

Jurnal Biotek

p-ISSN: 2581-1827 (print), e-ISSN: 2354-9106 (online)
Website: <http://journal.uin-alauddin.ac.id/index.php/biotek/index>

Desain Primer *In Silico* untuk Analisis Ekspresi Gen Osteopontin (OPN) Sebagai Penanda Kesuburan pada Kambing Jantan (*Capra hircus*)

Hendro Sukoco^{1*}, Suriansyah¹, Salmin², Annisa Putri Cahyani³, Suci Andanawari³
Muzizat Akbarrizki³, Ferbian Milas Siswanto⁴

¹Universitas Sulawesi Barat, Indonesia

²Universitas Tadulako, Indonesia

³Politeknik Pembangunan Pertanian Yogyakarta Magelang, Indonesia

⁴Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Indonesia

*Correspondence email: hendrosukoco@unsulbar.ac.id

(Submitted: 10-11-2024, Revised: 18-11-2024, Accepted: 30-11-2024)

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendesain sepasang primer agar dapat digunakan dalam analisis ekspresi gen OPN sebagai penanda kesuburan pada kambing jantan (*Capra hircus*). Metode penelitian yang digunakan adalah kajian molekuler secara *in silico* berbasis bioinformatika. Data nukleotida diambil dari situs NCBI dengan kode NM_001285667.1. Data yang diperoleh kemudian diolah dengan menggunakan *Primer-Blast* pada situs NCBI untuk memperoleh kandidat primer. Kandidat primer Selanjutnya dianalisis struktur sekunder dan dimer primer menggunakan Oligo Evaluator Sigma-Aldrich. Primer yang dirancang kemudian dianalisis spesifisitas primer dan tingkat kesamaan sekuens dengan database nukleotida yang ada di NCBI menggunakan *Primer-Blast* dan *Nucleotide-Blast* pada situs NCBI. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diperoleh satu pasangan primer yang memiliki kriteria ideal primer yaitu primer *forward* 5'- ACCCTCCCGAGTAAGTCCAA-3' dan *reverse* 5'- AGTCCTCCTCTGTGGCATCT-3' yang mampu mengamplifikasi daerah gen OPN dengan panjang produk 325 bp. Hasil uji kinerja secara *in silico* juga menunjukkan bahwa primer tersebut dapat digunakan untuk deteksi gen OPN *Capra hircus* secara spesifik. Desain primer untuk deteksi ekspresi OPN diharapkan dapat membantu dalam memprediksi tingkat kesuburan pada ternak kambing jantan (*Capra hircus*), sehingga mampu meningkatkan efisiensi reproduksi ternak tersebut.

Kata Kunci: Kambing Jantan, Osteopontin, Primer, *In Silico*

ABSTRACT

This study aimed to design a pair of primers for analyzing OPN gene expression as a fertility marker in male goats (*Capra hircus*). The research method employed was an *in silico* molecular study based on bioinformatics. Nucleotide data were retrieved from the NCBI database using the code NM_001285667.1. The data obtained were processed using *Primer-Blast* on the NCBI site to identify candidate primers. These candidate primers were subsequently analyzed for secondary structure and primer dimer formation using the Sigma-Aldrich Oligo Evaluator. The designed primers were further analyzed for their specifications and sequence similarity with the nucleotide database available on the NCBI site using *Primer-Blast* and *Nucleotide-Blast*. The results revealed one pair of primers with ideal criteria: the forward primer 5'-ACCCTCCCGAGTAAGTCCAA-3' and the reverse primer 5'-AGTCCTCCTCTGTGGCATCT-3', capable of amplifying the OPN gene region with a product length of 325 bp. *In silico* performance tests also demonstrated that the primers could specifically detect the OPN gene in *Capra hircus*. The primer design for detecting OPN expression is expected to aid in predicting fertility levels in male goats (*Capra hircus*), thereby enhancing the reproductive efficiency of these livestock.

Keywords: Male Goat, Osteopontin, Primer, *In Silico*



Copyright©2024

How to cite: Sukoco, H., Suriansyah, S., Salmin, S., Cahyani, A. P., Andanawari, S., Akbarrizki, M., & Siswanto, F. M. (2024). *Desain Primer In Silico Untuk Analisis Ekspresi Gen Osteopontin (OPN) Sebagai Penanda Kesuburan Pada Kambing Jantan (Capra hircus)*. *Jurnal Biotek*, 12(2), 129–143. <https://doi.org/10.24252/jb.v12i2.49469>

PENDAHULUAN

Dalam beberapa dekade terakhir ini, penelitian mengenai genomik dan transkriptomik pada plasma semen dan spermatozoa kambing telah meningkatkan pengetahuan tentang mekanisme molekuler yang terlibat dalam kesuburan kambing pejantan serta preservasi semen (Xu *et al.*, 2024; Fajar *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2022; Nisa *et al.*, 2018). Genom pada ternak merupakan informasi keseluruhan DNA yang terletak di dalam tubuh ternak. Pesatnya perkembangan teknologi saat ini telah mendorong riset terkait pemanfaatan teknologi molekuler untuk pemuliaan, perbaikan genetika dan pembibitan ternak telah masuk ke ranah genom (Sudrajat *et al.*, 2021). Diharapkan, temuan-temuan tersebut dapat membantu dalam meningkatkan performa reproduksi pada kambing jantan. Performa reproduksi merupakan salah satu faktor terpenting dalam efisiensi produksi ternak kambing (Rahayu, 2014). Beberapa gen telah ditemukan berperan dalam performa reproduksi pada kambing jantan salah satunya yang penting adalah gen osteopontin (OPN).

Gen OPN merupakan sekuens DNA yang berfungsi membawa informasi untuk pembentukan protein OPN. Protein ini merupakan protein multi fungsional yang terlibat dalam perbaikan tulang mekanisme pertahanan homeostasis, dan enkapsulasi tumor. Selain itu, protein OPN juga berhubungan dan mempengaruhi kesuburan pada ternak jantan (Samik *et al.*, 2014). OPN sangat dibutuhkan dalam reproduksi mamalia jantan (Zhang *et al.*, 2016). Protein ini disekresikan dari ampula dan vesikula seminalis yang memiliki korelasi positif terhadap kesuburan (Biswal *et al.*, 2022). Keberadaan OPN dalam plasma mani berkaitan erat dengan kesuburan hewan jantan (Hernawati, 2015). OPN ditemukan pada permukaan berbagai jaringan reproduksi, seperti sel epitel prostat, vesikula seminalis, ampula, sel Sertoli, dan epididimis, yang berfungsi untuk pengaturan spermatogenesis (Tekin *et al.*, 2023). OPN juga berperan sebagai faktor dekapasitas yang mencegah spermatozoa prematur (Yoelinda *et al.*, 2023). Penelitian Zhang *et al.* (2016) membuktikan bahwa ekspresi OPN berkaitan erat dengan spermatogenesis dan fungsi sperma pada domba jantan Hu. Penelitian Zhao *et al.* (2014) membuktikan bahwa polimorfisme gen OPN memiliki hubungan dengan tingkat kesuburan pada kambing. OPN mampu

memprediksi kesuburan pejantan dengan akurasi sampai 81,3%, sensitivitas 75%, dan spesifitas 75%. (Rosyada *et al.*, 2023).

OPN memiliki banyak aplikasi bioteknologi yang potensial, seperti salah satunya adalah sebagai biomarker untuk mendeteksi kesuburan pada ternak jantan. Hal ini dikarenakan, OPN merupakan salah satu penanda yang menunjukkan korelasi konsisten dengan kesuburan pada hewan pejantan (Yoelinda *et al.*, 2023). Oleh karena itu, analisis ekspresi gen OPN diharapkan dapat membantu memprediksi tingkat kesuburan pada ternak kambing jantan (*Capra hircus*). Metode yang sering digunakan untuk analisis ekspresi gen adalah Real time PCR atau *quantitative real time* PCR (qPCR).

Salah satu kunci keberhasilan dalam penggunaan alat qPCR adalah pemilihan primer yang akan digunakan. Saat ini, kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi sudah berkembang pesat, sehingga para ilmuwan dapat mendesain primer agar memperoleh primer dengan kriteria baik dan spesifik secara *in silico*. *In silico* merupakan studi dengan bantuan komputer dan *software* (Saputra dan Wahyudi, 2023). Adapun gen OPN yang akan diamplifikasi merupakan suatu domain dari total sekuen gen OPN yang sudah ada di *GenBank*. Hingga saat ini, primer untuk deteksi ekspresi gen OPN pada kambing jantan sangat jarang, oleh karena ini penelitian ini bertujuan untuk mendesain sepasang primer agar dapat digunakan dalam analisis ekspresi gen OPN sebagai penanda kesuburan pada kambing jantan (*Capra hircus*).

METODE PENELITIAN

Gen OPN kambing (*Capra hircus*)

Sekuens gen yang digunakan adalah sekuens gen messenger RNA (mRNA) lengkap OPN *Capra hircus* dengan kode referensi sekuens : NM_001285667.1 yang di unduh dari GenBank National Center of Biotechnology Information (NCBI) dengan alamat situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Sekuens yang diperoleh kemudian diubah menjadi format FASTA.

Desain Primer

Sekuens gen OPN yang sudah diperoleh dan diubah formatnya menjadi FASTA, kemudian diolah dengan menggunakan *Primer-Blast* pada situs NCBI untuk memperoleh kandidat primer. Setelah memperoleh kandidat primer, selanjutnya akan dilakukan seleksi untuk memperoleh pimer yang spesifik dan memiliki kriteria

baik. Primer yang didesain harus memiliki kriteria seperti panjang nukleotida berkisar antara 18–30 bp (*base pair*), komposisi antara basa G dan C yaitu 40–60%, T_m pada primer forward dan reverse memiliki selisih yang tidak lebih dari 5°C, dan tidak memiliki struktur sekunder (Purwakasih dan Achyar, 2021).

Analisis Struktur Sekunder Pada Amplikon dan Struktur Dimer Primer

Struktur sekunder dari amplikon dan dimer primer juga dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak Oligo Evaluator Sigma–Aldrich dengan alamat situs <http://www.oligoevaluator.com/>. Adanya struktur sekunder pada daerah ini akan mengganggu perlekatan primer dengan gen target. Sedangkan adanya struktur dimer pada primer akan menyebabkan primer tersebut akan membuat ikatan satu sama lain daripada berikatan dengan gen target sehingga mengganggu proses amplifikasi (Saraswati *et al.*, 2019).

Analisis Spesifisitas Primer Secara In Silico

Primer yang dipilih kemudian dianalisis secara *in silico* untuk menguji spesifisitas primer dan tingkat kesamaan sekuens produk PCR dengan database nukleotida yang ada di NCBI. Spesifisitas primer dianalisis menggunakan *Primer-Blast* dan kesamaan nukleotida dengan menggunakan *Nucleotide-Blast* yang terdapat pada situs <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>. Primer dikatakan baik atau spesifik jika mampu mengenali dan menempel pada gen target yang diinginkan, begitupun sebaliknya primer yang tidak baik atau tidak spesifik akan menyebabkan teramplifikasinya daerah selain target yang diinginkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen OPN Kambing (*Capra hircus*)

Berdasarkan hasil penelusuran gen mRNA OPN pada kambing (*Capra hircus*) di *GenBank* NCBI, diperoleh hanya satu sekuens gen tersebut. Format FASTA gen OPN pada Kambing (*Capra hircus*) ditampilkan pada gambar 1.

Gen yang diperoleh bernama *secreted phosphoprotein 1* (SPP1) dengan panjang total sekuens yaitu 834 bp dan merupakan bagian dari mRNA. Gen ini berfungsi membawa informasi untuk pembentukan protein OPN. OPN juga dikenal dengan sebutan SPP1 merupakan protein multifungsional yang diekspresikan dalam sejumlah jenis sel yang berfungsi tidak hanya dalam komunikasi antar sel, tetapi juga dalam matriks ekstraseluler (Yim *et al.*, 2022). Protein OPN/SPP1 terlibat dalam perbaikan tulang, mekanisme pertahanan homeostasis, dan enkapsulasi tumor.

Selain itu, protein ini juga berhubungan dan mempengaruhi kesuburan pada ternak jantan (Samik *et al.*, 2014).

Capra hircus secreted phosphoprotein 1 (SPP1), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001285667.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NM_001285667.1:1-834 Capra hircus secreted phosphoprotein 1 (SPP1), mRNA
ATGAGAATTGCAGTGATTTGCTTCTGCCTCTTGGGCATTGCCTCCGCCCTTCCAGTTAAACCGACCAGTT
CTGGCAGCTCTGAGGAAAAGCTGCTTAACAACAAATACCCAGATGCTGTAGCCACATGGCTAAAGCCTGA
CCCATCTCAGAAGCAGACTTTCTAGAACCCAGAAATCTGTGCTCTGAGGAAACTGATGACAACAAA
CAAATACCTCCCGAGTAAGTCCAATGAAAGCCTGAGCAACAGACGATCTAGATGATGATGATGAAA
ACAGCCAGGAAGTCAACTCTGATGACTCCGACGATGCTAACCTGATGACTCTGACCATTCCAACGAGTC
TCACCATTCTGATGAATCTGATGAAGCTGATTTCCCACTGACATTCCAACAATCGCAGTTTCACTCCA
CCTTTCCCTACGGAAGCACAATGATGGCCGAGGTGATAGTGTGGCTTATGGACTGAAGTCAAAATCGA
AGAAGTTCCGCCGATCTAACGTTGAGAGTCCAGATGCCACAGAGGAGGACTTACATCACACATAGAGAG
TGAGGAGATGCATGATGCACCTAAGAAGACGAGTCAGCTGACTGACCACAGCGAAGAAACCAACAGTGAC
GAGTTTCCCAAAGAACTCACACCAAGGCCAGGAGGAGAGCAAGCATTCCAATCGGATCGAGAGTCAGG
AAAATTCCAACTCAGCCAAGAATTCCATAGCCTTGAAGACAAGCTAGACCTAGATCATAAGAGTGAAGA
AGACAAGCGCCTGAAAATCCGCATTCTCATGAATTAGATAGTGCTCTTCTGAGGTCAACTGA
```

Gambar 1. Format FASTA gen OPN/SPP1 *Capra hircus*

OPN terlibat dalam proses spermatogenesis dan pematangan sperma, serta dapat mempengaruhi motilitas sperma dan kemampuan fertilisasi (Liu *et al.*, 2013). Protein OPN ditemukan pada berbagai organ reproduksi seperti sel epitel prostat, ampula, sel sertoli, vesikula seminalis, dan epididimis. Selama masa kebuntingan, protein OPN yang diekspresikan oleh sel germinal di tubulus seminiferus dan membantu mempersiapkan testis untuk kehidupan post natal (Tekin *et al.*, 2023). Beberapa temuan telah membuktikan bahwa OPN berkaitan dengan kesuburan pada berbagai spesies seperti pada babi hutan jantan (Chen *et al.*, 2022), sapi Madura jantan (Rosyada *et al.*, 2013), dan kerbau jantan (*Bubalus bubalis*) (Kumar *et al.*, 2016). Sekuens gen OPN/SPP1 yang diperoleh dari GenBank, selanjutnya sekuens gen tersebut diubah ke dalam format FASTA sehingga dapat digunakan dalam desain primer menggunakan alat *Pick Primers* yang terdapat di situs NCBI.

Desain Primer Menggunakan Situs NCBI

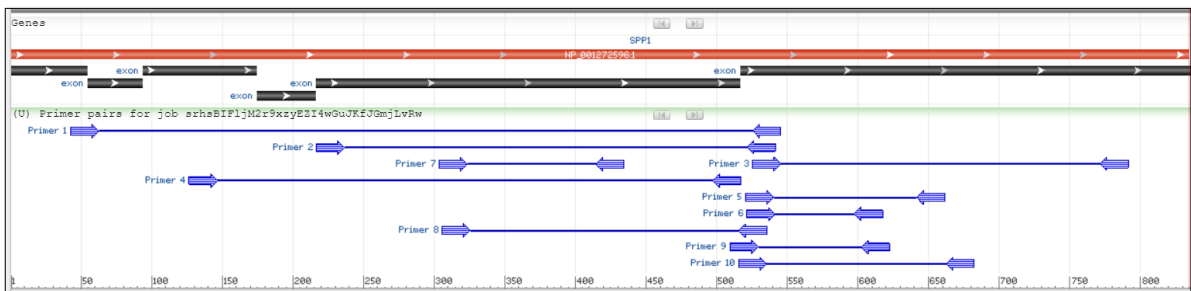
Hasil desain primer menggunakan *Primer-Blast* pada situs NCBI, diperoleh sepuluh kandidat primer untuk gen OPN yang tertuang pada tabel 1 dan ilustrasi daerah aplikasi dari primer tersebut tertuang pada gambar 2. Kandidat primer yang diperoleh tersebut kemudian diseleksi kembali untuk mendapatkan primer dengan kriteria baik untuk qPCR. Hal ini dikarenakan, salah satu kunci keberhasilan dalam penggunaan alat qPCR adalah pemilihan primer yang akan digunakan (Lim *et al.*, 2011), sehingga dibutuhkan kriteria tertentu yang harus dipenuhi untuk mendapatkan desain primer yang terbaik (Salsabila *et al.*, 2021). Rancangan primer

yang kurang baik akan menyebabkan reaksi qPCR tidak bekerja dengan baik, sehingga menyebabkan produk qPCR tidak spesifik atau bahkan terbentuknya primer dimer (Yustinadewi *et al.*, 2018).

Tabel 1. Kandidat Primer gen OPN Pada Kambing Jantan (*Capra hircus*)

No	Sequence (5'-3')	Length	T _m (°C)	GC%	Self Compl.	Self 3' Compl.
Primer Pair 1						
1	F: TCCGCCCTTCCAGTTAAACC	20	59.96	55.00	5.00	3.00
	R: GTGAAGTCCTCCTCTGTGGC	20	60.04	60.00	3.00	2.00
Product Length 503						
Primer Pair 2						
2	F: ACCCTCCCGAGTAAGTCCAA	20	59.88	55.00	4.00	0.00
	R: AGTCCTCCTCTGTGGCATCT	20	59.96	55.00	3.00	0.00
Product Length 325						
Primer Pair 3						
3	F: GCCACAGAGGAGGACTTCAC	20	60.04	60.00	3.00	2.00
	R: CGGATTTTCAGGCGCTTGTC	20	60.18	55.00	6.00	2.00
Product Length 266						
Primer Pair 4						
4	F: TGGCTAAAGCCTGACCCATC	20	59.74	55.00	6.00	0.00
	R: TCTCAACGTTAGATCGGCGG	20	59.90	55.00	8.00	2.00
Product Length 391						
Primer Pair 5						
5	F: CAGATGCCACAGAGGAGGA	20	59.82	60.00	3.00	1.00
	C					
	R: GGGCCTTTGGTGTGAGTTCT	20	60.18	55.00	4.00	2.00
Product Length 141						
Primer Pair 6						
6	F: AGATGCCACAGAGGAGGACT	20	59.96	55.00	3.00	2.00
	R: TCTTCGCTGTGGTCAGTCAG	20	59.68	55.00	3.00	1.00
Product Length 96						
Primer Pair 7						
7	F: GACTCCGACGATGCTAACCC	20	60.25	60.00	3.00	0.00
	R: TCCGTAGGGAAGGTGGAGT	20	59.88	55.00	6.00	1.00
Product Length 131						
Primer Pair 8						
8	F: CTCCGACGATGCTAACCCCTG	20	60.25	60.00	3.00	1.00
	R: CCTCTGTGGCATCTGGACTC	20	59.82	60.00	3.00	3.00
Product Length 230						
Primer Pair 9						
9	F: CGTTGAGAGTCCAGATGCCA	20	59.75	55.00	3.00	3.00
	R: TGGTTTCTTCGCTGTGGTCA	20	59.82	50.00	2.00	2.00
Product Length 113						
Primer Pair 10						
10	F: GAGTCCAGATGCCACAGAGG	20	59.82	60.00	3.00	3.00
	R: TGAATGCTTGCTCTCCTCC	20	59.75	55.00	4.00	0.00
Product Length 167						

Singkatan : F = Forward Primer; R = Reverse Primer; Self compl.= Self complementarity; Self 3' compl.= Self 3' complementarity.

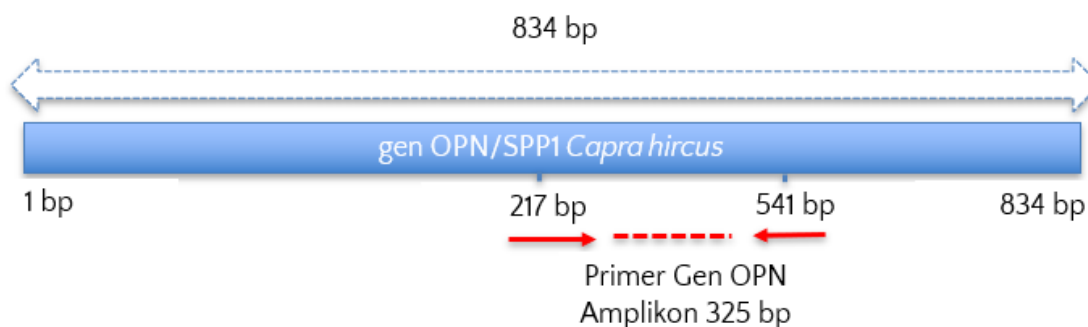


Gambar 2. Ilustrasi Daerah Amplifikasi Oleh Masing-Masing Pasangan Primer. Secara Khusus, Primer yang Dirancang Mampu Mengenali Daerah Gen OPN Dengan Panjang Produk yang Berbeda.

Dalam mendesain suatu primer, beberapa ketentuan harus diperhatikan seperti panjang primer, *temperature melting* (T_m), proporsi basa GC, dan *self 3' complementarity* (Atifah dan Achyar, 2022). Dalam penelitian ini, semua kandidat primer yang diperoleh memiliki panjang 20 bp. Secara teori, primer dengan panjang 18–30 basa merupakan panjang primer yang ideal (Septiasari dan Dewi, 2024). Primer yang terlalu pendek akan mengurangi kesepesifikan primer, sebaliknya primer yang terlalu panjang juga menyebabkan reaksi PCR tidak berjalan efektif (Andika *et al.*, 2019). Untuk T_m , semua kandidat primer menunjukkan rentang antara 59–61°C dan selisih yang tidak lebih dari 5°C setiap pasangan primer. Hasil tersebut masuk dalam kategori baik, hal ini sesuai dengan pernyataan Shen (2010) bahwa T_m yang ideal untuk desain primer berada di kisaran 58–65°C. Kemudian Khaira *et al.*, (2023) juga menyatakan bahwa pasangan primer harus memiliki selisih nilai T_m tidak lebih dari 5°C, karena dapat menyebabkan penurunan amplifikasi atau bahkan tidak terjadi proses amplifikasi.

Hasil dari proporsi basa GC dari semua pasangan kriteria primer yang diperoleh yaitu berkisar antara 55–60% dan mayoritas memiliki nilai *self 3' complementarity* yang tidak lebih dari 3, hanya pasangan primer nomer 2 yang memiliki nilai 0. Primer yang baik memiliki persentase GC sebesar 40–60%. Tingginya kandungan GC pada primer akan menyebabkan primer kesulitan dalam memutus rantai utas ganda pada primer. Namun sebaliknya, rendahnya kandungan GC akan menyebabkan primer kesulitan menempel pada gen target (Saputra dan Wahyudi, 2023). Selain itu, primer yang baik juga memiliki nilai *self 3' complementarity* yang kecil, Nilai maksimum *self 3' complementarity* adalah 3

(Sihotang *et al.*, 2021). Apabila suatu primer memiliki *self 3' complementarity* yang tinggi, maka akan menyebabkan tingginya peluang penempelan antar pasangan primer dan membentuk struktur harpin (Saraswati *et al.*, 2019). Atas dasar tersebut maka dipilih satu pasangan primer yang sesuai kriteria yang baik yaitu pasangan primer 2 dengan panjang 20 bp, T_m *forward* 59.88 °C dan *reverse* 59,96 °C, proporsi basa GC *forward* dan *reverse* sebesar 55%, serta nilai *self 3' complementarity* baik *forward* dan *reverse* yaitu 0. Untuk posisi relatif pasangan primer 2 pada gen OPN kambing (*Capra hircus*) dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Skema Posisi Relatif Primer 2 Terhadap gen OPN/SPP1 *Capra hircus*
Analisis Struktur Sekunder Pada Amplikon dan Struktur Dimer Primer

Hasil analisis terhadap struktur sekunder dan dimer, menunjukkan bahwa pasangan primer 2 dan sebagian besar pasangan primer lainnya tidak terdapat struktur sekunder pada amplikon. Pasangan primer 4 memiliki struktur sekunder pada amplikonnya yang bersifat *moderate* pada bagian *forward* dan *very weak* pada *reverse*. Untuk pasangan primer 6, 7, dan 10 memiliki struktur sekunder yang bersifat *weak* pada bagian *reverse*. Sedangkan untuk karakteristik dimer, semua pasangan primer tidak terjadi struktur primer dimer. Untuk hasil lengkapnya tertuang pada tabel 2.

Tabel 2. Analisis Struktur Sekunder Pada Amplikon dan Struktur Dimer Primer

No	Sequence (5'-3')	GC Lamp	Struktur Sekunder	Primer Dimer
Primer Pair 1				
1	F: TCCGCCCTTCCAGTTAAACC	2	None	No
	R: GTGAAGTCCTCCTCTGTGGC	3	None	No
Primer Pair 2				
2	F: ACCCTCCCGAGTAAGTCCAA	2	None	No
	R: AGTCCTCCTCTGTGGCATCT	1	None	No
Primer Pair 3				
3	F: GCCACAGAGGAGGACTTCAC	1	None	No
	R: CGGATTTTCAGGCGCTTGTC	1	None	No

Primer Pair 4				
4	F: TGGCTAAAGCCTGACCCATC	2	<i>Moderate</i>	No
	R: TCTCAACGTTAGATCGGCGG	5	<i>Very Weak</i>	No
Primer Pair 5				
5	F: CAGATGCCACAGAGGAGGAC	2	None	No
	R: GGGCCTTTGGTGTGAGTTCT	1	None	No
Primer Pair 6				
6	F: AGATGCCACAGAGGAGGACT	2	None	No
	R: TCTTCGCTGTGGTCAGTCAG	1	<i>Weak</i>	No
Primer Pair 7				
7	F: GACTCCGACGATGCTAACCC	3	None	No
	R: TCCGTAGGGAAAGGTGGAGT	2	<i>Weak</i>	No
Primer Pair 8				
8	F: CTCCGACGATGCTAACCCTG	3	None	No
	R: CCTCTGTGGCATCTGGACTC	1	None	No
Primer Pair 9				
9	F: CGTTGAGAGTCCAGATGCCA	3	None	No
	R: TGTTTCTTCGCTGTGGTCA	2	None	No
Primer Pair 10				
10	F: GAGTCCAGATGCCACAGAGG	2	None	No
	R: TGAATGCTTGCTCTCCTCC	2	<i>Weak</i>	No

Singkatan : F = Forward Primer; R = Reverse Primer

Kriteria selanjutnya untuk primer yang ideal adalah tidak membentuk struktur sekunder dan primer dimer. Struktur sekunder pada amplicon dapat menyebabkan terjadinya gangguan pada proses penempelan primer terhadap gen target. Selain itu adanya struktur sekunder menyebabkan menurunnya kualitas hasil qPCR. Sedangkan adanya struktur dimer pada primer akan menyebabkan terganggunya proses amplifikasi dan timbulnya efek negatif terhadap hasil qPCR. Dimer terjadi akibat banyaknya jumlah ikatan GC yang mendorong primer tersebut membuat dimer daripada berikatan dengan gen target (Saraswati *et al.*, 2019; Nugraha *et al.*, 2022).

Analisis Spesifisitas Primer Secara *In Silico*

Hasil analisis spesifisitas primer dengan menggunakan *Primer-Blast* dapat dilihat pada tabel 3. Hasil ini menunjukkan bahwa pasangan primer yang dipilih (pasangan primer2) dapat mengenali gen OPN pada kambing (*Capra hircus*) yang terdapat di pangkalan data NCBI dengan panjang sekuens 325 bp. Selain itu, pasangan primer yang dipilih juga dapat mengenali gen OPN pada spesies lainnya dengan total 66 genom dari spesies yang berbeda yaitu *Ovis aries* (328 bp), *Bos taurus* (328 bp), persilangan antara *Bos indicus* dan *Bos taurus* (328 bp), *Bos javanicus* (328 bp) dan spesies lainnya.

Hasil tersebut membuktikan bahwa pasangan primer yang dipilih termasuk kriteria ideal dan secara spesifik dapat mengenali target. Ye *et al.*, (2012) menyatakan bahwa salah satu kriteria yang paling penting dimiliki oleh primer terutama pada primer qPCR adalah spesifisitas target. Idealnya, sepasang primer hanya akan mengamplifikasi target yang diinginkan. Primer yang tidak spesifik akan menyebabkan teramplifikasinya daerah selain target yang diinginkan dan bahkan menyebabkan tidak teramplifikasinya daerah pada genom tersebut (Aulia *et al.*, 2021).

Tabel 3. Analisis Spesifisitas Primer Secara *In Silico*

Sequence (5'-3')	Jumlah Target Jenis Dikenali					Lainnya
	<i>Capra hircus</i>	<i>Ovis aries</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Bos indicus x Bos taurus</i>	<i>Bos Javanicus</i>	
F: ACCCTCCC GAGTAAGT CCAA	4	1	9	2	2	48
R: AGTCCTCCT CTGTGGCAT CT	Panjang produk = 325 bp	Panjang produk = 325 bp	Panjang produk = 325 bp	Panjang produk = 325 bp	Panjang produk = 325 bp	

Singkatan : F = Forward Primer; R = Reverse Primer

Selain spesifitas primer, sekuens nukleotida juga dianalisis tingkat kesamaan dengan pangkalan data yang terhadap di NCBI. Berdasarkan tampilan gambar 3 dan nilai *query cover*, *percent identity*, dan E value pada tabel 4, menunjukkan bahwa sekuens nukleotida memiliki urutan yang sangat mirip dengan *Capra hircus*, *Ovis aries*, *Bos taurus*, persilangan *Bos indicus* dan *taurus*, serta *Bos Javanicus*. Pada *Capra hircus* diperoleh data kesamaan sebanyak 5 pada NCBI dengan nilai *query cover*, *percent identity*, serta *expectation value* (E-value) yang bervariasi yaitu 3 dengan nilai *query cover* sebesar 100%, *percent identity* 100%, E value 5×10^{-167} , 1 memiliki nilai *query cover* 100%, *percent identity* 97,26%, E value $= 5 \times 10^{-167}$, serta 1 dengan *query cover* 47%, *percent identity* 97,39%, E value $= 4 \times 10^{-64}$.

Tabel 4. Hasil Penjajaran Sekuens Nukleotida Produk PCR

Sequence (5'-3')	Jumlah Target Jenis Dikenali				
	<i>Capra hircus</i>	<i>Ovis aries</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Bos indicus x Bos taurus</i>	<i>Bos Javanicus</i>
ACCCTCCCCGAGTAAG TCCAATGAAAGCCCT GAGCAAACAGACGA TCTAGATGATGATGA	5 3 (Query Cover =100%,	2 1 (Query Cover =100%, Ident =	9 4 (Query Cover =100%, Ident =	2 2 (Query Cover =100%,	2 2 (Query Cover =100%,

TGAAAACAGCCAGG	Ident =	98,78% E	93,29% E	Ident =	Ident =
AAGTCAACTCTGATG	100%, E	value = 7×10^{-161})	value = 7×10^{-131})	93,29% E	93,29% E
ACTCCGACGATGCTA	evalue			evalue	evalue
ACCCTGATGACTCTG	= 5×10^{-167})			= 7×10^{-131})	= 7×10^{-131})
ACCATTCCAACGAGT					
CTCACCATTCTGATG	1 (Query	1 (Query	2 (Query		
AATCTGATGAAGCTG	Cover	Cover = 54%,	Cover = 100%,		
ATTTTCCCACTGACA	= 100%,	Ident = 100%	Ident =		
TTCCAACAATCGCAG	Ident =	E value	92,99% E		
TTTTCACTCCACCTTT	97,26%, E	= 1×10^{-84})	evalue = 3×10^{-129})		
CCCTACGGAAAGCA	evalue				
CAAATGATGGCCGA	= 5×10^{-167})				
GGTGATAGTGTGGCT					
TATGGACTGAAGTCA			3 (Query		
AAATCGAAGAAGTTC	1 (Query		Cover = 91%,		
CGCCGATCTAACGTT	Cover		Ident = 93% E		
GAGAGTCCAGATGC	= 47%, Ident		evalue = 5×10^{-117})		
CACAGAGGAGGACT	= 97,39%, E				
	evalue				
	= 4×10^{-64})				

Alignment Scores ■ < 40 ■ 40 - 50 ■ 50 - 80 ■ 80 - 200 ■ >= 200

Distribution of the top 20 Blast Hits on 20 subject sequences



Gambar 3. Grafik Penjajaran Sekuens Nukleotida Pada *Capra hircus*, *Ovis aries*, *Bos taurus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, dan *Bos Javanicus*. Garis berwarna merah menunjukkan bahwa sekuens-sekuens tersebut memiliki urutan yang sangat mirip yaitu > 200 nukleotida

Query cover merupakan persentase dari panjang sekuens yang sama dengan data yang ada di NCBI. *Percent identity* merupakan persentase tertinggi dari sekuens yang dicari dengan sekuens yang terdapat di pangkalan data NCBI. Dan *E-value* merupakan indikator probabilitas untuk menemukan kecocokan secara kebetulan, apabila nilainya kecil maka homologi sekuens semakin tinggi (Sihotang et al., 2021). Tingkat kesamaan sekuens dikatakan mirip apabila memiliki skor *query cover* mendekati 100%, *percent identity* mendekati 100% dan *E-value* mendekati 0 (Gaffar dan Sumarlin, 2020).

KESIMPULAN

Primer yang berhasil didesain dan memenuhi syarat ideal primer untuk digunakan dalam analisis ekspresi gen OPN sebagai penanda kesuburan pada kambing jantan (*Capra hircus*). Desain primer yang dibuat secara *in silico* menghasilkan pasangan primer sebagai berikut : primer *forward* 5'-ACCCTCCCGAGTAAGTCCAA-3' dan *reverse* 5'-AGTCCTCCTCTGTGGCATCT-3'. Pasangan primer tersebut mampu mengamplifikasi daerah gen OPN dengan panjang produk 325 bp. Hasil uji kinerja secara *in silico* juga menunjukkan bahwa primer tersebut dapat digunakan untuk deteksi gen OPN *Capra hircus* secara spesifik. Desain primer untuk deteksi ekspresi OPN diharapkan dapat membantu memprediksi tingkat kesuburan pada ternak kambing jantan (*Capra hircus*), sehingga mampu meningkatkan efisiensi reproduksi ternak tersebut. Saran untuk menguji keberhasilan desain primer *in silico* adalah dengan uji secara *in vitro* untuk mengetahui keberhasilan primer dalam membentuk produk yang diinginkan. Deteksi produk dapat dilakukan dengan uji elektroforesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Amrullah, M.F., Utomo, B., Utama, S., Suprayogi, T.W., Lestari, T.D., Restiadi & T.I., Belgania, R.H. (2023). Genetic Analysis of The Leptin Gene in Goats Based on GenBank DNA Sequences. *Jurnal Medik Veteriner*. 6(1): 125-131. DOI: <https://doi.org/10.20473/jmv.vol6.iss1.2023.125-131>
- Anika, M., Putri, D.H., & Wahyuni. (2019). Primer Design For Identification Of Beta-Carotene Encoding Genes In Cassava. *Bio Sains*. 4(1): 39-47. DOI: <http://dx.doi.org/10.24036/5320RF00>
- Atifah, Y., & Achyar, A. (2022). Design of Specific Primer for Methallothionein Gene of Tor Fish (Tor tambra). *Natural Science Journal Of Science and Technology*. 11(2): 42-48. DOI: <https://dx.doi.org/10.22487/25411969.2022.v11.i2.16216>
- Aulia, S.L., Suwigyo, R.A., & Hasmeda, M. (2021). Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*. 18(1): 44-54. DOI : <https://doi.org/10.31851/sainmatika.v18i1.5805>
- Biswal, S.S., Joseph, C., Kumar, T.M.A.S., Reena, D., & Mishra, C. (2022). Qualitative and Quantitative Estimation of Osteopontin in Bull Semen and its Effect on

- Sperm Quality Parameters and Fertility Rate In vivo. *Indian Journal of Animal Research*. 1-5. DOI: <https://doi.org/10.18805/IJAR.B-4764>
- Chen, Y., Wang, K., & Zhang, S. (2022). Osteopontin enhances sperm capacitation and *in vitro* fertilization efficiency in boars. *J Anim Sci Technol* 64(2):235-246. DOI: <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e15>.
- Gaffar, S., & Sumarlin. (2020). Analisis sekuen mtDNA COI Pari Total Biru yang didaratkan di Tempat Pendaratan Ikan Kota Tarakan. *Jurnal Harpodon Borneo*. 13(2): 80-89. DOI: <https://doi.org/10.35334/harpodon.v13i2>
- Hernawati, T. (2015). The Effect Of Osteopontin In Semen Freezing Process On The Quality Of Holstein Friesian Dairy Bull Frozen Semen. *Asian Academic Research Journal Of Multidisciplinary*. 1(33): 120-132.
- Khaira, A., Achyar, A., Zulyuri., Atifah, Y., Putri, D.H., & Violita.(2023). Primer Design and Optimization of Annealing Temperature for Analysis of Glutathione Reductase Gene Expression in Rice (*Oryza sativa* L.). *3BIO: Journal of Biological Science, Technology and Management*. 5(1): 142-148. DOI: <https://doi.org/10.5614/3bio.2023.5.1.3>
- Kumar, P., Saini, M., Kumar, D., Bharadwaj, A & Yadav, P.S. (2016). Estimation of endogenous levels of osteopontin, total antioxidant capacity and malondialdehyde in seminal plasma: Application for fertility assessment in buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Reproduction in Domestic Animals*. 52(2): 221-226.DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12882>
- Lim, J., Shin, S.G., Lee, S., & Hwang, S. (2011). Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*. 5(1): 28-39. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11783-011-0302-x>
- Liu, Q., Xie, Q., Huang, W., Xie, F. (2013). expression and potential role of osteopontin in the testis, epididymis and epididymal sperm of mouse. *Medical Journal of Wuhan University*. 34(2): 183-187
- Nisa, L.Z., Rahayu, S., & Ciptadi, G. (2018). The Abnormality of Spermatozoa Goat after Freezing on -80°C Using Tris Diluent Added Combination Hatching Egg Yolk and Amniotic Fluid. *J.Exp. Life Sci.*. 8(3): 133-138
- Nugraha, R., Dewi, P.S., & Nurilmala, M. (2022). Evaluasi Primer Gen Coi Sebagai Biomarker Ketertelusuran Ikan Menggunakan Bioinformatika. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 25(1): 67-79. DOI: <https://doi.org/10.17844/jphpi.v25i1.36501>
- Purwakasih, D.B., & Achyar, A. (2021). Desain Primer dan PCR In Silico untuk Deteksi *Shigella* Sp. pada Sampel Air Minum Isi Ulang. *Serambi Biologi*. 6(1): 1-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.24036/11072RF00>
- Rahayu, S. (2014). The Reproductive Performance Of Bali Cattle And It's Genetic Variation. *Journal of Biological Researches*. 20(1): 28-35. DOI: <https://doi.org/10.23869/bphjbr.20.1.20145>
- Rosyada, Z.N.A., Yoelinda, V.T., Kain, E.A.M., Gunawan, M., Ulum, M.F., Tumbelaka, L.I.T.A., Solihin, D.D., Agil, M., Gunawan, A., & Purwantara, B. (2023). Sperm osteopontin mRNA expression levels and its correlation on semen quality and fertility in Madura bulls. *Biodeversitas*. 24(1): 563-570. DOI: [10.13057/biodiv/d240165](https://doi.org/10.13057/biodiv/d240165)

- Salsabila, N., Fadilah., Permana, R.C., Muti'atul, S.K.A., Romzalis, A.A., Ramadhani, D.N., Rachmawati, Y., & Arianti, O.F. (2021). Penentuan Sekuens Terbaik untuk Gen COI pada *Crocodylus rhombifer* Menggunakan SoftWare Perlprimer dan Primer Blast Sebagai Bentuk Praktikum Saat Pandemi Covid-19. *Indonesian Journal Of Science Learning*. 2(1): 15-21. DOI: <https://doi.org/10.15642/ijsl.v2i1.1233>
- Samik, A., Oktanella, Y., Hernawati, T., Widjaja, N.M.R., & Dewanti, I.P. (2014). Penambahan Osteopontin dalam Pengencer Semen Beku Sapi Perah Friesian Holstein Meningkatkan Ekspresi B-Cell CLL/Lymphoma-2 Spermatozoa Postthawing. *Jurnal Veteriner Desember*. 15(4): 461-466
- Saputra, R.A.S., & Wahyudi, D. (2023). Desain Primer Secara In Silico Untuk Amplifikasi Gen Coa Pada *Staphylococcus Aureus* Dengan Polymerase Chain Reaction. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal Of Applied Chemistry)*. 11(1): 8-15. DOI: <https://doi.org/10.24843/CK.2023.v11.i01>
- Saraswati, H., Seprianto., & Wahyuni, F.D. (2019). Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 3(1): 33-38. DOI: <https://doi.org/10.47007/ijobb.v3i1.37>
- Septiasari, N.P.S., & Dewi, N.Y.P.A. (2024). Primer Design and in Silico PCR for Detection Microsatellite Locus on Cassava (*Manihot esculenta*) as an Early Study of Genetic Diversity of Gluten Free Food Crops. *Advances in Tropical Biodiversity and Environmental Sciences*. 8(1): 20-25. DOI: [10.24843/ATBES.2024.v08.i01.p04](https://doi.org/10.24843/ATBES.2024.v08.i01.p04).
- Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Hang, X., Wang, X., Zhao, D., & Zhang, C.(2010) . MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics*. 11(143): 1-7. DOI:<https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-143>
- Sihotang, M.A.E.D., Erwinda, Y.E., Suwarni, E., & Lusianti, E. (2021). Short Communication: Desain Primer dan Analisis in Silico untuk Amplifikasi Gen mt-Co1 pada Tikus got (*Rattus norvegicus*). *ERUDITIO*. 1(2): 20-29. DOI: <https://doi.org/10.54384/eruditio.v1i2.82>
- Sudrajad, P., Volkandari, S.D., Cahyadi, M., Prasetyo, A., Komalawati., Wibowo, S., & Subiharta. (2021). Review Article Pemanfaatan informasi genom untuk eksplorasi struktur genetik dan asosiasinya dengan performan ternak di Indonesia. *Livestock and Animal Research*. 19(1): 1-12. DOI: <https://doi.org/10.20961/lar.v19i1.47658>
- Tekin, K., Kurtdeede, E., Salmanoğlu, B., Uysal, O., & Stelletta C. (2023). Osteopontin Concentration in Prostates Fractions: A Novel Marker of Sperm Quality in Dogs. *Veterinary Sciences*. 10(11):646. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci10110646>
- Xu, H., Zhang, S., Duan, Q., Lou, M., & Ling, Y. (2024). Comprehensive analyses of 435 goat transcriptomes provides insight into male reproduction. *International Journal Of Biological Macromolecules*. 255: 127942. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127942>
- Xu,B., Bai, X., Zhang, J. Li, B., Zhang, Y., Su, R., Wang, R., Wang, Z., Lv, Q., Zhang, J., & Li, J. 2023. Metabolomic analysis of seminal plasma to identify goat semen

- freezability markers. *Front Vet Sci*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1132373>.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I. Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13 (134): 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yim, A., Smith, C., & Brown, A.M. (2022). Osteopontin/secreted phosphoprotein-1 harnesses glial-, immune-, and neuronal cell ligand-receptor interactions to sense and regulate acute and chronic neuroinflammation. *Immunol Rev*. 311(1): 224-233. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.13081>
- Yoelinda, V.T., Arifiantini, R.I., Solihin, D.D., Agil, M., Setiadi, D.R., Maulana, T., Purwantara, B., Hastuti, Y.T., Manansang, J., & Sajuthi, D. (2023). Correlation between Post-Thaw Spermatozoa Quality of the Endangered Javan Banteng with OPN Gene Expression. *Veterinary Medicine International*. 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/9982422>
- Yustinadewi, P.D., Yustiantara, P.S., Narayani, I. 2018. Teknik Perancangan Primer Untuk Sekuen Gen Mdr-1 Varian 1199 Pada Sampel Buffy Coat Pasien Anak Dengan Lla. *Jurnal Metamorfosa*. V(1): 105-111. DOI: [10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16](https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16)
- Zhang, G.M., Lan, S., Jia, R.X., Yan, G.Y., Wang, L.Z., Nie, H.T., , Lei, Z.H., Wang, F. (2016). Age-associated and tissue-specific expression of osteopontin in male Hu sheep reproductive tract. *Tissue and Cell*. 48(5): 496-502. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.07.003>
- Zhang, W., Min, L., Li, Y., Lang, Y., Hosque, S.A.M., Adetunji, A.O., & Zhu, Z. (2022). Beneficial Effect of Proline Supplementation on Goat Spermatozoa Quality during Cryopreservation. *Animals (Basel)*. 12(19): 2626. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12192626>
- Zhao, J.Y., Xu, H.Z., Zhao, Z.Q., Narisu., Mao, J.W., Guan, D.L., Xie, C. 2015. Polymorphisms of *osteopontin* gene and their association with placental efficiency and prolificacy in goats. *Journal of Applied Animal Research*. 43(3): 272-278. <https://doi.org/10.1080/09712119.2014.963098>