

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Kerbau merupakan salah satu ternak ruminansia yang sering ditemukan di Indonesia. Keuntungan dari usaha ternak kerbau yaitu dapat memanfaatkan pakan hijauan yang berkualitas rendah, tahan terhadap periode kering yang panjang, serta dapat digunakan sebagai tenaga kerja oleh para petani pemelihara kerbau (Afriani *et al.*, 2020). Dibalik keuntungan tersebut, terdapat tantangan dalam pengembangan kerbau sebagai hewan penghasil daging. Salah satunya terjadi penurunan populasi kerbau dari tahun ke tahun. Berdasarkan data Ditjen PKH (2023), populasi kerbau tahun 2020 mencapai 1.154.226 ekor, sedangkan pada tahun 2024 populasi kerbau hanya mencapai 556.794 ekor (Ditjen PKH, 2024).

Penurunan populasi kerbau disebabkan oleh berbagai faktor seperti kelangkaan pejantan, lama pubertas, rendahnya efisiensi reproduksi, *silent heat*, dan *inbreeding*. Tingginya laju *inbreeding* mengakibatkan penurunan populasi dan penurunan mutu genetik kerbau (Azizah dan Praharani, 2021). Penurunan mutu genetik pada kerbau terlihat pada performa reproduksi yang kurang optimal. Pada pejantan, penurunan mutu genetik ditandai dengan rendahnya libido, kemampuan beku semen dan kualitas semen yang buruk (Khatun *et al.*, 2013). Penurunan mutu genetik kerbau jantan dapat dicegah dengan melakukan seleksi berbasis molekuler melalui penggunaan *Mark Assisted Selection (MAS)* dalam menentukan sifat-sifat menguntungkan dalam program seleksi, salah satunya kualitas sperma. Beberapa kandidat gen yang berperan dalam menentukan kualitas sperma ialah gen *osteopontin*.

Osteopontin (OPN) adalah glikoprotein terfosforilasi tinggi dan diekspresikan di beberapa jaringan (Denhardt and Guo, 1993). Osteopontin mengandung motif pengikatan integrin tripeptide arginin-glisin-aspartat (RGD) (Liaw *et al.*, 1998). Osteopontin terutama berikatan dengan reseptor integrin dan CD44. Kehadiran osteopontin dan reseptornya pada spermatozoa serta cairan seminalis mengindikasikan bahwa molekul tersebut berperan dalam sistem reproduksi jantan (Samik dkk., 2014). Gen OPN berfungsi untuk mengikat sperma selama ejakulasi dan dibawa menuju tempat pembuahan untuk memfasilitasi kapasitas dan viabilitas sperma sapi (Souza *et al.*, 2008). Spermatozoa memperoleh *OPN* dari kelenjar aksesori dan terikat pada seluruh permukaan membran spermatozoa (Preedaa *et al.* 2020). Protein ini memiliki peran penting dalam fisiologi spermatozoa, seperti terlibat dalam melindungi membran plasma spermatozoa yang berdampak pada motilitas spermatozoa dan interaksi spermatozoa dengan oosit yang berkorelasi terhadap fertilitas pejantan (Hitit *et al.*, 2021). OPN ditemukan lebih banyak pada sapi jantan yang subur (Moura *et al.*, 2006; Rosyada *et al.*, 2023).

Osteopontin merupakan protein dengan berat molekul 55 kDa (Cancel *et al.*, 1997). 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 dari 7 *exon* dan 6 intron. Panjang masing-masing *exon* gen osteopontin yaitu *exon-1*=155 bp, *exon-2*=67 bp, *exon-3*=38 bp, *exon-4*=80 bp, *exon-5*=41 bp, *exon-6*=305 bp dan *exon-7*=748 bp.

Penelitian terdahulu tentang karakteristik OPN terhadap sifat produksi susu pada kerbau sungai oleh Tania *et al.* (2008) menunjukkan adanya 12 perbedaan

nukleotida pada wilayah *exon*, yang diantaranya terdapat pada *exon*-6. Pada *exon* 6, terjadi insersi tiga nukleotida (GAT) pada posisi 366-368. Selain itu juga terdapat mutasi atau SNP di beberapa titik yaitu pada (g.410 T>A) yang mengubah asam amino asparagin menjadi glutamin, (g.469 C>T) alanin menjadi valin dan posisi (g.531 A>G) yang mengubah asam amino arginin menjadi serin. Perubahan nukleotida di beberapa titik tersebut menyebabkan munculnya variasi genetik. Penelitian terdahulu pada gen OPN hanya mengkaji polimorfisme gen osteopontin pada wilayah promotor dan intron (Dubey *et al.*, 2015; Hasanain *et al.*, 2022). Selain itu penelitian tentang keragaman genetik gen OPN pada kerbau lumpur juga belum pernah dilaporkan di Indonesia.

Gen OPN dapat diidentifikasi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Teknik ini banyak digunakan sebagai metode penciri genetik karena memiliki sejumlah keunggulan, antara lain, kemampuan untuk memperbanyak DNA secara cepat dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis polimorfisme fragmen yang dilakukan melalui enzim restriksi, sehingga teknik ini dapat mengidentifikasi genotipe dengan jelas (Yurnalis dkk., 2017).

Enzim restriksi merupakan enzim yang memiliki fungsi untuk memotong fragmen DNA pada lokasi-lokasi tertentu. Enzim restriksi yang digunakan untuk penelitian ini adalah enzim *AluI*. *AluI* adalah enzim restriksi yang mengenali daerah sekuen 5' AGCT dan 3' TCGA, dengan pemotongan yang terjadi di antara basa G dan C (Herliyana, 2012).

Berdasarkan uraian tersebut, penulis tertarik untuk melakukan penelitian gen osteopontin pada kerbau dengan judul **"Eksplorasi Gen Osteopontin (OPN|*AluI*) Exon-6 pada Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) Menggunakan Metode PCR-RFLP"**

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat keragaman pada Gen *Osteopontin* (OPN) *exon-6* dengan enzim restriksi *AluI* pada Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) dengan menggunakan metode PCR-RFLP?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi keragaman genetik Gen *Osteopontin* (OPN) *exon-6* dengan enzim restriksi *AluI* pada Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) dengan menggunakan metode PCR-RFLP.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai sumber informasi untuk mengetahui keragaman genetik Gen *Osteopontin* (OPN) *exon-6* dengan enzim restriksi *AluI* pada Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*), serta untuk pengembangan program pemuliaan ternak kerbau di Indonesia dan dapat dijadikan sebagai landasan untuk penelitian berikutnya.

1.5. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini ialah adanya keragaman Gen *Osteopontin* (OPN) *exon-6* dengan enzim restriksi *AluI* pada Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) dengan menggunakan metode PCR-RFLP.