

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



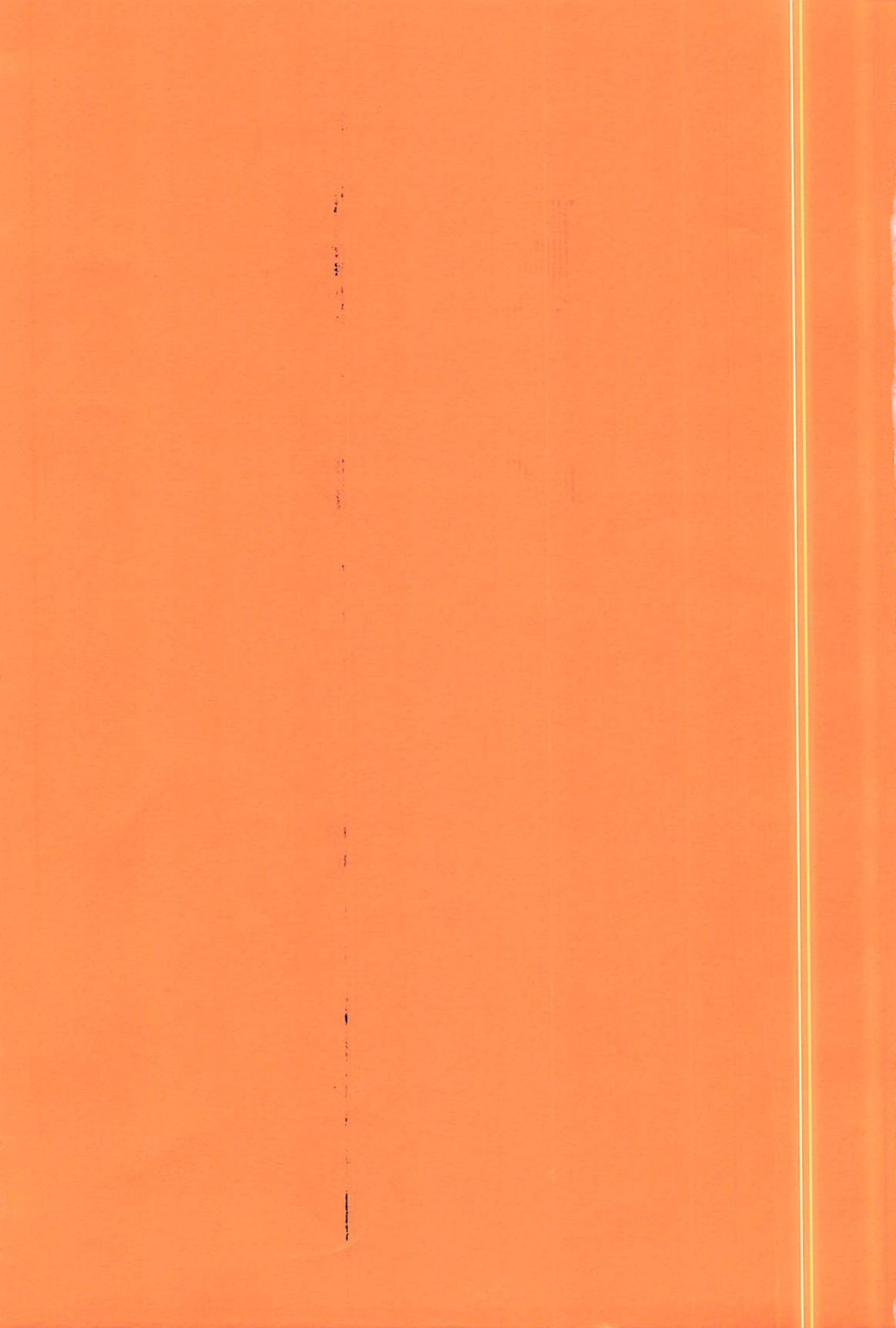
**IDENTIFIKASI GEN PROMOTER OSTEOPONTIN SEBAGAI KANDIDAT
DNA MARKER FERTILITAS SPERMATOZOA
SAPI PERAH FRIESIAN HOLSTEIN**

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 2 Tahun

**Dr. TATIK HERNAWATI, M.S, Drh /0029086005
Dr. SRI MULYATI, M.Kes., Drh / 0006116105
Dr. RIMAYANTI, M.Kes., Drh/0003126305
Dr. TRI WAHYU SUPRAYOGI, M.Si. Drh /0004016309**

**DIBIYAI OLEH :
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
November, 2018**



**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

KFC
KK
LP 10/19
Ide

**IDENTIFIKASI GEN PROMOTER OSTEOPONTIN SEBAGAI KANDIDAT
DNA MARKER FERTILITAS SPERMATOZOA
SAPI PERAH FRIESIAN HOLSTEIN**

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 2 Tahun

**Dr. TATIK HERNAWATI, M.S, Drh /0029086005
Dr. SRI MULYATI, M.Kes., Drh / 0006116105
Dr. RIMAYANTI, M.Kes., Drh/0003126305
Dr. TRI WAHYU SUPRAYOGI, M.Si. Drh /0004016309**

**DIBIYAI OLEH :
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
November, 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Identifikasi Gen Promoter Osteopontin Sebagai Kandidat DNA Marker Fertilitas Spermatozoa Sapi Perah Friesian Holstein

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr TATIK HERNAWATI, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0029086005
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Kedokteran Hewan
Nomor HP : 08155143779
Alamat surel (e-mail) : hernawati_tatik@yahoo.com

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr SRI MULYATI M.Kes
NIDN : 0006116105
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : drh.. Dr RIMAYANTI
NIDN : 0003126305
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (3)

Nama Lengkap : Dr TRI WAHYU SUPRAYOGI M.Si
NIDN : 0004016309
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 140,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 365,000,000



Mengetahui,
Dekan FKH Unair
(Prof. Dr. Pudji Srianto, M.Kes. Drh.)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 9 - 11 - 2018
Ketua,

(Dr TATIK HERNAWATI, M.Si)
NIP/NIK 196008291987012001

Menyetujui,
Ketua LPI Unair

(Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., PhD.)
NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Peningkatan mutu genetika sapi FH dapat dilakukan dengan seleksi genetik yang diarahkan untuk menghasilkan sapi jantan unggul. Seleksi berdasarkan peran gen yang berpengaruh terhadap angka pertumbuhan, ketahanan terhadap penyakit, serta karakteristik reproduksi merupakan dasar genetika untuk seleksi bibit unggul. Apabila gen-gen yang berpengaruh terhadap fenotip fertilitas diketahui, maka tujuan seleksi bibit unggul yang mempunyai sifat ekonomis tinggi dapat dilakukan lebih awal. Lebih jauh, hal tersebut tentunya menunjang peningkatan efisiensi produksi pada peternakan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya polimorfisme gen promoter *osteopontin* pada sapi perah Friesian Holstein (FH) dan hubungannya dengan tingkat fertilitas spermatozoa, yang ditunjukkan dengan kualitas spermatozoa sapi perah FH dari semen segar dan *post-thawing*. Dasar penentuan *osteopontin* sebagai bio-marker utama dalam penentuan kesuburan sapi perah Holstein jantan berdasarkan beberapa penelitian terdahulu (Killian *et al.*, 1993; Cancel *et al.*, 1997; Moura *et al.*, 2006) yang menunjukkan bahwa kadar *osteopontin* pada seminal plasma sapi perah *Holstein* dengan fertilitas yang bagus memiliki konsentrasi *osteopontin* 2,5 kali lipat jika dibandingkan dengan sapi perah dengan fertilitas rendah. Erikson *et al.*, (2007) membuktikan bahwa semen sapi perah jantan yang mengandung kadar *osteopontin* tinggi mempunyai potensi yang lebih besar dalam keberhasilan fertilisasi, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Hal ini diperkuat dengan studi sebelumnya yang membuktikan keterkaitan antara *osteopontin* dengan kualitas semen segar sapi perah FH di Indonesia, dan penambahan *osteopontin* ke dalam diluter semen beku meningkatkan kualitas *post-thawing* spermatozoa sapi perah FH melalui berbagai pengamatan parameter seluler dan molekuler (Samik dkk, 2014; Hernawati, 2016; Hernawati, 2016) serta meningkatkan keberhasilan fertilisasi secara *in vitro* dan *in vivo* (Hernawati dkk, 2016).

Penelitian dengan dasar genetika molekuler perlu dilaksanakan terutama untuk percepatan pengadaan bibit sapi perah. Percepatan ini dapat dilakukan dengan meningkatkan kualitas spermatozoa pejantan unggul untuk semen beku dengan terobosan teknologi molekuler. Sifat reproduksi termasuk fertilitas pejantan mempunyai heritabilitas sedang. Bilamana seleksi dilakukan secara konvensional, akan memerlukan waktu lebih lama dengan biaya tinggi karena harus menunggu kelahiran generasi cukup lama sampai diketahui sifat fenotip yang dicari. Oleh karenanya, hal tersebut dapat dipercepat melalui introduksi dengan teknologi marker gen-gen spesifik pada sapi perah FH.

Kata kunci : polimorfisme gen, *osteopontin*, fertilitas jantan, sapi perah FH

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PRAKATA

Ucapan syukur Alhamdulillah tim peneliti panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas segala karuniaNya dan hidayahNya, serta shalawat dan salam kepada junjungan kami Rasulullah Muhammad SAW, para Nabi, Rasul, keluarga, sahabat, serta para tabi'in dan orang-orang yang mengikuti jejak Rosulullah hingga hari pembalasan. Hanya atas perkenaan-Nyalah maka dengan segenap do'a dan ikhtiar peneliti dapat menyelesaikan laporan kemajuan penelitian yang berjudul "Analisis Polimorfisme Gen Promoter Osteopontin Terhadap Tingkat Fertilitas Spermatozoa Sapi Perah Friesian Holstein".

Selama pelaksanaan penelitian hingga tersusunnya naskah ini, banyak pihak yang telah membantu, oleh karenanya tim peneliti ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bentuk dukungan moril maupun materil.

Diakhir kata, tim peneliti menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kami mengharapkan saran dan kritik yang membangun untuk perbaikan dan penyempurnaan penelitian ini guna mencapai hasil yang lebih baik. Tim peneliti berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat dan menambah khasanah ilmu pengetahuan bagi semua.

Malang, November 2018

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	1
HALAMAN PENGESAHAN	2
RINGKASAN	3
PRA KATA	4
DAFTAR ISI	5
DAFTAR TABEL	6
DAFTAR GAMBAR.....	7
DAFTAR LAMPIRAN	8
BAB 1 PENDAHULUAN.....	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	13
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	15
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	17
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	23
BAB 6 RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA.....	31
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN	
1. Artikel Ilmiah (review di Jurnal Internasional Q3).....	35
2. Artikel Ilmiah <i>Internasional Scopus</i>	43

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Sapi perah FH jantan	32
Tabel 5.2 Urutan Nukleotida Primer gen OPN Sapi perah FH jantan	33
Tabel 5.3 Program PCR untuk Amplifikasi gen OPN Sapi perah FH jantan	33
Tabel 5.4 Hasil Penyejajaran dengan database NCBI	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%)	32
Gambar 5.2 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%) sampel nomer 1-13	34
Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%) sampel nomer 14-27	34
Gambar 5.4 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%) sampel nomer 28-37	35
Gambar 5.5 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%) sampel nomer 38-47	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Protokol Isolasi DNA	41
Lampiran 2. Protokol Purifikasi Produk PCR	42
Lampiran 3. Hasil Blast dari sekuensing gen OPN 14 sampel	43
Lampiran 4. Bukti Submit dan Jurnal Internasional	51
Lampiran 5. Draft Prosiding	61

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pemeriksaan air mani pada pejantan sebagai tolak ukur tingkat kesuburan selama ini hanya dilakukan melalui pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis saja. Selain pemeriksaan tersebut bisa juga dilihat dari silsilahnya (*pedigree*), yaitu seleksi yang didasarkan pada reputasi yang ditunjukkan oleh nenek moyang sapi yang bersangkutan tetapi uji ini kurang akurat, karena suatu *bloodline* atau keturunan dari individu yang baik tidak selalu berarti bahwa ciri yang baik itu akan diwariskan melalui seleksi dan perkawinan (Blakely dan Bade, 1994; Copeland, 1994). Uji kesuburan pejantan yang lain adalah didasarkan pada uji *progeny* yaitu suatu uji untuk melihat sifat heritabilitasnya tetapi uji ini memakan waktu lama kurang lebih 4-6 tahun sehingga tidak efisien (Tomaszewska *et al.*, 1991; Akiko, 1998).

Untuk melengkapi pemeriksaan air mani tersebut perlu juga dilakukan pemeriksaan molekuler, mengingat bahwa dalam seminal plasma ada kumpulan bio-marker yang dapat dipakai untuk menunjukkan kesuburan air mani, sel spermatozoa sebelum mampu melakukan fertilisasi dengan sel telur akan mengalami kapasitasi di dalam saluran reproduksi sapi betina. Kapasitasi sel spermatozoa dapat dirangsang oleh protein spesifik osteopontin. Osteopontin adalah protein dengan berat molekul 55 kilodalton yang disekresikan oleh kelenjar aksesoris sehingga keberadaan osteopontin dalam semen berkaitan erat dengan kualitas dan fertilitas hewan jantan (Cancel *et al.*, 1997, Rodriguez *et al.*, 2000).

Dasar penentuan osteopontin sebagai bio-marker utama dalam penentuan kesuburan sapi perah Holstein jantan adalah berdasarkan beberapa penelitian terdahulu (Killian *et al.*, 1993; Cancel *et al.*, 1997; Moura *et al.*, 2006) yang menunjukkan bahwa kadar osteopontin pada seminal plasma sapi perah *Holstein* dengan fertilitas yang bagus memiliki konsentrasi osteopontin 2,5 kali lipat jika dibandingkan dengan sapi perah dengan fertilitas rendah. Erikson *et al.*, (2007) mengatakan bahwa sapi perah jantan yang diperiksa semen segarnya dan mengandung osteopontin mempunyai potensi yang besar dalam keberhasilan pembuahan secara *in vitro* maupun *in vivo* dibandingkan yang tidak mengandung osteopontin. Hal ini diperkuat dengan studi sebelumnya yang membuktikan keterkaitan antara osteopontin dengan kualitas semen segar sapi perah FH di Indonesia, dan penambahan osteopontin ke dalam diluter semen beku meningkatkan kualitas *post-thawing* spermatozoa sapi perah FH melalui berbagai pengamatan parameter seluler dan molekuler (Samik dkk, 2014; Hernawati, 2016; Hernawati dkk, 2016) serta meningkatkan keberhasilan fertilisasi secara *in vitro* dan *in vivo* (Hernawati dkk, 2016).

Polimorfisme pada susunan DNA disebabkan oleh karena ada atau tidaknya sisi pengenal terhadap enzim restriksi, yang disebut “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (RFLP). Polimorfisme gen promotor osteopontin berkaitan dengan fertilitas pejantan pada sapi perah Holstein. Beberapa bukti menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara polimorfisme gen promotor osteopontin, salah satunya ialah polimorfisme gen promotor osteopontin dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa semen segar sapi (Schnabel *et al.*, 2005; Gafer *et al.*, 2015; Rorie *et al.*, 2016). Penentuan region gen promotor osteopontin berdasarkan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Rori *et al.*, (2016) mengidentifikasi tujuh region SNP yang bertindak sebagai promotor osteopontin, antara lain: 3379 bp, 3490 bp, 3492 bp, 5075 bp, 5205 bp, 5209 bp, and 5263 bp dari gen promotor osteopontin. Kemudian, substitusi timin ke guanine pada 3379 bp berkorelasi dengan peningkatan persentase motilitas spermatozoa, namun untuk parameter viabilitas belum diidentifikasi.

Pengembangan populasi sapi perah ke depan sebaiknya dilakukan seleksi berdasarkan nilai pemuliaan (*breeding value*), penggunaan penciri genetik terutama yang mengontrol reproduksi dan penerapan BSE sehingga pejantan sapi perah FH di balai IB dapat dipertanggungjawabkan kualitasnya, karena jantan tersebut yang akan menyebarkan *trait* unggul ke populasi. Pengembangan pengujian pejantan melalui identifikasi penciri genetik untuk kualitas semen telah dilakukan di beberapa negara maju (Lechniak *et al.* 1998; Dai *et al.* 2009; Gorbani *et al.* 2009b; Afshar *et al.* 2011; Chenoweth 2011), hal ini diharapkan menunjang percepatan populasi sapi perah FH yang unggul secara kualitas. Sistem seleksi secara genetik membutuhkan identifikasi penciri genetik sebagai kandidat gen yang mengontrol sifat reproduksi, khususnya pada sapi pejantan.

1.2. Tujuan Penelitian

Ada beberapa tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini, yaitu:

1. Menganalisis keragaman gen promotor osteopontin pada pejantan sapi perah FH, yang digunakan sebagai bio-marker fertilitas spermatozoa.
2. Membuat model seleksi pejantan sapi perah FH yang nantinya akan digunakan sebagai pejantan unggul dengan menggunakan teknologi biomolekuler melalui gen penciri.
3. Adanya perubahan sistem perkawinan pada proses seleksi pejantan, yang awalnya masih menggunakan seleksi berdasarkan fenotipik (tradisional) menjadi sistem seleksi berbasis genotip.

1.3. Urgensi dan Manfaat Penelitian

Penelitian dengan dasar genetika molekuler perlu dilaksanakan terutama untuk percepatan pengadaan bibit sapi perah. Percepatan ini dapat dilakukan dengan meningkatkan kualitas spermatozoa pejantan unggul untuk semen beku dengan terobosan teknologi molekuler. Sifat reproduksi termasuk fertilitas pejantan mempunyai heritabilitas sedang. Bilamana seleksi dilakukan secara konvensional, akan memerlukan waktu lebih lama dengan biaya tinggi karena harus menunggu kelahiran generasi cukup lama sampai diketahui sifat fenotip yang dicari. Hasil perkawinan secara seleksi fenotip (tradisional) juga belum tentu menghasilkan individu baru dengan parameter fenotip yang sudah dipilih.

Terlebih, selama ini diagnosis kesuburan air mani pejantan di lapangan jarang dilakukan bahkan tidak pernah, hanya apabila ada laporan dari peternak yang mengatakan bahwa air mani beku buatan Balai Inseminasi tertentu dengan nama pejantan X mempunyai kualitas jelek atau jarang menghasilkan kebuntingan, kemudian pihak yang berkepentingan baru melakukan tes laboratoris dengan memeriksa persentase dan kecepatan motilitas individu serta persentase hidup. Pemeriksaan ini tidak menjadi jaminan bahwa semen beku tersebut subur/fertil, karena berdasarkan laporan hanya 40-70% angka kebuntingan yang dihasilkan setelah inseminasi buatan (Direktorat Jenderal Peternakan, 2005). Berarti ada 30 sampai 60% sapi betina yang gagal mengalami kebuntingan. Keadaan demikian dapat menurunkan daya reproduksi ternak karena kehilangan waktu produksi selama satu sampai dua bulan apabila pada saat diagnosis tersebut tidak menunjukkan kebuntingan.

Osteopontin merupakan protein spesifik yang diproduksi oleh kelenjar kelamin aksesori dan disekresikan di dalam cairan yang mungkin mengikat heparin pada membran spermatozoa dan mempercepat kapasitas sel spermatozoa setelah diejakulasikan, menghasilkan peningkatan kesuburan sapi yang berdampak langsung dengan keberhasilan fertilisasi (Erikson *et al* 2007).

Manfaat penelitian ini adalah sebagai sumber informasi mengenai korelasi karakteristik fenotip dan interaksi gen pada pewarisan fertilitas yang dilihat dari kualitas semen segar serta polimorfisme gen *SNP osteopontin* pada pejantan sapi perah FH. Selain itu, keterkaitan antara polimorfisme gen penyandi osteopontin dapat dijadikan parameter kesuburan semen, khususnya sapi perah di Indonesia. Diharapkan hasil penelitian nantinya bisa digunakan sebagai dasar pengembangan seleksi perkawinan secara genetik di semua Balai Besar Inseminasi Buatan maupun Daerah.

1.4. Strategi yang dicanangkan

Adapun beberapa tema telah dibagi dalam penelitian ini antara lain :

1. Keragaman Gen promoter osteopontin sapi perah FH Metode PCR-RFLP dengan amplifikasi Ruas Gen promoter osteopontin, kemudian menentukan frekuensi alel dan genotipe gen promoter osteopontin.
2. Analisa polimorfisme promoter gen osteopontin pada sapi jantan FH: pengaruhnya dengan kualitas semen segar secara makroskopis.
3. Analisa polimorfisme promoter gen osteopontin pada sapi jantan FH: pengaruhnya dengan kualitas semen segar secara mikroskopis.
4. Analisa polimorfisme promoter gen osteopontin pada sapi jantan FH: pengaruhnya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa *post-thawing*.
5. Analisis nilai heterozygositas gen promoter osteopontin menggunakan metode PCR-SSCP.

BAB 2 TARGET DAN LUARAN

Permasalahan yang dihadapi dalam bidang peternakan di Indonesia antara lain adalah masih rendahnya produktifitas dan mutu genetik ternak. Keadaan ini terjadi karena sebagian besar peternakan di Indonesia masih merupakan peternakan konvensional, dimana mutu bibit, penggunaan teknologi dan keterampilan peternak relatif masih rendah. Sejak dikenalkannya Inseminasi Buatan (IB) dalam mengembangkan populasi ternak, maka seleksi pejantan dalam meningkatkan mutu genetik ternak sering diasumsikan lebih penting daripada seleksi induk, tetapi dengan berkembangnya teknologi Transfer Embrio (TE), maka seleksi pejantan dapat dikatakan sama pentingnya dengan seleksi induk, tetapi dalam segi intensitasnya seleksi pejantan lebih ketat dari seleksi induk. Diwyanto et al. (2001) menyatakan bahwa pada teknologi transfer embrio ini memungkinkan evaluasi mutu genetik produksi susu sapi perah pejantan berdasarkan penampilan saudara-saudara betinanya. Hardjosubroto (1994) menyatakan bahwa seleksi pejantan sangat penting, karena seekor pejantan yang dipergunakan dalam inseminasi buatan selama hidupnya menghasilkan keturunan lebih banyak daripada seekor betina. Pemilihan pejantan sedini mungkin dianjurkan agar nilai genetik pejantan tersebut akan cepat diketahui, untuk dapat diambil keputusan dalam penentuan pejantan yang akan dipilih.

Penelitian dengan dasar genetika molekuler perlu dilaksanakan terutama untuk percepatan pengadaan bibit sapi perah. Percepatan ini dapat dilakukan dengan meningkatkan kualitas spermatozoa pejantan unggul untuk semen beku dengan terobosan teknologi molekuler. Sifat reproduksi termasuk fertilitas pejantan mempunyai heritabilitas sedang. Bilamana seleksi dilakukan secara konvensional, akan memerlukan waktu lebih lama dengan biaya tinggi karena harus menunggu kelahiran generasi cukup lama sampai diketahui sifat fenotip yang dicari. Hasil perkawinan secara seleksi fenotip (tradisional) juga belum tentu menghasilkan individu baru dengan parameter fenotip yang sudah dipilih.

Terlebih, selama ini diagnosis kesuburan air mani pejantan di lapangan jarang dilakukan bahkan tidak pernah, hanya apabila ada laporan dari peternak yang mengatakan bahwa air mani beku buatan balai inseminasi tertentu dengan nama pejantan X mempunyai kualitas jelek atau jarang menghasilkan kebuntingan, kemudian pihak yang berkepentingan baru melakukan tes laboratoris dengan memeriksa persentase dan kecepatan motilitas individu serta persentase hidup. Pemeriksaan ini tidak menjadi jaminan bahwa semen beku tersebut subur/fertil, karena berdasarkan laporan hanya 40-70% angka kebuntingan yang dihasilkan setelah inseminasi buatan (Direktorat Jenderal Peternakan, 2005). Berarti ada 30 sampai 60% sapi betina yang gagal mengalami kebuntingan. Keadaan demikian dapat

menurunkan daya reproduksi ternak karena kehilangan waktu produksi selama satu sampai dua bulan apabila pada saat diagnosis tersebut tidak menunjukkan kebuntingan.

Target jangka pendek penelitian ini adalah sebagai sumber informasi mengenai korelasi karakteristik fenotip dan interaksi gen pada pewarisan fertilitas yang dilihat dari kualitas semen segar serta polimorfisme gen *SNP osteopontin* pada pejantan sapi perah FH. Selain itu, keterkaitan antara polimorfisme gen penyandi osteopontin dapat dijadikan parameter kesuburan semen, khususnya sapi perah di Indonesia. Diharapkan hasil penelitian nantinya bisa digunakan sebagai dasar pengembangan seleksi perkawinan secara genetik di semua Balai Besar Inseminasi Buatan maupun Daerah.

Tabel 2.1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian	
			TS	TS+1
1	Publikasi ilmiah	Internasional	Submit 2	Accepted 1
		Nasional terakreditasi	Submit 2	Accepted 1
2	Pemakalah dalam temu ilmiah	Internasional	draft	Submit 1
		Nasional	draft	Submit 1
3	<i>Invited speaker</i> dalam temu ilmiah	Internasional	-	-
		Nasional	-	-
4	<i>Visiting lecturer</i>	Internasional	-	-
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten	-	
		Paten sederhana	draft	submit
		Hak cipta		
		Merek dagang		
		Rahasia dagang		
		Desain produk industri		
		Indikasi geografis		
		Perlindungan varietas tanaman		
6	Teknologi Tepat Guna (TGT)	Perlindungan topografi sirkuit terpadu		
			Tidak ada	Produk
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/Rekayasa sosial		Tidak ada	Tidak ada
8	Buku Ajar (ISBN)		Tidak ada	Draft : Osteopontin dan fertilitas pejantan FH
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)		3	3

BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Permasalahan yang dihadapi dalam bidang peternakan di Indonesia antara lain adalah masih rendahnya produktifitas dan mutu genetik ternak. Keadaan ini terjadi karena sebagian besar peternakan di Indonesia masih merupakan peternakan konvensional, dimana mutu bibit, penggunaan teknologi dan keterampilan peternak relatif masih rendah. Sejak dikenalkannya Inseminasi Buatan (IB) dalam mengembangkan populasi ternak, maka seleksi pejantan dalam meningkatkan mutu genetik ternak sering diasumsikan lebih penting daripada seleksi induk, tetapi dengan berkembangnya teknologi Transfer Embrio (TE), maka seleksi pejantan dapat dikatakan sama pentingnya dengan seleksi induk, tetapi dalam segi intensitasnya seleksi pejantan lebih ketat dari seleksi induk. Diwyanto et al. (2001) menyatakan bahwa pada teknologi transfer embrio ini memungkinkan evaluasi mutu genetik produksi susu sapi perah pejantan berdasarkan penampilan saudara-saudara betinanya. Hardjosubroto (1994) menyatakan bahwa seleksi pejantan sangat penting, karena seekor pejantan yang dipergunakan dalam inseminasi buatan selama hidupnya menghasilkan keturunan lebih banyak daripada seekor betina. Pemilihan pejantan sedini mungkin dianjurkan agar nilai genetik pejantan tersebut akan cepat diketahui, untuk dapat diambil keputusan dalam penentuan pejantan yang akan dipilih.

Penelitian dengan dasar genetika molekuler perlu dilaksanakan terutama untuk percepatan pengadaan bibit sapi perah. Percepatan ini dapat dilakukan dengan meningkatkan kualitas spermatozoa pejantan unggul untuk semen beku dengan terobosan teknologi molekuler. Sifat reproduksi termasuk fertilitas pejantan mempunyai heritabilitas sedang. Bilamana seleksi dilakukan secara konvensional, akan memerlukan waktu lebih lama dengan biaya tinggi karena harus menunggu kelahiran generasi cukup lama sampai diketahui sifat fenotip yang dicari. Hasil perkawinan secara seleksi fenotip (tradisional) juga belum tentu menghasilkan individu baru dengan parameter fenotip yang sudah dipilih.

Terlebih, selama ini diagnosis kesuburan air mani pejantan di lapangan jarang dilakukan bahkan tidak pernah, hanya apabila ada laporan dari peternak yang mengatakan bahwa air mani beku buatan balai inseminasi tertentu dengan nama pejantan X mempunyai kualitas jelek atau jarang menghasilkan kebuntingan, kemudian pihak yang berkepentingan baru melakukan tes laboratoris dengan memeriksa persentase dan kecepatan motilitas individu serta persentase hidup. Pemeriksaan ini tidak menjadi jaminan bahwa semen beku tersebut subur/fertil, karena berdasarkan laporan hanya 40-70% angka kebuntingan yang dihasilkan setelah inseminasi buatan (Direktorat Jenderal Peternakan, 2005). Berarti ada 30

sampai 60% sapi betina yang gagal mengalami kebuntingan. Keadaan demikian dapat menurunkan daya reproduksi ternak karena kehilangan waktu produksi selama satu sampai dua bulan apabila pada saat diagnosis tersebut tidak menunjukkan kebuntingan.

Osteopontin merupakan protein spesifik yang diproduksi oleh kelenjar kelamin aksesori dan disekresikan di dalam cairan yang mungkin mengikat heparin pada membran spermatozoa dan mempercepat kapasitas sel spermatozoa setelah diejakulasikan, menghasilkan peningkatan kesuburan sapi yang berdampak langsung dengan keberhasilan fertilisasi (Erikson *et al* 2007).

Manfaat penelitian ini adalah sebagai sumber informasi mengenai korelasi karakteristik fenotip dan interaksi gen pada pewarisan fertilitas yang dilihat dari kualitas semen segar serta polimorfisme gen *SNP osteopontin* pada pejantan sapi perah FH. Selain itu, keterkaitan antara polimorfisme gen penyandi osteopontin dapat dijadikan parameter kesuburan semen, khususnya sapi perah di Indonesia. Diharapkan hasil penelitian nantinya bisa digunakan sebagai dasar pengembangan seleksi perkawinan secara genetik di semua Balai Besar Inseminasi Buatan maupun Daerah.

BAB 4 METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional dengan menggunakan pendekatan studi *cross sectional*.

Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah sapi perah jantan peranakan FH yang berumur 3 – 4 tahun yang terdapat di yang terdapat di BBIB Singosari, Malang dan Pejantan sapi perah FH di Taman Ternak Pendidikan (Teaching Farm) FKH Universitas Airlangga.

Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah sampel darah dan semen segar dari 50 ekor sapi peranakan FH. Sampel diambil dengan cara *purposive sampling* method dengan menetapkan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria inklusi:

- 1.Sapi perah peranakan FH jantan
- 2.Pejantan yang berusia antara 2-6 tahun
- 3.Tidak menderita penyakit reproduksi infeksius/non infeksius

Kriteria eksklusi:

- 1.Pejantan afkir
- 2.Berada di kandang isolasi
- 3.BCS kurang dari 3

Bahan dan Peralatan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: sampel darah sapi perah FH, DeRiPro extraction kit, DNA Purification Kit, cell lysis solution, nuclei lysis solution, protein precipitation solution, RNAase, DNA rehydration solution, isopropanol, 70 % etanol, PCR Core System, buffer reaction Taq DNA polymerase, PCR nucleotida mix, Taq DNA polymerase, enzim restriksi HaEIII, agarosa, 1X tris acetic acid EDTA (TAE), ethidium bromida, aquades steril, primer *Osteopontin* 3307F: 5'-AGC CCA CCA CCA AAT ACC TA-3' dan *osteopontin* 4006R: 5'-TCT GAA GGA CTG GCT TAG ATT TC-3', primer *Osteopontin* 4816F: 5'-TCC CTC CCT CTA CGT TTT CA-3' and OPN5528R: 5'-CAT CCC AAA AGG GCA TAG AA-3', *blue loading dye*, kertas tisu, parafilm, kristal es, ultra pure water, 50-2000 bp marker, zat warna eosin-negrosin. Phosphate Buffer Saline (PBS), NaCl fisiologis, gliserol, susu skim, kuning telur, eosin-negrosin, nitrogen cair, gentamycin, kertas tissue.



Alat-alat penelitian untuk koleksi semen meliputi : kandang penjepit, vagina buatan, tabung penampung semen dengan pelindung sinar matahari, thermometer, dan tali *handling*. Alat-alat untuk pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen meliputi : kertas catatan, bolpoin, kertas pH, mikroskop, spektrofotometer, tabung penampung semen, gelas objek, gelas penutup, mikropipet, pipet tetes, batang pengaduk gelas, kertas tisu, kapas, bunsen. Alat-alat untuk mengencerkan semen dan pengemasan meliputi: mikroskop, tabung penampung semen, gelas objek, gelas penutup, timbangan analitik kapasitas 100 gram, batang pengaduk gelas, pipet tetes, labu erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, pipet ukur, thermometer, scalpel, lemari es, *cool top*, aluminium foil, rak besi, container gas nitrogen cair, mini straw, *filling* dan *sealing machine*, mesin pembeku (*ice cub*). Alat-alat untuk uji *Hypo-Osmotic Swelling* meliputi : inkubator CO₂, tissue culture dish, pipet tetes, gelas objek, gelas penutup, eosin negrosin, bunsen, mikroskop. Alat untuk running PCR meliputi: mikropipet 1-10 μ l, mikropipet 100-200 μ l, microsentrifuge tube, venojek, mini sentrifuge, inkubator CO₂, PCR, Gel Doc, vortex, SDS-PAGE horizontal, microwave, gelas ukur 500ml dan 1000ml.

Pengambilan sampel darah

Sampel darah diambil secara intravena melalui vena jugularis di leher dengan menggunakan *venojack* yang telah diisi dengan EDTA. DNA diisolasi berdasarkan metode yang ditulis oleh SAMBROOK dan RUSSEL (2001). Hasil isolasi DNA total disimpan pada suhu -20°C. Untuk mengetahui ukuran DNA total hasil isolasi dilakukan elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 0,8%. Estimasi konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer.

Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan Kit DeRiPro™ 3-in1 extraction kit. Sampel yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam microsentrifuge tube 1,5 ml kemudian ditambahkan 300 μ l DroP1, dicampur homogen. Inkubasi dalam suhu 37°C selama 3-5 menit. Setelah diinkubasi, ditambahkan larutan DroP2 200 μ l kemudian di vortex 13.000xg selama 3 menit pada suhu ruang. Berikutnya, menuangkan cairan supernatan ke dalam tabung baru dan menambahkan DroP3 800 μ l kemudian di vortex 10.000-16.000 xg selama 6-10 menit pada suhu ruang. Cairan supernatan dan air dry 5-15 menit untuk menambahkan 50-100 ml buffer TE atau ddH₂O.

DNA yang diperoleh kemudian dilakukan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif. Pengujian kualitatif dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 1%. Sedangkan pengujian kuantitatif dilakukan dengan menggunakan nanodrop spektrofotometri untuk mengetahui konsentrasi DNA plasmid yang diperoleh. Tahapan untuk pengujian secara

kualitatif dengan menggunakan elektroforesis gel agarose adalah sebagai berikut: 1g agarose dimasukkan ke dalam beaker. Tambahkan 100ml TBE 1x untuk membuat suspensi agarose 1%. Suspensi dipanaskan pada suhu 250°C pada lempengan pemanas atau pada microwave jika tersedia. Dalam buffer yang panas, agarose terlarut. Larutan sedikit didinginkan dan ditambahkan 1µL EtBr sebelum dituangkan ke dalam tangki elektroforesis, dimana larutan ini akhirnya akan mengeras. Letakkan agar pada tangki dan Tambahkan TBE 1x ke dalam setiap tangki, sampai gel sepenuhnya terendam. Sisir akan membentuk kantung pada gel, dimana didalamnya dapat diisi dengan sampel. Mengisikan 2µL DNA plasmid hasil isolasi ke dalam tabung terlabel yang baru dan tambahkan 1µL blue loading buffer untuk fragmen DNA berukuran kecil dan campurkan.

Amplifikasi DNA

Untuk mendapatkan fragmen DNA dari gen *osteopontin* dilakukan amplifikasi dengan menggunakan dua set primer yang diadopsi dari Rorie *et al.* (2016), yaitu *Osteopontin Forward: 5'-AGC CCA CCA CCA AAT ACC TA-3'* dan *Reverse: 5'-TCT GAA GGA CTG GCT TAG ATT TC-3'* pada 700bp, serta primer *Osteopontin forward: 5'-TCC CTC CCT CTA CGT TTT CA-3'* dan *reverse: 5'-CAT CCC AAA AGG GCA TAG AA-3'* amplifikasi 707bp. Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sebanyak 35 siklus. Kondisi PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer (annealing) 49°C selama 45 detik, suhu pemanjangan DNA baru 72°C selama 1 menit dan suhu pemanjangan akhir 72 °C selama 1 menit. Siklus diawali dengan *hot start* pada suhu 94°C selama 2 menit dan diakhiri dengan inkubasi pada suhu 72°C selama 5 menit.

Untuk melihat keberhasilan amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarosa 2%, diwarnai dengan Ethidium Bromide dan dievaluasi menggunakan UV transluminator. DNA yang terekspresi didokumentasi dengan *Gel Documentation*.

Teknik PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Untuk mengetahui variasi fragmen gen *osteopontin*, hasil amplifikasi PCR dipotong dengan enzim restriksi. Enzim restriksi yang digunakan adalah *HaeIII* yang memotong pada sisi GG'CC. Tiga microliter hasil PCR dicampur dengan 3,5 unit enzim restriksi *HaeIII*, 0,5 ul H₂O dan 1,2 ul buffer 10 X. Campuran kemudian diinkubasi pada *waterbath* suhu 37°C selama 3 jam. Untuk melihat keberhasilan digesti dilakukan elektroforesis dengan agarosa 2%, diwarnai dengan Ethidium Bromide dan dievaluasi menggunakan UV transluminator. DNA yang terekspresi didokumentasi dengan Gel Doc. Data hasil PCR - RFLP dianalisis berdasarkan elektrophenogram kemudian diinterpretasikan.

Teknik PCR-SSCP

PCR-SSCP dilakukan berdasarkan metode Fitriani (2009) dengan modifikasi. Sebanyak 10 µl produk PCR ditambah dengan 15 µl loading buffer (campuran bromo phenol blue, formamide, EDTA, gliserol) diinkubasi dalam waterbath 95°C selama 10 menit, kemudian secepatnya dimasukkan dalam freezer -20°C selama 10 menit. Sebanyak 25 µl campuran produk PCR dan loading buffer dimasukkan dalam sumuran gel poliakrilamid (acrylamide:bis-acrylamide 29:1). Elektroforesis dilakukan pada 100 Volt, 50 mA selama 100 menit dalam TBE 0,5×. Visualisasi hasil PCR-SSCP dilakukan dengan pewarnaan ethidium bromide yang diamati dengan UV transiluminator.

Koleksi Semen

Koleksi semen segar dilakukan dengan menggunakan vagina buatan. Vagina buatan dipersiapkan dengan suhu internal 45°C dan sudah diolesi dengan vaselin. Pejantan dipancing dengan menggunakan dummy/betina pemancik kemudian dilakukan koleksi semen. Hasil koleksi semen segera diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis yang kemudian dilanjutkan dengan penentuan kadar osteopontin dan prosesing semen beku.

Melakukan pemeriksaan persentase viabilitas spermatozoa

Pemeriksaan spermatozoa yang hidup dengan cara membuat preparat ulas. 10 μ l suspensi semen diteteskan pada bagian ujung gelas obyek, kemudian teteskan zat warna eosin-negrosin dicampur sampai homogen. Ambil gelas obyek lain, tempelkan bagian ujung pada campuran semen, kemudian dengan posisi miring bersudut lancip dorong sepanjang gelas obyek yang telah disiapkan untuk mendapatkan selapis semen yang telah diwarnai setipis mungkin. Selanjutnya diangin-anginkan sampai kering. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Spermatozoa dengan bagian kepala tidak berwarna adalah spermatozoa yang hidup, sedang yang berwarna merah muda adalah spermatozoa yang mati (Partodihardjo, 1992).

Melakukan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa

Pemeriksaan motilitas spermatozoa terdiri dari pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif. Sepuluh mikroliter suspensi semen pada tiap kelompok perlakuan diteteskan pada obyek glass yang terdapat lekukan di bagian tengah, kemudian ditutup dengan *cover glass* dan diamati motilitas spermatozoa dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Pemeriksaan kuantitatif motilitas spermatozoa ditentukan berdasarkan tingkatan pergerakan progresif kedepan. Motilitas spermatozoa dibagi empat kriteria yaitu : a. Pergerakan sangat baik (bergerak cepat ke depan), b. Pergerakan yang baik (bergerak maju ke depan), c. Pergerakan ditempat atau berputar dan d. Spermatozoa tidak bergerak. Motilitas spermatozoa ditentukan dengan menghitung pergerakan spermatozoa motil dan tidak motil pada beberapa lapangan pandang secara acak. Persentase pergerakan spermatozoa dihitung berdasarkan rataan persentase motilitas untuk semua lapangan pandang yang dihitung (Hafez,2000)

Pemeriksaan membran plasma utuh spermatozoa

Pemeriksaan membrane plasma utuh spermatozoa dilakukan dengan metode *hyposmotic swelling test* (HOST) yang dikembangkan oleh Jayendra *et al.* (1984). Suspensi spermatozoa yang berasal dari semen beku sapi yang telah di suplementasi dengan OPN berbagai dosis (P0, P1, P2, P3) diambil sebanyak 0,1 ml kemudian tambahkan 9,9 ml larutan hypoosmotik 0,032 M (yang dibuat dari 7,35 g natrium sitrat 2H₂O, 13,52 g fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter aquades). Selanjutnya diinkubasikan selama 1 jam dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Kemudian dibuat preparat ulas tipis dengan mencampurkan satu tetes larutan diatas dengan satu tetes eosin dan diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Spermatozoa yang mempunyai integritas membran plasma utuh terlihat adanya pembengkakan bagian ekor yang diikuti ekor berputar dengan pancaran warna terang, sedang

spermatozoa dengan membran plasma yang sudah rusak ditandai dengan tidak adanya pembengkakan kepala dengan ekor lurus.

Analisis Data

Polimorfisme genetika sapi perah FH diukur dengan rata-rata heterozigositas (H), jumlah dan frekuensi alel yang dihitung untuk semua lokus. Frekuensi alel, jumlah alel, H_o (*observed heterozygosities*), dan H_e (*expected heterozygosities*) dihitung dengan menggunakan program *Microsatellite Toolkit V.3.1*. Asosiasi promotor gen osteopontin dengan tingkat fertilitas (melalui beberapa parameter kualitas semen) kemudian dianalisis menggunakan *the least squares maximum-likelihood method* (Harvey, 1991).

BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Pengambilan darah dan pemeriksaan kualitas semen segar sapi perah FH jantan

Sampel darah berupa whole-blood diperoleh dari dua tempat, yakni BBIB Singosari dan peternakan rakyat di Kota Batu. Koleksi sampel darah dari 17 ekor sapi perah FH dan PFH di BBIB Singosari dan 30 sampel dari peternakan rakyat menggunakan tabung venoject berisi EDTA dengan metode pengambilan darah dari vena coccigea (ekor). Total sampel yang berhasil dikumpulkan adalah sebanyak 47 sampel darah.

Setelah dilakukan koleksi darah dilakukan pemeriksaan kualitas semen segar dengan dikoleksi semennya terlebih dahulu. Koleksi semen segar dilakukan dengan menggunakan vagina buatan. Vagina buatan dipersiapkan dengan suhu internal 45°C dan sudah diolesi dengan vaselin. Pejantan dipancing dengan menggunakan dummy/betina pemancik kemudian hasil koleksi semen segera diperiksa secara makroskopis meliputi: volume, warna, bau, pH, dan viskositas dan pemeriksaan mikroskopis. **Lampiran 3.** menunjukkan data hasil pemeriksaan kualitas semen segar.

5.2 Isolasi DNA dari Sampel darah sapi FH jantan

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan sampel darah yang dikerjakan dengan Genomic DNA Mini Kit Tissue dan menggunakan metode ekstraksi konvensional / non-KIT sesuai dengan protokol (terlampir pada **Lampiran 1.**). Hasil yang didapatkan berupa ekstraksi DNA total yang selanjutnya dilakukan uji kuantitas dan kualitas. Uji kuantitas dengan menggunakan mesin Nano-200 Micro-asam nukleat spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Hasil DNA total dari isolasi tersebut selanjutnya dapat digunakan untuk proses amplifikasi gen OPN dari sapi FH jantan dengan teknik PCR untuk mengetahui sekuen gen OPN dari seluruh sampel sapi jantan.

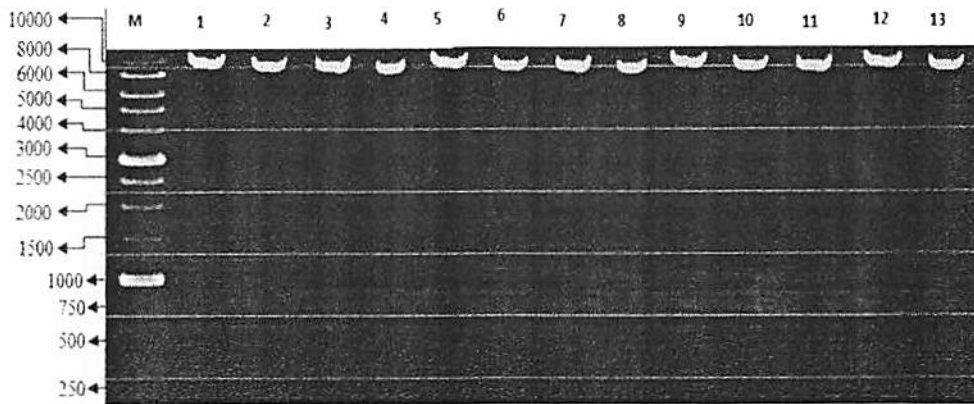
Kode Sampel	Nama sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (260/280)
1	2	308	1.92
2	7	190	1.91
3	8	223	1.81
4	13	254	1.87
5	14	302	1.89
6	17	201	1.91
7	19	210	1.81
8	D	254	1.87
9	H	338	1.98
10	I	176	1.91

11	J	220	1.81
12	L	271	1.88
13	M	289	1.80
14	N	198	1.77
15	A	167	1.67
16	B	135	1.79
17	C	98	1.56
18	E	199	1.70
19	F	203	1.66
20	G	105	1.62
21	K	89	1.52
22	1	266	1.71
23	3	290	1.74
24	5	185	1.69

Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Sapi perah FH jantan

Berdasarkan hasil uji kuantitas tersebut diketahui bahwa hampir semua sampel dari sapi perah FH jantan memiliki tingkat kemurnian yang baik yaitu masih dalam rentang 1,8-2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/ μ L. Menurut Fatchiyah (2011), hasil uji nano drop ialah berupa nilai kemurnian DNA pada $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ dan nilai konsentrasi DNA. DNA berkualitas baik berdasarkan uji nano drop memiliki kemurnian 1,8-2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/ μ L.

Apabila nilai kemurnian DNA di bawah 1,8 mengindikasikan pada DNA hasil ekstraksi masih terdapat kontaminan berupa senyawa protein. Kontaminasi berupa senyawa protein pada DNA dapat disebabkan oleh tidak adanya penambahan enzim protease pada protokol isolasi DNA (Kartini 2012). Menurut Fatchiyah (2011), nilai kemurnian DNA di atas 2,0 mengindikasikan masih terdapat kontaminan berupa RNA. Hal ini mungkin disebabkan pada penelitian ini tidak dilakukan penambahan ribonuklease. Hasil isolasi DNA total juga diuji secara kualitas dengan menggunakan elektroforesis konsentrasi agarose 1%. Hasil gel elektroforesis agarose 1% dapat dilihat pada **Gambar 5.1**. Hasil gel elektroforesis 1% menunjukkan adanya *band* diatas marker 10.000 bp, hal ini menunjukkan bahwa DNA total yang terisolasi memiliki ukuran diatas 10.000 bp.



Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%)

Keterangan : M : Marker 1 kb, Sampel nomer 1:Glen, 2:Shorty, 3:Rollex, 4:Harry, 5:Dundee, 6:Sg. Anset, 7:Sg. Marriot, 8:Sg. Dean 9:Formery, 10:Sg. Ogant, 11:Doming, 12:Sg. Pland, 13: Sg. Dohuns. Sampel hasil isolasi menggunakan Genoimic DNA mini kit tissue menunjukkan pita ≥ 10.000 bp.

5.2 Amplifikasi Gen OPN dengan Metode PCR

Amplifikasi gen OPN dilakukan untuk memperbanyak fragmen gen OPN sehingga dapat digunakan untuk mengetahui sekuen gen OPN sapi perah FH jantan normal ovarium dan kista ovarium folikuler homologi dengan genebank. Primer yang digunakan dalam penelitian ini dari NCBI genebank dengan nomer sekuen AY878328.1 menggunakan program primer3plus, sehingga didapatkan sepasang primer forward dan reverse yang ditunjukkan pada **Tabel 5.2**. metode PCR yang digunakan pada penelitian ini meliputi tahap pradenaturasi, denaturasi, annealing, extension dan postextension dengan suhu dan waktu yang ada pada **Tabel 5.3**.

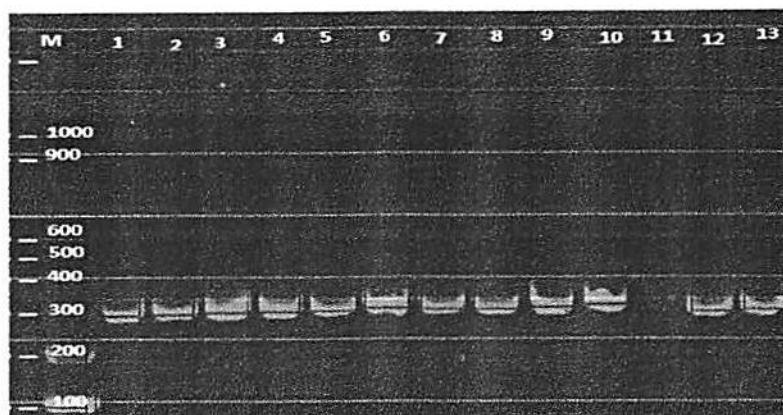
Primer	Urutan Oligo Nukleotida
OPN F	CTGAGGAAACTGATGACAAC
OPN R	GCTTTCATTGGACTTACTTGG

Tabel 5.2 Urutan Nukleotida Primer gen OPN Sapi perah FH jantan

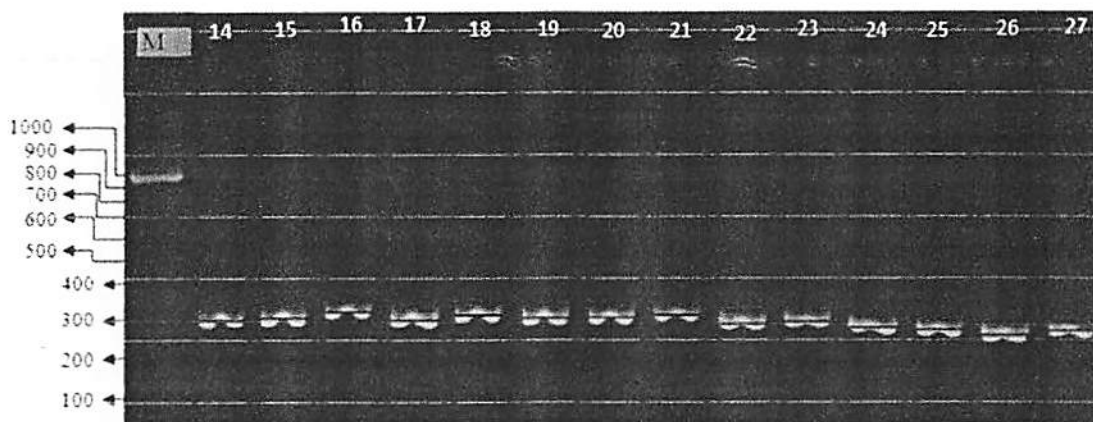
Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	4 menit	94°C
Denaturasi	30 detik	94°C
Annealing	30 detik	56°C
Ekstensi	30 detik	72°C
Post Ekstensi	7 menit	72°C

Tabel 5.3 Program PCR untuk Amplifikasi gen OPN Sapi perah FH jantan

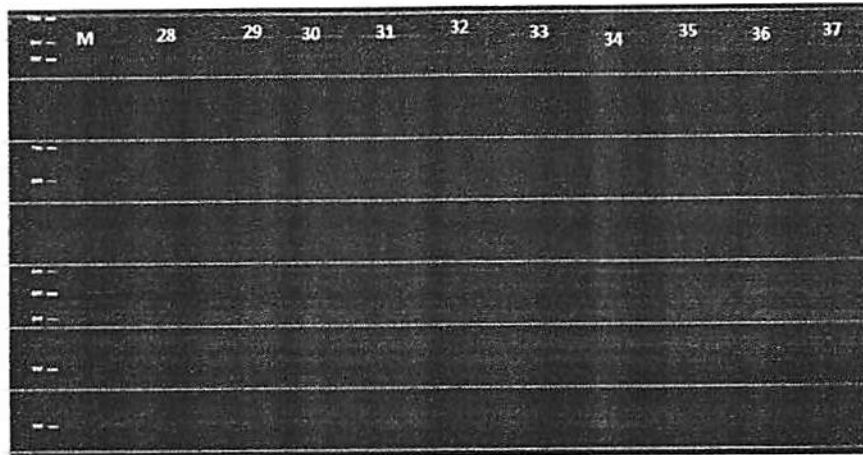
Hasil produk PCR dilakukan uji kualitatif dengan agarose 2% bertujuan untuk melihat pita DNA gen OPN apakah sesuai target yang diinginkan. Didapatkan hasil pita DNA gen OPN dengan ukuran 303 bp sesuai dengan target amplifikasi menggunakan primer forward dan reverse yang telah didesain menggunakan program *Primer3plus*. Berikut adalah hasil dari elektroforesis agarose 2% dari produk PCR gen OPN **Gambar 5.2**, **Gambar 5.3**, dan **Gambar 5.4**.



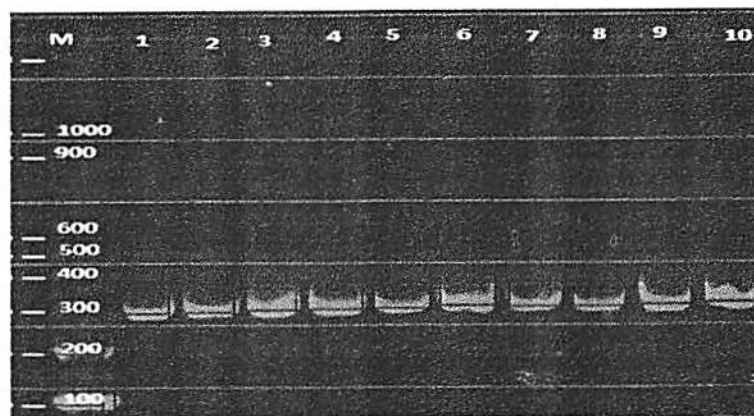
Gambar 5.2 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%) sampel nomor 1-13. Keterangan: kode M: Marker 1 kb, Sampel nomor 1:Glen, 2:Shorty, 3:Rollex, 4:Harry, 5:Dundee, 6:Sg. Anset, 7: Doming, 8:Sg. Dean 9:Formery, 10:Sg. Ogant, 11: Sg. Marriot, 12:Sg. Pland, 13: Sg. Dohuns.



Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%) sampel nomor 14-27. Keterangan: M: Marker 1 kb, kode sampel nomor 14: Bolton,15: Sg. Platro, 16: Gabe, 17:Sg. Casir, 18: PR1, 18:PR2, 19: PR3, 20: PR4, 21:PR5, 22:PRR6, 23:PR7, 24:PR8, P25:R9, 26:PR10, 27:PR11



Gambar 5.4 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%) sampel nomor 28-37.
Keterangan: M: Marker 1 kb, kode sampel nomor 28: PR12, 29: PR13, 30:PR14, 31:PR15, 32:PR16, 33:PR17, 34:PR18, 35:PR19, 36:PR20, 37:PR21.



Gambar 5.5 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%) sampel nomor 38-47.
Keterangan: M: Marker 1 kb, kode sampel nomor 1: PR12, 2: PR13, 3:PR14, 4:PR15, 5:PR16, 6:PR17, 7:PR18, 8:PR19, 9:PR20, 10:PR21.

Hasil produk PCR kemudian dipurifikasi bertujuan untuk memurnikan DNA dan menghilangkan sisa-sisa PCR mix, ddh₂o dan primer yang berada di dalam PCR tube. Metode yang digunakan dalam purifikasi adalah presipitasi etanol dengan modifikasi protokol santella. Hasil produk dari purifikasi kemudian disekuensing DNA dari gen OPN dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer OPN_F dan OPN_R untuk melihat sekuen gen OPN yang teramplifikasi.

Hasil Sekuensing DNA

Hasil sekuensing berupa grafik yang menunjukkan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA dan format data berupa fasta. Sampel yang Hingga laporan kemajuan ini ditulis, 14 sampel yang sudah keluar hasilnya dimasukkan ke

dalam program NCBI BLAST untuk penjejajaran hasil sekuensing dengan genebank NCBI AY878328.1. Hasil penjejajaran tersebut untuk melihat besarnya ident dan kesejajaran pada basa sampel dengan database NCBI

Tabel 5.4 Hasil Penjejajaran dengan database NCBI

NO	Nama Kode	Identity
1	Sampel H	98%
2	Sampel J	99%
3	Sampel L	99%
4	Sampel I	99%
5	Sampel N	98%
6	Sampel D	97%
7	Sampel 17	99%
8	Sampel 7	99%
9	Sampel 18	99%
10	Sampel 2	99%
11	Sampel 13	99%
12	Sampel 8	99%
13	Sampel 19	99%
14	Sampel 14	99%
15	Sampel M	99%

Urutan sekuen sampel yang disejajarkan dimulai dari basa ke 9900-10092 terdapat di **Lampiran 3**.

BAB 6 RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA

Identifikasi polimorfisme gen SPPI dengan parameter-parameter yang telah diamati pada tahun pertama meliputi : data kualitas semen segar sapi perah jantan Friesian Holstein, .konsentrasi spermatozoa sapi perah, persentase viabilitas dan motilitas spermatozoa. Hasil analisa sekuens pada seluruh sampel menunjukkan adanya korelasi antara polimorfisme gen SPPI terhadap kualitas semen segar sapi perah jantan Friesian Holstein, .konsentrasi spermatozoa sapi perah, persentase viabilitas dan motilitas spermatozoa. Mengingat hasil penelitian identifikasi polimorfisme gen SPPI terhadap kualitas semen segar sapi perah FH menunjukkan korelasi positif, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait ada tidaknya pengaruh polimorfisme gen SPPI pada kualitas semen beku sebagai screening awal untuk memperoleh kualitas semen post thawing yang lebih optimal. Penelitian tahap lanjut yang akan dilaksanakan meliputi:

Identifikasi polimorfisme gen SPPI dan OPN terhadap kualitas semen beku post-thawing yang meliputi: persentase motilitas post-thawing, presentasi viabilitas post-thawing, integritas membran post-thawing dan ekspresi beberapa parameter molekuler yang berhubungan dengan kemampuan spermatozoa mempertahankan viabilitasnya. Data ini akan ditunjang juga dengan pemeriksaan kadar testostosterone sapi perah jantan FH melalui metode ELISA sehingga parameter-parametr yang diperoleh berkenaan dengan identifikasi gen promotor osteopontin yakni SPPI dan OPN bersifat lebih komprehensif.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Identifikasi polimorfisme gen dengan parameter-parameter yang telah diamati meliputi : data kualitas semen segar sapi perah jantan Friesian Holstein, konsentrasi spermatozoa sapi perah, persentase viabilitas dan motilitas spermatozoa. Seluruh sampel darah (50 sampel) telah diekstraksi, diamplifikasi, dan dipurifikasi. Amplifikasi memperlihatkan seluruh target ukuran pita DNA yakni 306 bp. Analisa sekuensing, penyejajaran dan identifikasi polimorfisme berhasil dilakukan sebanyak 29 sampel saja. Hasil analisa sekuens pada seluruh sampel menunjukkan adanya korelasi antara polimorfisme gen SPPI terhadap kualitas semen segar sapi perah jantan Friesian Holstein, konsentrasi spermatozoa sapi perah, persentase viabilitas dan motilitas spermatozoa. Dimana didapatkan adanya delesi pada sampel dengan kualitas semen rendah (N=9) pada (T - -) basa ke- 10080 dan transisi (G-A) pada basa ke 10090 bp juga berkorelasi dengan kualitas semen segar secara mikroskopik. Hasil penelitian tahap satu membuktikan bahwa lokasi mutasi pada gen SPPI dapat digunakan sebagai indikasi awal adanya perubahan kualitas semen segar sapi perah FH.

Saran

1. Terdapat beberapa sampel yang diisolasi dengan metode konvensional (non KIT) gagal disekuensing meskipun telah mengalami purifikasi, sehingga ketika dilakukan BLAST dan penyejajaran tidak terdeteksi. Oleh karena itu sebaiknya hasil amplikon yang akan dilakukan sekuensing diambil dari metode ekstraksi yang menggunakan KIT.
2. Mengingat hasil penelitian identifikasi polimorfisme gen SPPI terhadap kualitas semen segar sapi perah FH menunjukkan korelasi positif, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait ada tidaknya pengaruh polimorfisme gen SPPI pada kualitas semen beku sebagai screening awal untuk memperoleh kualitas semen post thawing yang lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Aulanni'am, 2005. *Protein dan Analisisnya*. Cetakan pertama. Penerbit Citra Mentari Group. Malang. Hal. 19-27
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay, 1992. *Applied Animal Reproduction*. 3th. Edition Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Blakely, J. dan D.H. Bade. 1994. *Ilmu Peternakan*. Cetakan keempat. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. Hal. 156-164.
- Caballero, J.; G. Frenette and R. Sullivan. 2010. Post Testicular Sperm Maturation changes and Protosome. *Vet. Medicine International* 1 – 25 Cambridge.
- Cancel. A.M; David A. Chapman and G.J. Killian. 1997. Osteopontin is the Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. Department of Dairy and Animal Sci and The Department of Biology. University park. Pennsylvania. 1293-1301.
- Copeland, L. 1994. Pedigree Analysis as a Basis of Selecting Bull Calves. *Journal Of Dairy Science*. 17 (2) 93-102.
- Direktur Jendral Peternakan. 2005. *Produksi Daging, Telur dan Susu*.
http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak/isi_infoekse_nak.htm.
- Erikson D.W., A.L. Way, R.P. Bertolla, D.A. Chapman and G.J. Killian. 2007. Influence of osteopontin, casein and oviductal fluid on bovine sperm capacitation. *Anim.Reprod* 4:103-112
- Esteves, S.C., D.M. Spaine, A.P. Cedenho, and M. Srough., 2005. Effects of The Technique of Cryopreservation and Dilution/Centrifugation After Thawing on The Motility and Vitality of Spermatozoa of Oligoasthenozoospermic Men. *International Braz.J.Urol.* 29 : 133-40.
- Gordon, I., 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. The UK. University Press.
- Hafez, E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th. Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Harvey, W.R. 1991. *User's Guide for LSMLMW: Mixed Model Least Squares and Maximum Likelihood Computer Programs*. Ohio State University, USA.
- Hernawati T, S. Mulyati, Y. Oktanella. 2016. Specific-Protein Sperm Membrane Supplementation on Freezing Medium Maintain Post-Thawed Bull Sperm Quality. *Int Journal of ChemTech Research* Vol 9/No.12/2016
- Hunter, RHF., 1995. *Fisiologi dan Teknologi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB Bandung.
- Kasai, M., 1996. *Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos*. *Animal Reproduction Sciences*.

- Kim S and T Shin. 2007. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis. *J. Vet. Sci.* 8: 107-110.
- Moura, A.A., H. Koc, D.A. Chapman and G.J. Killian, G.J., 2007. A comprehensense proteomic analysis of the accessory sex gland fluid of mature Holstein bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 98: 169-188.
- Moura, A.A., H. Koc, D.A. Chapman and G.J. Killian. 2006. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J. Androl.* 27: 201-211.
- Park, J.E. and J.K. Graham, 1992. *Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes.* *J. Theriogenology* 38 : 2009-222
- Partodihardjo, S., 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan.* Cetakan ketiga. Mutiara Sumber Widya. Jakarta. Hal. 522 - 556.
- Rodriguez, C.M.; Jonathan, R.D and G.J. Killian. 2000. Osteopontin Gene Expression in The Holstein Bull Reproductive Tract. Department of Dairy and Animal Sci and The Department of Biology. University park. Pennsylvania. 414-419.
- Rorie, R. W., C. L. Williams, T. D. Lester. 2016. Association of osteopontin Gene Promoter Single Nucleotide Polymorphisms with Bull Semen Quality. *Advances in Reproductive Sciences*, 2016, 4, 1-7.
- Samik, A., Oktanella, Y., Hernawati, T., Widjaja, NMR. Dan Dewanti, I.P. 2014. Penambahan Osteopontin dalam Pengencer Semen Beku Sapi Perah Friesien Holstein Meningkatkan Ekspresi B-Cell CII/Lymphoma-2 Spermatozoa Post-thawing. *Jurnal Veteriner* Vol.15/No.4. Udayana. Denpasar.
- Santoso, G., 2005. *Metodologi Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif.* Cetakan pertama. Prestasi Pustaka Publisher. Hal.27-44.
- Schleif, R. 1993. *Genetics and Molecular Biologi* 2nd edition. *The John Hopkins Press Ltd.* London.
- Schnabel, R.D., Kim, J.J., Ashwell, M.S., Sonstegard, T.S., Van Tassell, C.P., Connor, E.E. and Taylor, J.F. (2005) Fine-Mapping Milk Production Quantitative Trait Loci on BTA6: Analysis of the Bovine Osteopontin Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 6896-6901.
- Susilawati, T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Toelihere, M.R., 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak.* 6th. Ed. Penerbit Angkasa Bandung.
- Tomaszwaska, M.W., Sutarna, I.K., Putu, I.G dan Chaniago, T.D. 1991. *Reproduksi, Tingkat laku, dan Produksi Ternak Indonesia.* PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 88.

Lampiran 1. Protokol Isolasi DNA (Genomic DNA mini kit tissue)

Organ 30 mg

- Dimasukkan ke dalam eppendorf dan ditumbuk menggunakan micropestle
- Ditambahkan 200 μ L GT buffer, dicampur
- Diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit
- Ditambahkan GBT buffer 200 μ L , divortex 5 detik
- Diinkubasi 60°C selama 20 menit
- Disentrifuge selama 2 menit (14.000-15.000 rpm)
- Dipindah supernatan ke tabung baru
 - Ditambahkan 200 μ L ethanol absolut, divortex selama 10 detik
 - Dipindah Collection tube dengan GS column
 - Disentrifuge selama 2 menit (14.000-16.000rpm)
 - Dibuang tabung lama dan dipindah GS column
 - Ditambahkan 400 μ L W1 buffer via GS column, lalu disentrifuge selama 30 detik dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm
 - Dibuang collection tube, diganti dengan yang baru
 - Ditambahkan 600 μ L wash buffer dan disentrifuge selama 30 detik
 - Dibuang collection tube dan disentrifuge selama 3 menit (14.000-16.000rpm)
 - Dipindah GS column ke 1,5 ml microtube
 - Ditambahkn 100 μ L Elution buffer
 - Dibiarkan 5 menit, sentrifuge selama 30 detik (14.000-16.000rpm)

HASIL

Lampiran 2. Protokol Purifikasi Produk PCR

Protokol PCR 20

- Dimasukkan ke dalam *micro centrifuge tube* 1,5 ml
- Ditambahkan 2 μL Natrium asetat 3M
- Ditambahkan 40 μL etanol absolut
- Divortex
- Diinkubasi selama 1 malam pada suhu -20°C
- Disentrifugasi (13500 rpm) selama 60 menit
- Dibalik *microcentrifuge tube* dan dibuang sisa cairan di dalamnya
- Ditambahkan 175 μL etanol 70%
- Disentrifugasi (13500 rpm) selama 15 menit
- Dibalik *micro centrifuge tube* dan dibuang sisa cairan di dalamnya
- Ditambahkan 175 μL etanol 70%
- Disentrifugasi (13500 rpm) selama 10 menit
- Dibalik *micro centrifuge tube* dan dibuang sisa cairan di dalamnya
- Ditambahkan 175 μL etanol 70%
- Disentrifugasi (13500 rpm) selama 10 menit
- Dibalik *micro centrifuge tube* dan dibuang sisa cairan di dalamnya
- Ditambahkan 175 μL etanol 70%
- Disentrifugasi (13500 rpm) selama 10 menit
- Dibalik *micro centrifuge tube* dan dibuang sisa cairan di dalamnya
- Diinkubasi pada suhu 40°C dengan penutup tabung
- Dibuka dan dibiarkan kering pada ruangan yang steril
- Ditambahkan 20 μL ddH₂O
- Disimpan pada suhu -20°C

Langkah 1

Langkah 2

Langkah 3

Langkah 4

Langkah 5

Langkah 6

Langkah 7

Langkah 8

Hasil

Sampl 17

Score	Expect	Identities	Gaps	Plus/Minus	Strand
455 bits(246)	3e-124	261/268(97%)	2/268(0%)		
Query 3	TTGGATTATGAACTGTTTTTCCCTTGGTATATTAACCTAATTAACCAATTTCA	92			
Subject 10189	TTGATCAATGACAC-TG-TTTTCCCTTGGTATATTAACCTAATTAACCAATTTCA	10952			
Query 63	ATGATCCAGTAAATACAG-TACATAATATATATATATATATATATATATATAT	122			
Subject 10051	ATGATCCAGTAAATACAG-TACATAATATATATATATATATATATATATATAT	9932			
Query 123	TCTAGGGGATTCAGAGATTCATGATATATATATATATATATATATATATATAT	162			
Subject 9991	TCTAGGGGATTCAGAGATTCATGATATATATATATATATATATATATATATAT	9932			
Query 183	TATTAAGCTTGGATATATCAAAAGGATGACTTCTTATCCATGATAGAAACTATAGCTCAGT	242			
Subject 9931	TATTAAGCTTGGATATATCAAAAGGATGACTTCTTATCCATGATAGAAACTATAGCTCAGT	9872			
Query 243	TATTAAGCTTATCAACCTTCTGATTTGCAT	270			
Subject 9872	TATTAAGCTTATCAACCTTCTGATTTGCAT	9842			

Range 1: 9844 to 10109 **BLASTN**
 Sequence ID: AF070238.1 Length: 12300 Number of Matches: 1

Bcs taurus osteopontin gene, complete cds

Sampl D

Score	Expect	Identities	Gaps	Plus/Minus	Strand
448 bits(242)	6e-122	252/256(98%)	3/256(1%)		
Query 3	ATGA-ACATGTTTTT-CTTGTTC-TATTAACCACTAATTAACCAATTTCAAGTCCAGT	65			
Subject 10181	ATGACACATGTTTTTCTTGTTCATATTAACCACTAATTAACCAATTTCAAGTCCAGT	10042			
Query 66	AAATACAGTACAAATATGATGAGCTTCTTATATGAAATGAAATATGAAATATGAGGGA	125			
Subject 9982	AAATACAGTACAAATATGATGAGCTTCTTATATGAAATGAAATATGAAATATGAGGGA	9982			
Query 126	TCAAGAAATCCATGATATTAATGACACACCCCAAACTAATAATCACTCCCTATATAGCCCTG	185			
Subject 9961	TCAAGAAATCCATGATATTAATGACACACCCCAAACTAATAATCACTCCCTATATAGCCCTG	9922			
Query 186	GATAATC AAAGGATGACTTCTTATCCATGATAGTAACTATAGCTCAGTAAATGATCATA	245			
Subject 9921	GATAATC AAAGGATGACTTCTTATCCATGATAGTAACTATAGCTCAGTAAATGATCATA	9862			
Query 246	CACACTTCTGATTTGC	261			
Subject 9861	CACACTTCTGATTTGC	9846			

Range 1: 9846 to 10101 **BLASTN**
 Sequence ID: AF070238.1 Length: 12300 Number of Matches: 1

Bcs taurus osteopontin gene, complete cds

Sampl 18

Range 1: 9845 to 10096 Score: 453 bits(245) Expect: 1e-123 Identities: 250/252(99%) Gaps: 1/252(0%) Strand: Plus/Minus

Query	Subject
16	9845
17	9846
18	9847
19	9848
20	9849
21	9850
22	9851
23	9852
24	9853
25	9854
26	9855
27	9856
28	9857
29	9858
30	9859
31	9860
32	9861
33	9862
34	9863
35	9864
36	9865
37	9866
38	9867
39	9868
40	9869
41	9870
42	9871
43	9872
44	9873
45	9874
46	9875
47	9876
48	9877
49	9878
50	9879
51	9880
52	9881
53	9882
54	9883
55	9884
56	9885
57	9886
58	9887
59	9888
60	9889
61	9890
62	9891
63	9892
64	9893
65	9894
66	9895
67	9896
68	9897
69	9898
70	9899
71	9900
72	9901
73	9902
74	9903
75	9904
76	9905
77	9906
78	9907
79	9908
80	9909
81	9910
82	9911
83	9912
84	9913
85	9914
86	9915
87	9916
88	9917
89	9918
90	9919
91	9920
92	9921
93	9922
94	9923
95	9924
96	9925
97	9926
98	9927
99	9928
100	9929
101	9930
102	9931
103	9932
104	9933
105	9934
106	9935
107	9936
108	9937
109	9938
110	9939
111	9940
112	9941
113	9942
114	9943
115	9944
116	9945
117	9946
118	9947
119	9948
120	9949
121	9950
122	9951
123	9952
124	9953
125	9954
126	9955
127	9956
128	9957
129	9958
130	9959
131	9960
132	9961
133	9962
134	9963
135	9964
136	9965
137	9966
138	9967
139	9968
140	9969
141	9970
142	9971
143	9972
144	9973
145	9974
146	9975
147	9976
148	9977
149	9978
150	9979
151	9980
152	9981
153	9982
154	9983
155	9984
156	9985
157	9986
158	9987
159	9988
160	9989
161	9990
162	9991
163	9992
164	9993
165	9994
166	9995
167	9996
168	9997
169	9998
170	9999
171	10000

Sequence ID: AY020228.1 Length: 12300 Number of Matches: 1
 Bos taurus osteopontin gene complete cds

Sampl 7

Range 1: 9845 to 10101 Score: 457 bits(247) Expect: 9e-125 Identities: 254/257(99%) Gaps: 2/257(0%) Strand: Plus/Minus

Query	Subject
1	9845
2	9846
3	9847
4	9848
5	9849
6	9850
7	9851
8	9852
9	9853
10	9854
11	9855
12	9856
13	9857
14	9858
15	9859
16	9860
17	9861
18	9862
19	9863
20	9864
21	9865
22	9866
23	9867
24	9868
25	9869
26	9870
27	9871
28	9872
29	9873
30	9874
31	9875
32	9876
33	9877
34	9878
35	9879
36	9880
37	9881
38	9882
39	9883
40	9884
41	9885
42	9886
43	9887
44	9888
45	9889
46	9890
47	9891
48	9892
49	9893
50	9894
51	9895
52	9896
53	9897
54	9898
55	9899
56	9900
57	9901
58	9902
59	9903
60	9904
61	9905
62	9906
63	9907
64	9908
65	9909
66	9910
67	9911
68	9912
69	9913
70	9914
71	9915
72	9916
73	9917
74	9918
75	9919
76	9920
77	9921
78	9922
79	9923
80	9924
81	9925
82	9926
83	9927
84	9928
85	9929
86	9930
87	9931
88	9932
89	9933
90	9934
91	9935
92	9936
93	9937
94	9938
95	9939
96	9940
97	9941
98	9942
99	9943
100	9944
101	9945
102	9946
103	9947
104	9948
105	9949
106	9950
107	9951
108	9952
109	9953
110	9954
111	9955
112	9956
113	9957
114	9958
115	9959
116	9960
117	9961
118	9962
119	9963
120	9964
121	9965
122	9966
123	9967
124	9968
125	9969
126	9970
127	9971
128	9972
129	9973
130	9974
131	9975
132	9976
133	9977
134	9978
135	9979
136	9980
137	9981
138	9982
139	9983
140	9984
141	9985
142	9986
143	9987
144	9988
145	9989
146	9990
147	9991
148	9992
149	9993
150	9994
151	9995
152	9996
153	9997
154	9998
155	9999
156	10000
157	10001
158	10002
159	10003
160	10004
161	10005
162	10006
163	10007
164	10008
165	10009
166	10010
167	10011
168	10012
169	10013
170	10014
171	10015
172	10016
173	10017
174	10018
175	10019
176	10020
177	10021
178	10022
179	10023
180	10024
181	10025
182	10026
183	10027
184	10028
185	10029
186	10030
187	10031
188	10032
189	10033
190	10034
191	10035
192	10036
193	10037
194	10038
195	10039
196	10040
197	10041
198	10042
199	10043
200	10044
201	10045
202	10046
203	10047
204	10048
205	10049
206	10050
207	10051
208	10052
209	10053
210	10054
211	10055
212	10056
213	10057
214	10058
215	10059
216	10060
217	10061
218	10062
219	10063
220	10064
221	10065
222	10066
223	10067
224	10068
225	10069
226	10070
227	10071
228	10072
229	10073
230	10074
231	10075
232	10076
233	10077
234	10078
235	10079
236	10080
237	10081
238	10082
239	10083
240	10084
241	10085
242	10086
243	10087
244	10088
245	10089
246	10090
247	10091
248	10092
249	10093
250	10094
251	10095
252	10096
253	10097
254	10098
255	10099
256	10100
257	10101

Sequence ID: AY020228.1 Length: 12300 Number of Matches: 1
 Bos taurus osteopontin gene complete cds

Bos taurus osteopontin gene complete cds
Sequence ID: AF078228.1 Length: 12300 Number of Matches: 1

Range: 1: 9845 to 10101 (SAMPLE)

Score 452 bits(250) Expect 2e-126 Identities 255/257(99%) Gaps 1/257(0%) Plus/Minus Strand

Query	67	ATGAC-CGTGTTTTCCTTGTTCATATTAACCACTAATTCACCAATTCATGATCCAGT
Subject	10101	ATGACACGTGTTTTCCTTGTTCATATTAACCACTAATTCACCAATTCATGATCCAGT
Query	68	AATACAGATACATATGATGAGACACTACCTTTTCATATTTGAAATGAAATTCACAGGGAA
Subject	10041	AATACAGATACATATGATGAGACACTACCTTTTCATATTTGAAATGAAATTCACAGGGAA
Query	126	TCAGGATCCATGATATTAAGCACCCCAAACTAATAATCACTCCCTATTAAGCTTG
Subject	9922	TCAGGATCCATGATATTAAGCACCCCAAACTAATAATCACTCCCTATTAAGCTTG
Query	105	GATAATCAAAAGGTG-CCTCTCTTATCCATGATGTAAGAACTAATAGCTCAATATGTCAT
Subject	9922	GATAATCAAAAGGTG-CCTCTCTTATCCATGATGTAAGAACTAATAGCTCAATATGTCAT
Query	248	CACACTTCGATTTGCA 264
Subject	9861	CACACTTCGATTTGCA 9845

Sampl 2

Bos taurus osteopontin gene complete cds
Sequence ID: AF078228.1 Length: 12300 Number of Matches: 1

Range: 1: 9845 to 10100 (SAMPLE)

Score 455 bits(246) Expect 3e-124 Identities 253/256(99%) Gaps 2/256(0%) Plus/Minus Strand

Query	21	TGAC-CGTGTTT-CGTGTTTCATATTAACCACTAATTCACCAATTCATGATCCAGTA
Subject	10100	TGACACTGTTTTCCTTGTTCATATTAACCACTAATTCACCAATTCATGATCCAGTA
Query	69	AATACAGATACATATGATGAGACACTACCTTTTCATATTTGAAATGAAATTCACAGGGAA
Subject	10040	AATACAGATACATATGATGAGACACTACCTTTTCATATTTGAAATGAAATTCACAGGGAA
Query	125	CAGGATCCATGATATTAAGCACCCCAAACTAATAATCACTCCCTATTAAGCTTG
Subject	9921	CAGGATCCATGATATTAAGCACCCCAAACTAATAATCACTCCCTATTAAGCTTG
Query	189	ATATCAAAAGGTGACTCTTATCCATGATGTAAGAACTAATAGCTCAATATGTCAT
Subject	9920	ATATCAAAAGGTGACTCTTATCCATGATGTAAGAACTAATAGCTCAATATGTCAT
Query	249	CACACTTCGATTTGCA 264
Subject	9860	CACACTTCGATTTGCA 9845

Sampl 13

Bos taurus osteopontin gene complete cds

Sequence ID: AF070323.1 Length: 12300 Number of Matches: 1

Range 1: 9845 to 10101 SeqName Accession

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
457 bits(247)	9e-125	254/257(99%)	2/257(0%)	Plus/Minus
Query: 8	ATGACCTGTTTTTCTTGTTCATAATAAACACTAATTTACCAATTTCAATGATCCAAT	65		
Subject: 10101	ATGACACTGTTTTTCCTTGTTCATAATAAACACTAATTTACCAATTTCAATGATCCAAT	10042		
Query: 66	AAATACAGATACATAAATGTGTGAGACTACCTTTTCTATTTGAAATGAAAATTCTCAGGGGA	125		
Subject: 10041	AAATACAGATACATAAATGTGTGAGACTACCTTTTCTATTTGAAATGAAAATTCTCAGGGGA	9982		
Query: 126	TCAGAGAAATCCATGTATTAAATGCACACCCCCAAAACATAAAATCACCTCCCTATTAGCCTG	185		
Subject: 9981	TCAGAGAAATCCATGTATTAAATGCACACCCCCAAAACATAAAATCACCTCCCTATTAGCCTG	9922		
Query: 186	GATAATCAAAGGTGACTCTCTTATCCATGTGTAGAAACTATAGCTCAGTTAATGTCTAT	245		
Subject: 9921	GATAATCAAAGGTGACTCTCTTATCCATGTGTAGAAACTATAGCTCAGTTAATGTCTAT	9862		
Query: 246	CACACTTCTGATTTGCA	262		
Subject: 9861	CACACTTCTGATTTGCA	9845		

Sampel 8

Bos taurus osteopontin gene complete cds

Sequence ID: AF070323.1 Length: 12300 Number of Matches: 1

Range 1: 9845 to 10101 SeqName Accession

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
457 bits(247)	9e-125	255/258(99%)	3/258(1%)	Plus/Minus
Query: 7	ATGACCTGTTTTTCTTGTTCATAATAAACACTAATTTACCAATTTCAATGATCCAAT	64		
Subject: 10101	ATGACACTGTTTTTCCTTGTTCATAATAAACACTAATTTACCAATTTCAATGATCCAAT	10042		
Query: 65	AAATACAGATACATAAATGTGTGAGACTACCTTTTCTATTTGAAATGAAAATTCTCAGGGGA	124		
Subject: 10041	AAATACAGATACATAAATGTGTGAGACTACCTTTTCTATTTGAAATGAAAATTCTCAGGGGA	9982		
Query: 125	TCAGAGAAATCCATGTATTAAATGCACACCCCCAAAACATAAAATCACCTCCCTATTAGCCTG	184		
Subject: 9981	TCAGAGAAATCCATGTATTAAATGCACACCCCCAAAACATAAAATCACCTCCCTATTAGCCTG	9922		
Query: 185	GATAATCAAAGGTGACTCTCTTATCCATGTGTAGAAACTATAGCTCAGTTAATGTCTAT	244		
Subject: 9921	GATAATCAAAGGTGACTCTCTTATCCATGTGTAGAAACTATAGCTCAGTTAATGTCTAT	9862		
Query: 245	CACACTTCTGATTTGCA	262		
Subject: 9861	CACACTTCTGATTTGCA	9845		

Sampel 19

Range 1: 9945 to 10100 Sequence Length: 156

Sequence ID: [B02100291](#) Length: 12300 Number of Matches: 1

Bos taurus osteopontin gene complete cds

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
450 bits(249)	7e-126	254/256(99%)	2/256(0%)	Plus/Minus
Query 11	167-ACGTGTTT-CCTGTC-TAATTAACACTAAATTCACAAATTCATGATCCAAATA	98		
Subject 10100	TGACACTGTTTTCCATTAATTAACACTAAATTCACAAATTCATGATCCAAATA	10041		
Query 69	TAATCAATACATATGATGACTACCTTTCTATATGGAAATGCAAGGGGAT	128		
Subject 10040	TATCAAGATCAATATATGATGACTACCTTTCTATATGGAAATGCAAGGGGAT	9981		
Query 129	CAGGAAATCCATGTTTAAATGCAACCCCAAAACTAAATTCACCTCCCTAATAGCCTGG	188		
Subject 9980	CAGGAAATCCATGTTTAAATGCAACCCCAAAACTAAATTCACCTCCCTAATAGCCTGG	9921		
Query 189	ATAATCAAAAGGTGACTCTTAATCCATGATGTAAGAACTATAGCTCAATTAAATGCTATC	248		
Subject 9920	ATAATCAAAAGGTGACTCTTAATCCATGATGTAAGAACTATAGCTCAATTAAATGCTATC	9861		
Query 249	ACACTTCATGATTTGCA	264		
Subject 9860	ACACTTCATGATTTGCA	9845		

Range 1: 9946 to 10101 Sequence Length: 156

Sequence ID: [B02100291](#) Length: 12300 Number of Matches: 1

Bos taurus osteopontin gene complete cds

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
453 bits(245)	1e-123	253/256(99%)	3/256(1%)	Plus/Minus
Query 9	TGAC-CGTGTTT-CCTGTC-TAATTAACACTAAATTCACAAATTCATGATCCAAATA	65		
Subject 10101	TGACACTGTTTTCCATTAATTAACACTAAATTCACAAATTCATGATCCAAATA	10042		
Query 60	TAATCAATACATATGATGACTACCTTTCTATATGGAAATGCAAGGGGAT	129		
Subject 9982	TATCAAGATCAATATATGATGACTACCTTTCTATATGGAAATGCAAGGGGAT	9982		
Query 126	TGAGAAATCCATGTTTAAATGCAACCCCAAAACTAAATTCACCTCCCTAATAGCCTG	189		
Subject 9982	TGAGAAATCCATGTTTAAATGCAACCCCAAAACTAAATTCACCTCCCTAATAGCCTG	9922		
Query 186	GATAATCAAAAGGTGACTCTTAATCCATGATGTAAGAACTATAGCTCAATTAAATGCTAT	249		
Subject 9922	GATAATCAAAAGGTGACTCTTAATCCATGATGTAAGAACTATAGCTCAATTAAATGCTAT	9862		
Query 245	CAACTTCATGATTTGCA	241		
Subject 9862	CAACTTCATGATTTGCA	9846		

Lampiran 4. Submit Jurnal Internasional Terindex Scopus

Correlation between Osteopontin Promoter Gene and Fresh Semen Quality in Holstein Friesian Dairy Cows

Tatik Hernawati¹, Yudit Oktanella², Sri Mulyani¹, Rimayanti¹, Tri Wahyu Suprayogi¹
¹Department of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Airlangga, Surabaya
²Department of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Brawijaya University, Malang
*Corresponding Author E-mail: hernawati_tatik@yahoo.com

ABSTRAC

This study aims to investigate the polymorphism of osteopontin promoter gene in Holstein Friesian (FH) dairy cows and its correlation with quality of fresh semen in FH dairy cows. The basis determining for osteopontin as the main bio-marker in the determination of male Holstein dairy cow fertility by several previous studies which showed that osteopontin levels in seminal plasma Holstein dairy cows with a good fertility have osteopontin concentrations higher than the low fertility of dairy cows. A total of 14 blood samples taken from Holstein Friesian dairy cows then the DNA is extracted and amplified using primers SPP1F and SPP1R. The 306bp band as a target was detected in all 14 samples then sequenced for analysis of the nucleotide base. The results showed that all samples with low sperm concentration occurred deletion at 10080bp and the transition (G-A) at 10090bp. The results indicated that this mutation site could be related with the trait susceptibility to sperm concentration. Further studies are needed to address other parameter related to comprehensive sperm quality.

Keywords : polymorphism, osteopontin, male fertility, dairy cows

INTRODUCTION

Examination of semen in males as a measure of fertility rates have only done through macroscopic and microscopic examination. In addition to such examinations can also be seen from the pedigree, namely the selection of which is based on the reputation demonstrated by the ancestors of cows is concerned but the test is less accurate, because a bloodline or the offspring of individuals who either does not necessarily mean that the characteristics of good will selection and inherited through marriage (Blakely and Bade, 1994; Copeland, 1994). Another male fertility test that is based on progeny test is a test to see heritability trait but this test takes approximately 4-6 years old so it is not efficient (Tomaszewska et al., 1991; Akiko, 1998).

Basic determination of osteopontin as a bio-marker principal in determining the fertility of dairy cows Holstein bull is based on some earlier research (Killian et al., 1993; Cancel et al., 1997; Moura et al., 2006) which showed that the levels of osteopontin in seminal plasma Holstein dairy cows with a good fertility has a concentration of osteopontin 2.5-fold when compared with the low fertility of dairy cows. Erikson et al., (2007) says that the males are inspected dairy cows and fresh cement containing osteopontin has a great potential in the success of fertilization in vitro and in vivo than not containing osteopontin. This is reinforced by previous studies that prove the relationship between osteopontin with fresh semen quality dairy cows FH in Indonesia,

Osteopontin gene promoter polymorphism associated with male fertility in dairy cows Holstein. Some evidence suggests that there is a relationship between gene polymorphisms promoter osteopontin, one of which is polymorphism promoter osteopontin motility and viability of spermatozoa fresh semen cow (Schnabel et al., 2005; Gafer et al., 2015; Rorie et al., 2016).Osteopontin gene promoter region determination based on previous research conducted by Rori et al., (2016) identified seven SNPs region that acts as a promoter osteopontin, among others: 3379 bp, 3490 bp, 3492 bp, 5075 bp, 5205 bp, 5209 bp and 5263 bp of osteopontin gene promoter. Then, substitution thymine to guanine at 3379 bp correlated with an increase in the percentage motility spermazoa, but for the viability parameters have not been identified.Morales *et al*, (2010) in a research report that testing of males routinely in the IB program is very important as an indicator of fertility.

Development of dairy cow population ahead should be selected based on the value of breeding (breeding value), the use identifier genetically especially those controlling reproduction and application of BSE so stud dairy cattle FH in the Central IB can be accounted for its quality, because the male who will spread the trait superior to the population. Development testing of the stud through the identification identifier genetically to semen quality has been done in some developed countries (Lechniak et al., 1998; Dai et al., 2009; Gorbani et al. 2009b; Liu et al., 2011; Afshar et al. 2011; Chenoweth 2011), it is expected to support the accelerated population of dairy cows FH superior in quality. Genetic selection system requires the identification of the genetic identifiers as candidate genes that control reproductive traits, especially the bulls.

MATERIALS AND METHODS

Tools and materials

The tools used in the study include a glove, mask, ice box, paper labels, microcentrifuge tube (1.5 mL), micro PCR tube (200 mL), micropipette, white tip, yellow tip, vortex engine, centrifugator, incubator CO₂, freezer, thermocycler, EDTA, Horizontal SDS-PAGE (Biorad), Gel Documentation (Biorad), thermocycler (Biorad), Nano-200 Microspectrophotometer nucleic acid.

Materials used in research FH male cattle blood samples, Genomic DNA mini kit tissue, ddH₂O, forward primer (SPPI_F) 5'-GCAAATCAGAAGTGTGATAGA-3 'and reverse primer (SPPI_R) 5'-CCAAGCCAAACGTATGAGTT-3', the PCR mix, DNA ladder 100 bp and 1 kb, TBE, agarose 1% and 2%, loading dye, alcohol 70%, aluminum foil, red gel.

Cow Blood Sample Selection FH Males

Samples taken in the form of blood samples of 14 Holstein Friesian dairy cows 3-5 years old adult male obtained from BBIB Singosari, Malang, East Java, Indonesia, and local cattle ranchers.

table 1.1 Males FH Cow Sample Data

No.	Origin	Code
1	BBIB	2
2	breeder	7

3	breeder	8
4	BBIB	17
5	breeder	19
6	breeder	D
7	breeder	H
8	BBIB	I
9	BBIB	J
10	BBIB	L
11	BBIB	M
12	BBIB	N
13	BBIB	13
14	BBIB	14

Cow Blood Sampling FH Males

Location blood sampling performed on coccygea vein. The volume of blood samples are taken as 3cc of each individual bull. The blood sample is inserted into EDTA vacutainer tube and labeled according to the name of the individual samples of cattle. Samples were then stored at a temperature of 40C. Storage of whole blood samples at a temperature of 40C have been selected for the distance between sampling and DNA isolation process is not too long.

After blood collection examination fresh semen quality with cement collected in advance. Fresh semen collection is done by using an artificial vagina. Artificial vagina is prepared with an internal temperature of 45°C and already smeared with vaseline. The males are lured by using dummy / female pemancik then proceeds semen collection examined macroscopically immediately include: volume, color, odor, pH and viscosity and microscopic examination.

isolation of DNA

Isolation of DNA from blood samples of male cattle FH using insulation kit from Geneaid namely Genomic DNA mini kit tissue and blood. Following the protocol for the isolation of specific DNA blood. The main principle in the isolation of DNA, there are three namely the. destruction (lysis), DNA extraction or separation of solid materials such as cellulose and proteins, and DNA purification (Nita, 2013).

Quantity and Quality Test DNA

DNA quantity insulation test results done using machine Micro-Nano-200 spectrophotometer nucleic acids. Shells TE buffer used is obtained from a kit geneaid, TE buffer is dripped directly onto the pedestal submicroliter cell as 1µL, then absorbance is measured by pressing a button blank blank after the lid (cover) is closed. The wavelengths used are 260 nm and 280 nm. An initial stages, a total of 1 mL sample was dropped on pedestal submicroliter cell that has been cleaned using a tissue. Lid closed above the sample was dropped and pressed the button sample and then wait until the results come out on the screen. To sample the stages are the same as above, done up to the last sample. Data out in the form of numbers or graphs (Clark et al, 2001).

Primer design

Primers used for DNA amplification by polymerase chain reaction technique (PCR) was designed using NCBI Genebank: AY878328.1. Forward primer and reverse primer obtained through primer3plus using data AY878328.1 with 12,300bp linear DNA. A pair of forward primer (SPPI_F) 5'-GCAAATCAGAAGTGTGATAGA-3' (Length: 21 bp, Tm: 53.7, GC: 38.1% and the reverse primer (SPPI_R) 5'-CCAAGCCAACGTATGAGTT-3' (Length: 20 bp, tm: 56.3, GC: 45%).

The process of Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA samples of steers was amplified using the PCR method. A pair of primers used are forward primer (SPPI_F) and reverse (SPPI_R). PCR amplification dengna machine (Biorad) begins by mixing the DNA 1 μ L, 1 μ L 10 pmol forward primer, 10 pmol reverse primer 1 μ L, 5 μ L PCR mix and 2 mL ddH₂O into mikrotube 200 mL. According Zuhriana (2010), amplification stages starting from predenaturasi 940C for two minutes, denaturation 940C for 30 seconds, and then annealed at a temperature of 55-600C for 30 seconds. Extension at a temperature of 720C for 30 seconds and post extension at 720C for 7 minutes. The process will be repeated for 30-35 cycles.

Purification of PCR Products

Purification of the PCR product aimed to purify DNA and eliminate the remnants of PCR mix covering dNTPs, Taq polymerase, Mg ions, as well as ddH₂O and PCR primers located within the tube. The method used in the purification protocol was modified Santella by ethanol precipitation.

DNA sequencing

Sequencing of the PCR product of the gene Osteopontin be two-way, namely by using a primer SPPI_F 10 pmol and 10 pmol SPPI_R to see osteopontin gene sequences were amplified using dye terminator method. PCR product DNA concentration of at least 50 ng / mL to do sequencing. Sequencing the form of a graph representing the content of adenine, thymine, guanine and cytosine contained in the DNA fragment that had been labeled by ddNTPs.

Data analysis

Analysis of the data used is NCBI Blast, Bioedit and MEGA 7.0. Through the NCBI Blast program can know the percentage of homology and molecular variation in isolates a sample of SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) such as insertions, deletions, and substitutions (transition or transversion) by aligning the results of the fourth sample sequence with the NCBI database Genebank: AY878328.1 alignment using algorithm ClustalW multiple allignment. Further analysis of the molecular variation isolates the sample is to use Bioedit program to see what kind of mutation that occurs, the type of amino acid and nucleotide positions that have mutations in the sample isolates. Filogenik analysis using MEGA version 7.0 software with bootstrapped Neighbor-Joining method (NJ) uses 1000 times repetition. The results of the analysis of the MEGA program will be acquired genetic distance matrix equation of bases.

RESULTS AND DISCUSSION

Semen Quality Inspection FH Fresh Dairy Cattle

Fresh semen examination was conducted on the examination of the volume, color, odor, pH and concentration. 14 fresh semen of male dairy cows examined three times. Data quality fresh cement are shown in Table 2.1.

Code	The average of fresh semen volume (ml)	Color and Odor	pH	The mean concentration of fresh cement / ml	Overall quality
2	6.9	Normal	6.8	1.031,4x10 ⁶	Good
7	5.3	Normal	6.8	799.7 x10 ⁶	Good
8	10.1	Normal	6.8	705.7 x10 ⁶	Good
13	6.2	Normal	6.8	1418.7 x10 ⁶	Good
14	11	Normal	6.8	1090 x10 ⁶	Good
17	5.4	Normal	6.8	1075 x10 ⁶	Good
19	3.8	Normal	6.8	429.4 x10 ⁶	Poor
D	5.1	Normal	6.8	755.3 x10 ⁶	Good
H	4.1	Normal	6.8	286.6 x10 ⁶	Poor
I	5.8	Normal	6.8	1345.9 x10 ⁶	Good
J	5.9	Normal	6.8	1173.9 x10 ⁶	Good
L	7.3	Normal	6.8	1290 x10 ⁶	Good
M	6.2	Normal	6.8	1142.7 x10 ⁶	Good
N	4	Normal	6.8	312.4 x10 ⁶	Poor

Isolation of DNA from blood samples FH Cow Males

Isolation of DNA is done using a blood sample by using Genomic DNA mini kit in accordance with the procedure tissue. Results obtained in the form of total DNA extraction which further test the quantity and quality. Test quantity by machine Micro-Nano-200 Nucleic acid spectrophotometer with a wavelength of 260 nm and 280 nm. DNA total yield of isolation is then used for the amplification process osteopontin from bulls with the PCR technique to determine the sequence of the gene osteopontin from some bulls, so as to know their gene polymorphism promoter osteopontin in dairy cows Holstein Friesian (HF) and its relationship to the level of fertility spermatozoa, as indicated by the quality of dairy cows FH spermatozoa from fresh cement.

table 2.2 The concentration and purity of DNA Total Cattle FH Males

sample code	Concentration on ng / mL	Purity
2	308	1.92
7	190	1.91
8	223	1.81
13	254	1.87
14	302	1.89
17	201	1.91

19	210	1.81
D	254	1.87
H	338	1.98
I	176	1.91
J	220	1.81
L	271	1.88
M	289	1.80
N	198	1.77

Based on the quantity of test results known that almost all of the samples have a good degree of purity that is still within the range of 1.8 to 2.0 and all samples had concentrations above 100 ng / mL. If the DNA purity values below 1.8 indicate the DNA extraction yield there are contaminants in the form of protein compounds. Contamination in the form of protein compounds in the DNA can be caused by the addition of a protease enzyme on DNA isolation protocol (Kartini 2012). According Fatchiyah (2011), DNA purity value above 2.0 indicates there are contaminants in the form of RNA. This may be due to the addition of the study was not done ribonuclease. According Fatchiyah (2011), nano-drop test result is a value purity DNA at A260 / A280 and the concentration of DNA.

Osteopontin Gene amplification by PCR Method

Osteopontin gene amplification is done to increase the osteopontin gene fragment prior to sequencing so that it can be used to determine the osteopontin gene sequences FH male cattle. Primers used to amplify the gene osteopontin taken from Genebank with number sequences AY878328.1 and designed using primer3plus program, so we get a forward and reverse primer pair shown in Table 5.2. PCR method used in this study includes the step pradenaturasi, denaturation, annealing, extension and post-extension with suu and time listed in Table 5.3.

Table 2.3 Primary Nucleotide Sequence Cow Osteopontin gene FH Males

Primary	Oligo Nucleotide Sequence
<i>forward</i> (SPP1_F)	GCAAATCAGAAGTGTGATAGA 5'-3'
<i>Reverse</i> (SPP1_R)	CCAAGCCAAACGTATGAGTT 5'-3'

Table 2.4 PCR program for cattle Osteopontin Gene Amplification FH Males (35x cycle)

Condition	Time	Temperature
Pradenaturasi	4 minutes	94 °C
denaturation	30 seconds	94 oC
<i>annealing</i>	30 seconds	°C
extensions	30 seconds	°C
<i>Post extension</i>	7 minutes	°C

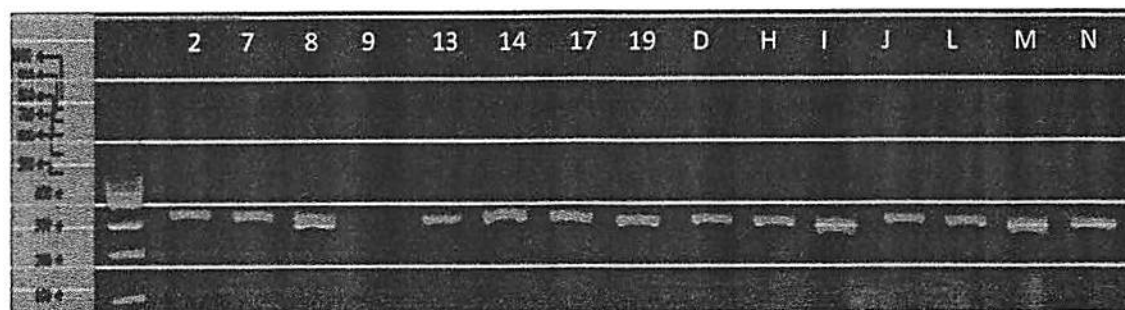


Figure 1. Photographs 2% agarose gels of PCR amplification products with a target of 306bp band was detected in all samples (n = 14) (Gel Doc, Biorad).

The results of the purified PCR products subsequently aim to purify DNA and eliminate the remnants of PCR mix, and ddH₂O primer inside the PCR tube. The method used in purification is ethanol precipitation with Santella protocol modification. The results of the purification product then sequenced the DNA of the gene osteopontin be two-way, namely by using a primer SPP1_F and SPP1_R to see osteopontin gene sequences were amplified.

Osteopontin Gene Sequence Analysis Results

Sequencing the form of graphs that show the content of adenine, thymine, guanine and cytosine contained in the DNA fragment and format data in the form fasta. The fourth sample is inserted into the NCBI BLAST program for alignment of the sequencing results with NCBI Genebank AY878328.1. The alignment results of that magnitude ident and alignment on the sample base with NCBI database **Table 2.4.**

Table 2.5 Results of alignment with NCBI database

NO	Sample Code	Identity
1	Sampel H	98%
2	Sampel J	99%
3	Sampel L	99%
4	Sampel I	99%
5	Sampel N	98%
6	Sampel D	97%
7	Sampel 17	99%
8	Sampel 7	99%
9	Sampel 18	99%
10	Sampel 2	99%
11	Sampel 13	99%
12	Sampel 8	99%
13	Sampel 19	99%
14	Sampel 14	99%
15	Sampel M	99%

Results of identity of all samples above 95%, it shows that all the samples had good similarity with the NCBI AY878328.1.Osteopontin gene sequences of all male cattle FH aligned with the reference gene osteopontin AY878328.1 NCBI database. Sample sequences aligned sequence starting from the base to 9900-10092 **Figure 2.1.**


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10060      10070      10080      10090      10100
AY878328.1 ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AAA-CAGTGT
D_SP1R      ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AAAACAGGTT
H_SP1R      ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTA- GAACAAGGAA AA--CAGGT-
I_SP1R      ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AA--CAGTT-
J_SP1R      ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AA--CAGGT-
L_SP1R      ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AAA-CAGTTC
M_SP1F      ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AAA-CAGTGT
N_SP1R      ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTA- GAACAAGGAA AA--CAGTT-
2_SP1R      ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AA--CAGGT-
7_SP1R      -----
8_SP1R      ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AA--CAGGT-
13_SP1R     ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AA--CAGGT-
14_SP1R     ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AA--CAGTT-
17_SP1R     ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AA--CAGTT-
18_SP1R     ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTAT GAACAAGGAA AAA-CAGGT-
19_SP1R     ATTGAAATTT GGTAAATTAG TGTTTATTA- GAACAAGGAA AA--CAGGT-

```

Figure 2.1 The result of the alignment of the nucleotide bases using Bioedit program

The results of sequencing all samples dihomologikan alignment with NCBI Genebank database (AY878328.1) obtained their deletion in the code sample 7 from the beginning of the sequence to the end, Sample code H, N, 19 (T - -) bases of DNA polymorphisms to-10080. characterized by differences in the nucleotide sequence between individuals. Transition (T - C) in the sample code D, H,

I, L, M, N, 2, 17, 18 bases to-10044 and transition (G - A) in the sample code H, I, J, N, 2, 8, 13, 14, 17. the susnan deletions affect amino acids that form, because there is a missing nucleotide bases. According Arruji (2014), transition mutation means a mutation that occurs when pyrimidine bases in DNA nucleotide chain is replaced by another pyrimidine base or purine base is replaced by another purine base.

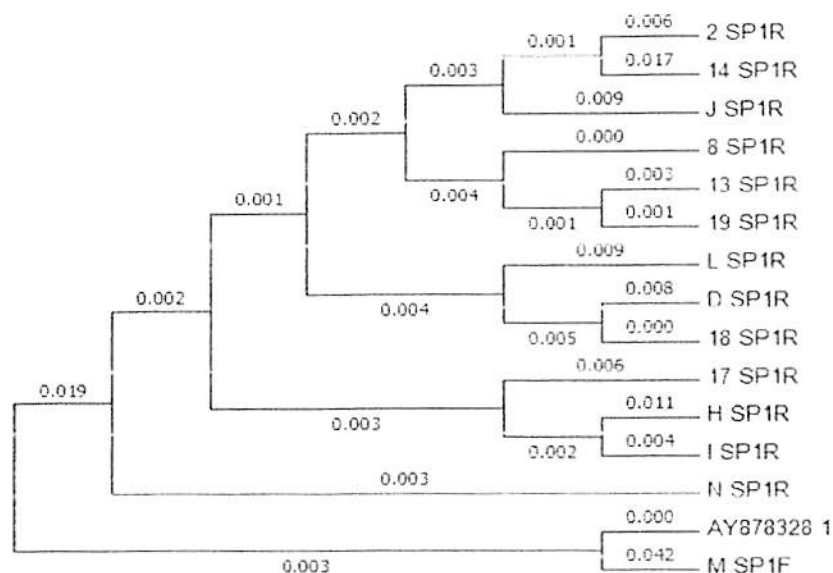


Figure 2.2 Cattle phylogenetic tree male FH Neighbor-Joining method with Bootstrap replication 1000x.

Based on the phylogenetic tree in Figure 2.2, there are known two major clade. The first clade consisting of the sample with the code 2, 14, J, 8, 13, 19, L, D, 18, 17, H, I, and N. As a second clade consisting of

NCBI AY878328.1 and sample M. All sample shows the results of genetic distance with NCBI Genebank AY878328.1 above 0,020 or above 2%.

COMPARISON WITH DATA EXAMINATION OF CEMENT

Code	The mean concentration of fresh cement / ml	Overall quality	Results Gene Sequences
2	1.031,4x106	good	Transition
7	799.7 x106	good	Can not be read
8	705.7 x106	good	Transition
13	1418.7 x106	good	Transition
14	1090 x106	good	Transition
17	1075 x106	good	Transition
19	429.4 x106	poor	deletions
D	755.3 x106	good	Transition
H	286.6 x106	poor	Deletions, Transitions
I	1345.9 x106	good	Transition
J	1173.9 x106	good	Transition
L	1290 x106	good	Transition

M	1142.7 x106	good	Transition
N	312.4 x106	poor	Deletions, Transitions

The comparison between gene sequences with the results of the concentration data of cement each sample obtained in samples that experienced deletions in the sequence of its gene have a concentration of low cement compared to the group, for example, in a sample of H and N concentrations were low compared to cows FH other males who come from BBIB Singosari. While in the 19 samples had a

low concentration also compared with samples 8. The results indicated resources site that this mutation could be related with the trait susceptibility to sperm concentration. It is possible that other genes linked with this molecular genetic markers affected the sperm quality. But the weakness of this study is at least phenotype samples with a low concentration of spermatozoa. Further studies are needed to address Reviews These possibilities.


References

- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay, 1992. *Applied Animal Reproduction*. 3rd Edition. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Blakely, J. dan D.H. Bade. 1994. Ilmu Peternakan. Cetakan keempat. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. Hal.156-164.
- Caballero, J.; G. Frenette and R. Sullivan. 2010. Post Testicular Sperm Maturation changes an Protosome. *Vet.Medicine International* 1 - 25 Cambridge.
- Cancel. A.M; David A. Chapman and G.J. Killian. 1997. Osteopontin is the Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. Department of Dairy and Animal Sci and The Department of Biology. University park. Pennsylvania. 1293-1301.
- Copeland, L. 1994. Pedigree Analysis as a Basis of Selecting Bull Calves. *Journal Of Dairy Science*. 17 (2) 93-102.
- Erikson D.W., A.L. Way, R.P. Bertolla, D.A. Chapman and G.J. Killian. 2007. Influence of osteopontin, casein and oviductal fluid on bovine sperm capacitation. *Anim.Reprod* 4:103-112
- Gordon, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. The UK. University Press.
- Hafez, E.S.E., 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Hernawati T, S. Mulyati, Y. Oktanella. 2016. Specific-Protein Sperm Membrane Supplementation on

Current Status

16/16/2018

Article Status



A and V Publications

Report Generated on: 10/16/2018 9:17:37 AM

BASIC INFORMATION

Paper ID: IS10611747499522 Submission Date: October 06, 2018

Paper Title: **CORRELATION BETWEEN OSTEOPONTIN PROMOTER GENE AND FRESH SEMEN QUALITY IN FRIESIAN HOLSTEINDAIRY COWS**

Author(s) Name: Teik Hemanata¹, Yudi Oktavia², Sa Mulyati¹, Ramayanti¹, In Wahyu Suprayogi

Author(s) Email: hemanata¹, teik@yahoo.com, yudioktavia2@gmail.com

Author(s) Address: (1) Department of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Anteraga, Surabaya (2) Department of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Brawijaya University, Malang, East Java, Indonesia

Journal: Research Journal of Pharmacy and Technology

Submitted By: vidi Email ID: vidihendrawan20@gmail.com

REVIEWER INFORMATION

	First Reviewer	Second Reviewer
Name	Widyas, DVM, MSc, PhD	Vidi Fidi Hendrawan, DVM, M Vet
Email ID	widyas@ghumanis.com	vidi_hendrawan20@yahoo.com
Mobile No	031330649116	08643127302
Address	Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Anteraga, Surabaya	Department of Veterinary Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Brawijaya University, Malang

PAYMENT DETAILS

Order No: Order Date:

Amount INR: 000 OR Amount USD: 0.00

PAPER PUBLICATION / PUBLISHING STATUS

- » 06/Oct/2018, 02:17:47 PM ... Article submitted by the author
- » 15/Oct/2018, 06:09:18 PM ... Article sent back to author for minor corrections
- » 15/Oct/2018, 06:09:18 PM ... New comments from editorial board
- » 16/Oct/2018, 10:17:23 AM ... Article resubmitted by author after correction

://anvpublication.org/ArticleStatus.aspx?PID=1810611747499522

1/1

Lampiran 5. Darft Jurnal

Hubungan Polimorfisme Gen Promotor Osteopontin dengan Kualitas Semen Beku Post-thawing Sapi Perah Friesian Holstein

Tatik Hernawati^{1*}, Sri Mulyati^{2*}, Yudit Oktanella^{3**}, Rima Damayanti^{4*}, Tri Wahyu Suprayogi^{5*}

*Faculty of Veterinary Medicine,
Airlangga University,
Kampus C Unair Mulyorejo Surabaya

** Faculty of Veterinary Medicine,
Brawijaya University
M.T. Haryono No. 169, Malang

*Correspondence e-mail: yudito@ub.ac.id
[/yuditoktanella@gmail.com](mailto:yuditoktanella@gmail.com)

ABSTRACT

This study aims to determine the existence of osteopontin promoter gene polymorphism in Holstein Friesian dairy cattle (FH) and its relationship with the quality of FH beef frozen semen. The basis for determining osteopontin as the main bio-marker in determining the fertility of male Holstein dairy cows is based on several previous studies which showed that

INTRODUCTION

Examination of semen in dairy bull of Friesian Holstein as a benchmark for fertility has only been carried out through macroscopic and microscopic examination. In addition to these examinations, it can also be seen from pedigree, namely selection based on the reputation shown by the ancestors of the cow concerned, but this test is less accurate, because a bloodline or descendant from a good individual does not necessarily mean that

osteopontin levels in seminal Holstein dairy plasma with good fertility had higher osteopontin concentrations compared to dairy cows with low fertility. A total of 10 Holstein Friesian dairy cow blood samples were taken and then DNA extracted and amplified using SPP1F and SPP1R primers. The target band 306bp is detected in all samples which are then sequenced to analyze the sequence of nucleotide bases. The results showed that all samples with low quality frozen semen were deleted in the 10080th base and transition (GA) and (CT) in bases to 10090 and 10100. The results indicated that this mutation site could be related to the trait susceptibility to frozen semen. quality. Comprehensive studies are needed to address other parameters related to any abnormality in sperm during cryopreservation. The results indicated that this mutation site could be related with the trait susceptibility to frozen semen quality. Comprehensive studies are needed to address other parameters related to any abnormality in sperm during cryopreservation.

Keywords : polimorfisme gene, osteopontin, frozen semen, dairy bull Friesian Holstein

the good characteristics will inherited through selection and marriage (Blakely and Bade, 1994; Copeland, 1994). Another male fertility test is based on the progeny test, which is a test to see the nature of heritability but this test takes a long time of approximately 4-6 years so it is not efficient (Tomaszewska et al., 1991; Akiko, 1998).

The basis for determining osteopontin as the main bio-marker in determining the fertility of male Holstein dairy cows is based on several previous

studies (Killian et al., 1993; Cancel et al., 1997; Moura et al., 2006) which show that seminal plasma osteopontin Holstein dairy cows with good fertility have 2.5 times osteopontin concentrations when compared to dairy cows with low fertility. Erikson et al., (2007) said that male dairy cows that were examined for fresh semen and containing osteopontin had great potential in the success of fertilization in vitro and in vivo compared to those without osteopontin. This is reinforced by previous studies that prove the link between osteopontin and the quality of fresh semen of FH dairy cows in Indonesia, and the addition of osteopontin to frozen semen diluter increases the quality of post-thawing FH dairy cows through various observations of cellular and molecular parameters (Samik et al., 2014 ; Hernawati, 2016; Hernawati et al., 2016) and increasing the success of fertilization in vitro and in vivo (Hernawati et al., 2016).

The polymorphism of the osteopontin promoter gene is related to male fertility in Holstein dairy cows. Some evidence suggests that there is a relationship between osteopontin promoter gene polymorphism, one of which is the osteopontin promoter gene polymorphism with motility and viability of fresh semen semen spermatozoa (Schnabel et al., 2005; Gafer et al., 2015; Rorie et al., 2016).

Determination of osteopontin promoter gene regions based on previous research conducted by Rori et al., (2016) identified seven SNP regions acting as osteopontin promoters, including: 3379 bp, 3490 bp, 3492 bp, 5075 bp, 5205 bp, 5209 bp, and 5263 bp from the osteopontin promoter gene. Then, substitution of thymine into guanine at 3379 bp correlated with an increase in the percentage of spermatozoa motility, but for the parameters of viability it was not identified. Morales et al. (2010) in their study reported that regular male testing in the IB program was very important as a fertility indicator.

The development of dairy cattle populations in the future should be selected based on breeding value, the use of genetic identifiers, especially those that control reproduction and application of BSE so that the quality of FH dairy cow males at the Balai Balai is because the male will spread superior trait to the population. The development of male testing through identification of genetic markers for semen quality has been carried out in several developed countries (Lechniak et al. 1998; Dai et al. 2009; Gorbani et al. 2009b; Liu et al., 2011; Afshar et al. 2011; Chenoweth 2011), this is expected to support the acceleration of the quality of the superior FH dairy cattle population. Genetic selection systems require identification of genetic markers as

candidate genes that control reproductive properties, especially in male cattle.

MATERIALS AND METHODS

Tools and materials

The tools used in the study include a glove, mask, ice box, paper labels, microcentrifuge tube (1.5 mL), micro PCR tube (200 µL), micropipette, white tip, yellow tip, vortex engine, centrifugator, incubator CO₂, freezer, thermocycler, EDTA, Horizontal SDS-PAGE (Biorad), Gel Documentation (Biorad), thermocycler (Biorad), Nano-200 Micro-spectrophotometer nucleic acid.

Materials used in research FH male cattle blood samples, Genomic DNA mini kit tissue, ddH₂O, forward primer (SPPI_F) 5'-GCAAATCAGAAGTGTGATAGA-3' and reverse primer (SPPI_R) 5'-CCAAGCCAAACGTATGAGTT-3', the PCR mix, DNA ladder 100 bp and 1 kb, TBE, agarose 1% and 2%, loading dye, alcohol 70%, aluminum foil, red gel.

Cow Blood Sample Selection FH Males

Samples taken in the form of blood samples of 10 Holstein Friesian dairy cows 3-5 years old adult male obtained from BBIB Singosari, Malang, East Java, Indonesia, and local cattle ranchers.

Blood samples

Location blood sampling performed on coccygea vein. The volume of blood samples are taken as 3cc of each individual bull. The blood sample is inserted into EDTA vacutainer tube and labeled according to the name of the individual samples of cattle. Samples were then stored at a temperature of 40C. Storage of

whole blood samples at a temperature of 40C have been selected for the distance between sampling and DNA isolation process is not too long.

After blood collection examination fresh semen quality with cement collected in advance. Fresh semen collection is done by using an artificial vagina. Artificial vagina is prepared with an internal temperature of 45°C and already smeared with vaseline. The males are lured by using dummy / female pemancik then proceeds semen collection examined macroscopically immediately include: volume, color, odor, pH and viscosity and microscopic examination.

isolation of DNA

Isolation of DNA from blood samples of male cattle FH using insulation kit from Geneaid namely Genomic DNA mini kit tissue and blood. Following the protocol for the isolation of specific DNA blood. The main principle in the isolation of DNA, there are three namely the destruction (lysis), DNA extraction or separation of solid materials such as cellulose and proteins, and DNA purification (Nita, 2013).

Quantity and Quality Test DNA

DNA quantity insulation test results done using machine Micro-Nano-200 spectrophotometer nucleic acids. Sielis TE buffer used is obtained from a kit geneaid, TE buffer is dripped directly onto the pedestal submicroliter cell as 1µL, then absorbance is measured by pressing a button blank blank after the lid (cover) is closed. The wavelengths used are 260 nm and 280 nm. An initial stages, a total of 1 mL sample was dropped on pedestal submicroliter cell that has been cleaned using a tissue. Lid closed above the sample

was dropped and pressed the button sample and then wait until the results come out on the screen. To sample the stages are the same as above, done up to the last sample. Data out in the form of numbers or graphs (Clark et al, 2001).

Primer design

Primers used for DNA amplification by polymerase chain reaction technique (PCR) was designed using NCBI Genebank: AY878328.1. Forward primer and reverse primer obtained through primer3plus using data AY878328.1 with 12,300bp linear DNA. A pair of forward primer (SPP1_F) 5'-GCAAATCAGAAGTGTGATAGA-3' (Length: 21 bp, Tm: 53.7, GC: 38.1% and the reverse primer (SPP1_R) 5'-CCAAGCCAAACGTATGAGTT-3' (Length: 20 bp, tm: 56.3, GC: 45%).

The process of Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA samples of steers was amplified using the PCR method. A pair of primers used are forward primer (SPP1_F) and reverse (SPP1_R). PCR amplification dengna machine (Biorad) begins by mixing the DNA 1 μ L, 1 μ L 10 pmol forward primer, 10 pmol reverse primer 1 μ L, 5 μ L PCR mix and 2 mL ddH₂O into mikrotube 200 mL. According Zuhriana (2010), amplification stages starting from predenaturasi 940C for two minutes, denaturation 940C for 30 seconds, and then annealed at a temperature of 55-600C for 30 seconds. Extension at a temperature of 720C for 30 seconds and post extension at 720C for 7 minutes. The process will be repeated for 30-35 cycles.

Purification of PCR Products

Purification of the PCR product aimed to purify DNA and eliminate the remnants of PCR mix covering dNTPs, Taq polymerase, Mg ions, as well as ddH₂O and PCR primers located within the tube. The method used in the purification protocol was modified Santella by ethanol precipitation.

DNA sequencing

Sequencing of the PCR product of the gene Osteopontin be two-way, namely by using a primer SPP1_F 10 pmol and 10 pmol SPP1_R to see osteopontin gene sequences were amplified using dye terminator method. PCR product DNA concentration of at least 50 ng / mL to do sequencing. Sequencing the form of a graph representing the content of adenine, thymine, guanine and cytosine contained in the DNA fragment that had been labeled by ddNTPs.

Data analysis

Analysis of the data used is NCBI Blast, Bioedit and MEGA 5.0. Through the NCBI Blast program can know the percentage of homology and molecular variation in isolates a sample of SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) such as insertions, deletions, and substitutions (transition or transversion) by aligning the results of the fourth sample sequence with the NCBI database Genebank: AY878328.1 alignment using algorithm ClustalW multiple alignment. Further analysis of the molecular variation isolates the sample is to use Bioedit program to see what kind of mutation that occurs, the type of amino acid and nucleotide positions that have mutations in the sample isolates. Filogenik analysis using MEGA version 6.0 software with bootstrapped

Neighbor-Joining method (NJ) uses 1000 times repetition. The results of the analysis of the MEGA program will be acquired genetic distance matrix equation of bases.

RESULT AND DISCUSSION

Post-thawing Frozen Cement Quality of FH Dairy Cow

Fresh semen checks include examination of volume, color, odor, pH and concentration. Fresh semen of 14 male dairy cows was examined three times.

Fresh semen quality data are shown in Table 2.1.

Code	Average post-thawing motility %	Average post-thawing Viability %	General Quality
A	50	65	Poor
B	55	80	Moderate
C	60	75	Moderate
D	60	80	Moderate
E	55	80	Moderate
F	60	80	Moderate
G	50	60	Poor
H	65	85	Moderate
I	50	80	Poor
J	65	85	Moderate

DNA Isolation

DNA isolation was carried out using blood samples using Genomic DNA mini kit tissue according to the procedure. The results obtained in the form of total DNA extraction which is then tested for quantity and quality. Quantity test using the Nano-200 nucleic Micro-acid spectrophotometer with a wavelength of 260 nm and 280 nm.

The total DNA from the isolation was then used to amplify the osteopontin gene from the male cattle using the PCR technique to determine the osteopontin gene sequences of several bulls, so as to determine the osteopontin promoter gene polymorphism in Holstein Friesian dairy cattle (FH) and its relationship with fertility rates spermatozoa, which is indicated by the quality of fresh semen semen spermatozoa from FH.

Table 2.2 Total DNA concentration and purity of FH Bull

Code	Concentration ng/ μ L	purity
A	209	1.90
B	198	1.90
C	223	1.80
D	254	1.85
E	310	1.80
F	201	1.92
G	234	1.90
H	254	1.81
I	338	1.98
J	179	1.78

Based on the results of the quantity test, it is known that almost all samples have good purity levels which are still in the range of 1.8-2.0 and all samples have concentrations above 100 ng / μ L. If the purity of DNA below 1.8 indicates that the DNA from the extraction results, there are contaminants in the form of protein compounds. Contamination in the form of protein compounds in DNA can be caused

by the absence of protease enzymes in the DNA isolation protocol (Kartini 2012). According to Fatchiyah (2011), the purity value of DNA above 2.0 indicates that there are still contaminants in the form of RNA. This might be due to the lack of ribonuclease addition in this study. According to Fatchiyah (2011), the nano drop test results are in the form of DNA purity values on $\text{A}260 / \text{A}280$ and DNA concentration values. Good quality DNA based on the nano drop test has a purity of 1.8-2.0 and concentrations above 100 ng / μL .

Osteopontin Gene amplification by PCR Method

Osteopontin gene amplification is done to increase the osteopontin gene fragment prior to sequencing so that it can be used to determine the osteopontin gene sequences FH male cattle. Primers used to amplify the gene osteopontin taken from Genebank with number sequences AY878328.1 and designed using primer3plus program, so we get a forward and reverse primer pair shown in Table 5.2. PCR method used in this study includes the step pradenaturasi, denaturation, annealing, extension and post-extension with suu and time listed in Table 5.3.

Table 2.3 Primary Nucleotide Sequence Cow Osteopontin gene FH Males

Primary	Oligo Nucleotide Sequence
<i>forward</i> (SPPI_F)	GCAAATCAGAAAGTGTGATA GA 5'-3'
<i>Reverse</i> (SPPI_R)	CCAAGCCAAACGTATGAGT T 5'-3'

Table 2.4 PCR program for cattle Osteopontin Gene Amplification FH Males (35x cycle)

Condition	Time	Temperature
Pradenaturasi	4 minutes	94 °C
denaturation	30 seconds	94 oC
<i>annealing</i>	30 seconds	°C
extensions	30 seconds	°C
Post extension	7 minutes	°C

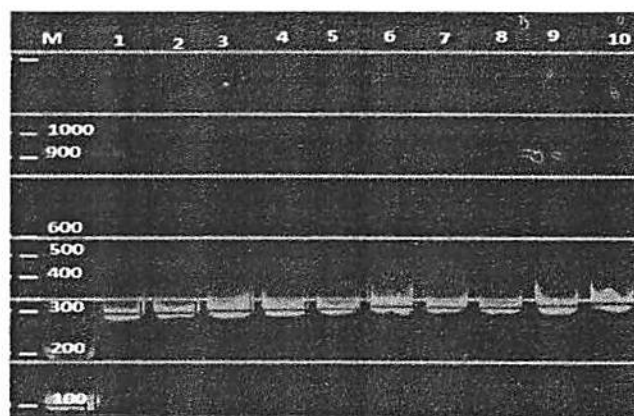


Figure 1. Photographs 2% agarose gels of PCR amplification products with a target of 306bp band was detected in all samples (n = 14) (Gel Doc, Biorad).

The results of the purified PCR products subsequently aim to purify DNA and eliminate the remnants of PCR mix, and ddH₂O primer inside the PCR tube. The method used in purification is ethanol precipitation with Santella protocol

modification. The results of the purification product then sequenced the DNA of the gene osteopontin be two-way, namely by using a primer SPPI_F and SPPI_R to see osteopontin gene sequences were amplified.

Hasil Analisa Sekuen Gen Osteopontin

Hasil sekuensing berupa grafik yang menunjukkan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA dan format data berupa fasta. Keempat sampel dimasukkan ke dalam program NCBI BLAST untuk penjejarian hasil sekuensing dengan genebank NCBI AY878328.1. Hasil penjejarian tersebut untuk melihat besarnya ident dan kesejajaran pada basa sampel dengan database NCBI Tabel 2.4.

Tabel 2.5 Hasil Penjejarian dengan database NCBI

Hasil identity semua sampel diatas 95%, hal ini menunjukkan bahwa semua sampel memiliki kesamaan yang baik dengan NCBI AY878328.1. Sekuen gen osteopontin dari semua sapi FH jantan disejajarkan dengan referensi yaitu gen osteopontin database NCBI AY878328.1. Urutan sekuen sampel yang disejajarkan dimulai dari basa ke 9900-10092 Gambar 2.1.

ME: Doga, res: Test
File Dupli, Copy, Help

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1.1278319FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2.1278419FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3.1278519FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4.1278619FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5.1278719FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6.1278819FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7.1278919FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8.1279019FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9.1279119FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10.1279219FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
11.1279319FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12.1279419FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
13.1279519FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
14.1279619FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15.1279719FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
16.1279819FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
17.1279919FF	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

The comparison between gene sequences with the results of the concentration data of cement each sample obtained in samples that experienced deletions in the sequence of its gene have a concentration of low post thawing quality compared to the group. While in the 4 samples had a low concentration also compared with samples 6. The results indicated resources site that this mutation could be related with the trait susceptibility to sperm concentration. It is possible that other genes linked with this molecular genetic markers affected the sperm quality. But the weakness of this study is at least phenotype samples with a low concentration of spermatozoa. Further studies are needed to address Reviews These possibilities.

References

- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay, 1992. *Applied Animal Reproduction*. 3th. Edition Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Biakely, J. dan D.H. Bade. 1994. Ilmu Peternakan. Cetakan keempat. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. Hal. 156-164.
- Caballero, J.; G. Frenette and R. Sullivan. 2010. Post Testicular Sperm Maturation changes in Protosome. *Vet. Medicine International* 1 – 25 Cambridge.
- Cancel, A.M.; David A. Chapman and G.J. Killian. 1997. Osteopontin is the Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. Department of Dairy and Animal Sci and The Department of Biology. University park. Pennsylvania. 1293-1301.
- Copeland, L. 1994. Pedigree Analysis as a Basis of Selecting Bull Calves. *Journal Of Dairy Science*. 17 (2) 93-102.
- Erikson D.W., A.L. Way, R.P. Bertolla, D.A. Chapman and G.J. Killian. 2007. Influence of osteopontin, casein and oviductal fluid on bovine sperm capacitation. *Anim. Reprod* 4:103-112
- Gordon, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. The UK. University Press.
- Hafez, E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th. Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Hernawati T, S. Mulyati, Y. Oktanella. 2016. Specific-Protein Sperm Membrane Supplementation on Freezing Medium Maintain Post-Thawed Bull Sperm Quality. *Int Journal of ChemTech Research* Vol 9/No.12/2016



