

IDENTIFIKASI PROTEIN *EPIDERMAL GROWTH FACTOR* (EGF) 46 kDa HASIL MATURASI OOSIT SAPI SECARA *IN VITRO*

Identification of 46 kDa Protein Suspected as Epidermal Growth Factor (EGF) Isolated from In Vitro Matured Bovine Oocyte

Widjiati¹, Anike Rachmawati², Sri Mumpuni³, dan Bambang Sektiari⁴

¹Departemen Anatomi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

²Departemen Anatomi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

³Departemen Parasitologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

⁴Departemen Klinik Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi suatu protein dengan berat molekul 46 kDa yang diduga sebagai *epidermal growth factor* (EGF) yang diisolasi dari oosit sapi yang telah dimatursasi secara *in vitro* dengan metode elektroforesis. Ovarium sapi yang berasal dari rumah potong hewan, diaspirasi pada folikel dengan diameter permukaan ≤ 5 mm menggunakan spuit dan jarum. Oosit dimatursasi dalam *tissue culture medium* (TCM) 199 selama 22 jam pada suhu 38,5° C di dalam inkubator CO₂. Preparasi protein dengan berat molekul 46 kDa menggunakan *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel elektroforesis* (SDS PAGE). Berdasarkan perhitungan jumlah regresi dari protein marker, didapatkan 12 fraksi protein yaitu BM 172,7; 153,09; 118,24; 102,43; 89,27; 59,75; 46,41; 43,82; 40,2; 36,06; 23,45; dan 18,42 kDa. Protein dengan berat molekul 46,41 kDa yang tampak pada pita protein dapat diidentifikasi sebagai protein yang diduga EGF yang berperan dalam proses maturasi oosit.

Kata kunci: *epidermal growth factor*, elektroforesis, oosit sapi, maturasi *in vitro*

ABSTRACT

The aim of this research was to identify a protein 46 kDa that suspected as *epidermal growth factor* (EGF) isolated from *in vitro* matured bovine oocyte using electrophoresis method. Bovine ovary from a slaughterhouse was aspirated in its ovary follicle ≤ 5 mm with spuit and needle. The oocyte was matured in *tissue culture medium* (TCM) 199 for 22 hours at 38.5° C, CO₂ incubator. The protein 46 kDa was identified using *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS PAGE). Based on the calculation of regression equation from protein marker, 12 fractions were determined, 172.7, 153.09, 118.24, 102.43, 89.27, 59.75, 46.41, 43.82, 40.2, 36.06, 23.45, and 18.42 kDa. The protein band with the molecular weight of 46.41 kDa was identified as EGF that important in maturation process.

Key words: *epidermal growth factor*, electrophoresis, bovine oocyte, *in vitro* maturation

PENDAHULUAN

Data menunjukkan bahwa pada tahun 2010 jumlah impor daging mencapai 120.000 ton melampaui target yang ditetapkan pemerintah sebanyak 76.000 ton (Djumen, 2011). Kondisi ini disebabkan karena penurunan jumlah populasi ternak lokal yang belum mampu memenuhi kebutuhan di dalam negeri. Oleh karena itu, perlu dilakukan suatu upaya untuk memperbaiki genetik sapi dengan tujuan meningkatkan populasi ternak, diantaranya dengan bioteknologi reproduksi yaitu metode transfer embrio (TE). Transfer embrio membutuhkan embrio kualitas baik dalam jumlah yang cukup. Embrio dapat diperoleh dengan dua cara, yaitu secara *in vivo* maupun *in vitro*. Untuk mendapatkan embrio kualitas baik secara *in vitro* dibutuhkan proses maturasi oosit terlebih dahulu (Hurk dan Zhao, 2005).

Proses maturasi oosit, selain dipengaruhi oleh faktor hormonal juga oleh *growth factor* (GF). *Growth factor* merupakan faktor yang berperan dalam peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel granulosa sehingga menyebabkan terjadinya ekspansi kumulus. *Growth factor* mempunyai pengaruh penting dalam meningkatkan sekresi protein pada cairan folikel. Hal tersebut disebabkan karena GF berperan dalam

meningkatkan transportasi asam amino melintasi membran sel serta meningkatkan pengikatan asam-asam amino sehingga membentuk protein (Frandsen, 1992). *Epidermal growth factor* (EGF) merupakan salah satu *growth factor* yang terikat pada reseptor *epidermal growth factor receptor* (EGFR). *Epidermal growth factor* disekresi oleh sel teka dan bertindak sebagai faktor parakrin untuk meregulasi pertumbuhan sel granulosa (Skinner *et al.*, 1987). Selama fase pertumbuhan, EGF berperan pada proliferasi sel granulosa dan ketika berada pada antrum folikuli, EGF meregulasi diferensiasi sel granulosa dan maturasi oosit (Bristol-Gould dan Woodruff, 2006). Menurut Xuan *et al.* (2011), banyak faktor ditemukan seperti *nerve growth factor* (NGF), EGF, dan *growth differentiation factor-9* (GDF-9) yang berfungsi untuk menstimulasi folikulogenesis.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan ovarium sapi yang diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) sebagai sampel penelitian yang sebelumnya dibersihkan dahulu dari organ-organ yang melekat, darah, dan lemak. Ovarium selanjutnya dibawa ke Laboratorium Fertilisasi *in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga dengan cara dimasukkan ke dalam botol yang berisi NaCl fisiologis dan gentamisin sulfat 50 µg/ml dan dibawa menggunakan termos yang sudah diberi air hangat dengan suhu 30-35° C. Di laboratorium, dilakukan pencucian lagi dengan NaCl fisiologis dan ditambahkan gentamisin sulfat. Kemudian dilakukan koleksi oosit dengan cara aspirasi dan dimaturasi secara *in vitro*. Protein diisolasi dari oosit dan diidentifikasi protein 46 kDa yang diduga EGF dengan metode *sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Koleksi Oosit

Ovarium sapi yang diperoleh dari RPH dicuci dengan NaCl fisiologis sampai beberapa kali pencucian hingga cairan pencuci menjadi jernih lalu diberi gentamisin sulfat 50 µg/ml. Oosit diaspirasi dengan menggunakan jarum ukuran 18-G yang dihubungkan dengan spuit 5 ml berisi 1 ml *tissue culture medium* (TCM) 199. Sampel oosit diambil dari folikel dengan ukuran diameter permukaan folikel ≤ 5 mm. Oosit dicuci secara berturut-turut sebanyak dua kali di dalam medium TCM 199.

Maturasi Oosit

Proses maturasi oosit mempergunakan medium TCM199 yang ditambah 0,01 µg/ml *folligon*, 0,01 µg/ml *chorulon*, 3% BSA dan 50 µg/ml gentamisin sulfat. Oosit dikultur dalam 50 µl medium tetes (tiap 50 µl berisi 8-10 oosit) yang sebelumnya telah ditutup dengan *mineral oil* dan sebelumnya telah diinkubasi minimal 1 jam. Pematangan oosit dilakukan pada suhu 38,5° C di dalam inkubator CO₂ selama 22 jam (Widjiati *et al.*, 2010). Selanjutnya oosit yang telah dimaturasi kemudian dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* dan disimpan ke dalam *freezer*.

Isolasi Protein Oosit yang Telah Dimaturasi

Sampel oosit hasil kultur diambil sebanyak 200 µl, yang berisi 300 oosit, ditambah *phosphat buffer saline* (PBS) Tween yang mengandung *polymetyl sulfonil fluoride* (PMSF) sampai lima kali volume sampel. Sampel oosit yang telah diencerkan kemudian dilakukan sonikasi selama 10 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4° C selama 15 menit untuk memisahkan antara endapan dan supernatan. Supernatan yang dihasilkan ditambah etanol absolut dingin dengan jumlah yang sama (perbandingan dengan sampel 1:1) sebanyak 500 µl agar proteinnya mengendap kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* selama semalam agar dapat diperoleh hasil yang maksimal. Setelah diendapkan selama semalam, supernatan diencerkan terlebih dahulu. Kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 4° C selama 10 menit untuk memisahkan antara endapan dan supernatan. Endapan yang didapat dari supernatan yang disentrifugasi diberi penambahan 200 ml Tris HCL dengan perbandingan 1:1 dan disimpan dalam *freezer* sebelum digunakan sebagai

bahan isolat fraksi protein oosit. Hasil isolasi merupakan protein yang terdapat pada folikel yang diambil dari ovarium sapi. Setelah didapatkan fraksi protein, selanjutnya disiapkan *separating gel* untuk SDS-PAGE.

Preparasi Protein EGF 46 kDa dengan Metode SDS-PAGE

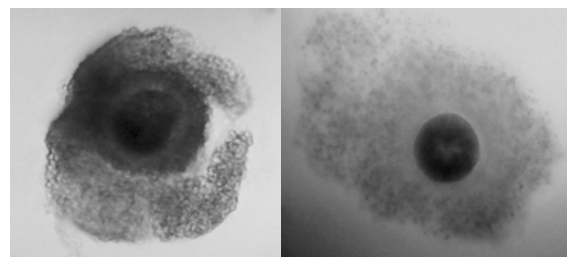
Separating gel 12% disiapkan pada alat SDS-PAGE. Setelah gel membeku ditambahkan *stacking gel* 3% lalu dimasukkan sisir (*comb*) pada puncak plate SDS dan ditunggu hingga menjadi gel (± 30 menit). Sisir dikeluarkan sehingga terbentuk sumur-sumur pada gel.

Sampel hasil isolasi protein sebanyak 10-20 µl dimasukkan ke dalam lubang sumuran. Pada satu lubang sumuran diisi *marker* untuk dijadikan patokan skala berat molekul protein. Selanjutnya *plate* yang telah terisi sampel dan *marker* dimasukkan ke alat Bio-Rad (seperangkat alat gel elektroforesis) dan diisi penuh dengan *buffer running*. Anoda dihubungkan pada *reservoir* bawah dan katoda dihubungkan pada *reservoir* atas. *Power supply* dihidupkan dengan mengalirkan arus listrik sebesar 30 mA dengan tegangan 130 V.

Proses pemisahan (*running*) dihentikan setelah arus warna biru dari penanda mencapai ketinggian ± 0,5 cm dari batas bawah *plate* gel. Gel dilepaskan dari *plate*, kemudian dilakukan pewarnaan dengan larutan *staining* dan dicuci dengan larutan *destaining*. Data yang diperoleh berupa berat molekul yang diduga EGF yang dijelaskan dengan metode deskriptif.

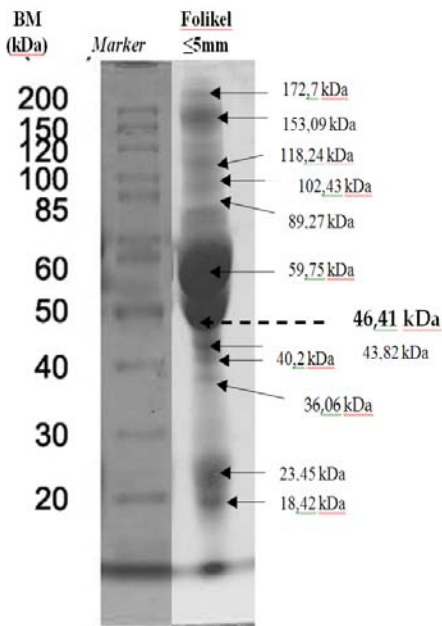
HASIL DAN PEMBAHASAN

Oosit hasil aspirasi dari folikel dengan diameter permukaan ≤ 5 mm terlihat bahwa oosit kompleks dengan kumulus oophorus dan korona radiata yang kompak sehingga terlihat gelap (Gambar 1a) sedangkan oosit yang telah dimaturasi secara *in vitro* korona radiata pada oosit matur tersebar secara merata mengelilingi oosit. Sel kumulus oophorus mengembang dan ikatannya merenggang sehingga tampak lebih terang (Gambar 1b).



Gambar 1. a.Oosit immatur, b.Oosit matur (400x)

Hasil identifikasi protein EGF dari oosit sapi yang telah dimaturasi secara *in vitro* dengan metode elektroforesis diperoleh gambaran *band* (pita) dalam satuan berat molekul kDa. Hasil SDS-PAGE disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Elektroforegram protein EGF dari hasil maturasi oosit secara *in vitro* dengan metode SDS-PAGE dengan pewarnaan *comassie blue* (Tanda panah menunjukkan adanya pita protein dengan berat molekul 46 kDa yang diduga sebagai protein EGF).

Penghitungan berat molekul (BM) dari pita-pita protein yang terdapat pada gel dilakukan dengan jalan membandingkan antara berat molekul dari *marker* dengan *retardation factor* (Rf) seperti yang disajikan pada Tabel 1. Selanjutnya dibuat kurva standar dengan nilai Rf sebagai sumbu x dan nilai logaritma berat molekul sebagai sumbu y (Gambar 3).

Berdasarkan perhitungan antara BM dan Rf dengan menggunakan regresi linear, diperoleh persamaan : $Y = 2,307 - 1,196X$, X adalah nilai Rf sedangkan Y adalah nilai logaritma berat molekul (BM). Penghitungan BM masing-masing sampel didapat dari anti-log Y yang sebelumnya nilai Rf sampel dikonversikan ke dalam persamaan regresi linear. Berdasarkan penghitungan persamaan regresi dari *marker* protein untuk menentukan berat molekul EGF diketahui 12 fraksi protein yaitu: 172,7; 153,09; 118,24; 102,43; 89,27; 59,75; 46,41; 43,82; 40,2; 36,06; 23,45; dan 18,42 kDa (Tabel 2).

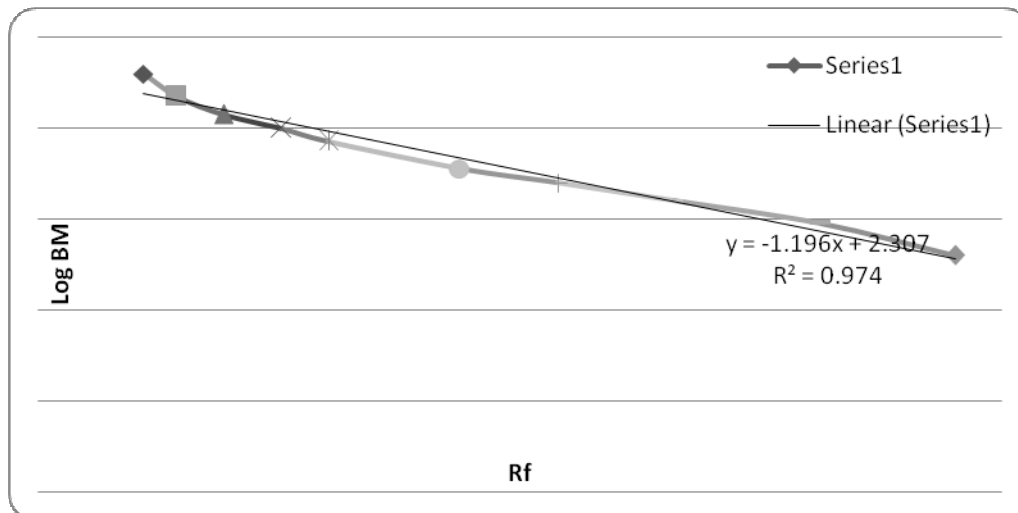
Protein dengan BM 46,41 kDa diidentifikasi awal sebagai protein yang diduga EGF. *Epidermal growth factor* merupakan faktor pertumbuhan berupa polipeptida yang berperan penting dalam pertumbuhan sel, proliferasi, dan diferensiasi melalui pengikatan pada reseptor spesifiknya yaitu EGFR. *Epidermal growth factor* merupakan rangkaian polipeptida

Tabel 1. Penghitungan persamaan regresi protein *marker*

No	<i>Marker</i>				
	A (mm)	B (mm)	Rf	Log BM	BM
1	7 61	77 71	0 097928	2 3010	200
2	10 04	77 71	0 129198	2 1761	150
3	13 44	77 71	0 172951	2 0792	120
4	17 65	77 71	0 227126	2 0000	100
5	21 05	77 71	0 270879	1 9294	85
6	30 6	77 71	0 393772	1 7782	60
7	37 72	77 71	0 485394	1 6990	50
8	46 14	77 71	0 593746	1 6021	40
9	56 83	77 71	0 731309	1 4771	30
10	66 54	77 71	0 856260	1 3010	20

Tabel 2. Penghitungan berat molekul protein EGF pada oosit yang telah dimaturasi secara *in vitro* dari folikel dengan diameter permukaan ≤ 5 mm

No.	Protein pada oosit sapi yang telah dimaturasi <i>in vitro</i>				
	A (mm)	B (mm)	Rf	Log BM	BM
1	5,5	77,71	0,0708	2,2224	166,8599
2	8,58	77,71	0,1104	2,1749	149,606
3	15,87	77,71	0,2042	2,0628	115,5452
4	19,82	77,71	0,2551	2,0020	100,4521
5	23,15	77,71	0,2979	1,9507	89,2706
6	36,27	77,71	0,4667	1,7488	56,0770
7	41,61	77,71	0,5355	1,6666	46,4087
8	48,68	77,71	0,6264	1,5578	36,1233
9	51,16	77,71	0,6583	1,5196	33,0841
10	54,40	77,71	0,7001	1,4697	29,4954
11	60,87	77,71	0,7883	1,3702	23,4518
12	67,68	77,71	0,8709	1,2654	18,4233



Gambar 3. Kurva linear dari protein marker

dengan BM terletak antara 46-47 kDa (Lonergan *et al.*, 1996). Protein EGF dapat diikat oleh gel poliakrilamid karena berat molekul EGF diantara 500-250.000 Dalton.

Epidermal growth factor disekresi di banyak jaringan dalam tubuh seperti ovarium yaitu pada sel teka interna, sel interstisial, dan korpus luteum (Bristol-Gould dan Woodruff, 2006). Di dalam sel teka, EGF berfungsi secara parakrin dan otokrin dalam meregulasi proliferasi sel pada folikulogenesis yang merupakan rangkaian proses maturasi oosit. Mekanisme fungsi EGF yaitu melalui pengikatan EGF pada reseptor spesifiknya yaitu EGFR yang terdapat pada permukaan sel dengan daya afinitas yang tinggi dan menstimulasi aktivitas intrinsik protein tirosin kinase (Polat *et al.*, 2009). Aktivitas protein tirosin kinase menginisiasi sinyal transduksi yang menghasilkan beberapa perubahan biokimiawi di dalam sel, meningkatkan level kalsium intraseluler, meningkatkan glikolisis dan sintesis protein, dan pada akhirnya berujung pada sintesis *deoxyribo nucleic acid* (DNA) dan proliferasi sel (Fallon *et al.*, 1984).

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa protein dengan BM 46,41 kDa dapat diidentifikasi pada oosit sapi yang telah dimaturasi secara *in vitro* sebagai protein yang diduga EGF. Protein EGF diekspresikan pada oosit, kumulus, mural granulosa, dan sel teka. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa EGF diekspresikan pada semua tahap perkembangan folikel (Silva *et al.*, 2006). *Epidermal growth factor* dimanfaatkan dalam memodifikasi media kultur sebelum terjadi fertilisasi secara *in vitro* sehingga fertilisasi akan menghasilkan embrio dengan kualitas yang baik dan embrio tersebut dapat digunakan dalam bioteknologi transfer embrio.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa protein yang diduga sebagai EGF dapat diidentifikasi dari oosit sapi yang telah dimaturasi secara *in vitro* dengan metode SDS-PAGE. Berdasarkan persamaan linear dari protein marker dapat diketahui bahwa BM protein yang diduga EGF adalah 46,41 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- Bristol-Gould, S. and T. K. Woodruff. 2006. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 66(1):5-13.
- Djumen, E. 2011. Swasembada Daging Terancam. Kompas. 11 Februari 2011.
- Fallon, J.H., K.B. Seroogy, S.E. Loughlin, R.S. Morrison, and R.A. Bradshaw. 1984. Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: Location and development. *Science* 224(4653):1107-1109.
- Hurk, R. and J. Zhao. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *J. Theriogenology* 63(6):1717-1751.
- Lonergan, P., C. Carolan, A. Van Langendonck, I. Donnay, H. Khatir, and Mermillod. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 54:1420-1429.
- Polat, B., D.B. Acar, H.C. Macun, O. Korkmaz, A. Çolak, A. Baştan, and A. Akça. 2009. Effect of epidermal growth factor on in vitro maturation of cat oocytes recovered from ovaries at follicular and luteal stages. *Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg.* 15(4): 623-627.
- Silva, J.R.V., R. Van Den Hurk, and J.R. Figueiredo. 2006. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. *Zygote* 14:107-117.
- Skinner, M.K., D. Lobb, and J.H. Dorrington. 1987. Ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology* 121(5):1892-1899.
- Widjiati, Rimayanti, A. Boediono, dan A. Setiadi. 2010. Peran *transforming growth factor β* terhadap tingkat kematangan dan kejadian apoptosis oosit sapi pada kultur *in vitro*. *Jurnal Veteriner* 11(2):92-98.
- Xuan, J., X. Li-Juan, Z. Xue-Sen, and L. Yi-Xun. 2011. Apoptosis in ovary. *Bioscience* S3:680-697.