

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



**KAWIN SUNTIK PADA KAMBING DENGAN MEMPERBAIKI MUTU  
SEMEN BEKU SEBAGAI UPAYA MEMENUHI KEBUTUHAN  
PROTEIN HEWANI**

**Tahun ke-1 dari rencana 2 Tahun**

**Prof. Dr. SUHERNI SUSILOWATI, MKes, Drh /0026065905  
INDAH NORMA TRIANA, MSi. Drh / 0021025705  
Dr. TRI WAHYU SUPRAYOGI, MSi. 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)



kkc  
kk  
LP 11/19  
Sus  
k

**KAWIN SUNTIK PADA KAMBING DENGAN MEMPERBAIKI MUTU  
SEMEN BEKU SEBAGAI UPAYA MEMENUHI KEBUTUHAN  
PROTEIN HEWANI**

**Tahun ke-1 dari rencana 2 Tahun**

**Prof. Dr. SUHERNI SUSILOWATI, MKes, Drh /0026065905  
INDAH NORMA TRIANA, MSi. Drh / 0021025705  
Dr. TRI WAHYU SUPRAYOGI, MSi. 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 : Kawin Suntik pada Kambing dengan Memperbaiki Mutu Semen Beku sebagai Upaya Memenuhi Kebutuhan Protein Hewani

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : Dr SUHERNI SUSILOWATI, M.Kes  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0026065905  
Jabatan Fungsional : Guru Besar  
Program Studi : Biologi Reproduksi  
Nomor HP : 087852047371  
Alamat surel (e-mail) : suherni\_s@fkh.unair.ac.id

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : drh. INDAH NORMA TRIANA M.Si  
NIDN : 0021025705  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**

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 100,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 242,000,000

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan



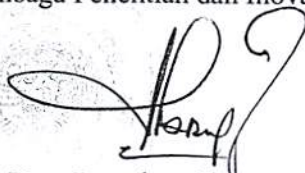
(Prof. Dr.) Pudji Srianto, Mkes, drh)  
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 9 - 11 - 2018  
Ketua,



(Dr SUHERNI SUSILOWATI, M.Kes)  
NIP/NIK 195906261987012001

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR



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

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S R G A

## RINGKASAN

Tujuan penelitian ini adalah meningkatkan populasi ternak kambing dengan cara kawin suntik. Kawin suntik pada kambing sampai saat ini belum berhasil dengan memuaskan. Hal ini disebabkan karena di dalam plasma semen kambing terdapat enzim fosfolipase A yang akan mengkoagulasi kuning telur dalam pengencer, selain itu komposisi dari membrane plasma itu sendiri yang menyebabkan kerentanan terhadap kondisi beku. Target khusus yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah meningkatkan kualitas semen beku kambing yang akan digunakan untuk kawin suntik dengan menambahkan protein plasma seminalis sapi Simental dalam bahan pengencer kuning telur sitrat dalam proses pembekuan sehingga meningkatkan kualitas spermatozoa kambing yang dibekukan. Rencana kegiatan penelitian ini terdiri dari 2 tahun. Tahun pertama (I) yaitu penambahan protein plasma seminalis sapi Simental dalam pengencer kuning telur sitrat dalam proses pendinginan maupun pembekuan semen kambing. Protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam bahan pengencer 2,5 mg dan 5 mg/ml kemudian dilakukan pembekuan. Tahun kedua (II) yaitu proses kawin suntik pada kambing dengan menggunakan semen beku yang telah diproses tersebut sampai terjadi kebuntingan. Pada tahun I dilakukan posthawing dan dilakukan evaluasi meliputi motilitas, viabilitas, membrane plasma utuh, nekrosis dan apoptosis. Untuk kegiatan tahun kedua dilakukan kawin suntik pada kambing dengan terlebih dahulu disinkronisasi dan disuperovulasi. Data yang diperoleh dianalisis dengan F Test.

Kesimpulan yang didapat pada tahun I adalah penambahan protein plasma seminalis sapi Simental dapat memperbaiki kualitas semen beku kambing posthawing dan dosis sebesar 2,5 mg/ml bahan pengencer menunjukkan persentase yang paling baik dengan parameter motilitas, viabilitas dan membrane plasma utuh meningkat, nekrosis dan apoptosis spermatozoa persentasenya menurun baik pada penyimpanan suhu dingin maupun posthawing.

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

## PRAKATA

Berkat rahmat Allah SWT, kegiatan penelitian ini dapat berjalan dengan lancar dan selesai 100% .

Pada kesempatan ini tim peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi
2. Rektor Universitas Airlangga
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga
4. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Atas selesainya penelitian tahun I ini

Surabaya, 10 Nopember 2018

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Pengesahan .....	i
Ringkasan .....	ii
Prakata .....	iii
Daftar Isi .....	iv
Daftar Tabel .....	v
Daftar Gambar .....	vi
Daftar Lampiran .....	vii
BAB 1. Pendahuluan .....	1
BAB 2. Tinjauan Pustaka .....	6
BAB 3. Tujuan Dan Manfaat Penelitian .....	11
BAB 4. Metode Penelitian .....	12
BAB 5. Hasil dan Luaran Yang Dicapai .....	18
BAB 6. Rencana Tahapan Berikutnya .....	28
BAB 7. Kesimpulan Dan Saran .....	29
Daftar Pustaka .....	30
Lampiran I. Accepted Artikel ilmiah pada Philipp. J. Vet.Med .....	33
Lampiran II. Draft HKI .....	47

## DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi	18
Table 2. Band protein plasma seminalis sapi Simental (SDS-PAGE)	19
Table 3. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar kambing	20
Tabel 4. Rataan motilitas spermatozoa kambing pada suhu dingin	21
Tabel 5. Rataan viabilitas spermatozoa kambing pada suhu dingin	21
Tabel 6. Rataan membrane plasma utuh spermatozoa kambing pada suhu dingin	22
Table 7. Rataan kualitas spermatozoa kambing post thawing	23



## DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Spermatozoa yang mengalami hidup dan mati	22
Gambar 2. Spermatozoa yang membrannya utuh dan tidak	23
Gambar 3. Spermatozoa yang mengalami nekrosis dan tidak	24
Gambar 4. Spermatozoa yang mengalami apoptosis dan tidak	25

## BAB I. PENDAHULUAN



### 1.1. Latar Belakang

Penyediaan pangan-termasuk pangan asal hewan-akan terus menjadi tantangan bagi negara manapun di dunia, karena kecepatan perkembangan penduduk dan tingkat pendapatan telah menjadi suatu keniscayaan. Untuk memenuhi kebutuhan pangan sumber karbohidrat, sudah menjadi isu penting bagi negara-negara dengan sumberdaya yang terbatas, sementara kebutuhan pangan dasar terus meningkat. Ketahanan pangan nasional di Indonesia memiliki beberapa karakteristik, termasuk keharusan berorientasi kepada kepentingan sosial dan ekonomi, serta kebutuhan gizi masyarakat, menjamin ketersediaan, dan aksesibilitas agar hidup sehat dan produktif. Pengertian ketahanan pangan ini adalah suatu kondisi terpenuhinya pangan bagi masyarakat secara cukup, baik dalam jumlah maupun mutu yang, aman, merata, dan terjangkau.

Upaya untuk memenuhi ketahanan pangan tersebut, masih menyimpan sejumlah masalah besar, yakni bibit betina yang produktif, pejantan yang unggul, dan keberhasilan inseminasi buatan yang sampai saat ini belum tuntas. Potensi permintaan daging di Indonesia sangat besar. Dengan jumlah penduduk Indonesia saat ini lebih dari 200 juta dengan tingkat pertumbuhan sekitar 1,5% pertahun dan elastisitas permintaan daging yang tinggi, maka peningkatan pendapatan dan pertambahan penduduk secara nyata meningkatkan jumlah permintaan akan daging setiap tahunnya. Oleh karena itu, pemerintah terus berupaya mendorong perkembangan industri peternakan di Indonesia.

Berbagai teknologi telah diciptakan dan dipergunakan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak. Inseminasi buatan (kawin suntik) merupakan awal pemakaian bioteknologi reproduksi pada hewan jantan. Teknik inseminasi buatan pada kambing mempunyai keuntungan, yaitu selain mengoptimalkan penggunaan pejantan, peternak tidak perlu mengeluarkan biaya untuk pemeliharaan pejantan dan dapat memperbaiki kualitas genetik

dalam waktu yang relatif singkat. Teknologi inseminasi buatan (kawin suntik) telah lama berkembang di Indonesia terutama pada ternak besar (sapi potong dan sapi perah) dengan hasil yang cukup baik. Namun, pada ternak kecil seperti domba dan kambing masih sangat terbatas. Di masa mendatang, inseminasi buatan ini akan memegang peranan penting dalam program-program peternakan domba atau kambing di Indonesia, walaupun penerapannya masih dalam taraf uji coba dan hasilnya belum banyak dilaporkan. Salah satu faktor pendukung dalam upaya mengoptimalkan program inseminasi buatan (kawin suntik) pada ternak kambing adalah tersedianya *frozen semen* (semen beku) yang memenuhi standar minimal. Saat ini sangat sulit untuk mendapatkan semen beku kambing yang memenuhi standar minimal yang layak digunakan dalam program inseminasi buatan. Proses pembekuan menyebabkan kerusakan fungsi maupun struktur membran dan kemampuan spermatozoa untuk mempertahankan hidup (Lessard *et al*, 2000). Kualitas frozen semen merupakan salah satu faktor pembatas terhadap keberhasilan program inseminasi buatan pada kambing. Permasalahan frozen semen atau semen beku adalah rendahnya kualitas semen setelah pengenceran kembali atau yang disebut dengan *thawing*, yang ditandai dengan terjadinya perubahan fungsional spermatozoa ultrastruktur, kerusakan membran plasma dan tudung akrosom yang menyebabkan terjadinya penurunan motilitas, daya hidup yang berakibat kegagalan fertilisasi. Ada tiga faktor yang diduga sebagai penyebab rendahnya kualitas semen beku kambing yaitu: 1) *cold shock* (kejutan dingin) yang berakibat perubahan isotonis (tekanan osmotik) dari pembentukan kristal-kristal es; 2) Plasma semen kambing mengandung *egg yolk coagulating enzyme* yang diduga enzim fosfolipase A yang disekresikan oleh kelenjar *bulbourethralis*; dan 3) *triglycerol lipase* yang juga berasal dari kelenjar *bulbourethralis* (Susilowati, 2016).

Tujuan dari proses pembekuan adalah mempertahankan sesempurna mungkin beberapa sifat dari materi biologis terutama viabilitasnya (Supriatna dan Pasaribu, 1992).Kendala

utama dari proses pembekuan ini adalah terjadinya kerusakan sel. Penyebabnya antara lain karena proses dehidrasi tidak terjadi sehingga terbentuk kristal-kristal es intraseluler yang dapat merusak sel. Selain itu juga dapat karena peningkatan osmolaritas media pembekuan sehingga krioprotektan bersifat racun selanjutnya terjadi kerusakan fisik yaitu terbentuknya kristal es ekstraseluler, toksisitas dari elektrolit yang pekat atau terjadinya osmotic swelling (Kassai, 1996). Kerusakan selama pembekuan bisa terjadi pada membrane plasma maupun pada inti spermatozoa.(apoptosis). Membran plasma spermatozoa tersusun atas lipid, protein dan karbohidrat. Asam lemak tak jenuh pada lipid pada kambing mempunyai kandungan yang tinggi dibanding dengan ruminansia lain, oleh karena itu pada proses pembekuan membran lipid spermatozoa kambing mudah terinduksi sehingga terjadi Lipid Peroxidation (LPO). Kerentanan suhu dingin dikaitkan dengan rasio asam lemak tak jenuh yang tinggi dari pada lemak jenuh sehingga Reactive Oxygen Species (ROS) yang terbentuk juga tinggi yang hasil akhirnya adalah Malondialdehid (Bansal and Bilaspuri, 2010). Inisiasi apoptosis bisa terjadi akibat signal intrinsik yang dihasilkan oleh sel yang mengalami stress. Jalur intrinsik atau jalur mitokondria dimulai dengan permeabilisasi selaput luar mitokondria. Permeabilisasi ini bergantung pada *permeability transition pore* (PT pore). Terbukanya PT pore akan berakibat masuknya air kedalam matrik mitokondria sehingga ruang intermembran membengkak dan membrane luar robek. Robeknya selaput luar mitokondria berakibat keluarnya protein-protein proapoptogenik (Crompton *et al*, 1998). Beberapa protein yang dilepas antara lain *cytokrom c*, *apoptosis inducing factor* (AIF) dan endonuklease G (Liet *al*, 2001). Cytochrome C bersama dengan Apaf-1 serta procaspase 9 membentuk ikatan kompleks yang disebut apoptosome yang nantinya akan mengaktifkan caspase efektor hingga terjadinya apoptosis (Zou *et al*, 1999). AIF dan endonuklease G berkontribusi akan terjadinya fragmentasi DNA dan kondensasi kromatin yang merupakan tanda khas terjadinya apoptosis (Loo *et al*, 2001) Pelepasan *cytochrome C* ke sitosol dari mitokondria akan membentuk suatu

kompleks multimerik dan *cytochrom c*, *apaf 1* dan *procaspase 9* yang disebut apoptosom. Di dalam apoptosom segera *procaspase 9* akan diaktifkan menjadi caspase 9 suatu enzyme yang kemudian akan mengaktifkan *procaspase 3* menjadi caspase 3 suatu caspase eksekutor (Peterson *et al*, 2010)

Plasma seminalis dari semen terdiri dari bermacam-macam komponen biokimia yang spesifik yang mengatur fungsi spermatozoa. Menurut Riadi (2004) komposisi utama plasma semen air dan juga beberapa substansi organik dan anorganik. Plasma seminalis juga mengandung *factor dekapasitasi* (DF) yang pada waktu ejakulasi melapisi permukaan spermatozoa. Faktor-faktor dekapasitasi tersebut akan mengikat permukaan spermatozoa mengaktifkan kalsium intraseluler-ATP ase untuk mempertahankan konsentrasi kalsium intraseluler tetap rendah (Baldi *et al*, 2000). Plasma semen mengandung bahan yang bersifat sebagai antioksidan seperti vitamin C, zink, transferin, laktoferin dan albumin (Subratha, 1998). Faktor yang terdapat didalam plasma seminalis dapat mempengaruhi viabilitas, motilitas dan integritas membrane spermatozoa dalam keadaan dingin (Beatriz *et al*, 2000). Perbaikan terhadap membrane plasma sel akan berpengaruh positif terhadap proses-proses biokimia di dalam sel dan pada akhirnya dapat memperbaiki kualitas spermatozoa yang lain seperti motilitas dan viabilitas spermatozoa. Penelitian biomolekuler membuktikan bahwa dengan penambahan beberapa protein saja dapat memperbaiki proses fertilisasi tetapi juga dapat mempertahankan kehidupan sel.

Sampai saat ini proses pembekuan semen kambing baik kambing kacang maupun kambing peranakan etawah (PE) post thawing masih belum memuaskan, hal ini disebabkan karena plasma seminalis kambing mengandung enzim *fosfolipase A* dari kelenjar bulbourethralis yang dapat mengkoagulasi kuning telur dalam bahan pengencer (Evans and Maxwell, 1988). Selain itu membrane plasma spermatozoa kambing rentan terhadap cekaman dingin, oleh karena itu peneliti ingin meneliti hasil fertilisasi dengan menggunakan semen

beku kambing PE dengan menggunakan diluter kuning telur yang ditambah dengan protein plasma seminalis sapi Simental.

## 1.2. Perumusan Masalah

1. Apakah protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat meningkatkan persentase motilitas spermatozoa beku kambing PE post thawing
2. Apakah protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat meningkatkan persentase viabilitas spermatozoa beku kambing PE post thawing
3. Apakah protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat meningkatkan persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa beku kambing PE post thawing
4. Apakah protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat menurunkan persentase nekrosis spermatozoa beku kambing PE post thawing
5. Apakah protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat menurunkan persentase apoptosis spermatozoa kambing PE post thawing

## BAB. 2. TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1. Semen atau air mani

Semen atau air mani merupakan cairan yang dikeluarkan oleh alat kelamin jantan yang terdiri dari 2 bagian yaitu : sel gamet jantan atau spermatozoa dan cairan semen atau yang disebut dengan cairan asesoris. Cairan asesoris atau yang disebut dengan plasma seminalis mempunyai fungsi utama sebagai media pembawa spermatozoa di dalam saluran reproduksi hewan betina. Plasma seminalis mengandung bahan organik dan anorganik yang digunakan sebagai sumber energi untuk kelangsungan hidup dan pergerakan spermatozoa (Hardijanto, dkk; 2010). Plasma semen mengandung asam askorbat, asam amino, peptida, protein, lipid, asam lemak, beberapa enzim, antimikroba yaitu Imunoglobulin A dan beberapa hormon (Susilowati dan Hernawati, 2013). Plasma semen mengandung berbagai macam protein yang berasal dari kelenjar asesoris dan sebagian besar turut berkontribusi dalam fertilitas. maupun fungsi spermatozoa protein tersebut dapat bertindak sebagai stimulator maupun inhibitor berbagai reaksi biokimia dalam spermatozoa (Muino-Blanco *et al*, 2008)

Spermatozoa mempunyai struktur yang cukup padat dan tidak mudah terdispersi kecuali membran plasma. Morfologi spermatozoa terdiri dari tiga bagian yaitu bagian kepala, leher dan ekor (Garner and Hafez, 2000). Kepala spermatozoa berbentuk oval, mengandung nukleus dengan kromatin yang padat sekali. Kromatin terdiri dari DNA yang kompleks dari protein dasar (protamine). Inti ada di dalam kepala dan mempunyai ukuran kira-kira sepertiga panjang kepala, mengandung bahan genetik yang dibutuhkan pada saat membuahi sel telur. Inti spermatozoa mengandung kromosom yaitu separuh dari jumlah kromosom inti yang diploid pada sel somatik. Bagian tengah merupakan pusat tenaga spermatozoa karena adanya mitokondria di dalamnya. Ekor spermatozoa menyerupai flagelum. Bagian leher juga mengandung sentriol proksimal sebagai pusat kinetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak.

## 2.2. Bahan pengencer semen

Bahan pengencer yang dipakai untuk penyimpanan harus sedemikian rupa sehingga kualitas yang baik dari semen yang disimpan dapat dipertahankan. Adapun tujuan pengenceran adalah untuk meningkatkan volume semen yang diperoleh (Hardijanto, dkk, 2010). Syarat bahan pengencer yang baik adalah sebagai berikut : mempunyai tekanan osmose isotonis dengan darah dan dapat mempertahankan tekanan isotonis selama penyimpanan, memberikan imbalan unsur mineral yang dibutuhkan untuk kehidupan spermatozoa, menyebabkan bahan makanan spermatozoa untuk proses metabolisme aerob dan an aerob, memiliki lipoprotein atau lecitin untuk melindungi spermatozoa untuk kejutan dingin, menyediakan penyanggah terhadap produk akhir metabolisme yang bersifat racun terhadap spermatozoa, merupakan bahan reduksi untuk melindungi enzim seluler yang mengandung sulfhydryl, bebas dari substansi produk kuman-kuman atau organisme yang berbahaya bagi spermatozoa, alat reproduksi betina, fertilisasi, implantasi dan pengembangan ovum yang difertilisasi (Salisbury dan Van Denmark, 1985).

Keisotonisan larutan pengencer berguna untuk menjaga keseimbangan cairan yang ada di dalam sel dan diluar sel karena bila larutan pengencer bersifat hipotonik maka cairan yang ada di luar sel akan masuk ke dalam sel dan apabila larutan pengencer bersifat hipertonik cairan yang ada di dalam sel akan terserap ke luar. Keadaan diatas dapat terjadi karena dinding sel bersifat semipermeabel. Larutan pengencer yang bersifat hipotonik atau hipertonik sangat berbahaya bagi kehidupan sel (Bearden & Fuquay, 1980).

## 2.3. Protein

Protein merupakan makromolekul yang menyusun lebih dari sebagian dari sel. Protein menentukan ukuran dan struktur sel, komponen utama dari sistem komunikasi antar sel serta sebagai katalis berbagai reaksi biokimia di dalam sel. Semua jenis protein terdiri dari



rangkaian dan kombinasi dari 20 asam amino. Setiap jenis protein mempunyai jumlah dan urutan asam amino yang khas. Di dalam sel, protein terdapat pada membran plasma maupun pada membran internal yang menyusun organel sel seperti mitokondria, retikulum endoplasma, nukleus, dan badan golgi yang berbeda-beda tergantung pada tempatnya (Fatchiyah dkk, 2011).

Protein merupakan biomakromolekul yang sangat heterogen ketika berada di makhluk hidup atau sel, protein sangat tidak stabil, untuk mempertahankan fungsinya setiap jenis protein membutuhkan kondisi tertentu ketika diekstraksi dari normal biological milieu. Protein yang diekstraksi hendaknya dihindarkan dari proteolisis atau dipertahankan aktivitas enzimatisnya. Untuk menganalisis protein yang ada di dalam sel diperlukan prosedur fraksinasi sel, yaitu (1) memisahkan sel dari jaringannya, (2) menghancurkan membran sel untuk mengambil kandungan sitoplasma dan organelnya, serta (3) memisahkan organel-organel dan molekul penyusunnya. Prosedur 1 dan 2 dinamakan homogenisasi. Homogenisasi dapat dilakukan dengan alat homogenizer atau mortir, sampai dengan menggunakan yang paling mutakhir seperti vibrasi atau sonikasi. Sedangkan prosedur 3 dilakukan dengan menggunakan sentrifus dengan kecepatan dan lama sentrifugasi tertentu dan untuk mempertahankan struktur dan fungsi protein, fraksinasi dilakukan pada suhu 0-4° C dalam buffer dan pH tertentu (tergantung dari jenis protein yang dianalisis) (Fatchiyah., 2011).

#### 2.4. Pembekuan Semen

Pembekuan merupakan suatu fenomena pengeringan fisik, dimana pada pembekuan tersebut terbentuk kristal-kristal es, penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel. Kristal sel intraseluler dapat merusak spermatozoa secara mekanik. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding

spermatozoa. Waktu thawing semen beku akan menyebabkan perubahan permeabilitas membran spermatozoa yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa (Toelihere, 1993).

Pada proses penyimpanan suhu rendah akan terjadi cold shock yang akan menyebabkan terjadinya perubahan susunan lipid membran dan fluiditas membran akhirnya terjadi pelepasan komponen fosfolipid dan kolesterol (Watson and Morris, 1987) serta hilangnya beberapa proteinase akrosin (Church and Graves, 1976) yang menyebabkan hilangnya integritas membran. Selama penyimpanan pada suhu dingin akan terbentuk Reactive Oxygen Species (ROS) yang akan menyebabkan oksidasi baik lipid maupun protein membran sehingga integritas membran spermatozoa terganggu (Sanocka and Kurpisz, 2004). Perubahan integritas membran akan menyebabkan pemasukan sodium dan kalsium ke dalam sel serta pemasukan oksigen juga menurun akibatnya aktivitas metabolik dan motilitas akan menurun (White, 1993).

## 2.5. Membran plasma spermatozoa

Membran spermatozoa mempunyai fungsi seperti perlekatan spermatozoa dengan sel telur, transport substrat dan metabolisme. Membran bagian kepala berfungsi untuk menembus sel telur pada proses fertilisasi, membran bagian luar akrosom berfungsi mengadakan kontak pertama dan menjadi satu dengan oolema sel telur pada proses fertilisasi sedangkan membran pada bagian ekor mempunyai fungsi untuk mendapatkan substrat untuk energi spermatozoa dan menghantar gelombang gerakan. Membran spermatozoa terdiri dari 43% lipid (dua lapis fosfolipid), 48 % protein dan 9% karbohidrat (Hardijanto, dkk; 2010). Keutuhan membran plasma sangat diperlukan oleh spermatozoa, karena kerusakan membran akan berpengaruh terhadap proses metabolisme dan berhubungan dengan motilitas serta daya hidup spermatozoa (Soler et al, 2003).

## 2.6. Fertilisasi

Keberhasilan fungsi spermatozoa dalam fertilisasi dipengaruhi oleh kualitasnya. Spermatozoa yang normal mempunyai kualitas baik sehingga mampu melakukan kapasitasi, reaksi akrosom dan menerobos dinding zona pelusida sel telur pada saat fertilisasi. Fertilisasi terjadi karena adanya pertemuan antara spermatozoa dan oosit. Spermatozoa dalam menjalankan fungsinya untuk fertilisasi dilengkapi dengan kemampuan untuk bergerak. Kemampuan ini datangnya tidak begitu saja melainkan melalui banyak proses, ketika spermatozoa keluar dari tubulus seminiferus menuju epididimis, ditempat inilah spermatozoa mulai bergerak (Hayati, 2011).

### BAB.3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan khusus penelitian : untuk mengetahui peran protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur sitrat terhadap kualitas spermatozoa beku kambing dan mengetahui keberhasilan kawin suntik pada kambing tersebut.

3.2. Manfaat penelitian : adalah kualitas dari semen beku kambing dapat ditingkatkan sehingga pada program kawin suntik keberhasilannya meningkat dan akhirnya populasi ternak kambing juga meningkat, kebutuhan protein hewani terpenuhi.

M I L I K  
P E R P U S T A K A A N  
U N I V E R S I T A S A I R L A N G G A  
S U R A B A Y A

## BAB.4. METODE PENELITIAN

### 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung 2 tahun. Tahun I yaitu aplikasi protein plasma seminalis sapi Simental dalam bahan pengencer (kuning telur sitrat) semen kambing sampai tahap pembekuan, selanjutnya dilakukan kawin suntik pada kambing dengan menggunakan semen beku yang telah diproduksi untuk tahun II. Penampungan semen, pemeriksaan kualitas spermatozoa dan pembuatan semen beku dilakukan di Teaching Farm Fakultas Kedokteran Hewan. Begitu juga kawin suntik pada kambing juga dilakukan di Teaching Farm Fakultas Kedokteran Hewan Unair.

### 4.2. Variabel penelitian :

1. Variabel bebas : macam bahan pengencer dan dosis protein plasma seminalis
2. Variabel tergantung : motilitas spermatozoa, viabilitas spermatozoa, keutuhan membran plasma spermatozoa, nekrosis dan apoptosis spermatozoa dan angka kebuntingan setelah kawin suntik dengan cara mengukur kadar hormon progesteron atau palpasi abdominal.
3. Variabel kendali : umur kambing, pakan dan pemeliharaan

### 4.3. Definisi operasional penelitian :

1. Motilitas spermatozoa : spermatozoa yang bergerak aktif maju ke depan dalam satu lapang pandang
2. Viabilitas spermatozoa : spermatozoa yang hidup bagian kepala spermatozoa dengan pewarnaan eosin negrosin berwarna jernih.
3. Keutuhan membran spermatozoa : persentase jumlah spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh yang ditandai dengan adanya pembengkakan pada kepala spermatozoa dan adanya ekor yang melingkar yang diuji dengan teknik Hypoosmotik Swelling Test

4. Nekrosis : persentase kematian spermatozoa yang ditandai dengan inti mengalami picnotis, kariorexis, dan kariolysis yang diketahui dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) yang ditemukan pada lima lapang pandang yang berbeda pada pembesaran 400 kali per 100 spermatozoa
5. Apoptosis : persentase kerusakan /fragmentasi DNA spermatozoa yang diuji dengan pewarnaan Acridin Orange dan diamati dengan mikroskop fluorescen. Spermatozoa yang terlihat berwarna kehijauan berarti spermatozoa tidak mengalami fragmentasi DNA, sedangkan yang berwarna kuning sampai orange berarti spermatozoa mengalami fragmentasi DNA.
6. Inseminasi Buatan : kawin suntik pada kambing dengan menggunakan semen beku kemudian dilakukan test hormon progesteron

#### 4.4. Tahapan Penelitian

##### 1. Penampungan Semen

Semen ditampung dari sapi pejantan Simental dengan menggunakan vagina buatan yang dilengkapi dengan tabung gelas penampung berskala. Vagina buatan disiapkan dengan memasang kedua selubung dan alat penampung yang telah disterilkan, sedangkan ruangan antara selubung luar dan dalam diisi dengan air hangat yang bersuhu 45° C dengan tujuan memberi suhu terhadap selubung dalam sebesar 42-43°C dan sepertiga bagian depan selubung dalam vagina buatan diolesi vaselin. Setelah vagina buatan selesai dipersiapkan, pejantan diberi rangsangan dengan betina pemancing kemudian dilakukan penampungan semen. Segera setelah penampungan, semen dibawa ke laboratorium untuk dipisahkan dari spermatozoa dan plasmanya digunakan untuk diambil proteinnya yang terlebih dahulu dipurifikasi dan dilakukan running protein supaya dapat menggambarkan ada berapa protein yang ada pada plasma seminalis sapi Simental yang digunakan dalam penelitian dan

selanjutnya protein plasma seminalis sapi yang sudah dipurifikasi ditambahkan kedalam bahan pengencer semen kambing.

Aplikasi protein plasma seminalis sapi Simental dalam diluter semen kambing. Semen kambing ditampung dengan vagina buatan kemudian diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi dan pH serta pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, viabilitas, konsentrasi dan resistensi test. Apabila semen yang diperiksa memenuhi syarat yaitu persentase motilitas progresif dan viabilitasnya  $\geq 70\%$  dapat dilakukan untuk penelitian lebih lanjut.

## 2. Pembuatan Bahan Pengencer Kuning Telur Sitrat

Telur dibersihkan kemudian dipisahkan kuningnya, setelah itu ditambah dengan larutan sitrat dengan perbandingan 1 : 4. Ditambah Penicillin 1.000 IU/ ml dan Streptomycin 1 mg/ ml bahan pengencer. Setelah bahan pengencer disiapkan kemudian semen kambing yang ditampung ditambahkan protein plasma seminalis sapi dan bahan pengencer kuning telur sitrat. Perlakuan kontrol (PO) adalah bahan pengencer + semen kambing, Perlakuan I (PI) adalah bahan pengencer + semen kambing + protein plasma seminalis sapi 2,5 mg/ ml bahan pengencer, Perlakuan II (PII) adalah bahan pengencer + semen kambing + protein plasma seminalis sapi 5 mg/ ml bahan pengencer. Kemudian ketiga perlakuan tersebut dilakukan pembekuan selanjutnya dithawing pada suhu 37°C selama 10 detik dan diperiksa motilitas, viabilitas, keutuhan membran plasma, nekrosis dan fragmentasi DNA spermatozoa (apoptosis).

Metode pemeriksaan :

### 1. Motilitas spermatozoa

Sebanyak 10  $\mu$ l suspensi semen ditambah dengan 10  $\mu$ l Na Cl fisiologis dihomogenkan dan ditetaskan pada obyek glass kemudian ditutup dengan gelas penutup dan

diamati berapa banyak spermatozoa yang bergerak progresif (maju ke depan) dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400 kali. Motilitas spermatozoa ditentukan dengan menghitung pergerakan spermatozoa motil (bergerak maju) dan tidak motil sampai sebanyak 100 spermatozoa. Motilitas spermatozoa dibagi menjadi 4 kriteria yaitu bergerak maju ke depan, bergerak mundur, bergerak berputar atau ditempat dan tidak bergerak.

## 2. Viabilitas spermatozoa

Semen segar diteteskan pada gelas obyek ditambahkan eosin negrosin dicampur sampai homogen dan dibuat preparat ulas, dikeringkan diatas nyala api dengan cepat. Hasil ulasan diperiksa dengan mikroskop perbesaran 400 kali. Jumlah persentase spermatozoa yang mati dan hidup dihitung dengan ulangan 3 kali dan tiap perhitungan dalam 100 spermatozoa. Penilaian terhadap viabilitas spermatozoa adalah sebagai berikut: spermatozoa yang hidup kepalanya terlihat transparan atau berwarna jernih. Spermatozoa yang mati membran plasmanya rusak, permeabilitas meningkat akhirnya zat warna masuk ke dalam sel dan kepalanya nampak kemerahan. (Susilowati, dkk 2010)

## 3. Pengujian keutuhan membran plasma spermatozoa dengan Hipoosmotic Swelling Test.

Sebanyak 1 ml larutan hipoosmotic (7,35 gram Na Citrat 2 H<sub>2</sub>O, 13,52 gram fruktosa dilarutkan dalam 1000 ml aquades) ditambah dengan 0,1 ml spermatozoa kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit dan diamati dengan mikroskop pembesaran 400 x. Spermatozoa dengan membrane plasma utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar karena membrane plasma spermatozoa masih berfungsi dengan baik dalam penyerapan air pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Spermatozoa yang membrannya rusak ditandai dengan ekor yang lurus (Susilowati, 2007).

## 4. Pemeriksaan nekrosis spermatozoa

Persentase kematian spermatozoa yang ditandai dengan inti mengalami picnotis, kariorexis, dan kariolysis yang diketahui dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) yang



ditemukan pada lima lapang pandang yang berbeda pada pembesaran 400 kali per 100 spermatozoa

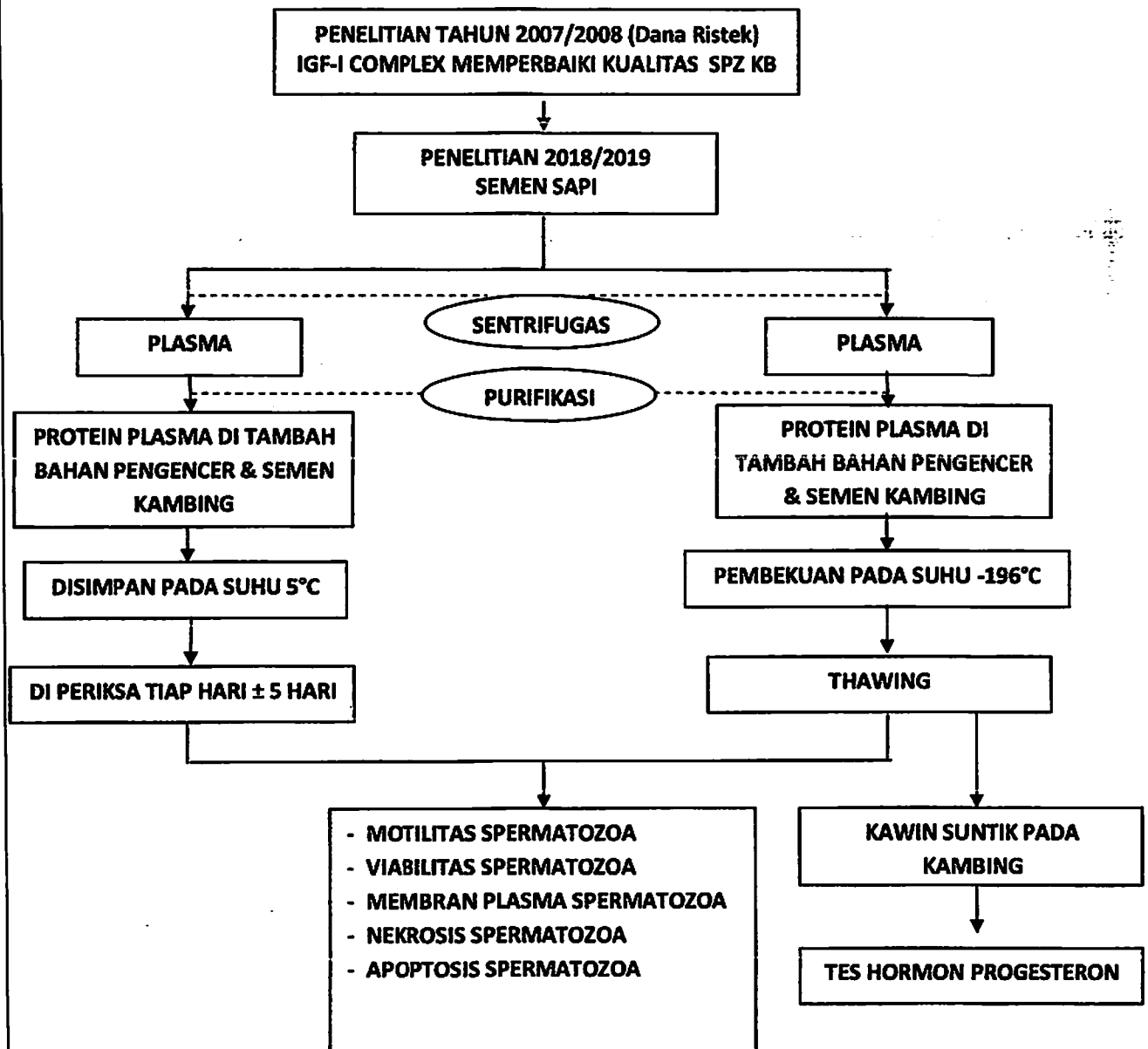
#### 5. Pemeriksaan apoptosis spermatozoa dengan pewarnaan acridin orange

Satu tetes semen dibuat preparat ulas, didiamkan 10 menit disuhu kamar, difiksasi dengan metanol dan acid glacial (3:1) selama 30 menit. Selanjutnya ditetesi pewarna acridin orange ditutup dengan cover glass. Diperiksa dengan mikroskop fluorescen, bila spermatozoa berwarna hijau berarti tidak mengalami apoptosis dan bila spermatozoa berwarna kuning sampai keorangean berarti mengalami apoptosis.

#### 4.5. Analisa Data

Data hasil yang diperoleh ditabulasikan sesuai dengan variabel yang diamati. Hasil pengamatan motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, nekrosis dan fragmentasi DNA spermatozoa dilakukan dengan F Test dan bila ada perbedaan dilanjutkan dengan Uji BNT. Sedangkan untuk angka kebuntingan dilakukan pencatatan data (deskriptif). (Santoso dan Fandy, 2001)

#### 4.6. BAGAN ALIR PENELITIAN



## BAB.5. HASIL DAN LUARAN PENELITIAN

### 5.1. Hasil Penelitian

#### 5.1.1. Penampungan semen sapi Simental

Penelitian ini membutuhkan semen sapi Simental untuk diambil protein plasma seminalisnya. Semen sapi yang ditampung dengan vagina buatan dilakukan pemeriksaan secara makroskopis ( volume, pH, bau, konsistensi dan warna), pemeriksaan secara mikroskopis yaitu konsentrasi, motilitas massa dan individu serta ketahanan hidup ( viabilitas) spermatozoa (Tabel 1).

Tabel 1. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi Simental

Indikator	Karakter
Warna	Putih kekuningan
Bau	Khas
Volume (ml)	7,16 ± 1,52
pH	6-7
Konsistensi	Kental
Konsentrasi (juta) spz/mm <sup>3</sup>	1040 ± 236,45
Motilitas massa	+++
Motilitas individu (%)	85,83 ± 2,69
Viabilitas (%)	94,65 ± 2,26

#### 5.1.2. Hasil fraksi –fraksi protein plasma seminalis sapi Simentaldengan menggunakan SDS-PAGE

Hasil deskriptif berat molekul (BM) masing-masing fraksi protein plasma seminalis sapi Simental berdasarkan migrasi protein pada Native Page dengan menggunakan separating gel 12,5% dan stacking gel 3% yang diwarnai dengan *Commassie Brilliant Blue*(CBB). Hasil isolate protein plasma seminalis sapi Simental ditemukan ada 8 pita (band) dapat dilihat pada tabel 2.

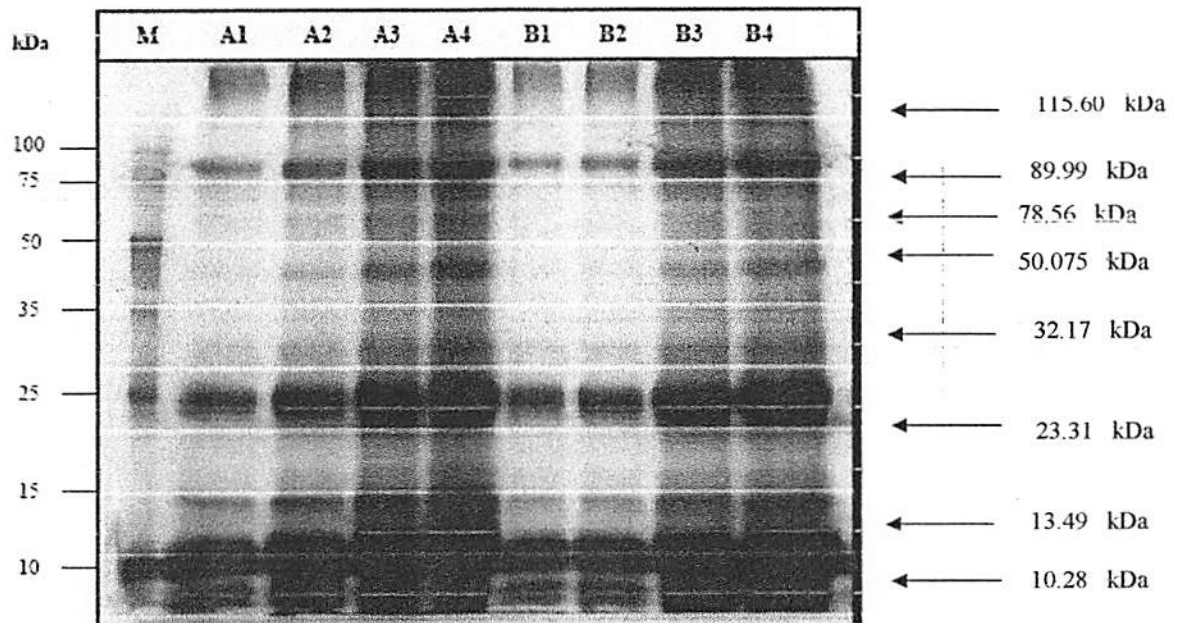
**Tabel 2. Protein plasma seminalis sapi Simental ada 8 pita (band)**

<b>Band</b>	<b>Rerata <math>\pm</math> SD (kDa)</b>
Band I	115,60 $\pm$ 0,25
Band II	89,99 $\pm$ 0,45
Band III	78,56 $\pm$ 0,20
Band IV	50,075 $\pm$ 0,10
Band V	32,17 $\pm$ 0,15
Band VI	23,31 $\pm$ 0,70
Band VII	13,49 $\pm$ 0,15
Band VIII	10,28 $\pm$ 0,20

**5.1.3. Hasil konsentrasi protein plasma seminalis sapi Simental dengan spektrofotometer**

1. Sampel plasma seminalis sapi sebelum dipurifikasi dengan ethanol : 41,51 mg/ml
2. Sampel plasma seminalis sapi setelah dipurifikasi dengan ethanol : 52,94 mg/ml

**5.1.4. Gambar hasil running protein plasma seminalis sapi Simental (SDS-PAGE)**



Tabel 3. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar kambing peranakan ettawa hasil penampungan yang digunakan untuk penelitian

Indikator	Karakter
Warna	Putih kekuningan
Bau	Khas
Konsistensi	Kental
pH	6,0 -7,0
Volume (ml)	2,5±0,45
Konsentrasi (juta) sel spz/mm <sup>3</sup>	3960
Motilitas massa	+++
Motilitas individu (%)	Progresif (90±0,25)
Viabilitas (%)	92±0,35
Abnormal (%)	5,60±0,15
Membran plasma utuh (%)	86±0,60

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semen kambing ettawa yang ditampung dengan vagina buatan mempunyai warna putih kekuningan, bau khas, konsistensi kental, pH 6-7,

volume  $2,5 \pm 0,45$  ml, konsentrasi  $3960 \times 10^6$  sel spz/mm<sup>3</sup>, motilitas massa +++( pergerakan membentuk gelombang besar dan banyak), motilitas individu bergerak progresif (maju kedepan), viabilitas  $92 \pm 0,35\%$ , abnormal  $5,60 \pm 0,15\%$  dan membrane plasma utuh  $86 \pm 0,60\%$ . Dari hasil pemeriksaan diatas dapat disimpulkan bahwa kualitas semen yang ditampung memenuhi persyaratan untuk digunakan penelitian lebih lanjut yaitu untuk didinginkan atau dibekukan.

Tabel 4. Rata –rata  $\pm$  SD hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa kambing ettawa yang disimpan pada suhu dingin ( $5^{\circ}\text{C}$ ) setelah penambahan protein plasma seminalis sapi dalam bahan pengencer kuning telur sitrat

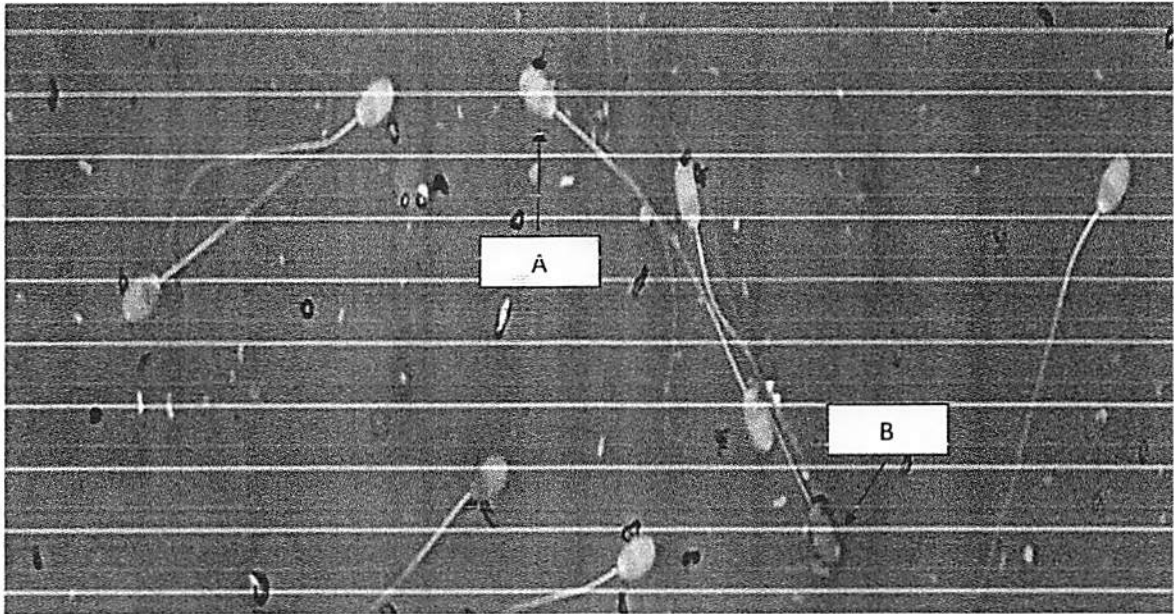
Perlakuan	Hari I (%)	Hari II (%)	Hari III (%)	Hari IV (%)	Hari V (%)
P0	$45,50^b \pm 0,50$	$44,25^b \pm 0,25$	$40,35^b \pm 0,05$	$32,45^b \pm 0,05$	$24,55^a \pm 0,10$
PI	$76,05^a \pm 0,45$	$73,40^a \pm 0,05$	$62,45^a \pm 0,85$	$53,25^a \pm 0,40$	$40,25^b \pm 0,15$
PII	$55,10^b \pm 0,55$	$48,20^b \pm 0,35$	$40,50^b \pm 0,75$	$35,10^b \pm 0,45$	$28,75^a \pm 0,75$

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).

Tabel 5. Rata –rata  $\pm$  SD hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa kambing ettawa yang disimpan pada suhu dingin ( $5^{\circ}\text{C}$ ) setelah penambahan protein plasma seminalis sapi dalam bahan pengencer kuning telur sitrat

Perlakuan	Hari I (%)	Hari II (%)	Hari III (%)	Hari IV (%)	Hari V (%)
P0	$46,50^b \pm 0,50$	$44,25^b \pm 0,05$	$39,35^b \pm 0,05$	$32,45^b \pm 0,05$	$30,25^b \pm 0,20$
PI	$74,05^a \pm 0,25$	$70,30^a \pm 0,15$	$64,45^a \pm 0,55$	$50,25^a \pm 0,40$	$34,15^a \pm 0,15$
PII	$55,10^b \pm 0,45$	$48,20^b \pm 0,25$	$44,50^b \pm 0,65$	$36,10^b \pm 0,45$	$30,55^b \pm 0,45$

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).



Gambar 1 Viabilitas spermatozoa kambing ettawa post thawing setelah bahan pengencer kuning telur ditambah dengan protein plasma seminalis sapi Simental

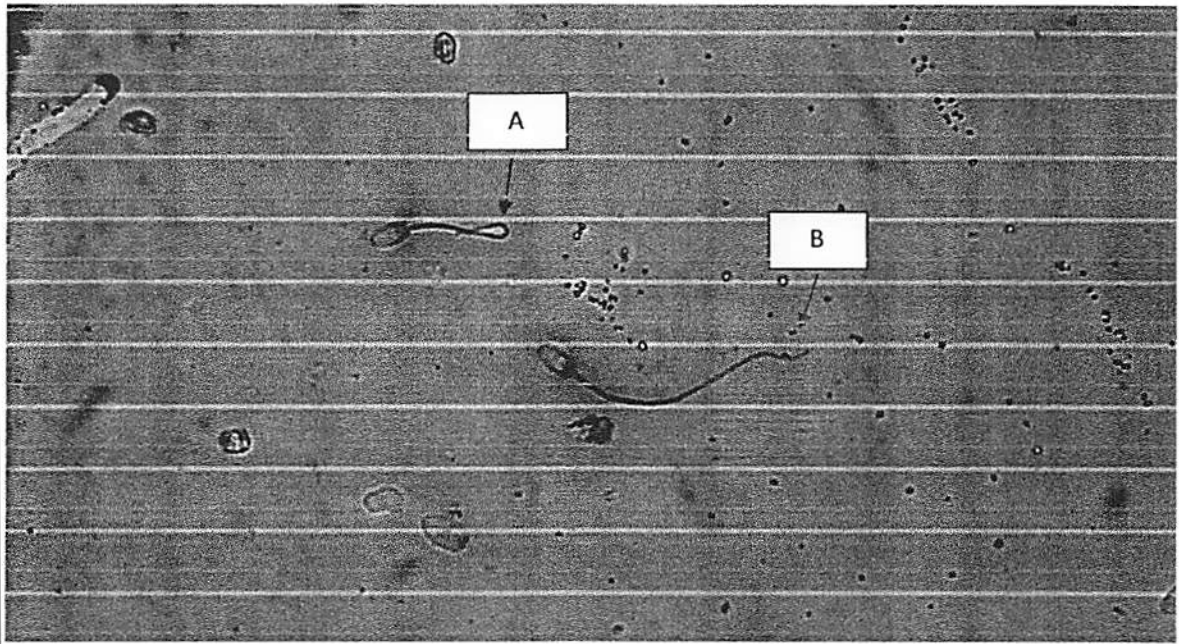
Keterangan Gambar :

- A. Spermatozoa hidup ( kepala spermatozoa tidak berwarna/ jernih)
- B. Spermatozoa mati ( kepala spermatozoa berwarna merah/ keunguan)

Tabel 6. Rata –rata ± SD hasil pemeriksaan membran plasma spermatozoa (MPU) kambing ettawa yang disimpan pada suhu dingin (5°C) setelah penambahan protein plasma seminalis sapi dalam bahan pengencer kuning telur sitrat

Perlakuan	Hari I (%)	Hari II (%)	Hari III (%)	Hari IV (%)	Hari V (%)
P0	46,50 <sup>b</sup> ±0,50	45,25 <sup>b</sup> ±0,25	42,35 <sup>b</sup> ±0,05	32,45 <sup>b</sup> ±0,05	27,55 <sup>b</sup> ±0,20
PI	78,05 <sup>a</sup> ±0,25	79,30 <sup>a</sup> ±0,15	64,45 <sup>a</sup> ±0,55	55,25 <sup>a</sup> ±0,40	44,15 <sup>a</sup> ±0,15
PII	57,10 <sup>b</sup> ±0,45	50,20 <sup>b</sup> ±0,35	44,50 <sup>b</sup> ±0,65	36,10 <sup>b</sup> ±0,45	30,55 <sup>b</sup> ±0,45

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata (p<0,05).



Gambar 2 Membran plasma spermatozoa kambing ettawa post thawing setelah bahan pengencer kuning telur ditambah dengan protein plasma seminalis sapi Simental (HOS Test)

Keterangan Gambar :

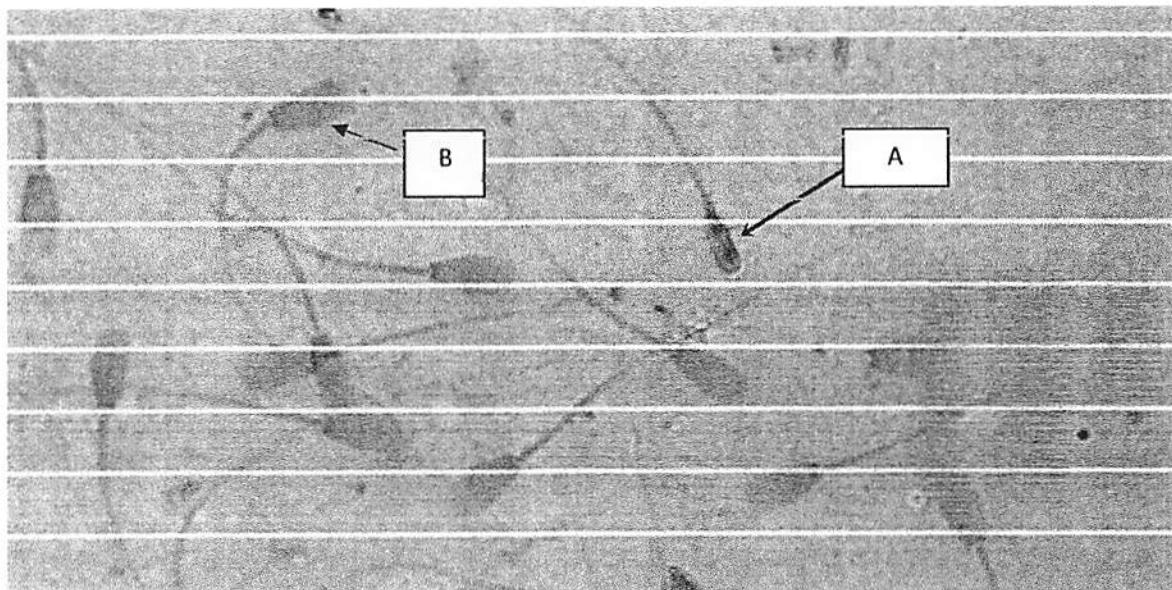
- A. Ekor spermatozoa melingkar : spermatozoa yang membrannya utuh
- B. Ekor spermatozoa lurus : spermatozoa yang membrannya rusak

Tabel 7. Rata –rata  $\pm$  SD hasil pemeriksaan motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, nekrosis dan apoptosis spermatozoa kambing ettawa post-thawing.

Perlakuan	Motilitas (%)	Viabilitas (%)	MPU (%)	Nekrosis (%)	Apoptosis (%)
PO	37,50 <sup>c</sup> $\pm$ 0,75	41,45 <sup>c</sup> $\pm$ 0,55	35,15 <sup>c</sup> $\pm$ 0,50	11,35 <sup>c</sup> $\pm$ 0,10	12,25 <sup>c</sup> $\pm$ 0,60
PI	65,05 <sup>a</sup> $\pm$ 0,45	67,75 <sup>a</sup> $\pm$ 0,40	63,05 <sup>a</sup> $\pm$ 0,70	2,05 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05	3,55 <sup>a</sup> $\pm$ 0,75
PII	52,50 <sup>b</sup> $\pm$ 0,25	53,50 <sup>b</sup> $\pm$ 0,50	50,75 <sup>b</sup> $\pm$ 0,25	7,25 <sup>b</sup> $\pm$ 0,75	8,15 <sup>b</sup> $\pm$ 0,45

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ( $p < 0,05$ )

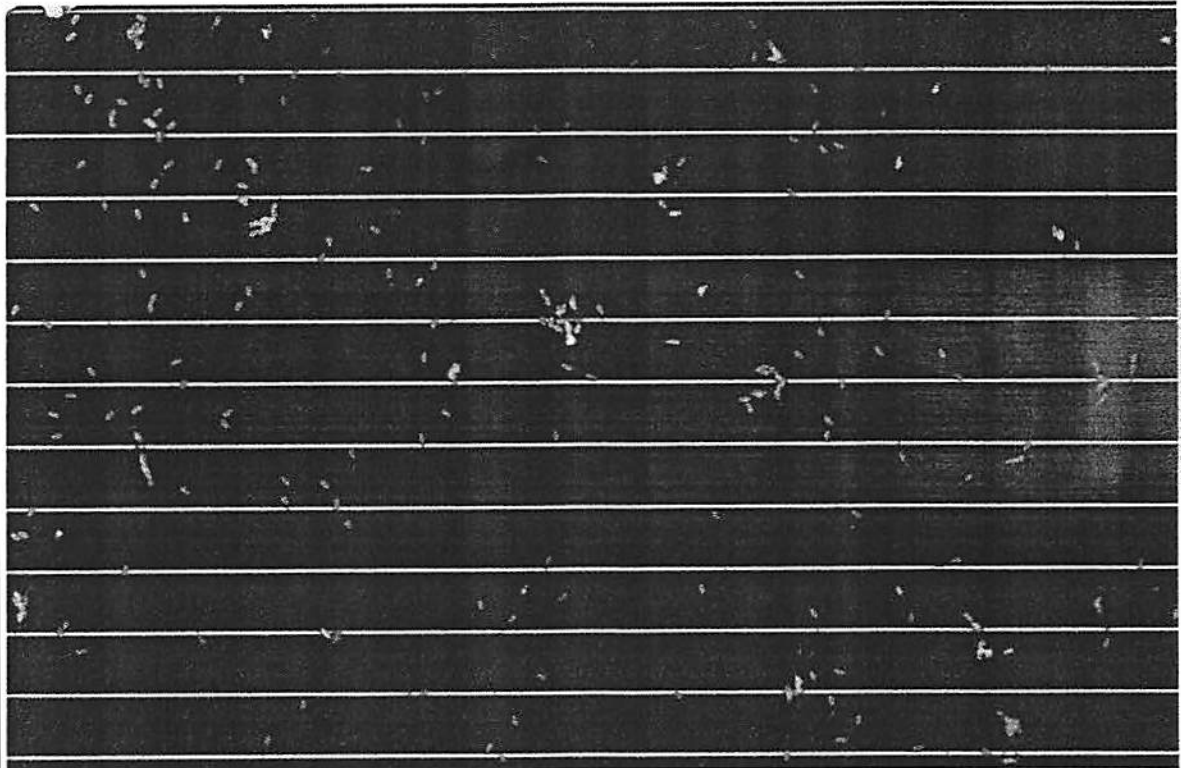




Gambar 3. Nekrosis spermatozoa kambing ettawa post thawing setelah bahan pengencer kuning telur ditambah dengan protein plasma seminalis sapi Simental

Keterangan gambar :

- A. Spermatozoa yang mengalami fragmentasi DNA (Spermatozoa yang mengalami nekrosis)
- B. Spermatozoa yang tidak mengalami nekrosis



Gambar 4. Apoptosis spermatozoa kambing ettawa post thawing setelah bahan pengencer kuning telur ditambah dengan protein plasma seminalis sapi Simental

Keterangan gambar :

Spermatozoa yang berwarna hijau adalah spermatozoa yang tidak mengalami apoptosis  
Spermatozoa yang berwarna kekuningan adalah spermatozoa yang mengalami apoptosis

Protein plasma seminalis terdiri dari campuran cairan kelenjar asesoris (Moura *et al*, 2007), cairan yang berasal dari cauda epididimis (Moura *et al*, 2010) dan dapat juga berasal dari leluhan membrane spermatozoa (Thimon *et al*, 2005). Protein yang terdapat pada plasma seminalis dihubungkan dengan berbagai fungsi spermatozoa seperti kapasitas spermatozoa (Gwathmey *et al*, 2006) dan berfungsi untuk interaksi dengan gamet (Rodrigues *et al*, 2012). Fraksi protein yang dipisahkan dari seminal plasma juga dihubungkan dengan kemampuan untuk melindungi membrane spermatozoa setelah proses pembekuan (Perez-Pe *et al*, 2001).

dapat bertindak sebagai antioksidan. Menurut penelitian Roncoletta *et al* (2000), menyatakan bahwa lebih dari 40 % protein plasma semen sapi ikut berperan dalam memodifikasi permeabilitas membrane spermatozoa. Hal tersebut juga sejalan dengan penelitian Sinha *et al*, 1996, yang menyatakan bahwa protein plasma seminalis sapi dalam melindungi spermatozoa sangat tinggi disbanding dengan protein plasma seminalis hewan lain .

## 5.2. Luaran yang dicapai

1. Accepted di Philipine Jurnal Veterinary Science
2. Draft HKI

Identifikasi fraksi protein plasma seminalis sapi Simental dengan menggunakan metode SDS-PAGE 12% dengan pewarnaan Comassie Blue terdapat 8 pita atau fraksi protein. Sebagai pembanding fraksi protein yang ada pada seminal plasma sapi Bali terdapat 12 pita (band) (Erry T, 2016). Fraksi protein plasma seminalis kambing terdapat 7 pita (band) (Susilowati, 2007). Nomenklatur protein plasma seminalis didasarkan atas mobilitas protein tersebut pada gel Native-PAGE dari atas kebawah dengan BM berturut-turut makin kecil. Dari hasil penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa banyaknya fraksi protein dalam plasma seminalis tergantung dari masing-masing species dan metodenya.

Motilitas spermatozoa merupakan parameter yang terpenting untuk mengukur fertilitas. Motilitas spermatozoa tergantung dari fungsi mitokondria. Oleh sebab itu menurunnya motilitas spermatozoa akibat pembekuan semen dapat dihubungkan dengan kerusakan mitokondria (Ruiz-Pesini *et al*, 2001). Spermatozoa yang motil pasti hidup. Ada faktor yang menyebabkan kematian spermatozoa yaitu karena permeabilitas membrane sel meningkat. (Anzar, 2002). Selama proses pembekuan terjadi depolarisasi atom atau molekul penyusun membrane sehingga dapat menurunkan fungsi fisiologis membrane (Fuller and Shields, 1998). Pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen asam amino penyusun protein membrane sehingga akan menyebabkan destabilisasi membrane yang berpengaruh terhadap proses metabolisme spermatozoa.

Penambahan protein plasma seminalis sapi Simental dalam bahan pengencer kuning telur sitrat pada proses pembekuan meningkatkan kualitas spermatozoa postthawing dan menurunkan kejadian nekrosis dan apoptosis spermatozoa dengan dosis yang paling baik yaitu 2,5 mg / ml bahan pengencer. Hal tersebut karena protein plasma seminalis sapi mampu menstabilkan membrane spermatozoa melalui ikatan hydrogen antara asam amino penyusun membrane ketika didinginkan atau dibekukan, sehingga berpengaruh positif terhadap motilitas dan viabilitas (Juyena and Calegero, 2012). Selain itu protein plasma seminalis sapi

## BAB 6. RENCANA TAHUN BERIKUTNYA

Rencana penelitian tahun II (2019) adalah inseminasi buatan atau kawin suntik pada kambing dengan menggunakan semen beku yang telah diteliti pada tahun I (2018).

## BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1. Kesimpulan penelitian

1. Protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat meningkatkan persentase motilitas spermatozoa beku kambing PE post thawing dengan dosis terbaik 2,5 mg/ ml bahan pengencer.
2. Protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat meningkatkan persentase viabilitas spermatozoa beku kambing PE post thawing dengan dosis terbaik 2,5 mg/ ml bahan pengencer.
3. Protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat meningkatkan persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa beku kambing PE post thawing dengan dosis terbaik 2,5 mg/ ml bahan pengencer.
4. Protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat menurunkan persentase nekrosis spermatozoa beku kambing PE post thawing dengan dosis terbaik 2,5 mg/ ml bahan pengencer.
5. Protein plasma seminalis sapi Simental yang ditambahkan dalam diluter kuning telur dapat menurunkan persentase apoptosis spermatozoa kambing PE post thawing dengan dosis terbaik 2,5 mg/ ml bahan pengencer.

### 7.2. Saran penelitian

Saran penelitian ini adalah apabila akan melakukan pembekuan semen kambing sebaiknya ditambah dengan protein plasma seminalis sapi yang dapat bertindak memperbaiki kualitas spermatozoa postthawing.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anzar, M., Buhr, M.M., Kroetsch, T.G and Pauls, K.P, 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *J.Biol.Reprod.* 66:354-360.
- Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, C. Krausz and G Forti. 1996. Human Sperm Activation during Capacitation and Acrosom Reaction: Role of Calcium, protein phosphorylation and Lipid Remodeling pathways. *Frontiers in Bioscience.* : 189-205.
- Bansal AK and G.S. Bilapuri. 2010. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International.* Vol. 2011. Article ID 686137.
- Beatriz, B., R. Perez-Pe, M gallego, A. Tato, J. Osada, T. Muino Blanco and J.A. Cebrian Perez. 2000. Seminal Plasma Protein Revert the Cold Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Biology Reproduction.* 63:1531-1537.
- Crompton M, Virji S and Ward JM, 1998. Cyclophilin-D bind strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258:729-735.
- Curry MR, PF Watson, 1995. Sperm Structure and Function in Gamete the Spermatozoa. *Cambridge Reviews in Human Reproduction.* Ed. Gruzinskas & JL Yovich, Cambridge University Press.
- Direktorat Jenderal Produksi Peternakan, 2007. Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Erry Tri Sheliana Adikara. 2016. Pengaruh Penambahan Protein Plasma Seminalis Sapi Dalam Pengencer Susu Kuning Telur Semen Domba Ekor Gemuk Terhadap Motilitas, Viabilitas, Fragmentasi DNA Dan Nekrosis Setelah Equilibrasi. Tesis. Program Studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi. Fak Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Fatchiyah., Arumingtyas E.L., Widyarti S dan Rahayu S. *Biologi Molekuler. Prinsip Dasar Analisis.* Penerbit Erlangga.
- Feitosa, W.B; A.M, De Rocha; C.M Mendez, MP. Milazzoto; M.D Goissis; C Delboni; J.A Visintin and M.E. OD'Avila Assumpco. 2008. Kinetics of change in plasma membrane related to apoptosis and necrosis in bovine sperm cells at different incubation times. *Braz. J. Vet Res. Anim. Sci, Sao Paulo.* Vol 4 (5):398-404.
- Fuller, G.M and Shields, D, 1998. *Molecular Basis of Medical Cell Biology* Prentice Hall International. Inc. USA.
- Garcia-Vazquez, F and Matas C, 1998. *Molecular Basis of Medical Cell Biology.* Prentice Hall International. Inc. USA.

- Garner and Hafez, E.S.E, 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7<sup>th</sup> Edition. Philadelphia. Baltimore. New York London.
- Gwathmey T.M., Ignatz G.G., Mueller J.L., Manjunath P and Suarez S.S. 2006. Bovine Seminal Plasma Protein PDC-109, BSP-A3 and BSP-30 kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol.Reprod.* 75:501-507.
- Evans, G and M.W.C. Maxwell, 1988. *Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat*. Butherworths, Sydney.
- Hayati, A, 2011. *Spermatologi*. Pusat Penerbit dan Percetakan Universitas Airlangga.
- Hardijanto, Susilowai, S, Sardjito T, Hernawati T, Suprayogi TW, 2010. *Buku Ajar. Inseminasi Buatan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Juyena, S.T and Calegero, S, 2012. Seminal Plasma : As an Essential Attribute to Spermatozoa (A Review).. *Journal Andrology*. 33(4) :536-551.
- Kasai, M. 1996. Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos. *Animal Reproduction Sciences*. 42(1): 67-75.
- Kleinsmith, L.J. 2006. *Principle of Cancer Biology*. Pearson Education Inc.
- Lessard, C., S. Parent, P. Leclerc, J.L. Bailey and R. Sullivan, 2000. Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. *Journal Andrology*. 21:700-707.
- Li LY Luo X, Wang ., 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 6842: 95-99.
- Moura A.A., Chapman D.A., Koc H and Killian G.J. 2007. A Comprehensive Proteomics Analysis of the Accessory Sex Gland Fluid From Mature Holstein Bulls. *Anim Reprod Sci.* 98:169-188.
- Moura A.A., Souza C.E., Stanley B.A., Chapman D.A and Killian G.J. 2010. Proteomics of Cauda Epididymal Fluid From Mature Holstein Bulls. *J. Proteomics*. 73: 2006-2020
- Muino-Blanco, T.; R. Perez -Pe and J.A. Cebrian Perez. 2008. Seminal Plasma Protein and Sperm Resistance to Stress. *Reproduction in Domestic Animal*, 43:18-31.
- Perez-Pe, R., Cebrian Perez J.A and Muino Blanco T. 2001. Semen Plasma Protein prevent Cold Shock Membrane Damage. *Theriogenology* 56:425-434.
- Peterson QP, Goode DR, West DC, Botham RC and Hergenrother PJ. 2010. Preparation of the caspase -3/7 substrate AC-DEVD-pNA by solution-phase peptide synthesis. *Nature Protocols* 5 : 294-302. Published online 28 January 2010.
- Rodrigues, M.A.M., Souza C.E.A., Martins J.A.M., Rego J.P.A., Oliveira J.T.A., Domont G., Nogueira F.C.S and Moura A.A. 2013. Seminal Plasma Protein and their Relationship with Sperm Motility in Santa Ines Rams. *Small Ruminants Research* 109: 94-100. <http://www.sciencedirect.com>(13 Februari 2016).



Roncoletta M, Morani EDSC, Franschesini PH and Ramos PRR. 2000. Caracterizac a o da prote'na 26 kDa do plasma seminal e sua relac,a o com a congelabilidade do se men de touros. Arq Fac Vet UFRGS 2000; 28:323.

Rubinsky,B, 2000. Cryosurgery. Annual Review in Biomedical Engineering University of California at Barkeley. Barkeley.

Ruiz-Pesini E., Alvarez E., Enriquez J and Lopez-Perez M, 2001. Association Between Seminal Plasma carnitine and Sperm Mitochondrial Enzymatic Activities. Int.J.And: 24:335-340.

Santoso,S dan Fandy, T, 2001. Riset Pemasaran, Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. PT Gramedia . Jakarta.

Salisbury, G.W and N.L VanDemark, 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Terjemahan R. Djanuar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Sinha, M.P., Sinha A.K.and Singh B.K, 1996. The Effect of Glutation on Motility, Enzyme Leakage and Fertility of Frozen Goat Semen. J. Anim Reprod Sci 41:237-243.

Soler, AJ., Gusman MDP and Garde JJ, 2003. Storage of Red Deer Epididymides for four days at 5° C. Effect of Sperm Motility, Viability and Morphology Integrity. J Exp. Zool. 295A:188-199.

Susilowati,S.2007. Peran Insulin Like Growth Factor-I Complex Plasma Seminalis Kambing Terhadap potensi Biologis Spermatozoa Hasil Sentrifugasi. Disertasi. Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Susilowati, S dan Hernawati ,T, 2013. Protein Plasma Seminalis Dan Pembekuan Semen Kambing .Hand Out. Fakultas Kedokteran Hewan Unair.

Thimon,V., Metayer,S., Belghazi M., Dacheux F., Dacheux J.L and Gatt J.L. 2005. Shedding of The Germinal Angiotensin I-converting Enzyme (gACE) Involves a Serine Protease and is Activated by Epididymal Fluid Biol Reprod. 73: 881-890.

UTILIZATION OF CATTLE SEMINAL PLASMA PROTEIN IN THE FREEZING  
PROCESS TO PRE AND POST-THAWING KACANG GOAT SPERMATOZOA  
NUCLEUS QUALITY

Suherni Susilowati<sup>1</sup> Indah Norma Triana<sup>1</sup>, Tri Wahyu Suprayogi<sup>1</sup>, Arimbi<sup>2</sup> and Wurlina<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Veterinary Reproduction Department Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University  
Surabaya, Indonesia; <sup>2</sup> Veterinary Anatomical Pathology Department Faculty of Veterinary  
Medicine Airlangga University Surabaya, Indonesia

E-mail : [suhernifkhunair@gmail.com](mailto:suhernifkhunair@gmail.com)

E-mail : [nor-maez@yahoo.com](mailto:nor-maez@yahoo.com)

E-mail : [twsuprayogi@gmail.com](mailto:twsuprayogi@gmail.com)

E-mail : [arimbi\\_bg22@yahoo.com](mailto:arimbi_bg22@yahoo.com)

E-mail : [wurlina-mad@yahoo.co.id](mailto:wurlina-mad@yahoo.co.id)

**ABSTRACT**

The aim of this study was to improve the quality of kacanggoat frozen semen to be used for artificial insemination by adding the seminal plasma protein of *simental* cattle in the diluent. Cattle seminal plasma protein obtained by collect cattle semen then centrifuged with a certain speed and time to get seminal plasma. Seminal plasma is purified to be taken only protein. The study consisted of 3 groups: control group (P0): without cattle seminal plasma protein + egg yolk citrate, group I (P1) treatment: 2.5 mg cattle seminal plasma protein / ml + egg yolk citrate diluent + semen, treatment II: 5 mg cattle seminal plasma protein/ ml + egg yolk citrate diluent + semen. Each group consists of 12 repetitions. The data obtained were test with Anava Test. From the results of this study it can be concluded that with the addition of cattle seminal plasma protein of 2.5 mg / ml egg yolk citrate diluent can improve the quality of kacang goat frozen semen by the percentage of integrity membrane spermatozoa, occurrence of necrosis and DNA fragmentation of kacanggoat spermatozoa.

Keywords : cattle seminal plasma protein, kacang goat frozen semen, integrity membrane spermatozoa, necrosis, DNA fragmentation

**INTRODUCTION**

Artificial insemination with preserved semen is a viable option for genetic upgrading of this breed (Daramola *et al.*, 2016). Artificial insemination program is supported by the presence of frozen semen. Semen freezing is an important technique, widely used in ruminant breeding programs to increase animal yields for fulfilling the rising demand of meat, milk and work in developing countries (Bucak *et al.*, 2008). Frozen semen is the process of freezing the semen at -196°C. Semen freezing is distinguished by slow freezing, rapid

freezing, and ultra rapid freezing. The most important principle of semen freezing is the discharge of water from the cell (dehydration) before it freezes. If dehydration does not occur there will be large ice crystals in cells that can damage cells and when the dehydration is so great then the cell will experience dryness so that the cell will die.

The freezing process of semen has a negative effect on the quality of spermatozoa due to low temperature exposure. As a result of low temperature exposure is the destabilization of spermatozoa membrane, the occurrence of oxidative stress due to decreased antioxidant content in spermatozoa. The destabilization of plasma membranes of spermatozoa both physically and chemically leads to increased cell permeability to extracellular ions, including  $Ca^{2+}$  ions (Garcia-Vasquez and Matas., 2004).

The effects of cryopreservation on sperm function and fertility have been widely studied. Techniques for the successful cryopreservation of spermatozoa have progressed and are now widely standardized (Gravance *et al.*, 2009). During cryopreservation, semen is exposed to cold shock and atmospheric oxygen, this raise up the level of lipid peroxidation (Bucak *et al.*, 2011). Experiments have shown that oxidative stress produced in this procedures due to high reactive oxygen species (ROS) are associated with low quality of seminal material and death of spermatozoa (Janice *et al.*, 2000). The semen freezing process will cause weak covalent binding of plasma membrane protein compositors, mitochondrial membranes, and other parts of the cytoskeleton as a means of spermatozoa motility. Continuous low temperature conditions will cause weak covalent binds and will be followed by breaking of the bind. This will lead to changes in the structure of the constituent components of the spermatozoa membrane, thereby causing a decline in the function of each of these components (Rubinsky, 2000). The main cause of this freezing process is the occurrence of cell damage. The cause is due to the dehydration process does not occur to form intracellular ice crystals that can damage cells. In addition, due to increased osmolarity of freezing media so that cryoprotectan is toxic and causing physical damage is the formation of extracellular ice crystals, the toxicity of a concentrated electrolyte or the occurrence of osmotic swelling (Kassai, 1996). Damage during freezing may occur in the plasma membrane as well as at the nucleus of the spermatozoa (apoptosis). The plasma membrane of spermatozoa is composed of lipids, proteins, and carbohydrates. Unsaturated fatty acids in goat spermatozoa lipid membrane have a high content compared with other ruminants, therefore in the process of freezing the goat lipid membrane spermatozoa easily induced resulting in Lipid Peroxidation (LPO). The susceptibility of cold temperatures is associated

with a high ratio of unsaturated fatty acids to saturated fats, so Reactive Oxygen Species (ROS) is also high (Bansal and Bilaspuri, 2010). Initiation of apoptosis may result from intrinsic signals generated by stressful cells. The intrinsic pathway or mitochondrial pathway begins with the permeabilization of the mitochondrial outer membrane. This permeability is dependent on permeability transition pore (PT pore). The opening of PT pore will result in the entry of water into the matrix of mitochondria so that the inter membrane space is swollen and the outer membrane is torn. Tearing of the mitochondrial outer membrane results in the release of proapoptogenic proteins (Crompton *et al.*, 1998). Some of the proteins released include cytochrome c, apoptosis inducing factor (AIF) and endonuclease G (Liet *et al.*, 2001). Cytochrome c together with Apaf-1 and procaspase 9 form a complex bond called apoptosom will activate procaspase 3 into caspase 3 an execution caspase (Peterson *et al.*, 2010; Said *et al.*, 2010).

It is well known that natural antioxidants of goat semen are not enough to safeguard the sperm integrity against oxidative stress during the process of cryopreservation (Nichi *et al.*, 2006). To cope up with these harmful effect, supplementation of antioxidant may be a feasible approach to improve cryopreservation techniques (Hamayun Khan *et al.*, 2017). In vitro studies suggested that the addition of some antioxidants to semen diluents could improve the motility and viability of spermatozoa (Sanchez-Partida *et al.*, 1997).

The seminal plasma of semen consist of a variety of specific biochemical components that regulate the function of spermatozoa. The seminal plasma also contains decapitation factor (DF) which at the time of ejaculation coats the surface of the spermatozoa. Decapitation factors will bind the surface of the spermatozoa activating the intracellular calcium-ATP ase to keep the intacellular calcium concentration low (Baldiet *et al.*, 2000). Factors present in the seminal plasma may affect the viability, motility and integrity of the spermatozoa membrane in a cold state (Beatriz *et al.*, 2000). Improvements to the plasma cell membrane will have a positive effect on biochemical processes within the cell and can ultimately improve the quality of other spermatozoa such as motility and viability of spermatozoa. Biomolecular research proves that with the addition of several proteins alone can improve the fertilization process but also can sustain cell life.

Until now the quality of post thawing goat semen is still not satisfactory, this is because the goat seminal plasma contains phospholipase-A of the bulbourethralis gland which can coagulate the yolk in the diluent (Evans and Maxwell, 1988; Gazali and Taming,

2002). According to Bergeron *et al* (2004), the seminal plasma protein of the goat has a negative effect on the freezing process of goat semen because some protein in the seminal plasma could cause cholesterol and phospholipid release from the spermatozoa membrane. In addition, the spermatozoa plasma membrane is susceptible to cold stress, therefore researchers want to study the status of quality goat sperm, plasma membranes, mitochondria, necrosis and apoptosis spermatozoa after freezing with egg yolk citrate diluents has been added with cattle seminal plasma protein.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental design**

This research is a random research which consist of 3 groups. Each group consist of 12 male goats. This research used 6 Simmental male cattles to take the seminal plasma protein. Semen was collected from a healthy male Simmental cattle by using artificial vagina equipped with a scaled glass tube. The vagina is made by placing both shrouded and sterilized containers, while the space between the outer and indoor heating with warm water (45°C) to form the desired temperature, approximately 42-43°C and one-third the front sheath was smeared with vaseline. After the artificial vagina was ready, the male Simmental was stimulated by sight of using a female Simmental then semen was collected. Semen were collected twice a week for three weeks successively.

### **Preparation of cattle seminal plasma protein**

Immediately after collection, the semen were transferred to laboratory and kept in water bath at 37°C. Simmental cattlesemen that has been collected was examined macroscopically (volume, odor, color, pH and consistency) and microscopically (concentration, mass spermatozoa motility, individual sperm motility, viability and test resistance). In normal situations processed Simmental cattle semen should have percentage of motility and viability of approximately  $\geq 70\%$ . Next, Phosphate Buffer Saline (PBS) was added then centrifuged at 5°C at 1800 rpm for 10 minutes. The supernatant (semen plasma) taken with a micropipette is inserted in an ependorf tube. Preparation of seminal plasma protein was done by adding PBS and Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) then

homogenized for 5-10 minutes at 4°C and centrifuged again at 6000 rpm for 10 minutes. The supernatant was supplemented with absolute ethanol at a ratio of 1:1 and precipitated overnight (until no odor of ethanol), ethanol was discarded and then the pellet was added Tris HCL with 1-2 times the pellet volume (seminal plasma protein purified) (Aulani'am 2005).

#### **Preparation of egg yolk citrate diluent**

A chicken egg was cleaned and the yolk separated out from the egg white. Approximately 5 ml of yolk was added to citrate solution 20 ml (2,9 gram Natrium citrate + 100 ml aquadest). Next, 1000 IU/ml penicillin and 1 mg/ml streptomycin was added to the mixture and then added with goat semen (1:10) (Susilowati dkk., 2010).

#### **Treatment of Simental cattle seminal plasma protein on kacang goat semen**

This treatment uses 36 male goats to be collected semen. Each group consist of 12 male goats. After it collected with an artificial vagina, the semen was examined macroscopically and microscopically. The semen requirements used for freezing process should have a progressive percentage of spermatozoa motility and viability  $\geq 70\%$ .

After the diluent was prepared, if the quality of kacanggoat semen is qualified, then added by the cattle seminal plasma protein and egg yolk citrate diluent. In the freezing process of egg yolk citrate is divided into 2 parts. Two diluents were prepared in this study : (A) with the addition of goat semen; (B) with the addition of 10% glycerol. Threetreatment groups were developed: (P0) as control group, consisted of diluent A as much as 10 ml + 1 ml kacanggoat semen (without addition of cattle seminal plasma protein), Treatment I (PI) was a diluent A as much as 10 ml + 1 ml kacang goat semen + cattle seminal plasma protein (2.5 mg / ml diluent), Treatment II (PII) was a diluents A as much as 10 ml + 1 ml kacang goat semen + cattle seminal plasma protein (5 mg / ml diluent). Then the diluent B is added gradually into the diluent. A. The three treatments are storage in the refrigerator with a temperature of 5°C (equilibration time) for 2 hours and followed by the initial phase of freezing (-140°C) for 9 minutes and then placed into liquid nitrogen (-196°C).

### Post-thawed semen evaluation

Thawing was conducted at a temperature of 37°C for 30 seconds and thawed treatment samples were examined semen quality, plasma membrane, necrosis and apoptosis spermatozoa. Three semen straws were evaluated for each treatment.

### Spermatozoa motility

For the assessment of motility, one straw of semen was thawed in water bath at 37°C for 30 seconds and then semen straw was emptied in a test tube kept in water bath. A drop (10 µl) of semen was placed on prewarmed (37°C) glass slide and covered with glass cover slip (18x18 mm) from five selected representative fields. Samples were selected randomly from 10 fields, for a total of 200 cells. Percentage motility was assessed at X 40 under phase-contrast microscope (Olympus BX 51 TF, Japan).

### Spermatozoa viability

Eosin negrosin stain was used to evaluate the viability (live/dead %) of the frozen-thawed semen. After thawing one drops of semen was placed on a tempered glass slide and this samples was mixed with one drop of eosin-negrosin solution. The mixture was smeared on the glass slide and allowed to air dry. Two hundred spermatozoa were evaluated in at least five different fields in each smear under a light microscope. Unstained heads of spermatozoa (live) and/or stained/partial stained heads of spermatozoa (dead) (Susilowati *et al.*, 2010).

### Plasma membrane integrity

Hypo-osmotic swelling test (HOS) as previously described was used to evaluate plasma membrane integrity (Gohar *et al.*, 2014 ; Malik *et al.*, 2011). One ml of hypoosmotic solution (7.35 grams of Na Citrate 2 H<sub>2</sub>O, 13.52 grams of fructose was dissolved in 1000 ml of aquadest) plus 0.1 ml of spermatozoa then incubated at 37°C for 30 minutes and observed with a 400x magnification microscope. Spermatozoa with intact plasma membrane are characterized by a circular spermatozoa tail because the plasma membrane of spermatozoa still works well in water absorption in a hypotonic environment. Spermatozoa whose membrane is damaged is marked by a straight tail (Zekariya *et al.*, 2011).

### **Spermatozoa Necrosis**

Hematoxylin Eosin staining (HE) as previously described was used to evaluate necrosis of sperm. The percentage of spermatozoa necrosis characterized by nuclei undergoes picnotis, kariorexis, and kariolysis known with Hematoxylin Eosin (HE) staining found in five different fields of view at 400 magnification per 100 spermatozoa under phase-contrast microscope (Olympus BX51 TF, Japan).

### **Spermatozoa Apoptosis**

Acridin Orange Staining as previously described was used to evaluate apoptosis of sperm. One drop of semen dripped on the glass object and then added by the acridin orange, then covered with a glass cover. After that was observed under a fluorescence microscope with magnification 100 times per 100 spermatozoa. Spermatozoa with apoptosis are yellow - red, while the living spermatozoa are greenish.

### **Statistical analysis**

The result data is tabulated according to the observed variables. The results of the observation of the motility, viability, integrity of the plasma membrane, necrosis, and apoptosis of spermatozoa were tested with F Test to determine the differences between treatments and if there were differences followed by BNT Test. All data were expressed as the mean value  $\pm$  S.D. P- value  $< 0,05$  were considered to be significantly different. (Santoso and Fandy, 2001)

## **RESULT AND DISCUSSION**

### **Seminal Plasma Protein Collection from Simmental Cattle Semen**

This study requires fresh semen Simmental cattle first examined in macroscopic and microscopic. The macroscopic examination includes: volume, color, odor, consistency and degree of acidity or pH. Microscopic examination includes: mass movement, individual movement, concentration and survival (viability) of spermatozoa. The results of examination of the characteristics of fresh semen Simmental cattle in Table 1.



**Table 1. Simental Cattle Fresh Semen Characteristics**

Indicator	Character
Volume (ml)	7,16 ± 1,52
Consistency	Medium to Thick
Color	Milky white to yellowish
Smell	Typical
pH	6-7
Motility (%)	85,83 ± 2,69
Viability (%)	94,65 ± 2,26
Abnormality (%)	6,69 ± 1,86
Concentrations (juta/ml)	1040 ± 236,45
Cattlel seminal plasma protein {mg/ml}	46,8 - 196

Pre-freezing and post-thaw sperm functional assay of different level of cattle seminal plasma protein in semen egg yolk citrate diluents are expressed in table II, II, IV and V. Data were expressed as percentage of mean with standard deviation of respective fertility indicator including sperm motility, viability, plasma membrane integrity, necrosis and apoptosis of the pre-freezing and post-thaw spermatozoa in kacang goat semen with various concentration of cattle seminal plasma protein current finding demonstrated positive response of the cattle seminal plasma protein on pre-freezing and post-thawed quality indicators. For motility, viability, necrosis and apoptosis of pre-freezing and post-thawed spermatozoa, significant respon of cattle seminal plasma in semen diluents was attained at 2,5 mg (P<0,05) inclusion level in comparison with the other treated groups at 5 mg including the control group.

**Table 2. Mean (± Standard Deviation) and F-Test of motility spermatozoa goats pre-freezing and post-thawing on each experiment.**

Treatment	Spermatozoa Motility Mean ± Standard Deviation (%)	
	Pre-Freezing	Post-Thawing
P0	37,55 <sup>a</sup> ±2,30	33,37 <sup>a</sup> ± 2,33
P1	50,45 <sup>b</sup> ±2,25	45,20 <sup>b</sup> ± 2,36
P2	39,65 <sup>a</sup> ±2,15	32,51 <sup>a</sup> ± 2,45

Different letter notations on the same column are significantly different (p <0.05).

Table 3. Mean ( $\pm$  Standard Deviation) and F-Test of viability spermatozoa goats pre-freezing and post-thawing on each experiment.

Treatment	Spermatozoa Viability Mean $\pm$ Standard Deviation (%)	
	Pre-Freezing	Post-Thawing
P0	54,55 <sup>a</sup> $\pm$ 2,30	51,87 <sup>a</sup> $\pm$ 2,15
P1	62,45 <sup>b</sup> $\pm$ 2,25	60,10 <sup>b</sup> $\pm$ 2,25
P2	56,45 <sup>a</sup> $\pm$ 2,05	52,55 <sup>a</sup> $\pm$ 2,45

Different letter notations on the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 4. Mean ( $\pm$  Standard Deviation) and F-Test of membrane plasma integrity spermatozoa goats pre-freezing and post-thawing on each experiment.

Treatment	Spermatozoa Plasma Membrane Integrity Mean $\pm$ Standard Deviation (%)	
	Pre-Freezing	Post-Thawing
P0	37,55 <sup>a</sup> $\pm$ 2,35	31,57 <sup>a</sup> $\pm$ 2,73
P1	42,45 <sup>b</sup> $\pm$ 2,25	37,25 <sup>b</sup> $\pm$ 3,06
P2	37,65 <sup>a</sup> $\pm$ 2,05	32,71 <sup>a</sup> $\pm$ 2,75

Different letter notations on the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

The results showed that *kacang* goat semen with addition of cattle seminalis plasma protein dose 2.5 mg / ml egg yolk citrate diluent is best in maintaining the membrane plasma integrity of *kacang* goat spermatozoa compared with no or addition of cattle seminalis plasma protein dose 5 mg / ml egg yolk citrate diluent.

Table 5. Mean ( $\pm$  Standard Deviation) and F-Test of necrosis *kacang* goat spermatozoa pre-freezing and post-thawing on each experiment.

Treatment	Spermatozoa Necrosis Mean $\pm$ Standard Deviation (%)	
	Pre-Freezing	Post-Thawing
P0	0,40 <sup>a</sup> $\pm$ 0,65	0,47 <sup>a</sup> $\pm$ 0,55
P1	0,20 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	0,25 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01
P2	0,35 <sup>a</sup> $\pm$ 0,75	0,40 <sup>a</sup> $\pm$ 0,80

Different letter notations on the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 6. Mean ( $\pm$  Standard Deviation) and F-Test of apoptosis kacanggoat spermatozoa pre-freezing and post-thawing on each experiment.

Treatment	Spermatozoa Apoptosis Mean $\pm$ Standard Deviation (%)	
	Pre-Freezing	Post-Thawing
P0	1,45 <sup>a</sup> $\pm$ 0,25	1,75 <sup>a</sup> $\pm$ 0,38
P1	0,75 <sup>b</sup> $\pm$ 0,35	0,92 <sup>b</sup> $\pm$ 0,44
P2	0,97 <sup>a</sup> $\pm$ 0,20	1,25 <sup>a</sup> $\pm$ 0,25

Different letter notations in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ )

The results showed that the semen contained from Simmental cattle was yellowish white, distinctive odor, consistency thick, pH between 6.00-7.00, volume  $7.26 \pm 1.72$  ml, concentration  $1040.106 \pm 236,45$  / ml, mass motility +++ (movements form large and multiple waves), individual motility moves progressively  $85.83 \pm 2.69\%$ , and viability of  $94.65 \pm 2.26\%$ . In general, the volume of semen will increase according to age, body size, change of state, reproductive organ health and semen storage frequency. The color, consistency and concentration of spermatozoa are closely related to each other. The more dilute a semen the concentration of the spermatozoa will be lower and the color of the semen getting pale. While the consistency of semen depends on the ratio of spermatozoa and plasma semen (Evans and Maxwell, 1987). The degree of acidity of pH greatly affects the life force of spermatozoa. If high or low pH will cause the spermatozoa to die, the degree of semen acidity may be influenced by the concentration of lactic acid produced in the final process of metabolism. According to Toelihere 1985, spermatozoa metabolism in an anaerobic condition will produce lactic acid buried and increase or decrease the pH of semen.

The intact plasma membrane of spermatozoa has the function of protecting the cell as a whole for survival, indirectly also protecting the cell organelles from mechanical or chemical damage, the plasma membrane also plays an important role as a filter for the exchange of intra- and extracellular substances maintained in the metabolic process (Garner and Hafez, 2000). Damage to the cell membrane will increase the permeability of the cell membrane, so materials that should not pass through the cell membrane can be freely in and out of the cell and eventually the integrity of the spermatozoa membrane is impaired (Agarwal *et al.*, 2003).

The results showed that kacanggoat semen with addition of cattle seminalis plasma protein dose 2.5 mg / ml of egg yolk citrate diluent was best in maintaining the integrity of

goat spermatozoa membrane compared with neither addition nor addition of cattle seminalis plasma protein 5 mg / ml egg yolk citrat.

The results showed that the mean percentage of necrosis in *kacang* goat spermatozoa from the lowest to highest was in the addition of cattle seminalis plasma protein 2.5; 5 mg / ml and without cattle seminal plasma protein. These results prove that the addition of cattle seminal plasma protein can decrease the incidence of necrosis in pre freezing and post-thawing *kacang* goat spermatozoa, although statistically did not show any significant difference. The occurrence of necrosis in the group without supplementation of the highest seminal plasma protein is due to acute or sudden due to freezing process, so that the energy contained in the goat's spermatozoa is drained out suddenly. This leads to cell membranes rupture and extracellular-intracellular ions freely in and out so that the cell nucleus swells and then lysis. On the other hand, the addition of a cattle seminal plasma protein can protect the cell membranes while freezing, by increasing the stability of the membrane. This is in accordance with the opinion of Juyena and Stelletta (2012), which says that the protein from plasma semen can protect the spermatozoa from cold or freezing temperature.

The results showed that the percentage of apoptosis (DNA damage) in *kacang* goat spermatozoa plus the cattle seminal plasma protein from the lowest to the highest was in the addition group of 2.5; 5 mg and without cattle seminal plasma protein. This proves that the addition of the cattle seminal plasma protein into the *kacang* goat semen diluent can decrease the incidence of apoptosis. The situation can be explained because in the process of freezing goat spermatozoa cause the formation of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants available no longer able to eliminate the negative impacts that can induce apoptosis events (Ortega., 2009). The addition of cattle seminal plasma protein can protect the membrane and also as an antioxidant of goat spermatozoa in freezing process. This agrees with Rodrigues *et al.*, (2013). Roncoletta *et al.*, (2000) who stated that addition of 40% seminal plasma protein has the ability to maintain viability during the freezing procedure. The ability of cattle seminal plasma protein in protecting the spermatozoa membrane is very high compared with the plasma protein of other animal (Sinha *et al.*, 2001). On the other hand, various studies carried in field of reproductive biology has demonstrated that higher doses of antioxidants supplementation have been associated with detrimental effect whereas at physiological point the addition of such antioxidants are commonly not dangerous (Bouayed and Bohn, 2010).

The addition of cattle seminal plasma protein into the goat semen diluent can improve motility, viability, membrane plasma integrity and decrease the occurrence of spermatozoa necrosis and apoptosis pre-freezing and post-thawing.

## ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by funding from the Research and Technology, and Directorate General of Higher Education Ministry (RISTEK-DIKTI) (2018). The authors are also grateful to all of the laboratory staff in the Department of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University.

## REFERENCES

- Aulani,am. 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang.53-85.
- Agarwal A, RA Saleh and MA Bedalwy. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil and Steril*. 79:829-843.
- Bansal AK and GS Bilapuri. 2010. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*. Vol. 2011. Article ID 686137.
- Beatriz B, R Perez-Pe, M Gallego, A Tato, J Osada, T. Muino Blanco and JA Cebrian Perez. 2000. Seminal Plasma Protein Revert the Cold Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Biology Reproduction*. 63:1531-1537.
- Bouayed, J and Bohn, T. 2010. Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state. *Oxid. Med.Cell.Long*. 4: 228-237.
- Bucak MN, Tekin N. 2007. Protective effects of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rumin Res*. 73:103-108
- Crompton M, Virji S and Ward JM. 1998. Cyclophilin-D bind strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*. 258:729-735.
- Daramola JO, EO Adenkule, OM Onagbesan, OE, Oke, AO Ladokun, JA Abiona, MO Abioja, IK Oyewusi, JA, Oyewusi, OA Isah, OM Sogunle, MA Adeleke. 2016. Protective effects of fruit-juices on sperm viability of West African Dwarf goat bucks during cryopreservation. *Anim Reprod*. 13 (1) :7-13
- Evans G and WC Maxwell. 1988. Salomon's artificial insemination of sheep and goat. Butherworths, Sydney.
- Garner and Hafez ESE. 2000. Reproduction in farm animal. 7<sup>th</sup> Edition. Philadelphia. Baltimore. New York London.
- Garcia-Vazquez F and Matas C. 2004. Changes in Membrane Sulfhidryl Status of Boar Spermatozoa by Freezing.
- Gazali M dan Tambing SN. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati*. 9 (1) : 27-32.
- Gravance CG, M.E, Casey, PJ Casey. 2009. *Animal Reproduction Science*.114: 81-88

- Gohar A, Khan H, Yousaf MS, Ahmad J, Ali Q, Khan M, Khan D, Hayat Y, Ali F, Ahmad I, Saleem, M and Ullah F. 2014. Assessment of alpha lipoic acid inclusion in semen extender on cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull spermatozoa. *Life Sci.J* 11:45-50
- Hamayun Khan, Momen Khan, Muhammad Subhan Qureshi, Shakoor Ahmad, Ali Gohar, Hameed Ullah, Farman Ullah, Arab Hussain, Pershotam Khatri, Said Sajjad Ali Shah, Hamid Rehman and Azmatullah Khan. 2017. Effect of green tea extract (*Camellia sinensis*) on fertility indicators of post-thawed bull spermatozoa. *Pakistan J. Zool* 49(4):1243-1249.
- Janice L, Bilodeau J and Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals : A damaging and capacitation phenomenon. *J.Androl* 21:1-7.
- Juyena ST and S Calegero. 2012. Seminal plasma: As an essential attribute to spermatozoa (A Review). *Journal Andrology* 33(4): 536-551.
- Kasai M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Sciences* 42(1): 67-75.
- Li LY Luo X, Wang ., 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 6842: 95-99.
- Malik A, Wahid H, Rosnina Y, Bukar M, Kasim A, Sabri M. 2011. Verification of X-and-Y-Spermatozoa separation by nested polymerase chain reaction (PCR), motility and membrane integrity in bovine. *Afr J.Biotechnol* 10(85): 19796-19801.
- Nichi M, Bols PEJ, RMJ Barnabe, VH Goovaerts IGF, Barnabe RC and Cordata CNM. 2006. Seasonal variation in semen quality in *Bos Indicus* and *bos Taurus* Bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* 66: 822-828.
- Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Morrell JM, Salazar Sandoval C, Macías García B, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction* 138:55-63.
- Peterson QP, Goode DR, West DC, Botham RC and Hergenrother PJ. 2010. Preparation of the caspase -3/7 substrate AC-DEVD-pNA by solution-phase peptide synthesis. *Nature Protocols* 5 : 294-302.
- Rodrigues MAM, CEA Souza, JAM Martins JPA Rego, JTA Oliveira, G Domont FCS. Nogueira and A.A. Moura. 2013. Seminal plasma protein and their relationship with sperm motility in Santa Ines Rams. *Small Ruminants Research* 109: 94-100.
- Roncoletta M, Morani EDSC, Franchesini PH and Ramos PRR. 2000. Caracterização da proteína 26 kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. *Arq Fac Vet UFRGS* 2000; 28:323.
- Said TM, Gaglani A, and Agarwal A. 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicineOnline* 21(4): 456-462.

Sanchez-partida LG, Setchell BP; Maxwell WMC. 1997. Epididymal compounds and antioxidants in extenders for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 9: 689-696.

Santoso S dan Fandy T. 2001. Riset Pemasaran, Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. PT Gramedia . Jakarta.

Sinha MP, Sinha AK and Singh BK.1996. The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *J. Anim Reprod Sci* 41 :237-243

Susilowati S, Hardijanto, Tri Wahyu Suprayogi, Trilas Sardjito dan Tatik Hernawati. 2010. Buku Petunjuk Praktikum Fakultas Kedokteran Hewan, Airlangga University Press.

Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa Bandung.

Zekariya Nur, Selvinar Seven-Cakmak, Burcu Ustuner, Ibrahim Cakmak, Melih Erturk. 2011. The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, Springer Verlag. 43 (1) 31-38.

NAMA : Suherni Susilowati  
PT : Universitas Airlangga  
HP : 087852047371

## DESKRIPSI

### PROTEIN PLASMA SEMINALIS SAPI DALAM MEDIA PEMBEKUAN SEMEN KAMBING

#### Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan penambahan protein plasma seminalis sapi dalam media pembekuan semen kambing. Penambahan protein plasma seminalis sapi dilakukan pada media pengencer pada temperature kamar . Protein plasma seminalis berfungsi sebagai antioksidan dan melindungi membrane spermatozoa terhadap cekaman dingin. Media pembekuan semen kambing tersebut dapat meningkatkan kualitas semen beku kambing posthawing sehingga bila digunakan untuk kawin suntik akan menghasilkan angka kebuntingan yang tigggi.

#### Latar Belakang Invensi

Berbagai teknologi telah diciptakan dan dipergunakan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak. Inseminasi buatan (kawin suntik) merupakan awal pemakaian bioteknologi reproduksi pada hewan jantan. Teknik kawin suntik pada kambing mempunyai keuntungan, yaitu selain mengoptimalkan penggunaan pejantan, peternak tidak perlu mengeluarkan biaya untuk pemeliharaan pejantan dan dapat memperbaiki kualitas genetik dalam waktu yang relatif singkat. Teknologi kawin suntik telah lama berkembang di Indonesia terutama pada ternak besar (sapi potong dan sapi perah) dengan hasil yang cukup baik. Namun, pada ternak kecil seperti domba dan kambing masih sangat terbatas. Di masa mendatang, inseminasi



buatan ini akan memegang peranan penting dalam program-program peternakan domba atau kambing di Indonesia, walaupun penerapannya masih dalam taraf uji coba dan hasilnya belum banyak dilaporkan. Salah satu faktor pendukung dalam upaya mengoptimalkan program inseminasi buatan (kawin suntik) pada ternak kambing adalah tersedianya *frozen semen* (semen beku) yang memenuhi standar minimal. Saat ini sangat sulit untuk mendapatkan semen beku kambing yang memenuhi standar minimal yang layak digunakan dalam program inseminasi buatan

Proses pembekuan menyebabkan kerusakan fungsi maupun struktur membrane dan kemampuan spermatozoa untuk mempertahankan hidup. Tujuan dari proses pembekuan adalah mempertahankan sesempurna mungkin beberapa sifat dari materi biologis terutama viabilitasnya. Kendala utama dari proses pembekuan ini adalah terjadinya kerusakan sel. Penyebabnya antara lain karena proses dehidrasi tidak terjadi sehingga terbentuk kristal-kristal es intraseluler yang dapat merusak sel. Selain itu juga dapat karena peningkatan osmolaritas media pembekuan sehingga krioprotektan bersifat racun selanjutnya terjadi kerusakan fisik yaitu terbentuknya Kristal es ekstraseluler, toksisitas dari elektrolit yang pekat atau terjadinya osmotic swelling. Kerusakan selama pembekuan bisa terjadi pada membrane plasma maupun pada inti spermatozoa. Pada proses pembekuan, membrane lipid spermatozoa mudah terinduksi sehingga terjadi Lipid Peroxidation (LPO). Kerentanan suhu dingin dikaitkan dengan rasio asam lemak tak jenuh yang tinggi dari pada lemak jenuh sehingga Reactive Oxygen Species yang terbentuk juga tinggi.

Plasma seminalis dari semen terdiri dari bermacam-macam komponen biokimia yang spesifik yang mengatur fungsi spermatozoa. Komposisi utama plasma semen adalah air dan juga beberapa substansi organik dan anorganik. Plasma seminalis juga mengandung *factor dekapasitasi* (DF) yang pada waktu ejakulasi melapisi permukaan spermatozoa. Faktor-faktor dekapasitasi tersebut akan mengikat permukaan spermatozoa mengaktifkan kalsium

intraseluler-ATP ase untuk mempertahankan konsentrasi kalsium intraseluler tetap rendah. Faktor yang terdapat didalam plasma seminalis dapat mempengaruhi viabilitas, motilitas dan integritas membrane spermatozoa dalam keadaan dingin. Perbaikan terhadap membrane plasma sel akan berpengaruh positif terhadap proses-proses biokimia di dalam sel dan pada akhirnya dapat memperbaiki kualitas spermatozoa yang lain seperti motilitas dan viabilitas spermatozoa. Penelitian biomolekuler membuktikan bahwa dengan penambahan beberapa protein saja dapat memperbaiki proses fertilisasi tetapi juga dapat mempertahankan kehidupan sel. Protein plasma seminalis dapat bertindak sebagai antioksidan yang dapat meredam radikal bebas yang terbentuk pada proses pembekuan semen. Disini dijelaskan bahwa protein plasma seminalis yang digunakan untuk pembekuan semen kambing berasal dari sapi, hal tersebut karena plasma seminalis sapi tidak mengandung enzim phospholipase A yang dapat mengkoagulasikan bahan pengencer sehingga mengganggu motilitas spermatozoa.

Sesuai dengan invensi ini disediakan suatu komposisi bahan untuk media pembekuan semen kambing yaitu ditambahkan protein plasma seminalis yang berasal dari sapi. Komposisi media pembekuan sesuai invensi ini terdiri dari kuning telur sitar, gliserol dan crude protein plasma seminalis 2,5 mg/ml. Sedangkan langkah langkah pembekuan semen kambing adalah : penampungan semen kambing, pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis, apabila motilitas dan viabilitasnya  $\geq 70\%$  maka ditambah dengan crude protein plasma seminalis pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  lalu diinkubasi selama 5 menit, selanjutnya dicampur dengan pengencer kuning telur sitrat, dilakukan pendinginan pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$  ditambah gliserol, filling dan sealing straw kemudian prefreezing dan dilanjutkan freezing. Produk semen beku yang dihasilkan dari komposisi dan metode pembuatan sesuai invensi ini memiliki persentase hidup, motilitas individu progresif, membrane plasma utuh dan fragmentasi DNA (apoptosis) yaitu 67,75%; 65,05%; 63,05% dan 3,55%.

## Uraian Lengkap

Segera setelah semen ditampung dinyatakan memenuhi syarat dengan melalui serangkaian pemeriksaan, maka dilanjutkan dengan pengenceran yang memenuhi syarat. Syarat bahan pengencer tersebut adalah; mengandung nutrisi, bersifat buffer, bersifat isotonis, mempunyai efek antibakteri, tidak beracun dan dapat melindungi spermatozoa pada proses pendinginan, pembekuan dan thawing. Selain itu pengenceran juga bertujuan untuk memperbanyak volume dan memperpanjang lama hidup spermatozoa. Semen perlu diencerkan karena bila tidak ditambah bahan pengencer walaupun disimpan pada suhu dingin akan cepat mati, hal tersebut karena spermatozoa bergerak aktif (metabolism terjadi terus) sehingga cadangan energy akan habis dan efek sampingnya kadar asam laktat meningkat. Setelah diencerkan, semen dibekukan dengan tujuan dapat disimpan antara 10-12 tahun dengan kondisi kualitas semen masih dipertahankan. Tetapi sampai saat ini kualitas semen beku kambing posthawing masih berkisar 10-30% sehingga keberhasilan kawin suntik juga masih rendah.

Melihat fenomena diatas perlu kiranya diusahakan bahwa semen kambing yang dibekukan harus mempunyai kualitas yang memuaskan. Sehingga sampai saat ini masih banyak penelitian bahan apakah yang baik untuk ditambahkan didalam bahan pengencer sehingga kualitas semen beku kambing akan meningkat.

Crude protein plasma seminalis adalah hasil dari kelenjar asesoris yang terdiri dari beberapa protein yang peranannya saling menunjang untuk keperluan fungsi spermatozoa. Protein merupakan biomakromolekul yang sangat heterogen ketika berada di makhluk hidup atau sel, protein sangat tidak stabil, untuk mempertahankan fungsinya setiap jenis protein membutuhkan kondisi tertentu ketika diekstraksi dari normal biological milieu. Protein yang

diekstraksi hendaknya dihindarkan dari proteolisis atau dipertahankan aktivitas enzimatisnya.

Semen beku adalah semen hasil penampungan dengan menggunakan vagina buatan, mempunyai konsentrasi, motilitas dan viabilitas yang memenuhi syarat, selanjutnya ditambah dengan bahan pengencer yang dibuat menurut standart operasional di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari. Akhirnya dilakukan pembekuan sampai dibawah titik beku yaitu antara  $-79^{\circ}\text{C}$  sampai  $196^{\circ}\text{C}$ . Tujuan pembekuan adalah untuk mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Pembekuan merupakan proses penghentian sementara metabolisme sel tanpa mematikan fungsi sel, tanpa mematikan fungsi sel tetapi metabolisme dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan. Pembekuan merupakan suatu fenomena pengeringan fisik, dimana pada pembekuan tersebut terbentuk kristal – kristal es, penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel. Kristal es intraseluler dapat merusak spermatozoa secara mekanik. Penumpukan konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding spermatozoa. Sedangkan thawing semen beku akan menyebabkan perubahan permeabilitas membran spermatozoa yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa. Pada proses penyimpanan suhu rendah akan terjadi cold shock yang akan menyebabkan terjadinya perubahan susunan lipid membran dan fluiditas membran akhirnya terjadi pelepasan komponen fosfolipid dan kolesterol serta hilangnya beberapa proteinase akrosin yang menyebabkan hilangnya integritas membran. Selama penyimpanan pada suhu dingin akan terbentuk Reactive Oxygen Species (ROS) yang akan menyebabkan oksidasi baik lipid maupun protein membran sehingga integritas membran spermatozoa terganggu. Perubahan integritas membran akan menyebabkan pemasukan sodium dan kalsium ke dalam sel serta pemasukan oksigen juga menurun akibatnya aktivitas metabolik dan motilitas akan menurun.

Kondisi spermatozoa akibat pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen penyusun protein membran plasma, membran mitokondria serta komponen penyusun bagian lainnya. Misal sitoskeleton. Lemahnya ikatan kovalen akan diikuti dengan putusannya ikatan tersebut apabila paparan suhu rendah terus berlangsung. Hal tersebut akan menyebabkan perubahan struktur komponen membran spermatozoa, sehingga menyebabkan kemunduran fungsi dari masing-masing komponen. Terjadinya destabilisasi membran plasma yang akan menyebabkan peningkatan permeabilitas sel terhadap ion ekstraseluler termasuk ion  $\text{Ca}^{2+}$  yang akhirnya menyebabkan kematian sel.

Dari hasil penelitian lain dengan menggunakan protein plasma seminalis sapi dalam melindungi membran plasma spermatozoa sangat tinggi dibandingkan dengan protein plasma hewan lain. Juga penelitian lain mengatakan bahwa penambahan crude protein plasma seminalis dalam bahan pengencer dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa domba demikian juga penelitian dengan penambahan crude protein terhadap spermatozoa hasil swim up dapat memperbaiki kualitas spermatozoa. Perbedaan yang jelas dibandingkan dengan media pembekuan yang ada sekarang yaitu keberadaan Crude protein plasma seminalis yang penambahannya saat awal penambahan media pembekuan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan diinkubasi selama 5 menit. Sebagaimana dijelaskan diawal yang menunjukkan tentang cara penambahan protein plasma seminalis sapi dalam media pembekuan semen kambing yaitu kuning telur sitrat dilakukan sebelum pendinginan. Dan kadar Crude protein yang ditambahkan adalah 2,5 mg/ml bahan pengencer.

## **Klaim**

1. Komposisi media pembekuan semen kambing yang terdiri dari kuning telur sitrat, gliserol dan protein plasma seminalis sapi yang digunakan untuk meningkatkan fungsi media pembekuan sehingga bila digunakan untuk proses kawin suntik dapat menghasilkan fertilisasi yang maksimal akhirnya angka kebuntingan meningkat.
2. Suatu komposisi media pembekuan semen kambing sesuai dengan klaim 1 , dimana persentase masing-masing bahan adalah kuning telur sitrat dengan perbandingan 1:2, gliserol 10 % dan protein plasma seminalis sapi 2,5 mg/ ml bahan pengencer.
3. Suatu komposisi media pembekuan semen kambing sesuai klaim 1 dan 2 dimana pada dasarnya protein plasma seminalis yang ditambahkan merupakan gabungan beberapa protein yang ada didalam plasma seminalis yang berfungsi meredam radikal bebas pada saat pembekuan.
4. Suatu komposisi media pembekuan semen kambing sesuai klaim 1 sampai 3 dimana protein tersebut diisolasi dari cairan asesoris sapi yang mempunyai kualitas bagus yaitu motilitas dan viabilitas spermatozoanya  $\geq 70\%$  -