

RINGKASAN

Upaya meningkatkan daya reproduktivitas ternak sapi perah salah satunya adalah dengan teknik Inseminasi Buatan yang telah lama dan sudah diterima oleh masyarakat peternak. Dengan teknik Inseminasi Buatan akan memperbaiki mutu genetik ternak sapi perah dengan membuat semen beku yang berasal dari pejantan unggul, hal ini merupakan salah satu cara meningkatkan efisiensi reproduksi.

Proses pembekuan semen ini juga menimbulkan kendala antara lain *Post Thawing Motility* (PTM) hanya berkisar 40%, selanjutnya akibat pembekuan dan proses *thawing* akan mengakibatkan kerusakan akrosom spermatozoa, kerusakan membran sel dan penurunan sumber energi yang pada akhirnya menyebabkan penurunan motilitas dan metabolisme sel spermatozoa. Kerusakan seluler dari membran plasma spermatozoa sangat terkait dengan kondisi integritas membran, motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Kondisi di atas sangat menentukan angka fertilitas dan produksi embrio *in vitro*.

Fertilisasi dimulai dengan peristiwa pengenalan spesifik sel yang melibatkan membran plasma spermatozoa dengan konstituen glikoprotein zona pelusida (ZP3). Membran plasma spermatozoa terdiri dari lipid dan protein. Protein membran ini yang mempunyai peranan dalam proses fertilisasi yakni melalui adhesi spermatozoa – zona pelusida dan mediator utama pengenalan gamet ini adalah tyrosin kinase.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi dan isolasi protein tyrosin kinase dari membran spermatozoa sapi perah sebagai bahan bioaktif yang dapat digunakan untuk meningkatkan kecepatan fusi spermatozoa-zona pelusida dan tujuan jangka panjang adalah menunjang program inseminasi buatan untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas ternak sapi perah.

Subyek penelitian ini adalah protein tyrosin kinase yang diperoleh dari hasil pemisahan membran spermatozoa, identifikasi protein membran dengan SDS-PAGE dan isolasi protein tyrosin kinase dengan Elusi.

Penelitian ini meliputi aspek-aspek :

- a. Pemisahan protein membran plasma spermatozoa sapi perah dengan teknik sentrifugasi

- b. Identifikasi PTK dari membran plasma spermatozoa sapi perah dengan SDS PAGE
- c. Isolasi PTK dengan teknik elektro elusi
- d. Pembuatan anti-PTK pada kelinci lokal jantan serta pengukuran nilai *Optical Density* (OD) dengan Indirect ELISA
- e. Pengujian laboratoris isolat PTK yang ditambahkan dalam media TCM 199 sebagai media fertilisasi *in vitro* yang digunakan dalam proses fertilisasi *in vitro*

Sampel yang digunakan dalam penyediaan isolat protein tyrosin kinase adalah semen sapi perah sebanyak 160 ml dari 20 kali pengambilan selanjutnya dilakukan pemisahan dengan sentrifugasi untuk memisahkan pellet (spermatozoa) dengan supernatan (plasma semen). Pellet yang diperoleh dilakukan identifikasi protein dengan SDS-PAGE untuk mendapatkan pita-pita protein, selanjutnya pita-pita protein yang menunjukkan berat molekul 95 kDa dipotong dan dilakukan elusi untuk mendapatkan isolat protein tyrosin kinase.

Pembuatan antibodi terhadap protein tyrosin kinase (PTK) digunakan 5 ekor kelinci lokal jantan. satu ekor digunakan sebagai kontrol yaitu disuntik dengan PBS + CFA masing-masing dengan dosis 150 µl/Sc, Perlakuan 2 (P2) sebanyak 2 ekor disuntik dengan PTK + CFA masing-masing dengan dosis 100 µl/Sc, dan Perlakuan 3 (P3) sebanyak 2 ekor disuntik dengan PTK + CFA masing-masing dengan dosis 150 µl/Sc, booster dilakukan dua kali yaitu pada minggu ke-3 dan minggu ke-7. pengambilan darah (*bleeding*) dilakukan mulai minggu ke 1, minggu ke 3 s/d minggu ke 11, yang diambil dari vena auricularis. Serum yang diperoleh digunakan untuk uji spesifisitas secara kualitatif dengan metode dot blot dan secara kuantitatif dengan *Indirect* Elisa. Uji laboratoris isolat PTK dilakukan secara invitro menggunakan oosit yang telah dimaturasi dan semen segar sapi perah yang telah dikapasitasi. Selanjutnya isolat PTK ditambahkan dalam TCM-199. P0 (kontrol) media TCM tanpa penambahan PTK, P1: TCM + 1 µl PTK, P2 : TCM + 3 µl PTK, P3 : TCM + 5 µl PTK dan P4 : TCM + 7 µl PTK. Kemudian dibuat 5 tetes mikro 50 µl yang mengandung TCM pada masing-masing perlakuan dalam cawan petri, kemudian ditambahkan oosit dan spermatozoa. Kemudian inkubasi dalam inkubator CO₂ dan diamati kecepatan fusi spermatozoa-ZP selama 1, 2 dan 3 jam.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap sedangkan data kuantitatif dari nilai OD berdasarkan pembacaan dengan Elisa *Reader* dianalisis dengan Anova. Sedangkan kecepatan fusi spermatozoa- ZP diuji dengan Kruskal Wallis.

Hasilnya terlihat gradasi warna biru keunguan yang lebih gelap terdapat pada *bleeding* ke-4/minggu ke-4 setelah booster I. Selanjutnya gradasi warna lebih gelap juga terlihat pada *bleeding* ke-8/minggu ke-8 dan *bleeding* ke-9/minggu ke-9 setelah booster II. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi antibodi terhadap PTK sangat tinggi pada *bleeding* ke-4, ke-8 dan ke-9 dibandingkan dengan *bleeding* ke-3,5,6,7, dan 10 karena setelah dilakukan booster maka akan menimbulkan respon imun meningkat. Uji spesifisitas secara kuantitatif dengan *Indirect* Elisa.

Berdasarkan uji statistik menggunakan Kruskal Wallis, kecepatan fusi spermatozoa-zona pelusida pada P1 (39,67), P2 (48,78), P3 (57,89) dan P4 (64,72) berbeda nyata dengan P0 (16,44) ($p < 0,05$). Sedangkan antara P1, P2 dan P3 secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Pada P0 (kontrol) tanpa penambahan PTK dalam TCM tampak kumulus oophorus yang mengelilingi oosit masih sangat kompleks dan ikatan antar sel kumulus sangat erat. Hal ini berbeda dengan P1 (penambahan 1% PTK dalam TCM), P2 (penambahan 3% PTK dalam TCM) dan P3 (penambahan 5% PTK dalam TCM) terlihat ikatan antar sel-sel kumulus sudah mulai renggang sehingga memudahkan sel spermatozoa mencapai zona pelusida. Sedangkan pada P4 (penambahan 7% PTK dalam TCM) ikatan antar sel-sel kumulus merenggang dan terlepas sehingga sel-sel spermatozoa dapat mencapai zona pelusida bahkan telah ada yang masuk ke dalam ruang perivitelin.

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah bahwa protein tyrosin kinase (PTK) dapat diisolasi dari membran plasma spermatozoa sapi dengan metode Elusi, Isolat PTK dapat menimbulkan respon imun (antibodi terhadap PTK) pada kelinci jantan dan penambahan isolat PTK dalam TCM dapat meningkatkan kecepatan fusi spermatozoa-zona pelusida.

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan untuk menambahkan isolat PTK dalam media yang digunakan dalam prosesing semen beku yang bertujuan untuk meningkatkan post thawing motility dan pada akhirnya dapat meningkatkan angka kebuntingan pada ternak khususnya sapi perah.