

Literature Review

**Studi Molekuler dan Epigenetik Gen H19
pada Kambing (*Capra hircus*)**

**Oleh:
Rini Herlina Mulyono**



**Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan
Fakultas Peternakan
Institut Pertanian Bogor
2023**

Judul karya ilmiah : Studi molekuler dan epigenetik gen *H19* pada kambing (*Capra hircus*) (Literature Review)
Penulis : Dr Ir Rini Herlina Mulyono, MSi

Mengetahui:
Ketua DIPTP
Fakultas Peternakan IPB

Bogor, 5 Juni 2023,
Penulis



Prof Dr. agr. Asep Gunawan, SPt., MSc.
NIP. 198007042005011005



Dr. Ir. Rini Herlina Mulyono, MSi
NIP. 19621124198032002

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	iv
PENDAHULUAN	1
EPIGENETIK	1
METILASI DNA	2
GEN <i>H19</i>	3
Metilasi pada gen <i>H19</i> Kambing (<i>Capra hircus</i>)	4
Bahan dan Metode	5
Hasil dan Pembahasan	7
KESIMPULAN	11
DAFTAR PUSTAKA	11

DAFTAR GAMBAR

1	Metilasi pada ujung 5-sitosin	3
2	Gel elektroforesis agarose (agarosa 1,4%) menunjukkan PCR yang mengamplifikasi region yang mengikat fragmen CTCF III (295 bp) dari gen <i>H19 Capra hircus</i>	7
3	Sekuen nukleotida dari region yang mengikat CTCF III dari gen <i>H19 Capra hircus</i> (295 bp) yang mengandung 19 motif CpG dan dua mutasi titik	8
4	Sekuen nukleotida dari region yang mengikat CTCF III dari gen <i>H19 Capra hircus</i> (295 bp) dari sel kultur yang tidak diprogram ulang pada DNA genom yang dikonversi bisulfit	8
5	Sekuen nukleotida dari region yang mengikat CTCF III dari gen <i>H19 Capra hircus</i> (295 bp) dari sel kultur yang diprogram ulang pada DNA genom yang dikonversi bisulfit	9

PENDAHULUAN

Epigenetika bermanfaat untuk memberikan wawasan ke dalam mekanisme yang memungkinkan organisme untuk merespon lingkungan, karena proses epigenetik adalah inti dari beberapa jenis plastisitas fenotipik. Pada epigenetika pengaruh pada aktivitas gen yang diwariskan tidak memberikan perubahan pada DNA. Proses epigenetik itu sendiri merupakan konsekuensi interaksi antara gen dan lingkungan dan dapat terjadi akibat *silenced genes* atau informasi genomik yang tidak terekspresi.

Teknologi SCNT (somatic cell nuclear transfer) digunakan untuk memproduksi hewan yang secara genetik identik atau kembar identik. Teknologi ini melibatkan mekanisme epigenetik yaitu kejadian metilasi DNA. Metilasi DNA merupakan mekanisme epigenetik terbaik pada saat ini, yang melibatkan penambahan gugus metil (CH₃) ke situs CpG (sitosin yang diikuti oleh guanin dalam sekuen DNA). Situs CpG berkerumun pada region regulasi gen (CpG *island*) sering dihubungkan dengan penurunan aktivitas dari gen yang terkait. Anak kambing produk dari teknologi SCNT, tidak lepas dari peran gen *H19* yang merupakan salah satu dari 73 gen *imprinted* yang ditemukan pada mamalia, yang berperan penting dalam perkembangan, diferensiasi dan regulasi dari multiplikasi sel yang diwariskan secara *paternally imprinted*. Gen ini mengkodekan *untranslated RNA* (UTR) atau RNA yang tidak dapat diterjemahkan. Tingkat kelahiran kloning kambing dengan teknologi ini masih rendah. Dengan transplantasi nuklir, inti somatik membawa modifikasi epigenetik spesifik dari jenis sel yang dibedakan, yang harus diubah selama pemrograman ulang inti. Salah satu modifikasi epigenetik utama dari genom sel somatik mencakup metilasi DNA pada residu sitosin, yang berperan dalam ekspresi kode genetik dan mempengaruhi pertumbuhan awal dan perkembangan melalui ekspresi gen.

Paper ini menyajikan hasil penelitian Lal *et al.* (2012) mengenai studi molekuler dan epigenetik pada gen *H19* kambing (*Capra hircus*). Percobaan lanjutan pada analisis metilasi dari embrio kloning akan memudahkan identifikasi penyimpangan metilasi dari gen *H19* dan model tersebut dapat digunakan untuk mengatur protokol transfer inti pada saat ini.

EPIGENETIK

Bossdorf *et al.* (2008) dalam telaahannya menyatakan studi epigenetika akan memberikan wawasan ke dalam mekanisme yang memungkinkan organisme untuk merespon lingkungan, karena proses epigenetik adalah inti dari beberapa jenis plastisitas fenotipik, seperti transisi lingkungan yang diinduksi untuk pembungaan pada tanaman (Bastow *et al.* 2004, He dan Amasino 2005), dan proses epigenetik memediasi beberapa jenis dampak lingkungan maternal (Rossiter 1996).

Pengaruh pada aktivitas gen yang diwariskan dengan pengaruh tersebut tidak memberikan perubahan pada DNA disebut epigenetik (Gehring *et al.* 2004) seperti yang dilaporkan oleh Nusifera (2007). Holliday (2005) yang dikutip oleh Nusifera

(2007) menyatakan bahwa proses epigenetik (epigenesis) merupakan konsekuensi interaksi antara gen dan lingkungan dan dapat terjadi akibat *silenced genes* atau informasi genomik yang tidak terekspresi. Metilasi DNA dan modifikasi histon dapat menyebabkan *genomic imprinting* atau tidak tercetaknya informasi pada genom yang tidak tercetak. Menurut Nusifera (2007) berdasarkan Plass dan Soloway (2002) dan Holliday (2005) *genomic imprinting* adalah mekanisme regulasi ekspresi gen epigenetik dengan satu dari dua kopi gamet tetua terekspresi, sedangkan yang lainnya tidak.

Menurut Jaenisch dan Bird (2003) dan Bender (2004) seperti yang dinyatakan oleh Bossdorf *et al.* (2008), mekanisme epigenetik yang terbaik saat ini adalah metilasi DNA, yang melibatkan penambahan gugus metil (CH₃) ke situs CpG (sitosin yang diikuti oleh guanin dalam sekuen DNA). Bossdorf *et al.* (2008) menyatakan bahwa situs CpG sering berkerumun di region regulasi gen, yang disebut CpG *island* adalah sering (tetapi tidak selalu) berhubungan dengan penurunan aktivitas dari gen yang terkait. Dijelaskan lebih lanjut bahwa reaksi metilasi dikatalisis oleh beberapa enzim *methyltransferase*.

Hasil telaahan Bossdorf *et al.* (2008) berdasarkan Richards (2006), Whitelaw dan Whitelaw (2006), Jirtle dan Skinner (2007) dalam beberapa kasus perubahan epigenetik yang disebabkan lingkungan dapat diwariskan ke generasi berikutnya, yang merupakan mekanisme aktual penghubung stimulus lingkungan dan perubahan epigenetik. Misal: racun lingkungan (Anway *et al.* 2005 dan Crews 2007) yang dilaporkan oleh Bossdorf *et al.* (2008) dan suplemen makanan (Cropley *et al.* 2006) yang dilaporkan oleh Bossdorf *et al.* (2008), menginduksi perubahan dalam metilasi DNA yang diwariskan selama beberapa generasi. Pada *Drosophila*, eksperimental pengurangan *heat shock protein* Hsp90 (yang juga terjadi sebagai respons terhadap stres lingkungan) menyebabkan perubahan fenotip stabil yang disebabkan oleh pelepasan variasi epigenetik yang tersembunyi (Sollars *et al.* 2003, yang dilaporkan oleh Bossdorf *et al.* 2008). Dalam telaahannya Bossdorf *et al.* (2008) menyimpulkan bahwa efek epigenetik seperti tingkah laku hewan memiliki konsekuensi evolusi yang sangat dalam, karena menurut West-Eberhard (2003), tingkah laku sering dianggap menjadi aspek paling responsif terhadap fenotipe hewan.

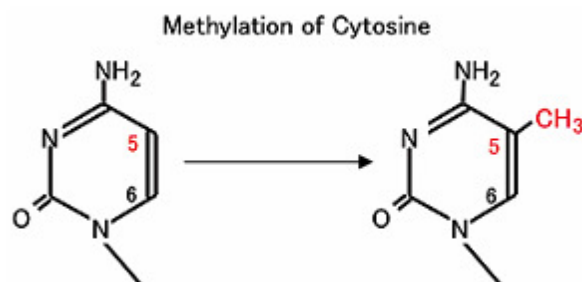
METILASI DNA

Modifikasi kimia untuk DNA, RNA atau protein dapat mempengaruhi kondisi kromatin dan ekspresi gen. Dengan mengacu pada *epigenetic inheritance* sebagai *epigenetic marks* (tanda epigenetik), maka modifikasi tersebut diwariskan secara stabil pada beberapa generasi. *Epigenetic marks* bersifat dinamis dan berperan penting untuk perkembangan normal, tetapi lingkungan dapat memodifikasi. Hal mana menunjukkan peran mekanistik untuk epigenetika dalam plastisitas fenotipik. Efek perilaku seorang ibu kepada perilaku anaknya, merupakan salah satu contohnya (Smith dan Rytchie 2013).

Kontrol ekspresi gen merupakan faktor utama dalam mekanisme epigenetik. Aksesibilitas DNA ditentukan oleh struktur kromatin yang pada akhirnya menentukan proses transkripsi (Nusifera 2007). Faktor yang mempengaruhi struktur kromatin adalah kompleks remodeling yang bergantung pada ATP (*ATP-dependent remodeling complex*), modifikasi histon (*histon modification*), group Polycomb dan Trithorax, metilasi DNA, varian histon, dan inaktivasi gen yang diinduksi RNA (*RNA-induced gene silencing*) (Hsieh dan Fischer 2005 seperti yang dikutip oleh Nusifera 2007).

Dalam telaahannya Nusifera (2007) menyatakan bahwa metilasi DNA merupakan modifikasi epigenetik yang paling banyak terjadi pada hewan yang tidak mengubah sekuen utama DNA tetapi merupakan faktor kritis bagi perkembangan normal, pola ekspresi gen dan stabilitas genomik. Smith dan Rtychie (2013) menyatakan bahwa metilasi DNA dipelajari dengan sangat dalam yang dikaitkan dengan *epigenetics marks* sehingga peran epigenetika dalam evolusi berfokus pada metilasi DNA.

Nusifera (2007) dalam telaahannya berdasarkan Plass dan Soloway (2002) dan Hsieh dan Fischer (2005) menyatakan bahwa metilasi DNA merupakan reaksi penambahan kovalen gugus metil (CH_3) pada ujung 5' sitosin (Gambar 1) dalam dinukleotida CpG dan trinukleotida CpNpG yang difasilitasi oleh enzim DNA metiltransferase.



Gambar 1 Metilasi pada ujung 5-sitosin

GEN *H19*

Menurut Yang *et al.* (2005) dan Paulsen *et al.* (2001) yang dilaporkan oleh Lal *et al.* (2012), gen *H19* merupakan salah satu dari 73 gen *imprinted* yang ditemukan pada mamalia. Gen *H19* berperan penting dalam perkembangan, diferensiasi dan regulasi dari multiplikasi sel yang diwariskan secara *paternally imprinted* dan mengkodekan RNA yang tidak dapat diterjemahkan atau *untranslated* RNA (UTR). Menurut Khatib dan Schutzkus (2006) gen *H19* diekspresikan dalam tahap awal embriogenesis dan pertumbuhan janin yang levelnya menurun pada *post-natal*. Ariel *et al.* (1997), Zhang *et al.* (1993) dan Binder *et al.* (2006) yang dinyatakan oleh Lal *et al.* (2012), bahwa pada manusia

gen *H19* terlibat dalam generasi tumor dan menunjukkan ekspresi onkofetal dalam kanker. Gangguan pada metilasi alel spesifik CpG dari gen ini menyebabkan kehilangan alel aktif dalam tumor *Wilms*. Dereglasi gen *H19* berakibat pada abnormalitas pertumbuhan dan asimetri pada sindrom Silver-Russel dan sindrom Beckwith-Wiedemann.

Khatib dan Schutzkus (2006) melaporkan bahwa ekspresi gen *H19* pada sapi melimpah pada jaringan janin yang meliputi amnion, chorion dan allantois, hati, paru-paru, jantung, limpa, mata, tulang rusuk dan kelenjar susu, ekspresi sedang pada kotiledon, ekspresi rendah pada usus dan otak. Level ekspresi rendah ditemukan pada sapi dewasa. Dalam perbandingan antara dewasa dan janin, perbedaan signifikan level ekspresi *H19* ditemukan pada hati, paru-paru, jantung dan limpa. Pola ekspresi pada dewasa menyiratkan bahwa kemungkinan peran dalam embriogenesis, dan gen *H19* kemungkinan memiliki fungsi lain.

Metilasi pada Gen H19 Kambing (*Capra hircus*)

Singh (2012) melakukan pengamatan tentang status metilasi gen *H19* selain *IGF2* pada line sel fibroblast kambing (*Capra hircus*) dengan perlakuan *serum starvation*. Anak kambing hasil SCNT (somatic cell nuclear transfer) mengalami banyak kejadian abnormalitas dan tidak efisien. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) adalah teknologi yang potensial untuk memproduksi hewan yang secara genetik identik atau kembar identik. Menurut Wilmut *et al.* (1997) yang dilaporkan oleh Lal *et al.* (2012), SCNT merupakan alat yang ampuh untuk menunjukkan perkembangan plastisitas sel yang dibedakan. Sejumlah spesies telah berhasil ditumbuh melalui SCNT secara dramatis sejak kelahiran domba kloning Dolly.

Pada ternak kambing, teknologi ini pernah dilakukan, tetapi tingkat kelahiran kloning yang dihasilkan masih rendah (Berg *et al.* 2007, Keefer *et al.* 2002, Paoloni-Giacobino dan Chaillet 2004) seperti yang dikutip oleh Lal *et al.* (2012). Dengan transplantasi nuklir, inti somatik membawa modifikasi epigenetik spesifik dari jenis sel yang dibedakan, yang harus diubah selama pemrograman ulang inti. Salah satu modifikasi epigenetik utama dari genom sel somatik mencakup metilasi DNA pada residu sitosin, yang berperan penting dalam ekspresi kode genetik dan mempengaruhi pertumbuhan awal dan perkembangan melalui pengaruhnya pada ekspresi gen (Cezar 2003, Rice dan Allis 2001) seperti yang dikutip oleh Lal *et al.* (2012).

Perubahan epigenetik seperti *imprinting* genom yang menyimpang, dianggap sebagai salah satu penyebab utama dari abnormalitas pada hewan kloning. Menurut Paoloni-Giacobino dan Chaillet (2004) seperti yang dilaporkan oleh Lal *et al.* (2012) bahwa *imprinting* genom merupakan fenomena epigenetik dengan ekspresi gen ditentukan oleh asal orang tuanya.

Lebih lanjut Singh (2012) menjelaskan bahwa status metilasi diamati pada region upstream gen *H19* yang mengikat CTCF III, melalui pengamatan sebelum dan setelah pemrograman ulang sel-sel fibroblast dengan metode *serum starvation*. Sel fibroblast dikultur hingga *passage* keenam dan DNA genom

diekstraksi sebelum dan setelah pemrograman ulang. Sampel DNA genomik kemudian digunakan untuk mengamplifikasi region yang mengikat CTCFIII gen *H19* fragmen 295 bp. Sekuen nukleotida fragmen gen *H19* memiliki 19 motif. Sampel DNA genomik kemudian diperlakukan dengan natrium bisulfit untuk menganalisis status metilasi motif CpG yang diidentifikasi. DNA genom yang dikonversi bisulfit diamplifikasi oleh *bisulphite sequencing primer* (BSP) set. Fragmen yang diamplifikasi dari sampel DNA genom yang dikonversi bisulfit dari sel yang diprogram ulang dan yang tidak diprogram ulang, kemudian disekuensekan. Variasi dalam sekuen diperoleh dari DNA genom yang dikonversi bisulfit dari sel yang diprogram ulang dan yang tidak diprogram ulang. Analisis sekuen nukleotida bisulfit dari sel kultur yang dikonversi bisulfit yang diprogram ulang dan yang tidak diprogram ulang mengungkapkan metilasi 6 motif CpG pada fragmen gen *H19*. Dengan demikian, tingkat metilasi yang diamati dalam studi untuk fragmen gen 295 bp adalah sekitar 31.5%. Namun, dalam sel-sel yang diprogram ulang motif CpG ditemukan menjadi *unmethylated* (tidak dimetilasi). DMR yang diidentifikasi dalam studi ini pada kambing dapat digunakan sebagai tag epigenetik untuk mendeteksi penyimpangan metilasi. Oleh karena itu, hal ini dapat berfungsi sebagai pendekatan yang menjanjikan untuk deteksi dini kegagalan pendugaan perkembangan terkait dengan teknologi reproduksi buatan pada spesies *caprine*.

Hasil penelitian Lal *et al.* (2012) memberi penjelasan lebih dalam dari penelitian yang dilaporkan oleh Singh (2012). Lal *et al.* (2012) menyatakan bahwa gen *H19* merupakan *paternally imprinted gene*. Penelitian dengan menggunakan kambing (*Capra hircus*) dilakukan untuk mempelajari status metilasi dari daerah yang mengikat CTCF III pada *upstream* gen *H19* sebelum dan setelah pemrograman ulang dengan metode *serum starvation*, dalam kultur sel fibroblast. Berdasarkan NCBI (National Center for Biotechnology Information), gen *H19* *Capra hircus* dengan nomer akses EF577239.1, terdiri atas 4 199 bp. Berikut ini disajikan uraian mengenai studi molekuler dan epigenetik pada gen *H19* kambing (*Capra hircus*). Uraian ini berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Lal *et al.* (2012). Status metilasi dari region region upstream CTCF III gen *H19* pada *chorioallantois* domba mengungkapkan metilasi paternal predominan yang mengindikasikan konservasi region regulasi imprinting pada manusia, mencit dan domba. Hal tersebut belum ditemukan pada kambing. Penelitian Lal *et al.* (2012) menemukan motif CpG dari region yang mengikat CTCFIII pada gen *H19* kambing. Status metilasi diselidiki pada sel somatik yang dikultur normal dan yang diprogram ulang untuk memahami mekanisme pemrograman ulang gen *H19*.

Bahan dan Metode

Penelitian mengenai perkembangan, pengkulturan, jalan lintasan (passage) dan isolasi dari donor sel somatik *caprine* dilakukan di J.N.K.V.V. Jabalpur. Sel fibroblast kambing dikultur dari sampel jaringan yang dikumpulkan dari RPH. Sampel telinga kambing dikumpulkan dan dicuci dengan *saline* steril normal (suhu 35-38 °C) dan diangkut ke laboratorium yang diletakkan dalam *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) hangat pada suhu kamar. Sebelum diproses lebih

lanjut, jaringan dicuci 3 kali dengan *saline* normal dan 2 kali dengan DPBS. *Saline* normal dan DPBS mengandung gentamisin sebagai antibiotik.

Metode *serum starvation* digunakan untuk pemrograman ulang dari *line* sel. *Line* sel ditumbuhkan pada sekitar 80% *confluency* dalam medium DMEM dengan 10% FBS dan disimpan dalam media yang memiliki 0.5 % FBS selama 72 jam (Yang *et al.* 2007). *Line* sel ini digunakan untuk isolasi DNA genom setelah trypsinisation.

DNA diekstraksi dari sel-sel fibroblas yang dikultur dengan menggunakan DNeasy Blood dan Tissue kit (QIAGEN, USA) sesuai dengan instruksi pabrik. Elektroforesis gel agarosa 0.7% b/v dijalankan untuk memeriksa kualitas DNA genom. Kemurnian dan konsentrasi DNA genom diperiksa dengan menggunakan *nanodrop-spectrophotometer*.

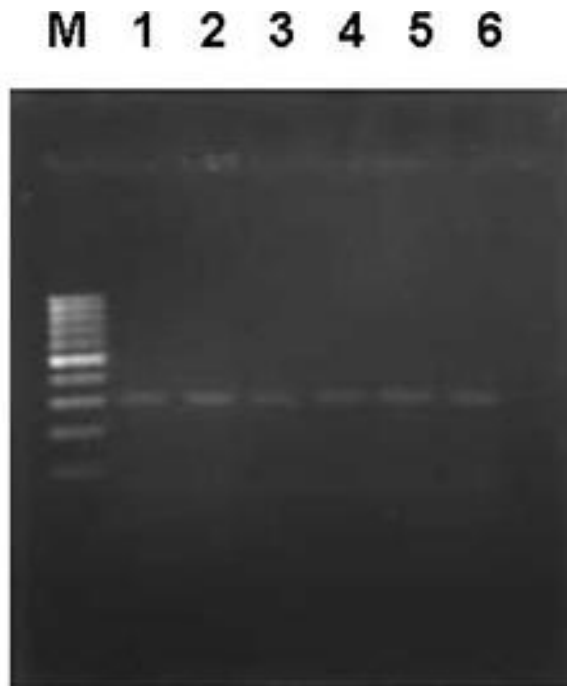
Perancangan primer menggunakan *H19 gene specific primer set* (P1) yang diproduksi oleh "*DNAstar Lasergene Software*" (Jerman). Primer dirancang untuk mengamplifikasi region yang mengikat CTCF III dari gen *H19*. Sekuen parsial dari gen *H19 C. hircus* digunakan sebagai sekuen acuan untuk merancang primer (No. Akses EF577239.1). Penelitian ini juga menggunakan *bisulphite sequencing primer set* (P2) yang diproduksi oleh "*Methprimer Software*" (Li dan Dahiya, 2002) untuk mengamplifikasi region yang sama. Lal *et al.* (2012) tidak menyertakan sekuen basa primer yang digunakan.

Reaksi PCR dari fragmen gen *H19* dijalankan dengan menggunakan P1 dan P2 *primer set*. Campuran reaksi PCR terdiri atas 100 ng DNA *template*, 200 μ M untuk setiap dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 unit *Dream Taq DNA polymerase* dan 5 μ M masing-masing primer P1/P2 (Sambrook dan Russel, 2001). Amplifikasi PCR dilakukan dalam *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystem) dengan volume reaksi akhir 25 μ l. Program PCR terdiri atas denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 54 °C/57 °C (P1/P2) selama 45 detik, ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit (35 siklus) dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit. Amplifikasi produk PCR diperiksa dalam elektroforesis gel agarosa 1.4%.

Konversi bisulfit sampel DNA genom dijalankan dengan *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (Zymo Research) yang menggunakan protokol standar dengan beberapa modifikasi. Gel agarosa dengan fragmen yang diamplifikasi PCR dari gen *H19* DNA genomik dan DNA genom dikonversi bisulfit, diiris dan dielusi dengan menggunakan *Minielute Gel Extraction Kit* (Qiagen). Hasil dari gel dielusi yaitu sekitar 80% dari produk PCR yang asli, digunakan. DNA yang diperoleh adalah sebuah pita tunggal tanpa *smear* apapun. Proses sekuen produk PCR yang dielusi dilakukan dalam rangkap tiga. Sampel dari masing-masing kelompok perlakuan (sel kutur normal, diprogram ulang dan tidak pemrograman ulang) menjadi sasaran sekuensing DNA dengan *Automatic DNA Sequencer* (ABI Pris, USA).

Hasil dan Pembahasan

Produk amplifikasi 295 bp fragmen gen H19 diperoleh dari sampel DNA genom dengan P1 *primer set* disajikan pada Gambar 2) dan nomor akses NCBI HM 348.768. Amplifikasi PCR dari sampel DNA yang dikonversi bisulfit oleh Amplifikasi PCR dari DNA genom yang dikonversi bisulfit dilakukan dengan menggunakan H19 BSP primer set P2. Produk amplifikasi 295 bp diperoleh dari sampel DNA dengan P2 *primer set* (Gambar 2) menunjukkan efisiensi dari reaksi konversi bisulfit.



Keterangan: Lane M: marker berbobot molekul DNA 100 bp. Lane 1-3: PCR mengamplifikasi fragmen 295 bp dari DNA genom sel fibroblast yang dikultur dengan menggunakan P1 *primer set*. Lane 4-6: PCR mengamplifikasi fragmen 295 bp dari sel kultur DNA genom yang dikonversi bisulfit dengan menggunakan P2 *primer set*.

Gambar 2 Gel elektroforesis agarose (agarosa 1.4%) menunjukkan PCR yang mengamplifikasi region yang mengikat fragmen CTCF III (295 bp) dari gen *H19 Capra hircus*

Sekuen nukleotida yang diperoleh dari fragmen yang mengamplifikasi dari gen H19 itu selaras dengan sekuen yang sudah tersedia dari kambing (Gene Bank No. Akses EF577239.1.). Sekuen 295 bp diekstraksi dengan sekuen *aligning* yang diperoleh dari primer *forward* dan *reverse* seperti ditunjukkan pada Gambar. 3. Variasi dalam sekuen nukleotida ditemukan pada dua posisi. Sekuen nukleotida ditemukan mengandung polimorfisme pada posisi ke-39 dan ke-41 dari sekuen nukleotida gen *H19* kambing, C dan G menggantikan G dan C. Sebanyak 19 motif

```

ACC TCA AAT AGG GCT GAG AGG TTG TGG GTG TGG AGA CAC AGG CCG CCG CGA GCG GGC
AGT GCA GAC TCA CAC ATC ACC ACC AAG GTG GCC CCG CCG GCG GGG TCT GCC CAC CAC CCG
ATC CCG CCG CCG TGG ATC CCG GGT CCG CCC AGG CCG GAT ACC ACA ATG GTC CAC AGG
GTC ATC AGG GAG ATG GGA TGC CTG TCC GAG CTC CCC CCG GTC ACC CCA AGT CAC CCG
GGG CCG CCC TGT TGA AGT TGG GAG AGG AGA GGG AGC ATT TGG GGA CAA TGA GGG ATC
CCC TGT GCC T

```

Gambar 3 Sekuen nukleotida dari region yang mengikat CTCF III dari gen *H19* *Capra hircus* (295 bp) yang mengandung 19 motif CpG dan dua mutasi titik

CpG diidentifikasi dalam sekuen nukleotida yang diperoleh setelah sekuensing fragmen gen *H19*.

Sekuen nukleotida dari fragmen gen *H19* dari DNA genom yang dikonversi bisulfit dari sel kultur yang tidak diprogram ulang menghasilkan sekuen 295 bp (Gambar 4). Sebagian besar dari basa sitosin (13 motif CpG) pada sekuen asli diubah menjadi basa timin setelah perlakuan bisulfit. Perlakuan bisulfit mengubah basa sitosin unmethylated ke basa urasil (Feil *et al.* 1994).

Sekuen nukleotida dari fragmen gen *H19* dari DNA genom yang dikonversi bisulfit dari sel kultur yang diprogram ulang menghasilkan sekuen 295 bp (Gambar

```

ATT TTA AAT AGG GTT GAG AGG TTG TGG GTG TGG AGA TAT AGG TGG TTG TGA GGT GGT AGT
GTA GAT TTA TAT ATT ATT ATT AAG GTG GTT GTG GTG GGG TTT GTT TAT TAT GTG ATT TGT
CG CG GGG ATT TTG GGT TCG TT AGG TTG GAT ATT ATA ATG GTT TAT AGG GTT ATT AGG
GAG ATG GGA TGT TTG TCC GAG TTT TTT CCG GTT ATT TTA AGT TAT TTT GGG CCG TTT TGT
TGA AGT TGG GAG AGG AGA GGG AGT ATT TGG GGA TAA TGA GGG ATT TTT TGT GTT T

```

Gambar 4 Sekuen nukleotida dari region yang mengikat CTCF III dari gen *H19* *Capra hircus* (295 bp) dari sel kultur yang tidak diprogram ulang pada DNA genom yang dikonversi bisulfit

Gambar 5 Sekuen nukleotida dari region yang mengikat CTCF III dari gen *H19* *Capra hircus* (295 bp) dari sel kultur yang diprogram ulang pada DNA genom yang dikonversi bisulfit

5). Hampir seluruh basa sitosin dalam sekuen asli diubah menjadi basa timin setelah perlakuan bisulfit. Dengan demikian sekuen nukleotida yang diperoleh merupakan indikasi penurunan metilasi CpG motif dari gen *H19* dalam sel somatik yang diprogram ulang.

Penggunaan Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) adalah alat yang ampuh untuk menunjukkan perkembangan plastisitas sel yang dibedakan, tetapi efisiensi SCNT belum diperbaiki secara dramatis dari yang dilaporkan 0.4% dari embrio yang direkonstruksi yang menghasilkan embrio yang sehat. Penggunaan teknik ini pada produksi ternak terbatas pada sejumlah kecil ternak kloning yang diproduksi secara komersial karena kegagalan perkembangan embrio. Hal ini dikaitkan dengan pemrograman ulang yang tidak tepat dari inti sel donor. Modifikasi ulang yang tidak lengkap dari inti sel donor setelah transfer inti atau nuclear transfer (NT) mungkin mengarah kepada ekspresi abnormal dari gen yang berperan penting untuk perkembangan.

Penelitian ini memilih region yang mengikat CTCF III pada bagian *upstream* dari gen *H19* sebagai kandidat potensial untuk mempelajari status metilasi gen *H19* kambing dalam sel kultur. Informasi mengenai DMR (differentially methylated region) dari gen *H19* kambing tidak tersedia. Informasi DMR gen *H19* pada ovine digunakan pada penelitian ini. Young *et al.* (2003) mendeteksi beberapa CTCF (I-IV) yang mengikat domain pada DMR *upstream* dari gen *H19* pada spesies *ovine*. Dalam penelitian ini region yang mengikat CTCF III pada bagian *upstream* dari gen *H19* terpilih sebagai kandidat potensial untuk mempelajari status metilasi gen *H19* kambing dalam sel kultur. Sekuen nukleotida dari region domba dan kambing yang mengikat CTCF III pada *upstream* gen *H19* memiliki hubungan filogenetik yang dekat. Dengan demikian

kemungkinan bahwa region tersebut cocok untuk mempelajari status metilasi dari gen *H19* kambing.

Pada studi ini 19 CpG motif pada fragmen 295 bp yang diamplifikasi dari region yang mengikat H19 CTCF III kambing diidentifikasi dengan sekuensing nukleotida. Prediksi CpG *island* yang menggunakan *Methprimer Software* (Li dan Dahiya 2002) mengungkapkan bahwa CpG *island* tunggal dari 121 bp pada fragmen gen yang diamplifikasi dari region yang mengikat H19 CTCF III. Island ini dimulai pada posisi ke-39 dan berakhir pada posisi 169 dalam sekuen nukleotida yang diperoleh.

Langkah yang paling penting untuk penentuan yang tepat dari pola metilasi adalah konversi lengkap *sitosin unmethylated*. Hal ini dicapai dengan menginkubasi DNA dalam konsentrasi garam bisulfit tinggi pada suhu tinggi dan pH rendah. Kondisi ini menyebabkan tingkat tinggi fragmentasi DNA dan kehilangan DNA berikutnya selama pemurnian. Pemurnian diperlukan untuk menghilangkan garam bisulfit dan bahan kimia yang digunakan dalam proses konversi yang menghambat prosedur sekuensing.

Penilaian metilasi dari fragmen yang diamplifikasi dilakukan dengan perlakuan DNA genom dengan natrium bisulfit (Thurston *et al.* 2008). Prosedur bisulfit yang dioptimalkan untuk meningkatkan efisiensi konversi bisulfit dan hasil DNA setelah konversi bisulfit menemukan bahwa inkubasi pada 54 °C selama 4 jam, sudah cukup untuk konversi sebagian besar residu sitosin *unmethylated* ke urasil dan tidak ditemukan efek yang merugikan terhadap kualitas DNA genom. Sekuensing bisulfit dari sampel mengungkapkan konversi sitosin *unmethylated* ke timin dalam fragmen gen yang diamplifikasi dari region yang mengikat CTCF III dari gen *H19* kambing. Metilasi pada CpG motif diperiksa dalam sampel DNA genom sel kultur sebelum dan sesudah pemrograman ulang pada passage ke-6.

Analisis metilasi DNA dari 19 motif CpG region yang mengikat CTCFIII pada gen *H19* kambing dari sel kultur yang tidak diprogram ulang mengungkapkan keadaan metilasi dari 6 motif CpG, sehingga perolehan tingkat metilasinya sekitar 31.5%. Hasil ini adalah konsisten dengan rataan level yang diamati sekitar 25% dari metilasi CpG dinucleotides dari region yang mengikat CTCF III dari gen *H19* sel chorioallantois embryo biparental oleh sekuensing bisulfit pada domba (Thurston *et al.* 2008). Sel kultur yang diprogram ulang menunjukkan profil metilasi CpG yang berbeda daripada sel-sel yang tidak diprogram ulang pada penelitian ini. Dalam sel yang diprogram ulang motif CpG dari region yang mengikat CTCF III dari gen *H19* kambing ditemukan *unmethylated*. Hasil ini sesuai dengan penelitian Eversole-Cire *et al.* (1995) pada pengamatan gen *IGF2* dan *H19* dalam kultur sel somatik yang dipaksa menjadi diam (quiescent), baik dengan *confluence arrest* atau *serum starvation*. Penelitian

Yang *et al.* (2007) melaporkan penurunan tingkat metilasi DNA setelah *serum starvation* dalam *line* sel dibandingkan dengan sel yang diberi serum. Penurunan level metilasi motif CpG sel pada serum starvation (G0/G1) dalam

penelitian ini bersesuaian dengan pengamatan penurunan yang signifikan dari metilasi DNA dalam sel fase G0/G1 (Giraldo *et al.* 2008).

KESIMPULAN

Studi epigenetika memberikan wawasan ke dalam mekanisme yang memungkinkan organisme untuk merespon lingkungan, karena proses epigenetik adalah inti dari beberapa jenis plastisitas fenotipik. Pengaruh pada aktivitas gen yang diwariskan dengan pengaruh tersebut tidak memberikan perubahan pada DNA. Konsekuensi interaksi antara gen dan lingkungan dan dapat terjadi akibat *silenced genes* atau informasi genomik yang tidak terekspresi. Beberapa kasus perubahan epigenetik yang disebabkan lingkungan dapat diwariskan ke generasi berikutnya, yang merupakan mekanisme aktual penghubung stimulus lingkungan dan perubahan epigenetik.

Mekanisme epigenetik yang terbaik saat ini adalah metilasi DNA, yang melibatkan penambahan gugus metil (CH₃) ke situs CpG (sitosin yang diikuti oleh guanin dalam sekuen DNA). Situs CpG berkerumun di region regulasi gen, yang disebut CpG *island* yang berhubungan dengan penurunan aktivitas dari gen yang terkait.

Region yang mengikat CTCF III dari gen *H19* kambing (*Capra hircus*) merupakan region metilasi diferensiasi yang potensial pada fragmen 295 bp. Hasil amplifikasi dari variasi pada kambing ditemukan pada posisi basa ke 39 dan ke 41 bila dibandingkan dengan sekuen genom DNA yang diterbitkan dari gen *H19* pada kambing (Akses No. EF577239).

Region CTCF III yang diamplifikasi dari gen *H19* ditemukan mengandung 19 CpG motif. Fragmen amplifikasi dari DNA genom yang dikonversi bisulfit pada sel kultur mengungkap metilasi pada 6 CpG motif. Dengan demikian, region yang mengikat CTCF III dari gen *H19* menunjukkan penurunan metilasi pada situs CpG dalam sel *serum starvation*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bossdorf O, Richards CL, Pigliucci M. 2008. Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters* 11: 106-115.
- Khatib H, Schutzkus V. 2006. The expression profile of the H19 gene in cattle. *Mammalian Genome* 17: 991-996.
- Lal SV, Singh S, Kumari R, Kumar S. 2012. Molecular and epigenetic study of *H19* gene in goat (*Capra hircus*). *Indian j. Anim. Res.* 46(1): 15 -21.
- Nusifera S. 2007. Metilasi DNA dan genomic imprinting (suatu tinjauan tentang mekanisme epigenetik). *Jurnal Agronomi* 11(1): 51-58.

Singh S. 2012. *Methylation status of H19 and IGF2 genes in fibroblast cell lines of goat (Capra hircus) after serum starvation treatment*. Hyderabad (INDIA): 3rd World Congress on Biotechnology.

Smith G, Rtychie MG. 2013. How might epigenetics contribute to ecological speciation? *Current Zoology* 59(5): 686-696.