

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pemeliharaan ternak kerbau di Indonesia secara langsung tidak diimbangi dan tidak dikelola secara baik karena pelestarian yang tidak tepat. Hal demikian terjadi karena peternak sering dikhawatirkan oleh populasi kerbau di Indonesia terus menunjukkan penurunan setiap tahun baik dari sisi jumlah maupun kualitasnya (Riyanto, 2010). Meskipun demikian, kerbau memiliki kontribusi yang cukup besar dalam menunjang program swasembada daging yaitu dengan target 2,2 juta ekor. Selain itu, ternak kerbau menyumbang 2% dari total produksi daging nasional, sementara kontribusi daging kerbau secara keseluruhan mencapai 19% (DitJenNak, 2012).

Potensi yang dimiliki kerbau sebagai penghasil protein hewani memiliki kendala pada perkembangan populasi kerbau yang terus menurun dari tahun ke tahun. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik tahun 2024, populasi kerbau di Sumatera Barat pada tahun 2021-2022 mengalami penurunan. Pada tahun 2021, Populasi kerbau sebanyak 83.398 ekor sedangkan pada 2022 populasi kerbau sebanyak 79.711 ekor. Penurunan ini disebabkan oleh beberapa alasan diantaranya kurangnya perhatian masyarakat terhadap pengembangan ternak (pemuliaan), terjadinya pemotongan betina produktif, pemeliharaan secara tradisional serta kurang tersedianya pakan ternak (Farid, 2024)

Kerbau lumpur adalah sebagai salah satu jenis ruminansia besar yang memiliki peranan penting dalam sektor pembangunan peternakan nasional dan merupakan sumber gen yang khas karena dianggap sebagai ternak penyimpan gen

unik yang dapat dimanfaatkan untuk konservasi, pemuliaan dan perbaikan mutu genetik (Husni, 2022). Reproduksi yang efisien menjadi faktor utama dalam keberhasilan produksi ternak salah satunya terdapat dalam program pemuliaan selektif. Tingkat fertilitas pada kerbau lumpur diketahui lebih rendah dibandingkan dengan kerbau sungai. Indikator yang digunakan dalam mengukur efisiensi reproduksi adalah *Service per Conception* (S/C). Perera (2011) menyatakan bahwa kerbau lumpur memiliki nilai S/C yaitu 2,5-3,5 lebih tinggi dibandingkan kerbau sungai yang memiliki nilai S/C yaitu 1,2-2,0. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kerbau lumpur membutuhkan lebih banyak inseminasi atau perkawinan sebelum terjadi kebuntingan dan menunjukkan rendahnya efisiensi fertilisasi dibandingkan kerbau sungai. Selain itu, kerbau lumpur memiliki jumlah kromosom lebih sedikit yaitu 48 kromosom sedangkan kerbau sungai memiliki 50 kromosom (Iannuzzi and DiMeo, 2009). Perbedaan yang terdapat pada kedua kerbau tersebut dapat mempengaruhi ekspresi genetik dan karakteristik biologis termasuk tingkat fertilitas dan efisiensi reproduksi.

Upaya peningkatan performa reproduksi ternak kerbau dapat dilakukan melalui perbaikan mutu genetik. Peningkatan kualitas genetik bertujuan memperbaiki tingkat fertilitas serta meningkatkan jumlah keturunan dari induk betina yang memiliki kualitas unggul. Salah satu cara yang dapat ditempuh adalah melalui seleksi berbasis DNA, khususnya pada sifat-sifat reproduksi yang berkaitan dengan peningkatan jumlah anak. Oleh karena itu, penelitian mengenai aspek reproduksi sangat diperlukan untuk mengetahui keragaman genetik yang berpengaruh terhadap regulasi hormon reproduksi pada kerbau lumpur. Salah satu yang mempengaruhi pada hormon reproduksi adalah *Osteopontin* (OPN). OPN

adalah glikoprotein yang diekspresikan dalam serangkaian kondisi fisiologis yang terdiri dari *remodelling* jaringan, penambatan biomineralisasi dan *chemotaxis* (Lanteri *et al.*, 2012).

Osteopontin (OPN) merupakan protein spesifik yang dihasilkan oleh kelenjar kelamin aksesori dan disekresikan ke dalam plasma semen. Protein ini berfungsi mencegah terjadinya penggumpalan membran spermatozoa serta mempercepat proses kapabilitas spermatozoa setelah ejakulasi dan menghasilkan peningkatan kesuburan yang berdampak langsung dengan keberhasilan fertilisasi (Chen *et al.*, 2022). OPN adalah protein dengan berat molekul 55 kilodalton yang disekresikan oleh kelenjar aksesoris sehingga keberadaan OPN berkaitan erat dengan kualitas dan fertilitas hewan jantan (Cancel *et al.*, 1997). Menurut Erikson *et al.*, (2007) OPN dikatakan sebagai regulator utama dalam sistem reproduksi dikaitkan OPN mengkode protein ekstraseluler yang berperan dalam adhesi sel, komunikasi antar sel, dan regulasi lingkungan mikro uterus. Dalam plasma seminal, OPN berinteraksi dengan spermatozoa membantu dalam kapabilitas sperma, reaksi akrosom, dan adhesi sperma ke zona pelusida ovum, dan berperan dalam meningkatkan kemampuan fertilisasi yang baik.

OPN memiliki struktur protein yang kompleks dan terdiri dari sekitar 300 asam amino, tergantung pada spesiesnya (Giacopelli *et al.*, 2004). Gen OPN pada kerbau terletak pada kromosom ke-7 dan memiliki panjang 7093 *base pair* (bp) yang terdiri atas tujuh ekson dan enam intron dengan masing-masing ekson memiliki panjang yang berbeda, yaitu: ekson-1 sepanjang 156 bp, ekson-2 sepanjang 69 bp, ekson-3 sepanjang 39 bp, ekson-4 sepanjang 81 bp, ekson-5 sepanjang 43 bp, ekson-6 sepanjang 306 bp, dan ekson-7 sepanjang 750 bp.

Struktur ini umum pada gen-gen yang memiliki peran penting dalam pengkodean protein seperti OPN yang terlibat dalam regulasi sistem reproduksi, tulang, dan metabolisme mineral. OPN mempengaruhi fungsi biologis penting termasuk adhesi sel, pembentukan tulang, dan respon imun. Struktur ini memberikan fleksibilitas dalam regulasi ekspresi gen melalui proses *splicing* alternatif (Sodek *et al.*, 2000).

Adhesi sel merupakan proses sel menempel pada matriks ekstraseluler melalui molekul adhesi seperti integrin. OPN bertindak sebagai ligan untuk reseptor ini sehingga berperan dalam migrasi sel, proliferasi, dan interaksi antar sel. (Sodek *et al.*, 2000). Mineralisasi sel (pembentukan tulang) merupakan proses pengendapan mineral seperti kalsium pada matriks seluler yang berperan penting pada proses pembentukan dan pemeliharaan jaringan keras yaitu tulang dan gigi. OPN memiliki peran ganda dalam mineralisasi sebagai promotor dan inhibitor. OPN sebagai promotor berfungsi dalam mineralisasi tulang normal, dan mendukung pembentukan dan penyembuhan tulang. OPN sebagai inhibitor berfungsi mencegah pembentukan kristal hidroksiapatit, menghambat agregasi kristal kalsium fosfat sehingga keseimbangan dalam proses pembentukan tulang berlangsung optimal dan mengurangi terjadinya mineralisasi berlebih (Denhardt *et al.*, 2001). Hubungan pada sistem reproduksi menunjukkan bahwa OPN sangat berperan dalam proses fertilisasi yaitu mendukung implantasi embrio di uterus, membantu dalam proses adhesi spermatozoa ke zona pelusida dan membantu dalam proses kapabilitas sperma (Cancel *et al.*, 1997).

Keragaman gen OPN dapat dianalisis menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). PCR merupakan metode amplifikasi DNA pada segmen tertentu yang berlangsung di luar

sel dan membutuhkan primer serta enzim polimerase. Primer merupakan fragmen DNA pendek yang berikatan dengan daerah target untuk diperbanyak. Metode PCR-RFLP banyak digunakan untuk mengidentifikasi lokasi variasi genetik pada kromosom yang berhubungan dengan sifat ekonomi ternak, seperti pertumbuhan dan produksi. Metode ini semakin banyak diterapkan sebagai pengenalan karakteristik genetik karena memiliki beberapa keunggulan, termasuk kemampuan untuk menggandakan DNA secara efisien melalui reaksi berantai polimerase (PCR) dan variasi panjang fragmennya diidentifikasi dengan bantuan enzim restriksi yang mempermudah proses penentuan genotipe (Jakaria dkk., 2007).

Enzim restriksi merupakan jenis nuklease yang mampu memotong DNA beruntai ganda pada urutan nukleotida tertentu, yang dikenal sebagai situs pengenalan. Untuk analisis gen OPN, enzim restriksi yang digunakan adalah *NsiI* yang memiliki situs pemotongan spesifik pada urutan ATGCA↓T.

Gen OPN mempengaruhi pada kualitas spermatozoa pada kerbau jantan. Boccia *et al.*, (2013), menyatakan bahwa pada ekson 7 teridentifikasi adanya polimorfisme yang terjadi terhadap kualitas spermatozoa. OPN yang terdapat pada plasma semen berperan dalam proses kapasitasi, motilitas, dan kemampuan fertilisasi spermatozoa. Pada tingkat ekspresi gen OPN kerbau jantan, plasma semen berhubungan erat dengan integritas membran spermatozoa, aktivitas biokimia yang mendukung keberhasilan fertilisasi, dan terlibat dalam proses kapasitasi yang akan menghasilkan proses *maturase* sperma untuk mempersiapkan fertilisasi. Selain itu, OPN mendukung adhesi sperma dan inisiasi reaksi akrosom yang melibatkan pelepasan enzim-enzim dari akrosom menghasilkan penetrasi

terhadap zona pelusida ovum selama proses fertilisasi dan berkontribusi pada viabilitas, motilitas, dan morfologi normal spermatozoa (Gomes *et al.*, 2020)

Penelitian yang dilakukan Tania *et al.*, (2008), menemukan bahwa posisi nukleotida 722 di ekson 7 gen OPN mengalami perubahan dari Adenin (A) menjadi Sitosin (C) pada kerbau (*Bubalus bubalis*). Perubahan ini menghasilkan mutasi nonsinonim yaitu perubahan asam amino dari Arginin (R) menjadi Serin (S). Perubahan ini berdampak pada struktur dan fungsi protein OPN yang berperan dalam pengaturan adhesi seluler dan komunikasi antar sel dalam sistem reproduksi. Analisis mutasi dilakukan menggunakan metode sekuensing DNA yaitu pada ekson 7 gen OPN di amplifikasi menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) kemudian dianalisis dengan teknik *Sanger Sequencing*. Hasil sekuensing menunjukkan adanya variasi nukleotida yang berbeda dari sekuens referensi yang mengindasikan adanya polimorfisme dalam populasi kerbau dan OPN berperan dalam adhesi sperma ke ovum atau fungsi uterus, perubahan ini akan mempengaruhi fertilitas dan kualitas spermatozoa (Kumar *et al.*, 2015). Penelitian ini belum secara spesifik mengevaluasi dampak mutasi ini terhadap parameter reproduksi seperti kualitas sperma dan tingkat fertilitas jantan.

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian “Eksplorasi Gen *Osteopontin* (OPN|*NsiI*) Ekson- 7 Pada Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) Menggunakan Metode PCR-RFLP”.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat keragaman pada Gen *Osteopontin* (OPN) ekson-7 dengan enzim restriksi *NsiI* pada kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) menggunakan metode PCR-RFLP?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman pada Gen *Osteopontin* (OPN) ekson-7 dengan enzim restriksi *NsiI* pada kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) menggunakan metode PCR-RFLP.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai informasi untuk mengetahui Gen *Osteopontin* (OPN) ekson-7 dengan enzim restriksi *NsiI* pada kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) menggunakan metode PCR-RFLP.

1.5. Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah adanya keragaman Gen *Osteopontin* (OPN) ekson-7 dengan enzim restriksi *NsiI* pada kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) menggunakan metode PCR-RFLP.

