.

- KMIEC, M., I.K. LUCZAK, H. KULIG and A. TERMAN. 2007. Association between GHRH/*Hae*III restriction polymorphism and milk production traits in a herd of dairy cattle. *J. Anim. Vet. Adv.* 6: 1298-1303.
- LAGZIEL, A., S. DENISE, O. HANOTTE, S. DHARA, V. GLAZKO, A. BROADHEAD, R. DAVOLI, V. RUSSO and M. SOLLER. 2000. Geographic and breed distribution of an *Msp*I PCR-RFLP in the bovine growth hormone (bGH) gene. *Anim. Genet.* 31: 210-213.
- LOPEZ-GATIUS, F. 2003. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 60: 89-99.
- LONERGAN, P. 2007. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64: 315-25.
- MARTAL, J., N. CHENE, S. CAMOUS, L. HUYNH, F. LANTIER, P. HERMIER, R. L'HARIDON, G. CHARPIGNY, M. CHARLIER and G. CHAOUAT. 1997. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: The role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 355-380.
- MITRA, A., P. SCHELE, C.R. BALAKRISNAN and F. PIRCHNER. 1995. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *J. Anim. Bred. Genet.* 112: 71-74.
- MOODY, D.E., D. POMP and W. BARENDSE. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in amplification product in the bovine growth hormone releasing hormone gene. *J. Anim. Sci.* 73: 3789-3791.
- MOORE, R.K. and S. SHIMASAKI. 2005. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol. Cell. Endocrinol.* 234: 67-73.
- MURPHY, A.M., K.G. MEADE, P.A. HAYES, S.D. PARK, A.C. EVANS, P. LONERGAN and D.E. MACHUGH. 2008. Transmission ratio distortion at the growth hormone gene (GH1) in bovine preimplantation embryos: An in vitro culture-induced phenomenon? *Mol. Reprod. Dev.* 75: 715-722.
- NEI, M. and S. KUMAR. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- O'CALLAGHAN, D., H. YAAKUB, P. HYTTTEL, L.J. SPICER and M.P. BOLAND. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 118: 303-313.
- OTSUKA, F. and S. SHIMASAKI. 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 8060-8065.
- PAULA-LOPES, F.F., C.C. CHASE JR, Y.M. AL-KATANANI, C.E. KRININGER, R.M. RIVERA, S. TEKIN, A.C. MAJEWSKI, O.M. OCON, T.A. OLSON and P.J. HANSEN. 2003. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: Differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction.* 125: 285-294.
- PETER, J.H., J. BLOCK, B. LOUREIRO, L. BONILLA, E. KATHERINE and M. HENDRICKS. 2009 Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 59-66.
- RENAVILLE, R., N. GENGLER, E. VRECH, A. PRANDI, S. MASSART, C. CORRADINI, C. BERTOZZI, F. MORTIAUX, A. BURNY and D. PORTETELLE. 1997. PIT-1 gene polymorphism milk yield and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.* 80: 3431-3438.
- SAMBROOK, J. and D. RUSSELL. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United State of America.
- SIRARD, M.A., F. RICHARD, P. BLONDIN and C. ROBERT. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65: 126-136.
- VELAZQUEZ, M.A., M. NEWMAN, M.F. CHRISTIE, P.J. CRIPPS, M.A. CROWE, R.F. SMITH and H. DOBSON. 2005. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology* 64: 1977-1994.
- VIITALA, S., J. SZYDA, S. BLOTT, N. SCHULMAN, M. LIDAUER, A. MAKI-TANILA, M. GEORGES and J. VILKKI. 2006. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Genetics* 173: 2151-2164.
- WANG, X., V. SCHUTZKUS, W. HUANG, G.J. ROSA and H. KHATIB. 2009. Analysis of segregation distortion and association of the bovine FGF-2 with fertilization rate and early embryonic survival. *Anim. Genet.* 40: 722-728.
- WASHBURN, S.P., W.J. SILVIA, C.H. BROWN, B.T. MCDANIEL and A.J. MCALLISTER. 2002. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J. Dairy Sci.* 85: 244-251.
- WEBB, R., P.C. GARNSWORTHY, J.G. GONG and D.G. ARMSTRONG. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* 82: E63-E74.
- WOLF, E., G.J. ARNOLD, S. BAUERSACHS, H.M. BEIER, H. BLUM, R. EINSPIANIER, T. FRÖHLICH, A. HERRLER, S. HIENDLEDER and S. KÖLLE. 2003. Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 276-289.

- WOOLLARD, J., C.B. SCHIMTZ, A.E. FREEMAN and C.K. TUGGLE. 1994. Rapid Communication: *Hinf*I polimorphisms at the bovine Pit-1 locus. *J. Anim. Sci.* 72: 3267-3269.
- ZULKHARNAIM, JAKARIA dan R.R. NOOR. 2010. Identifikasi keragaman genetik gen reseptor hormone pertumbuhan (GHR|AluI) pada sapi Bali. *Med. Petern.* 33: 81-88.