

Kedokteran Hewan
dan Peternakan

Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012



Perbaikan Mutu Semen Beku Sapi Perah Friesian Holstein
melalui Penambahan Osteopontin dalam Media Pembekuan

Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh.
Tatik Hernawati, M.Si, Drh
Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012 Nomor: 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012

Universitas Airlangga
2012

Kedokteran Hewan
dan Peternakan

Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012



Perbaikan Mutu Semen Beku Sapi Perah Friesian Holstein
melalui Penambahan Osteopontin dalam Media Pembekuan

Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh.
Tatik Hernawati, M.Si, Drh
Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012 Nomor: 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012

Universitas Airlangga
2012

b. Halaman Pengesahan

1. Judul Penelitian : Perbaikan Mutu Semen Beku Sapi Perah Friesian Holstein melalui Penambahan Osteopontin dalam Media Pembekuan

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh
 b. Jenis Kelamin : L / P
 c. NIP : 196405081990111001
 d. Jabatan Struktural : Penata Tk I
 e. Jabatan fungsional : Lektor
 f. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan / Reproduksi Veteriner
 g. Pusat Penelitian : LPPM Universitas Airlangga
 l. Tim Peneliti

No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/ Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh..	Fisiologi Reproduksi	Fak. Kedokteran Hewan	Unair
2	Tatik Hernawati, M.Si., Drh	Inseminasi Buatan	Fak. Kedokteran Hewan	Unair
3	Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh	Inseminasi Buatan	Fak. Kedokteran Hewan	Unair

3. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun (seluruhnya)
 Usulkan ini adalah usulan tahun ke- 1

4. Pembiayaan

- a. Jumlah yang diajukan ke Dikti tahun ke-1: Rp 60.000.000,00
 b. Jumlah yang diajukan ke Dikti tahun ke-2: Rp 60.000.000,00
 c. Jumlah yang diajukan ke Dikti tahun ke-3: Rp --

Surabaya, 31 Oktober 2012

Mengetahui,
 Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Hewan
 Universitas Airlangga

Dr. Anwar Muzrif, M.Kes.
 NIP. 196509051993031004

Ketua Peneliti

Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh
 NIP. 196405081990111001

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
 Universitas Airlangga

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, M.Si.
 NIP. 19590805 198701 1 001

ABSTRAK

PERBAIKAN MUTU SEMEN BEKU SAPI PERAH FRIESIAN HOLSTEIN MELALUI PENAMBAHAN OSTEOPONTIN DALAM MEDIA PEMBEKUAN

Osteopontin adalah protein yang memegang peranan penting dalam keberhasilan fertilisasi. Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan mekanisme peningkatan fertilisasi sapi menggunakan spermatozoa yang disimpan dalam media pembekuan dengan penambahan Osteopontin. Secara khusus menjelaskan karakterisasi Osteopontin dari semen sapi berdasarkan ekspresi Osteopontin pada membran spermatozoa, berat molekul dan konsentrasi osteopontin. Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi secara ilmiah tentang keberadaan osteopontin pada plasma membran spermatozoa. Berdasarkan penelitian di dapatkan hasil yaitu plasma membran spermatozoa sapi perah mengekspresikan Osteopontin dengan berat molekul 55 kDa dan konsentrasi Osteopontin hasil isolasi membran spermatozoa sapi berkisar antara 0,125 sampai 21,25 $\mu\text{g/ml}$.

Kata kunci: sapi perah FH, membran plasma spermatozoa, osteopontin

ABSTRACT

IMPROVING QUALITY FROZEN SEMEN OF FRIESIAN HOLSTEIN DAIRY CATTLE BY ADDING OSTEOPONTIN PROTEIN IN THE FREEZING MEDIA

Osteopontin is a protein that plays an important role in the success of fertilization. This study aimed to elucidate the mechanism of increased fertilization using spermatozoa Friesian Holstein dairy cattle in freezing media with the addition of osteopontin. Specifically describe the characterization of osteopontin expression from plasma membrane of spermatozoa, molecular weight and concentration of osteopontin. The benefit of this research is to provide scientific information about the presence of osteopontin in the plasma membrane of spermatozoa. Based on the results of research in getting the sperm plasma membrane of Friesian Holstein dairy cattle expressing osteopontin with molecular weight of 55 kDa and osteopontin concentration ranged from 0,125 to 21,25 mg/ml .

Key words: Friesian Holsteindairy cattle, plasma membrane of spermatozoa, concentration of osteopontin

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN.....	ii
ABSTRAK	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Urgensi (Keutamaan) Penelitian	2
BAB II STUDI PUSTAKA	6
2.1. Fisiologi Semen	6
2.2. Karakteristik dan Sifat Kimiawi Spermatozoa	6
2.3. Bahan Pengencer Semen Sapi	7
2.4. Semen Beku	8
2.5. Membran Plasma Spermatozoa	10
2.6. Kesuburan Semen	12
2.7. Osteopontin	12
2.8. Mekanisme Kerja Osteopontin	14
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	16
3.1. Tujuan Umum	16
3.2. Tujuan Khusus	16
3.3. Manfaat Penelitian	16
3.4. Manfaat Praktis	16
BAB IV METODE PENELITIAN	17
4.1. Penelitian Tahap I	17
4.2. Lokasi Penelitian	18
4.3. Populasi dan Sampel Penelitian	19
4.3.1. Populasi Penelitian	19
4.3.2. Sampel penelitian	19
4.4. Bahan dan Peralatan Penelitian	19
4.5. Prosedur Penelitian	21
4.5.1. Penelitian Tahap Pertama	21
4.5.2. Konfirmasi adanya Osteopontin pada Spermatozoa dan Plasma Semen Sapi perah dengan Teknik Imunositotokimia	21
4.5.3. Pemisahan Protein Spermatozoa dan Plasma Semen Sapi	22

4.5.4. Karakterisasi dan Identifikasi Osteopontin dengan SDS-PAGE	23
4.5.5. Isolasi Osteopontin dengan Teknik Elektroelusi	24
4.5.6. Konfirmasi isolat Osteopontin Spermatozoa dan Plasma semen dengan Teknik Immunoblotting	24
BAB V HASIL PENELITIAN	26
5.1. Penelitian I : Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi	26
5.1.1. Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar Sapi	26
5.1.2. Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar Sapi	27
5.2. Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Protein Osteopontin dari membrane dan plasma semen spermatozoa sapi jantan	27
5.2.1. Uji Pengikatan Anti-Osteopontin dan Protein-Osteopontin dari membrane spermatozoa sapi jantan	27
5.2.2. Identifikasi Protein Osteopontin dari beberapa Sapi dengan SDS-PAGE	28
5.2.3. Identifikasi Protein Osteopontin dengan <i>Western Blot</i>	31
5.3. Pengukuran kadar Osteopontin Hasil Isolasi Protein Osteopontin Spermatozoa Sapi.	31
5.3.1. Pengukuran Kadar Osteopontin dengan Metode Biuret	31
BAB VI PEMBAHASAN	34
6.1. Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Semen Sapi	34
6.2. Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Protein Osteopontin dari Spermatozoa Sapi	35
6.2.1. Uji Pengikatan Anti-Osteopontin dan Protein-Osteopontin Spermatozoa dengan Imunositokimia	35
6.2.2. Identifikasi Protein Osteopontin Spermatozoa dengan SDS-PAGE	36
6.2.3. Identifikasi Protein Osteopontin dengan <i>Western Blot</i>	37
6.2.4. Pengukuran kadar Osteopontin Hasil Isolasi Protein Osteopontin Spermatozoa Sapi.	38
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	39
7.1. Kesimpulan	39
7.2. Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1.	Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar Sapi Perah FH	26
Tabel 5.2.	Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar Sapi Perah FH	27
Tabel 5.3.	Protein-Protein Marker	29
Tabel 5.4.	Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 1	29
Tabel 5.5.	Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 2	29
Tabel 5.6.	Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 3	30
Tabel 5.7.	Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 4	30
Tabel 5.8.	Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 5	30
Tabel 5.9.	Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 6	30
Tabel 5.10.	Konsentrasi dan Nilai Absorbansi Protein Osteopontin Standar	31
Tabel 5.11.	Perhitungan kadar Osteopontin dari beberapa sampel semen sapi	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1.	Bagan Penelitian Isolasi dan Karakterisasi Protein Osteoponsin Spermatozoa Sapi Perah FH	18
Gambar 5.1.	Elektroforegram Membran Spermatozoa Sapi	28
Gambar 5.2.	Kurva Hubungan Antara Rf dengan Log BM Protein Standar	28
Gambar 5.3.	Hasil <i>Western Blot</i> Isolat Osteopontin dengan BM 55 kDa	31
Gambar 5.4.	Grafik Kurva Baku Protein Osteopontin	32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rencana Penelitian Tahun II	43
---	----

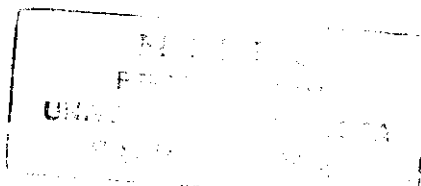
BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Usaha peternakan sapi perah di Indonesia sampai saat ini masih menghadapi banyak kendala, yang mengakibatkan produktivitas ternak masih rendah. Salah satu kendala tersebut adalah masih banyak kasus gangguan reproduksi menuju kepada adanya kemajiran ternak betina. Hal ini ditandai dengan rendahnya angka kelahiran pada ternak tersebut (Hardjopranjoto, 1995).

Kawin berulang bisa menjadi faktor utama ketidaksuburan. Kawin berulang dapat terjadi apabila sapi betina yang belum bunting setelah tiga kali atau lebih kawin. Dalam kelompok hewan fertil yang normal, dimana kecepatan pembuahan biasanya 50-55%, kira-kira 9-12% sapi betina menjadi sapi yang kawin berulang (Brunner, 1984). Salah satu penyebab *repeat breeder* adalah kualitas semen beku yang rendah sehingga sel spermatozoa kurang mampu untuk membuahi sel telur. Mutu semen beku memegang peranan penting dalam kejadian kebuntingan pada betina (Ax *et al.*, 1987).

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



dapat dipakai untuk menunjukkan kesuburan air mani, sel spermatozoa sebelum mampu melakukan fertilisasi dengan sel telur akan mengalami kapasitas di dalam saluran reproduksi sapi betina. Kapasitas sel spermatozoa dapat dirangsang oleh protein Osteopontin. Osteopontin adalah protein dengan berat molekul 55 kilodalton yang disekresikan oleh kelenjar ampula dan tuba falopii sehingga keberadaan Osteopontin dalam seminal plasma berkaitan erat dengan kualitas dan fertilitas hewan jantan (Cancel *et al.* 1997, Rodriguez *et al.* 2000). Menurut Caballero *et al.* (2010) osteopontin memegang peranan penting dalam keberhasilan fertilisasi dan mencegah terjadinya polispermi .

Penelitian Maura (2006), bahwa pejantan dengan semen yang mengandung Osteopontin yaitu semen yang di membran plasmanya mengandung protein dengan berat molekul 55 kDa mempunyai tingkat kesuburan yang lebih tinggi antara 20 sampai 25 % bila dibanding dengan semen pejantan tanpa osteopontin. Pada tahun 2007 Erikson *et al.*, mengatakan bahwa dari 8 sapi perah jantan yang diperiksa air mani mengandung osteopontin mempunyai potensi yang besar dalam keberhasilan pembuahan dibandingkan yang tidak mengandung osteopontin.. Hal ini bisa menimpa pada Balai Inseminasi Buatan dimana saja. Untuk itu perlu diupayakan peningkatan kesuburan air mani beku dengan penambahan osteopontin hasil isolasi dalam media pembekuan.

1.2. Urgensi (Keutamaan) Penelitian

Perkembangan populasi ternak ruminansia seperti sapi, kambing dan domba di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan bahkan cenderung menurun. Propinsi Jawa Timur pada tahun 2003 terjadi penurunan populasi ternak besar yaitu kuda turun 3,24 %, sapi perah 5,86 %, kerbau 5 % sedangkan sapi potong naik 0,02 %. Hal ini disebabkan oleh adanya banyaknya permintaan akan protein hewani yang berasal dari daging

ternak sapi, kambing dan domba namun tidak diimbangi dengan peningkatan populasi ternak tersebut (Anonymous, 2001).

Jawa Timur merupakan propinsi di Indonesia yang memiliki sapi perah dengan populasi tertinggi dan juga merupakan pemasok kebutuhan susu terbesar secara nasional. Program pembibitan dirasakan sebagai kebutuhan yang sangat mendesak oleh karena itu berdasarkan pengamatan lalu lintas ternak terutama pengeluaran ternak ke luar propinsi cukup besar sehingga dikhawatirkan untuk masa mendatang populasi ternak besar di Jawa Timur makin berkurang. Melihat kenyataan atau kondisi peternakan tersebut dirasa perlu untuk mengembangkan dan meningkatkan efisiensi reproduksi sehingga populasi ternak besar bisa terjaga.

Kendala yang sering dihadapi peternak sapi adalah menyangkut bidang reproduksi, seperti panjangnya calving interval dan rendahnya tingkat kebuntingan sehingga upaya untuk mencapai tingkat reproduktivitas yang tinggi sulit dicapai.

Upaya yang dilakukan agar target reproduktivitas yang tinggi dapat tercapai adalah dengan melakukan perbaikan pengelolaan reproduksi yang meliputi deteksi birahi dan sinkronisasi birahi, perkawinan yang tepat dan diagnosa kebuntingan yang tepat, serta air mani yang subur.

Keberhasilan inseminasi buatan sangat dipengaruhi oleh kualitas semen beku. Tapi ironisnya bahwa selama ini diagnosis kesuburan air mani pejantan di lapangan jarang dilakukan bahkan tidak pernah, hanya apabila ada laporan dari peternak yang mengatakan bahwa air mani beku buatan balai inseminasi tertentu dengan nama pejantan X mempunyai kualitas jelek atau jarang menghasilkan kebuntingan, kemudian pihak yang berkepentingan baru melakukan tes laboratoris dengan memeriksa persentase dan kecepatan motilitas individu serta persentase hidup. Pemeriksaan ini tidak menjadi jaminan bahwa air mani beku tersebut subur karena berdasarkan laporan hanya berkisar antara 40 sampai 70% angka

kebuntingan pada sapi-sapi betina yang di inseminasi buatan (Direktorat Jenderal Peternakan, 2005). Berarti ada 30 sampai 60% sapi betina yang gagal mengalami kebuntingan. Keadaan demikian dapat menurunkan daya reproduksi ternak karena kehilangan waktu produksi selama satu sampai dua bulan apabila pada saat diagnosis tersebut tidak menunjukkan kebuntingan.

Secara umum tes kesuburan sebagai pejantan didasarkan pada silsilahnya (*pedigree*), yaitu seleksi yang didasarkan pada reputasi yang ditunjukkan oleh nenek moyang sapi yang bersangkutan tetapi uji ini kurang akurat, karena suatu *bloodline* atau keturunan dari individu yang baik tidak selalu berarti bahwa ciri yang baik itu akan diwariskan melalui seleksi dan perkawinan (Blakely dan Bade, 1994; Copeland, 1994). Uji kesuburan pejantan yang lain adalah didasarkan pada uji *progeny* yaitu suatu uji untuk melihat sifat heritabilitasnya tetapi uji ini memakan waktu lama kurang lebih 4 - 6 tahun sehingga tidak efisien (Tomaszewska dkk., 1991; Akiko, 1998).

Melihat fenomena di atas perlu kiranya diusahakan bahwa semen yang akan dibekukan harus mempunyai kesuburan yang tinggi. Untuk itu semua semen yang akan dibekukan harus ditambahkan bahan yang dapat meningkatkan kesuburan semen yang dibekukan tersebut. Sampai saat ini masih terus dilakukan pengembangan dan pencarian tambahan bahan untuk meningkatkan kualitas semen beku.

Osteopontin merupakan protein spesifik yang diproduksi oleh kelenjar kelamin aksesori dan disekresikan di dalam cairan yang mungkin mengikat heparin dan mempercepat kapasitas sel spermatozoa setelah diejakulasikan, menghasilkan kesuburan sapi ditingkatkan karena mampu memproduksi protein yang dapat memberikan sinyal pada sel ovum sehingga sel ovum juga memberikan respon tersebut yang akhirnya terjadi fertilisasi (Erikson *et al* 2007).

Dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi, identifikasi dan karakterisasi dalam semen sapi sebagai bahan tambahan pada media pembekuan yang mampu meningkatkan angka fertilisasi baik secara *in vitro* maupun *in vivo* yang selanjutnya dapat meningkatkan reproduktivitas dan produktivitas ternak sapi serta nantinya bisa digunakan sebagai dasar pengembangan kualitas produksi semen beku di semua Balai Besar Inseminasi Buatan maupun Daerah.

BAB II STUDI PUSTAKA

2.1. Fisiologi Semen

Semen adalah sekresi alat kelamin jantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran kelamin betina pada waktu kopulasi (Toelihere, 1985). Semen terdiri dari dua bagian yaitu bagian yang padat adalah sel spermatozoa yang dihasilkan oleh tubulus seminiferus dalam testes dan bagian yang cair merupakan plasma semen yang dihasilkan oleh kelenjar asesoris (Hafez, 2000, Partodihardjo, 1992).

Menurut Hafez (2000) volume semen sapi yang diejakulasikan secara normal berkisar antara 5 – 8 ml, sedangkan menurut Partodihardjo (1992) volume semen sapi dalam satu kali ejakulasi hanya berkisar 4 – 5 ml, konsentrasi spermatozoa yang tinggi akan memberikan warna putih kekuningan. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap volume semen sapi per-ejakulasi antara lain adalah bangsa, umur, ukuran, berat badan, tingkat nutrisi, frekuensi penampungan dan besar testis (Bearden and Fuquay, 1992).

Konsentrasi spermatozoa adalah $1,2 \times 10^9$ /ml semen, sedangkan jumlah spermatozoa per-ejakulasi sebesar 6×10^9 dengan volume 4 – 6 ml (Partodihardjo, 1992), tetapi menurut Hafez (2000) setiap ml semen terdapat $1,8 \times 10^9$ spermatozoa.

2.2. Karakteristik dan Sifat Kimiawi Spermatozoa

Secara normal spermatozoa terdiri dari bagian kepala, leher, bagian tengah dan ekor. Komponen bagian kepala sel spermatozoa adalah nukleus sebagai pembawa materi genetik. *Post nuclear cap*, sebagai penutup bagian posterior dari nukleus. Akrosom sebagai penutup bagian nukleus (tudung protoplasmik) (Hafez, 2000).

Setiap bagian sel spermatozoa mempunyai perbedaan susunan kimiawi. Kepala spermatozoa terdiri dari *deoxyribo nucleic acid* (DNA) yang terdapat di bagian nukleus

spermatozoa. Bagian akrosom mengandung beberapa enzim proteolitik yaitu hyaluronidase, akrosin dan *coronary penetrating enzyme* (CPE) yang penting untuk penembusan sel telur saat proses fertilisasi (Hafez, 2000).

Pada bagian leher spermatozoa mempunyai panjang 5-7 μm dipisahkan dari ekor oleh cincin yang disebut annulus. Dalam sitoplasma spermatozoa banyak mengandung lipid juga terdapat mitokondria dan dikelilingi oleh suatu filamen yang berbentuk heliks. Bagian leher berhubungan dengan kebutuhan energi untuk motilitas serta berperan dalam metabolisme oksidatif. Beberapa zat yang dihasilkan di bagian leher spermatozoa antara lain enzim glikolitik, asam amino, sulfhidril, kolesterol, sitokrom oksida, lipoprotein dan sitokrom yang penting dalam reaksi respirasi spermatozoa. Plasmalogen merupakan senyawa lemak terbanyak di dalam spermatozoa didapatkan di bagian ekor terutama pada mitokondria yang merupakan sumber energi endogen untuk aktivitas spermatozoa. Beberapa enzim yang mengatur metabolisme aerob maupun anaerob pada sel spermatozoa banyak ditemukan pada bagian leher dan ekor, kecuali enzim hyaluronidase yang hanya ditemukan di bagian kepala dan akrosom (Hardjopranjoto, 1995, Toelihere, 1985).

2.3. Bahan Pengencer Semen Sapi

Segera setelah semen yang ditampung dinyatakan baik melalui serangkaian pemeriksaan, maka semen tersebut perlu diencerkan dengan salah satu bahan pengencer, sebelum digunakan untuk IB. Semen yang tidak diencerkan, sukar mempertahankan hidupnya lebih dari 24 jam, walaupun disimpan dalam suhu rendah. Karena spermatozoa yang senantiasa bergerak aktif, maka cadangan energi di dalam semen yang tidak diencerkan akan cepat habis digunakan. Di samping itu semakin meningkatnya kadar asam laktat yang terbentuk makin meningkat derajat keasaman semen yang bersifat racun terhadap sel spermatozoa. Untuk keberhasilan inseminasi buatan diperlukan bahan pengencer yang

fungsinya selain untuk memperbanyak volume semen, juga sebagai pelindung spermatozoa, sumber nutrisi dan bakteriostatik atau bakterisid (Partodihardjo, 1980). Menurut Dirjennak (2007) syarat bahan pengencer adalah sebagai berikut: (1) Mempunyai sifat isotonik terhadap semen, (2) Mempunyai sifat sebagai *buffer*, (3) Dapat melindungi spermatozoa dalam proses pendinginan, pembekuan, dan pencairan kembali, (4) Bersifat sumber nutrisi untuk metabolisme spermatozoa, (5) Mempunyai efek anti bakteri dan (6) Tidak boleh mengandung zat-zat yang bersifat toksik atau racun, baik terhadap spermatozoa maupun terhadap saluran kelamin hewan betina.

2.4. Semen Beku

Semen beku adalah semen hasil penampungan dengan vagina buatan, mempunyai konsentrasi dan motilitas yang memenuhi syarat, selanjutnya ditambah dengan bahan pengencer (diluter) menurut standart operasional prosedur di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari. Semen yang telah ditambah bahan pengencer selanjutnya dibekukan di bawah titik beku air antara -79°C sampai -196°C . Tujuan pembekuan adalah untuk mengawetkan viabilitas dan fertilitas sel spermatozoa (Partodihardjo, 1992). Menurut Susilawati (2000), pembekuan merupakan proses penghentian sementara metabolisme sel tanpa mematikan fungsi sel, metabolisme dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan.

Apabila suatu sel dibekukan, membran secara terbatas dapat menghalangi terbentuknya kristal es di bagian dalam membran dan mempertahankan keadaannya tetap terjaga sangat dingin tanpa disertai terbentuknya kristal es. Keadaan ini menimbulkan perbedaan tekanan osmotik di bagian luar dan bagian dalam membran sel. Sel berusaha membuat keadaan potensial kimia air intra dan ekstra seluler menjadi seimbang dengan mengeluarkan air melalui membran sel, akibatnya sel mengalami dehidrasi dan konsentrasi zat dalam sel akan meningkat (Toelihere, 1985).

Mekanisme pembekuan merupakan perubahan bentuk fisik timbal balik dari fase cair ke fase padat atau fase beku dan kembali ke fase cair. Perubahan fisika dari proses pembekuan meliputi penurunan suhu dalam keadaan tekanan normal disertai dehidrasi sampai ke tingkat tertentu dan mencapai temperatur di bawah 0°C (*deepfreezing*), sampai -196°C . Tujuan dari proses pembekuan adalah mempertahankan sesempurna mungkin beberapa sifat dari materi biologis terutama sifat viabilitas (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 besar intraseluler yang dapat merusak sel. Selain itu juga bisa karena peningkatan osmolaritas media pembekuan sehingga krioprotektan menjadi bersifat racun, selanjutnya terjadi kerusakan fisik yaitu terbentuknya kristal es ekstraseluler, toksisitas dari elektrolit yang pekat atau terjadinya *osmotic swelling* (Kasai, 1996).

Menurut Esteves *et al.* (2005), dari hasil penelitian yang menggunakan sampel semen manusia yang mengalami oligoasthenozoospermia didapatkan persentase motilitas spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan masing-masing sebesar 42% dan 8,0% sedangkan persentase spermatozoa hidup sebelum dan setelah pembekuan masing-masing adalah 89% dan 46,5%. Pada proses pembekuan dan *thawing* akan menyebabkan berbagai perubahan antara lain adalah ; (1) menurunkan motilitas spermatozoa, (2). perubahan pola penetrasi dalam cairan servik, (3) menurunkan daya penetrasi spermatozoa ke oosit, (4) perubahan struktur akrosom dan membran plasma spermatozoa. Dikatakan pula bahwa proses pembekuan semen dapat menurunkan motilitas sebesar 34 – 50% dan menurunkan integritas membran sebesar 45% (Anonymous, 2005).

Beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam proses pembekuan antara lain adalah; (1) media pengencer dan konsentrasi sel, (2) krioprotektan yang sesuai dan konsentrasi yang digunakan harus diperhatikan, (3) waktu dan temperatur penyeimbangan, (5) Pola laju

pendinginan (bentuk dan lajunya), (6) sifat kurva pencairan kembali, (7) penggunaan media pencairan kembali (Hunter, 1995).

2.5. Membran Plasma Spermatozoa

Spermatozoa ditutup oleh membran sel dari kepala sampai ekor, mempunyai struktur sangat kompleks dalam susunan mozaik yang teratur dan mempunyai peran biologik spesifik pada permukaannya (Jones, 1989). Membran sel spermatozoa mempunyai fungsi sebagai pembatas sel, mempertahankan integritas sel dan membentuk interfase dinamis antara sel dengan lingkungan sekitarnya. Pada umumnya membran sel mengandung enzim dan sistem transpor yang membantu mempertahankan keseimbangan intraseluler. Bagian luar membran sel banyak mengandung reseptor spesifik untuk mengenali isyarat molekuler tertentu dengan sel yang lain, sehingga memungkinkan komunikasi antar sel selama perkembangan (Aulanni'am, 2004^b).

Menurut Hafez (2000) permukaan spermatozoa mempunyai polaritas yang tinggi dan mempunyai lima daerah membran utama yang berkaitan erat dengan bagian dari masing-masing sel yang berkaitan dengan fungsi bagian sel yang berbeda. Membran sel akrosom kepala berfungsi untuk kapasitas, reaksi akrosom dan penembusan ovum pada proses fertilisasi. Membran akrosom bagian belakang (*post acrosomal region*) berfungsi untuk mengadakan kontak pertama dan menjadi satu dengan oolema ovum pada proses fertilisasi, sedangkan membran di bagian tengah ekor (*mid piece*) berfungsi untuk memperoleh substrat yang penting bagi energi spermatozoa dan menghantarkan gelombang gerak, dan membran utama berfungsi untuk pergerakan spermatozoa.

Komposisi membran spermatozoa terdiri dari lipid, protein, karbohidrat atau molekul lain yang bergabung bersama-sama dengan ikatan non kovalen yang sangat sensitif terhadap faktor luar, seperti temperatur, kekuatan ionik dan polaritas pelarut. Lipid merupakan

komponen struktur membran spermatozoa yang berperan penting dalam mempertahankan stabilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa secara keseluruhan, termasuk kemampuan kapasitas dan membuahi sel telur, serta ketidak stabilan spermatozoa dalam proses pendinginan dan pembekuan (Park and Graham , 1992).

Komposisi lipid membran yang bertanggungjawab terhadap fungsi spermatozoa adalah fosfolipid dan kholesterol. Fosfolipid memiliki molekul amfipatik dengan satu kelompok kepala hidrofilik dan beberapa rantai asil lemak hidrofobik. Sifat amfipatik dari molekul ini memungkinkan pembentukan membran lapis ganda (*bilayer*) pada spermatozoa (Darnell *et al.*, 1990).

Di antara dua lapisan fosfolipid hidrofobik dan hidrofilik terdapat protein globular dan fibrous dengan distribusi yang bervariasi. Protein ini bersifat dinamis dan dapat bergerak bebas di antara kedua lapisan fosfolipid. Protein pada membran ada yang terletak secara vertikal sehingga sebagian masuk dan menembus ke dalam dua lapisan fosfolipid serta berinteraksi dengan bagian hidrofilik, protein ini disebut protein integral. Sedangkan protein yang terletak dipermukaan luar dari membran sebagai pemegang kedua lapisan fosfolipid disebut protein perifer. Protein ini mempunyai fungsi sebagai reseptor terhadap rangsangan eksternal, sebagai sinyal terhadap cahaya, hormon, obat-obatan, faktor penumbuh, enzim dan antigen yang terlibat dalam pengenalan kepala spermatozoa, misalnya adhesi spermatozoa-zona pelusida, induksi reaksi akrosom dan fusi spermatozoa sel telur (Herrero *et al.*, 1999). Pablo *et al.* (1995) mengatakan bahwa membran plasma spermatozoa mengandung beberapa molekul yang berperan dalam proses fertilisasi. Molekul tersebut adalah lipid dan protein. Protein yang terkandung dalam membran plasma spermatozoa mempunyai peran utama dalam fusi spermatozoa dengan ZP3. yakni CD44 mengikat integrin dengan adanya Osteopontin dalam spermatozoa tersebut sehingga sehingga mudah mengalami fusi sperma ke dalam sel ovum (pembuahan) (Maura, 2005)

prostate dan cowper. Produksi yang spesifik HBP pada spermatozoa berhubungan dengan potensi kesuburan, besar kecilnya jumlah produksi berbeda pada tiap pejantan.

Pola perbedaan HBP pada spermatozoa sapi dapat dilihat dengan menggunakan antibody monoclonal dan western blot. Lebih jauh mengatakan bahwa HBP mempunyai varian kira-kira 31 kDA 41kDA , 45 kDA, 55 kDA yang ada hubungannya dengan peningkatan kesuburan air mani sapi.

Tujuan studi ini adalah untuk mengidentifikasi itu 55kDA HBP yang dikenal sebagai Osteopontin. Osteopontin telah terisolasi oleh heparin-affinitas chromatography dan reversed-phase cairan capaian tinggi chromatography dekat homogenitas. Secara biokimia menunjukkan bahwa Osteopontin adalah suatu unglycosylated, protein dasar. Osteopontin protein telah dideteksi dihasilkan oleh kelenjar vesikula dan prostata yang homogenates, dan Osteopontin telah diekstraksi dalam membrane sel spermatozoa dengan media hypertonic adalah cairan yang secara biokimia mirip dengan cairan plasma yang mengandung osteopontin.

N-Terminal Analisa Urutan dari Osteopontin menghasilkan suatu urutan 15 amino asam (VKPXSSGXSEEKQLN) dengan 85% homologous untuk sapi yang dikenal deoxyribonuclease (DNASE) I-like protein. (Cancel, et al., 1997). HBP dengan berat molekul 55-kDa yang selanjutnya diberi nama Osteopontin telah dikenali di dalam membran plasma spermatozoa sapi menunjukkan potensi kesuburannya lebih tinggi. Hasil survey menunjukkan bahwa angka kesuburan dari 36 sapi jantanair mani pejantan yang mengandung -positif osteopontin 26 pejantan, sedangkan 10 pejantan Osteopontin negatif . Berarti, sapi pejantan yang air maninya Osteopontin-positif mempunyai angka kesuburan sembilan persen lebih tinggi ($P < 0.01$) bila dibanding sapi penjantan Osteopontin-negatif (Cancel, et al., 1997).

2.8. Mekanisme Kerja Osteopontin

Air mani adalah hasil sekresi kelamin jantan secara normal yang diejakulasikan ke saluran kelamin betina sewaktu kopulasi atau ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan. Air mani yang diejakulasikan merupakan kombinasi produksi testis, produksi saluran pengeluaran dan sekresi kelenjar pelengkap (Hafez, 2000).

Air mani sapi terdiri dari dua bagian, yaitu spermatozoa dan plasma semen. Kandungan yang terdapat dalam spermatozoa maupun plasma semen salah satunya adalah protein. Protein dengan berat molekul 55-kDa yang selanjutnya diberi nama Osteopontin telah dikenali di dalam membran plasma spermatozoa maupun pada plasma semen sapi menunjukkan potensi kesuburannya lebih tinggi (Cancel, *et al.*, 1997).

Osteopontin merupakan protein spesifik yang diproduksi oleh kelenjar kelamin aksesori dan disekresikan di dalam cairan yang mungkin mengikat heparin dan mempercepat kapasitas spermatozoa setelah diejakulasikan, menghasilkan kesuburan sapi ditingkatkan karena mampu memproduksi protein (Maura, 2006). Osteopontin dapat menstabilkan membrane plasma karena dapat menstabilkan ikatan kovalen penyusun protein membrane plasma. Membrane plasma yang utuh ini akan mengakibatkan metabolisme spermatozoa berjalan lancar sehingga hasil metabolisme yang berupa ATP dapat digunakan untuk mempertahankan kondisi spermatozoa tetap hidup dan bergerak aktif. Hal ini ditandai dengan aktivitas enzim tirosin kinase yang meningkat.

Aktivitas tirosin kinase sangat penting untuk mengontrol fungsi spermatozoa serta reaksi yang mengatur fosforilasi tirosin kinase. Dengan meningkatnya aktivitas tirosin kinase ini maka fosforilasi tirosin kinase juga meningkat, peningkatan ini akan diikuti terjadinya kapasitas spermatozoa meningkat. Selama proses kapasitas terjadi peningkatan fisiologis dan fluiditas membrane yang menyebabkan peningkatan motilitas (Gordon, 1994), juga terjadi perubahan karakteristik fisik dan kimia, serta terjadi perubahan lipid yang diketahui

membantu pemasukkan ion kalsium ke dalam sel, peningkatan ion kalsium yang masuk ke dalam membrane dapat merangsang ikatan membrane dengan dengan cAMP intraseluler.

Ion kalsium dan cAMP diketahui sebagai pengatur untuk pergerakan ekor (Yanagimachi, 1988). Hal inilah yang lebih lanjut perlu adanya suatu pembuktian apakah diikuti pula dengan meningkatnya motilitas spermatozoa, viabilitas, membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh. Dengan meningkatnya kualitas spermatozoa ini diharapkan fertilisasi juga meningkat. Selain itu mekanisme Osteopontin merupakan protein yang dapat meningkatkan kesuburan spermatozoa bisa dengan jalan menurunkan kadar *reaction oxygen species* (ROS) akibat pergerakan aktif dari spermatozoa.

Malondialdehid (MDA) adalah produk akhir yang stabil dari peroksidasi lipid akibat adanya ROS, yang selanjutnya MDA ini dapat digunakan sebagai indikator terjadinya peroksidasi lipid pada membran spermatozoa (Koksal *et al.*, 2003). Osteopontin dapat juga mengaktivasi peningkatan signal transduksi yang selanjutnya mengakibatkan reseptor yang ada di ovarium yaitu zona pellusida-3 (ZP3) mudah mengenali spermatozoa tersebut, yakni CD44 mengikat integrin dengan adanya Osteopontin dalam spermatozoa tersebut sehingga mudah mengalami fusi sperma ke dalam sel ovum (pembuahan) (Maura, 2007)

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Umum

Meningkatkan mutu semen beku dengan mengukur kemampuan fertilisasi spermatozoa sapi perah FH yang didalam media pembekuannya ditambah Osteopontin.

3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Melakukan isolasi dan karakterisasi protein osteopontin membran plasma spermatozoa sapi perah FH.
2. Mengukur kadar protein osteopontin membran plasma spermatozoa sapi perah FH.

3.3. Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi secara ilmiah tentang keberadaan osteopontin pada membran plasma semen
2. Memberikan informasi ilmiah penambahan isolat osteopontin sebagai upaya meningkatkan kesuburan semen beku.

3.4. Manfaat Praktis

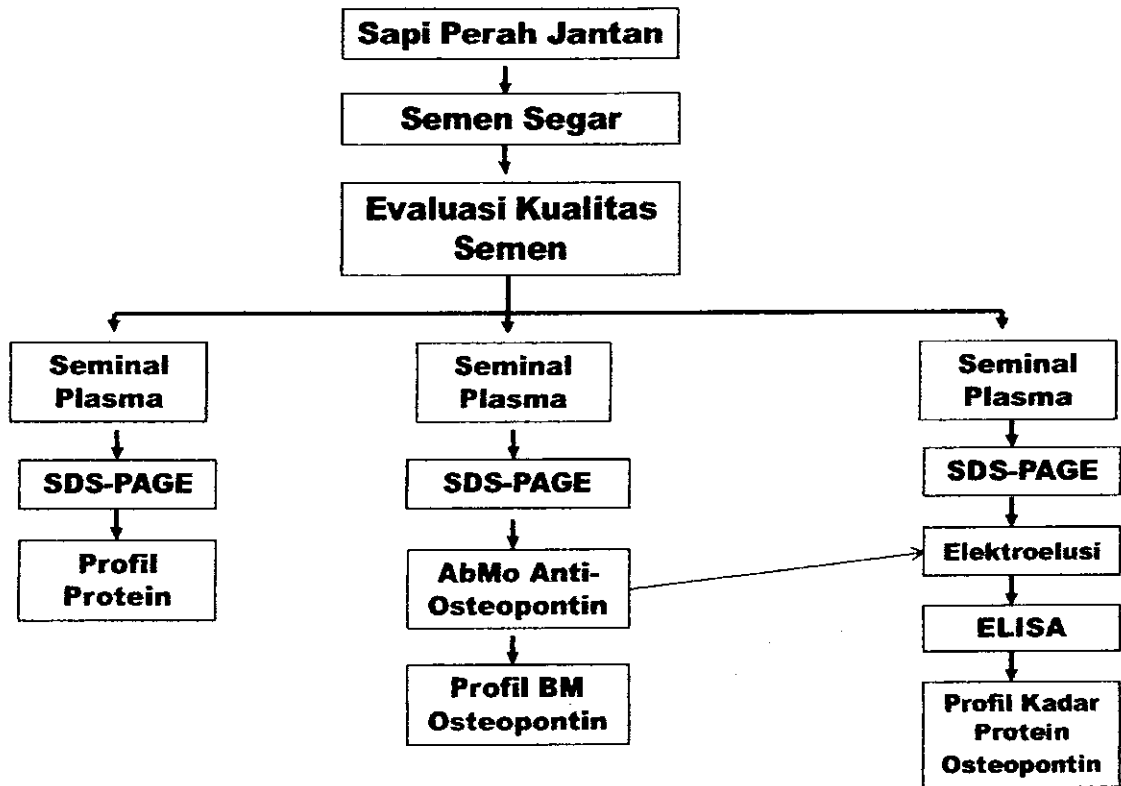
Bila media pembekuan yang ditambah osteopontin ini dapat meningkatkan daya fertilisasi, maka dapat digunakan sebagai media pembekuan untuk proses pembuatan semen beku sehingga semua pejantan yang dipelihara di balai inseminasi buatan mempunyai tingkat kesuburan yang tinggi dengan demikian angka kebuntingan pada sapi betina akan meningkat.

BAB IV METODE PENELITIAN

Kerangka pemecahan masalah dalam penelitian ini dibuat secara umum yang akan dijabarkan ke dalam metode yang lebih khusus dan terperinci. Pada garis besarnya penelitian ini merupakan penelitian laboratoris dan lapangan. Penelitian ini dilakukan secara bertahap yang terdiri atas dua tahap penelitian, yaitu : Penelitian tahap pertama bersifat eksploratif (tahap I), sedangkan pada tahap kedua bersifat eksperimental (tahap II) sehingga rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak lengkap (Santoso, 2005).

4.1. Penelitian Tahap I.

Penelitian tahap pertama ini dilakukan dilaboratorium dengan tahapan-tahapan metode sebagai berikut Penelitian tahap pertama ini dilakukan dilaboratorium dengan tahapan-tahapan metode sebagai berikut Isolasi dan Karakterisasi protein Osteopontin membran plasma spermatozoa meliputi : ekspresi Osteopontin pada membran plasma spermatozoa menggunakan monoklonal antibodi Osteopontin secara imunositokimia (ABGENT, no. Cat. AP7704b); penentuan berat molekul Osteopontin (dengan metode SDSPAGE yang dikonfirmasi dengan metode Western blot), elektroelusi dan penentuan kadar protein membran plasma spermatozoa. Bagan alir penelitian tahap I dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.1. Bagan Penelitian Isolasi dan Karakterisasi Protein Osteoponsin Spermatozoa Sapi Perah FH

4.2. Lokasi Penelitian

Secara umum penelitian ini dilakukan di daerah Jawa Timur yang meliputi :

- Departemen Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Laboratorium Semen Beku Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk pengambilan, pemeriksaan dan pembekuan semen.
- Laboratorium Fertilisasi *in vitro*, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (FKH Unair) untuk pelaksanaan fertilisasi *in vitro*.
- Infectious Tropical Disease (ITD) Universitas Airlangga untuk ekstraksi, karakterisasi, isolasi protein Osteopontin dari semen sapi
- Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Brawijaya untuk ekstraksi, karakterisasi, isolasi protein Osteopontin dari semen sapi dan uji spesifisitas anti-Osteopontin.

- Peternakan Sapi perah U.D Odihanjaya, Pujon Malang untuk pengambilan semen dan uji lapangan

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah sejumlah semen segar sapi yang diperoleh dengan cara penampungan menggunakan vagina buatan dari sapi jantan yang berumur 3 – 4 tahun yang terdapat di Taman Ternak Pendidikan FKH Unair dan Peternakan sapi perah U.D Odihanjaya Pujon Malang.

4.3.2. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah hasil random dari sejumlah sampel semen segar sapi berkualitas baik didasarkan pada kriteria yang ditetapkan oleh Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Direktorat Jenderal Peternakan yaitu persentase motilitas awal minimal 70%, konsentrasi spermatozoa lebih dari 600 juta/ml, persentase spermatozoa hidup lebih dari 80% dan spermatozoa abnormal kurang dari 20%.

4.4. Bahan dan Peralatan Penelitian

Pada penelitian tahap I diperlukan semen sapi yang dipisahkan antara spermatozoa dengan plasma semen untuk mendapatkan protein dari spermatozoa maupun plasma semen. Penelitian tahap II diperlukan semen sapi yang ditambah dengan bahan pengencer serta isolat Osteopontin.

Bahan dan reagen yang dipakai dalam penelitian tahap I adalah phosphate buffer saline (PBS) pH 7, tween 20 (polyoxyethylen sorbitan monolaurat, Art, 822184, Merck-Schuchardt, Munchen), phenyl methene sulfonil fluorid (PMSF, Biorad), etanol absolut, buffer Tris-HCl, NaN₃ (Sodium Azide), mAb-Osteopontin (ABGENT), Osteopontin standar

(SIGNALCHEM), substrat Western Blue (Western Blue Stabilized. Substrate for alkaline phosphatase cat # S 3841, Promega Co., USA), Anti IgG Rabbit AP (Anti Rabbit IgG C (Fc), AP Conjugate, Catalog # S 3731, Promega Co. USA), Anti IgG Rabbit SA-HRP (Catalog # S 3731, Promega Co. USA), nitroscelulosa (Hybond-C pure, nitrocellulose membrane, Amersham Life Science-England), kertas tissue, Adenosin triphosphate (ATP) BM 551,2 g/mol, histon (sigma, H 5505), TCA (*Tri Chlor acetic Acid*) 8%, BO caffeine (*Brickett and Olliphants Caffein*), Tris Cl, KCl, NaCl, KH_2PO_4 , Tween-20, Magnesium Klorida (MgCl_2), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , etanol absolut ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), aqua DM (*deionized water*) steril, bis-akrilamida, sodium dodecyl sulphate (SDS), Ammonium per sulfate (APS), *N,N,N',N'* tetramethyl ethylene diamina (TEMED), dan *bromophenol blue*. Sedangkan peralatan yang digunakan adalah Blotter (Bio-Dot Apparatus, BIORAD-USA), microplate, vacuum pump, vortex, gunting, pipet eppendorf, pipet Pasteur, millipore, plastik tip, gunting, kantong selofan, sentrifus, tabung reaksi, *refrigerated centrifuge*, freezer, autoclaf, labu takar 10 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL, pipet volume 10 mL, gelas ukur 100 mL, beaker gelas 10 mL, 250 mL, 1000 mL, pipet tetes, pengaduk gelas, gelas arloji, pengaduk magnetic, digital pH meter, neraca analitik (sartorius basic P-160), tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), incubator (memmert), vortex (Guo-Huq), sonikasi (Branson 200), spektrofotometer UV, mini 2D elektroforesis protein II (Biorad), *autoclave*, stirer, corong gelas, bola hisap, botol semprot, eppendof dan lemari pendingin.

Bahan dan reagen yang digunakan pada penelitian tahap II adalah TCM-199, Bovine Serum Albumin (BSA), Phosphate Buffer Saline (PBS), NaCl fisiologis, gliserol, susu skim, kuning telur, eosin-negrosin, nitrogen cair, gentamycin, kertas tissue. Peralatan yang digunakan adalah *cool top*, *water bath*, vagina buatan sapi, laminar flow, straw, *filling-sealing*, goblet, canister, container, cawan petri, pipet Pasteur, tabung reaksi, mikroskop *dissecting*, mikroskop inverted, mikroskop optik, obyek glass, *cover glass*, *insemination gun*.

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Penelitian Tahap Pertama

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

1. Melakukan pemisahan protein membran plasma spermatozoa dan plasma semen sapi dengan sentrifugasi dan sonikasi
2. Melakukan karakterisasi dan identifikasi protein membran plasma spermatozoa sapi perah FH dengan SDS – PAGE
3. Melakukan konfirmasi adanya Osteopontin pada membran plasma spermatozoa sapi perah FH dengan metode imunositokimia
4. Melakukan isolasi Osteopontin dari membran plasma spermatozoa sapi perah FH dengan Elektroelusi
5. Melakukan pemeriksaan kadar Osteopontin dengan metode ELISA
6. Melakukan konfirmasi isolat Osteopontin spermatozoa dan plasma semen sapi dengan teknik immunoblotting (Dot blot, Western blot dan Imunositokimia)

4.5.2. Konfirmasi adanya Osteopontin pada Spermatozoa dan Plasma Semen Sapi perah dengan Teknik Imunositotokimia

Pemeriksaan imunositokimia dilakukan pada spermatozoa dan plasma semen sapi bertujuan untuk mengetahui ekspresi Osteopontin pada membran plasma spermatozoa dan plasma semen. Tahapan pemeriksaannya meliputi :

1. Pembuatan preparat ulas spermatozoa

Semen ditetaskan pada bagian tengah gelas obyek, diratakan pada permukaan gelas obyek. Didiamkan selama 30 – 45 menit, selanjutnya ditetesi dengan methanol 95% dikeringkan selama 15 menit. Buang sisa methanol kemudian preparat disimpan dalam kotak

tempat preparat histologis. Selanjutnya kotak preparat disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C sampai dilakukan pewarnaan imunositokimia (Partodihardjo,1992)

2. Imunositokimia

Preparat dicuci dalam PBS pH 7.4 selama 3 x 5 menit. Selanjutnya direndam dalam 3% hidrogen peroksida (dalam *DI Water*) selama 5 – 10 menit. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan antibodi primer MAb-tirosin kinase (ABGENT) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan antibodi sekunder anti *rabbit* –IgG biotin *labelled* selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan SA-HRP (*Streptavidin- Horseradish Peroxidase*) selama 30 – 60 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan kromogen *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) selama 10 – 20 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3 x 5 menit. Dilakukan *counterstain* dengan hematoksilin selama 5 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan aquades selama 3 x 5 menit. Selanjutnya *mounting* dengan entellan. Pengamatan menggunakan mikroskop optik dengan pembesaran 400x (Nurhidayat, 2002).

4.5.3. Pemisahan Protein Spermatozoa dan Plasma Semen Sapi

Sampel semen yang ditampung dalam tabung reaksi setelah dilakukan pemeriksaan makroskopis (volume, warna, konsistensi dan pH) dan mikroskopis (motilitas, gerakan massa dan persentase spermatozoa hidup) selanjutnya di sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan pellet (spermatozoa) dengan plasma seminalis. Kemudian baik pellet maupun plasma semen ditambah dengan media BO-cafein 1 ml, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambah dengan PBS-tween 5 kali volume, ditambah *Phenylmethenesulfonyl fluoride* (PMSF) sebagai inhibitor enzim protease sebanyak 5 kali volume, selanjutnya di-vortex

selama 10 menit, dilanjutkan dengan sonikasi selama 20 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Endapan dibuang, supernatan ditambah dengan etanol dingin 1 : 1, disimpan dalam refrigerator selama 1 jam sampai terbentuk bintik-bintik putih, sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, dimasukkan ke refrigerator lagi selama 5 menit, Kemudian etanol dibuang dan dikeringkan menggunakan tissue dan dibiarkan sampai bau etanol hilang. Selanjutnya ditambah dengan Tris-HCl. Hasil akhirnya adalah isolat *crude* protein dari membran plasma spermatozoa maupun plasma semen (Aulanni'am, 2004).

4.5.4. Karakterisasi dan Identifikasi Osteopontin dengan SDS-PAGE

Identifikasi Osteopontin dengan SDS-PAGE bertujuan untuk mengetahui gambaran beberapa pita protein. Tahapan kerjanya adalah sebagai berikut: masukkan (*separating gel*) ke dalam alat Elektroforesis melalui dinding sampai di bawah batas atas. Selanjutnya tambahkan akuades sampai batas atas supaya *separating gel* rata. Selanjutnya akuades diserap dengan tissue dan tambahkan *stacking gel* melewati dinding sampai penuh, masukkan *comb* (pencetak sumuran dari gel) dan ditunggu terbentuk gel. Selanjutnya *comb* diambil dan dibersihkan dari sisa gel dengan tissue. Cetakan gel yang sudah jadi dipindahkan dan dimasukkan ke dalam *chamber*, kemudian direndam dalam *running buffer*. Selanjutnya diletakkan cetakan penuntun sampel yang akan di *running*. Sampel penelitian berupa isolat protein membran spermatozoa dan plasma semen sapi sebanyak 35 µl dimasukkan ke dalam lubang cetakan dengan tip 200 µl. Langkah berikutnya *chamber* dihubungkan dengan alat Biorad, *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 130 V, 30 mA selama 1,5 jam. Jika reaksi *gel* sudah sampai bawah kemudian dimatikan dan *plate* dibuka dan dipisahkan. Selanjutnya hasilnya berupa lembaran berbentuk gel diwarnai dengan *coomasie blue* dan di *sacker* (digoyang) selama 30 menit. Kemudian dikeluarkan dan ditambahkan dengan cairan

destaining dan di *sacker* lagi selama 30 menit. Jika cairan sudah terlihat biru diganti dengan cairan *destaining* yang baru begitu seterusnya sampai cairan berwarna putih dan hasilnya berupa beberapa pita protein. Berat molekul akan dapat terlihat pada cetakan gel SDS-PAGE (Rantam, 2003).

4.5.5. Isolasi Osteopontin dengan Teknik Elektroelusi

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selopahan. Selanjutnya dimasukkan dalam *block glass* yang mengandung PBS, setelah itu di *stirer* selama 24 jam. Setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Untuk mengetahui bahwa protein sudah mengalami elusi maka potongan gel diwarnai dengan pewarnaan silver, bila tidak terdapat pita artinya protein sudah ter-elusi (Aulanni'am, 2004).

4.5.6. Konfirmasi isolat Osteopontin Spermatozoa dan Plasma semen dengan Teknik Immunoblotting

1. Dot blotting

Konfirmasi isolat Osteopontin berdasarkan spesifisitas reaksi dengan antibodi monoklonal Osteopontin (MAb-Osteopontin ABGENT). Analisis melalui metode *dot blotting* dilakukan sebagai berikut: : sampel isolat Osteopontin sebagai antigen diencerkan 50 kali dengan PBS pH 7,4 . 50 μ L kemudian ditetaskan pada membran nitroselulosa yang sudah diletakkan pada alat *dot blotter* untuk dikeringkan. Setelah kering, dilakukan *blocking* dalam PBS-susu skim 5% pada semua tetesan selama 1 jam diatas alat penggoyang (*shaker*). Selanjutnya dicuci dengan PBS-Tween 20 0,05% selama 3 menit sebanyak 3 kali. Membran diinkubasi dengan antibodi primer (MAb-Osteopontin, ABGENT) yang telah diencerkan 50 kali dalam PBS-susu skim 1% pada suhu kamar sambil digoyang selama 2 jam. Membran dicuci dengan PBS-Tween 20 0,05% selama 3 menit dan diulang 3 kali. Kemudian diinkubasi

dengan antibodi sekunder (*Anti Rabbit IgG AP Conjugate* (Promega Corporation, USA) yang diencerkan dengan TBS 1:2500 selama 1 jam pada suhu kamar dan dicuci lagi dengan PBS-Tween 20 0,05%. Selanjutnya membran direndam dalam substrat *Western Blue* (Promega Corporation, USA) selama 30 menit dan reaksi dihentikan dengan penambahan aquades ketika muncul warna biru/ keunguan dengan intensitas yang jelas.

2. Western Blotting

Metoda *Western Blotting* pada penelitian ini digunakan untuk konfirmasi dalam menentukan apakah protein hasil SDS-PAGE sebelumnya adalah benar Osteopontin yang dimaksud. Teknik *Western Blotting* dapat digunakan untuk konfirmasi Berat Molekul (BM) dari protein yang dimaksud. Langkah selanjutnya adalah dengan melakukan konfirmasi dari hasil *Western Blotting*, SDS-PAGE, jika berat molekul yang muncul dari kedua metode itu sama, maka dapat dikatakan bahwa protein tersebut adalah benar Osteopontin yang dimaksud.

Pita protein yang muncul dari hasil *running* dalam SDS-PAGE 12% dalam kondisi tereduksi dan satu sumuran adalah *marker* dan ditransferkan pada membran nitroselulosa. Membran diblok dengan 3% BSA dalam 20 mM Tris-Cl pH 7,5 dan 150 mM NaCl selama 1 jam, selanjutnya diinkubasi dalam Tris/NaCl yang mengandung BSA 1% dengan Antibodi monoklonal Osteopontin (MAb-Osteopontin, ABGENT) sebagai antibodi primer. Kemudian dicuci dalam Tris-Cl yang mengandung 0,05% Tween 20. Selanjutnya membran diinkubasi dengan antibodi sekunder (*Anti-Rabbit Anti IgG Alkaline Phosphatase conjugated*, pengenceran 1:2500) dan ditambahkan substrat *western blue*. Pita yang muncul adalah pita osteopontin (Rantam, 2003).

BAB V HASIL PENELITIAN

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel, grafik, foto atau gambar yang disusun sesuai dengan tahapan penelitian yaitu :

1. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi
2. Isolasi dan karakterisasi biokimiawi protein Osteopontin dari membran semen spermatozoa sapi jantan.
3. Pengukuran kadar isolat protein Osteopontin dari membrane spermatozoa sapi.

5.1. Penelitian I : Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi**5.1.1. Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar Sapi**

Hasil pemeriksaan makroskopis semen segar sapi perah FH yang meliputi volume, konsistensi, warna, bau dan pH dapat dilihat pada tabel 5.1. di bawah ini :

Tabel 5.1. Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar Sapi Perah FH

No.	Volume (ml)	Konsistensi	Warna	Bau	pH
1.	8,2	Kental	Putih susu	khas	6-7
2.	8,2	Kental	Putih susu	khas	6-7
3.	7,5	Kental	Putih susu	khas	6-7
4.	5,5	Kental	Putih susu	khas	6-7
5.	6	Kental	Putih susu	khas	6-7
6.	7,5	Kental	Putih susu	khas	6-7
7.	6,5	Kental	Putih susu	khas	6-7
8.	6	Kental	Putih susu	khas	6-7
9.	5,3	Kental	Putih susu	khas	6-7
10.	5	Kental	Putih susu	khas	6-7

5.1.2. Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar Sapi

Hasil pemeriksaan mikroskopis semen segar sapi perah FH yang meliputi gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi, persentase hidup dan persentase abnormalitas dapat dilihat pada tabel 5.2. di bawah ini :

Tabel 5.2. Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar Sapi Perah FH

No.	Gerakan massa	Gerakan individu	Konsentrasi (juta/ml)	Persentase Hidup (%)	Persentase abnormalitas (%)
1.	++	75/3	1882	90	10
2.	++	70/3	526	85	5
3.	+	70/2	1052	85	7
4.	++	70/3	1010	85	7
5.	++	75/3	1025	90	12
6.	++	75/2	1015	85	12
7.	++	70/3	1035	90	8
8.	++	70/2	1015	85	7
9.	++	75/3	1775	85	12
10.	++	80/2	775	90	11

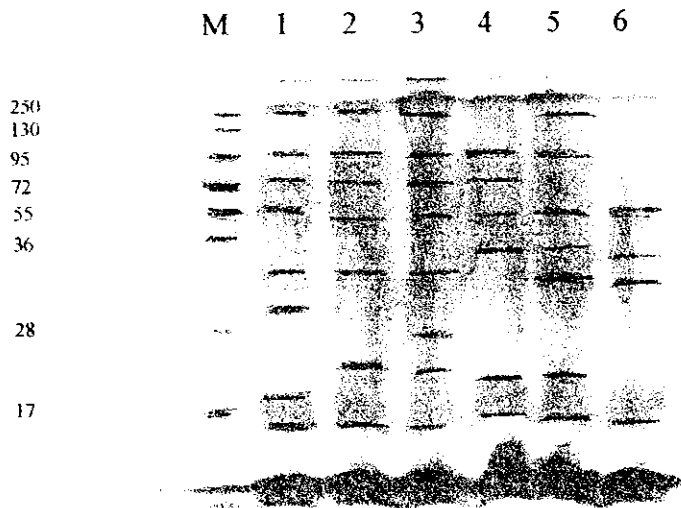
5.2. Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Protein Osteopontin dari membrane dan plasma semen spermatozoa sapi jantan

5.2.1. Uji Pengikatan Anti-Osteopontin dan Protein-Osteopontin dari membrane spermatozoa sapi jantan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah protein Osteopontin diproduksi dan diekspresikan oleh membrane spermatozoa sapi melalui tahapan : *embedding*, *coating* obyek gelas, pembuatan preparat dan imunositokimia.

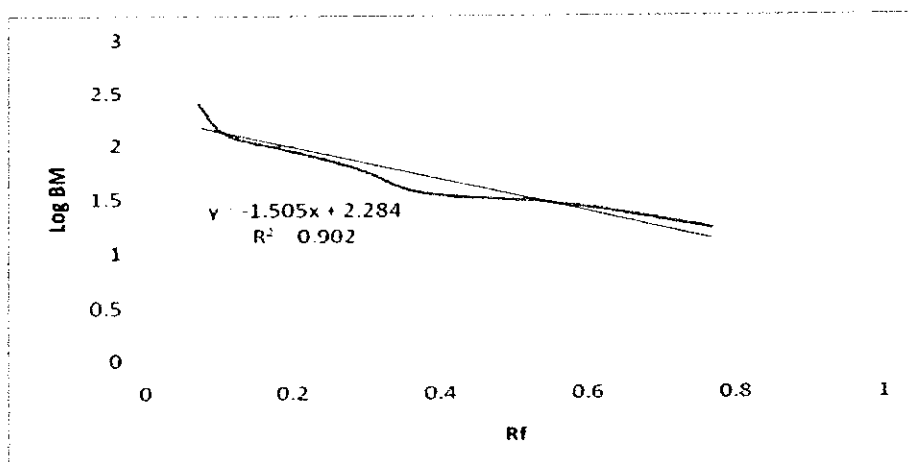
5.2.2. Identifikasi Protein Osteopontin dari beberapa Sapi dengan SDS-PAGE

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein-protein yang ada pada membrane spermatozoa dan plasma semen. Identifikasi protein berdasarkan pita-pita protein yang muncul pada elektroforegram membrane spermatozoa dan plasma semen. Hasil SDS-PAGE dari membran spermatozoa sapi dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 5.1. Elektroforegram Membran Spermatozoa Sapi

Penentuan berat molekul dilakukan dengan bantuan protein standar. Berat molekul isolat Osteopontin ditentukan dengan mengplotkan harga *Retardation Factor* (Rf) yang diperoleh pada persamaan regresi linier $y = -1,505x + 2,284$. Kurva hubungan antara Rf (x) dengan log BM protein standar (y) dapat dilihat pada grafik di bawah ini :



Gambar 5.2. Kurva Hubungan Antara Rf dengan Log BM Protein Standar

Sedangkan protein-protein marker dapat dilihat pada tabel 5.3. di bawah ini :

Tabel 5.3. Protein-Protein Marker

A	b	RF	Log BM	BM (kDa)
0,4	5,6	0,071429	2,397940	250
0,6	5,6	0,107143	2,113943	130
1,0	5,6	0,178571	1,977724	95
1,4	5,6	0,25	1,857332	72
1,7	5,6	0,303571	1,740363	55
2,1	5,6	0,375	1,556303	36
3,2	5,6	0,571429	1,447158	28
4,2	5,6	0,767857	1,230449	17

Pita protein yang terdapat pada plasma semen sapi dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 5.4. Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 1

A	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,4	5,6	0,071429	2,176499	150,14
1,0	5,6	0,178571	2,015251	103,57
1,3	5,6	0,232143	1,934625	86,03
1,7	5,6	0,303571	1,827126	67,16
2,5	5,6	0,446429	1,612124	40,93
4,2	5,6	0,767857	1,128375	13,44

Tabel 5.5. Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 2

A	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,4	5,6	0,071429	2,176499	150,14
1,0	5,6	0,178571	2,015251	103,57
1,4	5,6	0,25	1,90775	80,86
1,8	5,6	0,321429	1,80025	63,13
2,5	5,6	0,446429	1,612124	40,93
3,8	5,6	0,678571	1,262750	18,31

Tabel 5.6. Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 3

A	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,5	5,6	0,089286	2,149625	141,13
1,0	5,6	0,178571	2,015251	103,57
1,4	5,6	0,25	1,90775	80,86
1,8	5,6	0,321429	1,80025	63,13
2,6	5,6	0,464286	1,585250	38,48
3,4	5,6	0,607142	1,37025	23,46
3,8	5,6	0,678571	1,262751	18,31
4,1	5,6	0,732143	1,182124	15,21

Tabel 5.7. Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 4

a	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
1,0	5,6	0,178571	2,015251	103,57
1,4	5,6	0,25	1,90775	80,86
1,8	5,6	0,321429	1,80025	63,13
2,3	5,6	0,410714	1,665875	46,33
4,0	5,6	0,714286	1,209	16,18
4,4	5,6	0,785714	1,1015	12,63

Tabel 5.8. Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 5

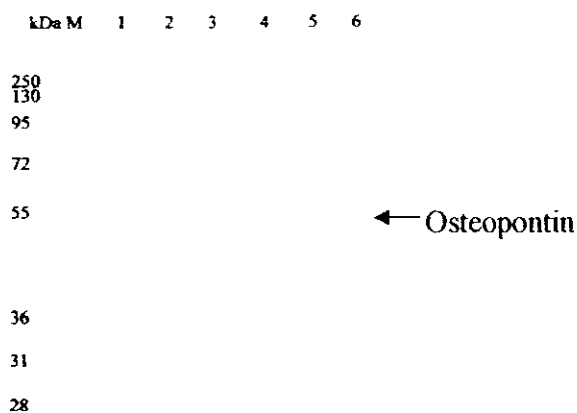
A	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,5	5,6	0,089286	2,149625	141,13
1,0	5,6	0,178571	2,015251	103,57
1,8	5,6	0,321429	1,80025	63,13
2,3	5,6	0,410714	1,665875	46,33
2,7	5,6	0,482143	1,558375	36,17
3,9	5,6	0,696429	1,235875	17,21
4,5	5,6	0,803571	1,074625	11,87

Tabel 5.9. Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi no 6

a	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
1,8	5,6	0,321429	1,80025	63,13
2,4	5,6	0,428571	1,639	43,55
2,7	5,6	0,482143	1,558375	36,17
4,6	5,6	0,821429	1,04775	11,16

5.2.3. Identifikasi Protein Osteopontin dengan *Western Blot*

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui molekul protein Osteopontin spermatozoa sapi bereaksi spesifik dengan anti- Osteopontin. Hasil *Western Blot* dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 5.3. Hasil *Western Blot* Isolat Osteopontin dengan BM 55 kDa

5.3. Pengukuran kadar Osteopontin Hasil Isolasi Protein Osteopontin Spermatozoa Sapi.

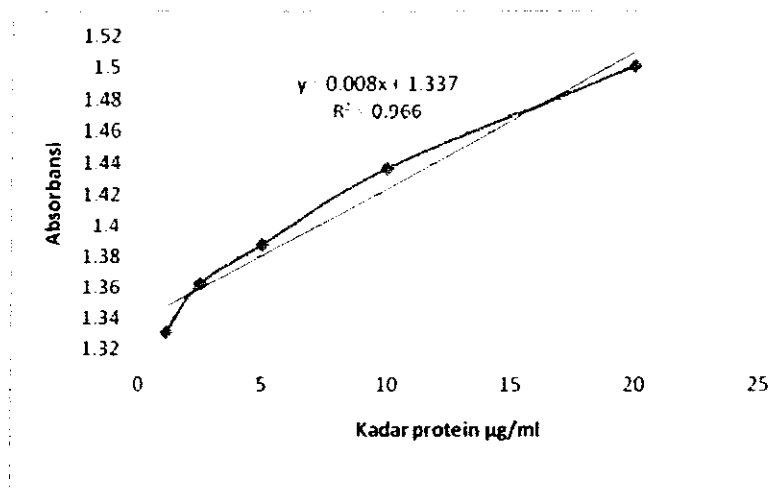
5.3.1. Pengukuran Kadar Osteopontin dengan Metode Biuret

Penentuan kadar Osteopontin hasil isolasi dari spermatozoa sapi menggunakan Osteopontin standar (Signal, Chem) dengan metode Biuret.

Tabel 5.10. Konsentrasi dan Nilai Absorbansi Protein Osteopontin Standar

Konsentrasi ug/ml (x)	Absorbansi (y)
20	1,501
10	1,437
5	1,388
2,5	1,363
1,25	1,331

Kurva standar protein Osteopontin dan nilai absorbansinya dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 5.4. Grafik Kurva Baku Protein Osteopontin

Hasil kadar protein Osteopontin setelah mengkonversi nilai absorbansi dengan rumus $y=0,008x+1,337$. Berdasarkan persamaan garis yang terlihat pada gambar 5.8 diketahui bahwa kadar Osteopontin hasil elektroelusi adalah antara 0,125 sampai 21,25 µg/ml. Bisa dilihat pada table 5.11. di bawah ini :

Tabel 5.11. Perhitungan kadar Osteopontin dari beberapa sampel semen sapi

No.	Sampel semen sapi	Absorbansi 550 nm	Konsentrasi µg/ml
1.	Nomor 1	1,339	0,25
2.	Nomor 2	1,507	21,25
3.	Nomor 3	1,419	10,25
4.	Nomor 4	1,364	3,375
5.	Nomor 5	1,502	20,625
6.	Nomor 6	1,338	0,125
7.	Nomor 7	1,313	3
8.	Nomor 8	1,383	5,75
9.	Nomor 9	1,340	0,375
10.	Nomor 10	1,427	11,25

Kadar yang terendah dimiliki oleh sampel semen sapi no. 8, sedangkan kadar yang tertinggi dimiliki oleh sampel semen sapi no. 4. Berdasarkan hasil ini bisa digunakan sebagai acuan besarnya suplementasi Osteopontin ke dalam media pembekuan (diusulkan untuk penelitian tahun kedua tahun anggaran 2013).

BAB VI PEMBAHASAN

Pada bagian ini dibahas secara berurutan berdasarkan tahapan hasil penelitian mulai dari pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen, Isolasi dan karakterisasi biokimiawi protein Osteopontin dari spermatozoa sapi, kadar Osteopontin hasil isolat protein Osteopontin spermatozoa sapi.

6.1. Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Semen Sapi

Pada pemeriksaan semen segar baik makroskopis maupun mikroskopisnya pada sapi no 1 – 10 memenuhi standar.

Ini berarti spermatozoa tersebut akan dapat menuju ke ovum, sehingga akan terjadi fertilisasi. Apabila gerakan individu yang jelek ini bisa disebabkan karena kadar fruktosa dalam semen rendah, sehingga energy yang dibutuhkan untuk pergerakan spermatozoa sangat kurang akibatnya banyak spermatozoa yang mati. Selain itu mungkin bisa juga spermatozoa tersebut dari sapi yang memang secara genetic mempunyai kualitas rendah. Perlu diketahui bahwa untuk membuahi sel ovum butuh gerakan individu yang progresif dan cepat sehingga dalam perjalanannya bisa mencapai sel ovum dan membuahi (Hafez, 2000). Selain itu persentase gerakan individunya juga harus tinggi, hal ini dikarenakan dalam perjalanannya menuju sel ovum banyak rintangan sehingga banyak spermatozoa yang mengalami kematian.

6.2. Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Protein Osteopontin dari Spermatozoa Sapi

6.2.1. Uji Pengikatan Anti-Osteopontin dan Protein-Osteopontin Spermatozoa dengan Imunositokimia

Imunositokimia merupakan metode pewarnaan suatu antigen (protein) di dalam jaringan atau sel dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan antigen yang spesifik oleh suatu antibody. Hasil reaksi antigen dan antibody dapat diidentifikasi karena antigen antibody diikat oleh suatu penanda yang dapat divisualisasikan. Imunositokimia dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan suatu antigen di dalam jaringan atau sel serta dapat mendeteksi letak antigen tersebut diakumulasikan.

Teknik yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode Avidin-Biotin complex. Osteopontin sebagai antigen akan terikat oleh antibody melalui dua tahap. Antibodi primer (monoclonal antibody Osteopontin) berikatan langsung dengan Osteopontin, selanjutnya antibody primer berikatan dengan antibody sekunder (anti Rabbit-IgG biotin labeled). Pada setiap tangan antibody sekunder telah terkonjugasi dengan biotin yang dapat berikatan dengan molekul avidin. Antibody primer berikatan pada tangan-tangan antibody sekunder yang terikat biotin. Kompleks ikatan avidin-biotin-antibodi ini dapat mengidentifikasi lokasi Osteopontin pada spermatozoa (Nurhidayat, 2002).

Hasil konfirmasi adanya ekspresi Osteopontin pada spermatozoa sapi dapat diketahui dengan teknik imunositokimia yang dapat dilihat pada gambar. 5.2. visualisasi warna kecoklatan pada bagian kepala spermatozoa menunjukkan bahwa terjadi ikatan kompleks antara Osteopontin -monoklonal antibody- Osteopontin (MAB- Osteopontin, ABGENT)- anti Rabbit-IgG berlabel biotin-SA-HRP dengan kromogen 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB).

Menurut penelitian Sprott *et al.* (2000), bahwa pejantan dengan air mani yang mengandung Osteopontin yaitu air mani yang di membran plasmanya mengandung protein

dengan berat molekul 31 kDa adalah mempunyai tingkat kesuburan yang lebih tinggi antara 9 – 40 % bila dibanding dengan air mani pejantan tanpa Osteopontin. Lebih lanjut mengatakan bahwa membrane plasma spermatozoa mengandung protein Osteopontin yang berperan utama dalam proses kapasitasi spermatozoa. Hal ini membuktikan bahwa pada membrane spermatozoa sapi adalah benar mengandung Osteopontin yang selanjutnya dapat diisolasi dan dikarakterisasi.

6.2.2. Identifikasi Protein Osteopontin Spermatozoa dengan SDS-PAGE

Hasil SDS-PAGE isolat Osteopontin membran spermatozoa dapat dilihat pada gambar 5.5. Pita-pita protein yang muncul berbeda antara sapi yang satu dengan yang lain. Paling sedikit pita yang muncul sebanyak 4 pita dengan berat molekul antara 11,16-63,13 kDa, dan yang terbanyak ada 8 pita dengan berat molekul antara 15,21-141,13 kDa. Penentuan berat molekul dilakukan dengan bantuan protein standar. Berat molekul protein Osteopontin ditentukan dengan mengplotkan harga *Retardation Factor* (Rf) yang diperoleh pada persamaan regresi linier $Y = -1.505X + 2.284$ kurva hubungan antara Rf (X) dengan log BM protein standar (Y) (gambar 5.4).

Mercaptoethanol digunakan untuk merusak ikatan disulfida dan memecah protein. SDS digunakan untuk mengisi protein secara natural, sehingga semua protein mempunyai isi sama dengan rasio massa (SDS per 1,4 asam amino). Bila protein tersebut diisikan ke dalam gel dan dengan menggunakan listrik, protein bermigrasi menembus lubang gel *polyacrylamide*, gel memisahkan protein berdasar ukuran molekul. Protein dengan molekul kecil akan bergerak lebih cepat ke bawah, sedangkan molekul besar bergerak lebih lambat. Pada elektroforegram hasil SDS-PAGE nampak pita protein dengan berat molekul paling kecil berada paling bawah sedangkan protein dengan berat molekul paling besar berada paling atas.

6.2.3. Identifikasi Protein Osteopontin dengan *Western Blot*

Molekul protein yang terlihat pada membran nitroselulose melalui metode SDS-PAGE masih belum spesifik. Oleh karena itu diperlukan uji spesifisitas secara kimia sehingga didapatkan molekul protein yang spesifik sesuai dengan keinginan. Salah satu uji spesifisitas yang biasa digunakan adalah western blotting (Murray et al., 2003).

Hasil *Western blot* dapat dilihat pada gambar 5.5. Pita protein yang dikenali oleh antibodi monoklonal anti- Osteopontin diyakini adalah protein Osteopontin dengan berat molekul 55 kDa. Pita-pita protein dengan berat molekul tersebut dielektroelusi supaya terpisah dengan protein lain dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein.

Western blot bergantung pada antibodi primer untuk mendeteksi protein yang ada pada membran atau gel. Penambahan antibodi sekunder akan terbentuk kompleks protein-antibodi-antibodi *sandwich*. Antibodi sekunder berikatan dengan enzim *horse radish peroxidase* yang dapat merubah substrat luminal menjadi substansi berwarna terang. Substansi ini dapat diukur kadar protein dan ukuran molekul relatif dengan dibandingkan protein marker.

Hasil western blot ini mengindikasikan bahwa molekul Osteopontin berikatan secara spesifik dengan anti-Osteopontin sebagai antibodi primer dan anti rabbit IgG sebagai antibodi sekunder. Anti-Osteopontin dan anti rabbit IgG dapat mengenali protein Osteopontin sebagai pita dengan berat molekul 55 kDa. Oleh karena itu dapat diyakini bahwa pita yang muncul pada SDS-PAGE adalah pita molekul Osteopontin dengan BM sebesar 55 kDa.

6.2.4. Pengukuran kadar Osteopontin Hasil Isolasi Protein Osteopontin Spermatozoa Sapi.

Pengukuran konsentrasi protein dengan metode Biuret, menurut Wiseman (1985) dan Holme *and* Peck (1993) yang dikutip oleh Aulanni'am,2005 mengatakan, bahwa reaksinya berlangsung dengan pembentukan kompleks ungu protein reagen Biuret. Metode biuret ini didasarkan pada pembentukan kompleks berwarna ungu. Kompleks ini terbentuk apabila suatu peptida atau protein yang terdiri dari dua ikatan peptida atau lebih bereaksi dengan CuSO_4 dan NaOH . Warna yang timbul disebabkan karena kompleks ion Cu^{2+} dengan empat atom nitrogen yang berasal dari empat cincin peptida. Selanjutnya diukur pada panjang gelombang maksimum yaitu pada 550 nm dengan spektrofotometer. Hasil pengukuran absorbansi pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi linier sehingga dihasilkan kurva baku Osteopontin.

Kadar protein Osteopontin hasil isolasi dihitung dengan mengkonversi pada kurva protein Osteopontin standar yang sudah diketahui konsentrasinya dengan persamaan garis $Y=0,008X+1,337$. Berdasarkan persamaan garis yang terlihat pada gambar 5.8. diketahui bahwa kadar Osteopontin hasil elektroelusi adalah berkisar antara 0,125 sampai 21,25 $\mu\text{g/ml}$. Ini berarti didalam semen sapi tersebut mengandung protein Osteopontin, sehingga bisa dikatakan sapi tersebut lebih subur. Data ini dipakai sebagai dasar untuk penentuan dosis suplementasi Osteopontin ke dalam media pembekuan semen yaitu sebesar 10 $\mu\text{g/ml}$ (P1), 20 $\mu\text{g/ml}$ (P2) dan 30 $\mu\text{g/ml}$ (P3) yang akan diaplikasikan pada penelitian tahap kedua (Tahun Anggaran 2013).

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Sel-sel spermatozoa sapi terutama membrannya mengekspresikan Osteopontin dengan berat molekul 56 kDa.
2. Kadar konsentrasi Osteopontin hasil isolasi membran spermatozoa sapi berkisar antara 0,125 sampai 21,25 $\mu\text{g/ml}$.

7.2. Saran

Berdasarkan hasil dan kesimpulan dapat diambil suatu saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai hasil isolate Osteopontin spermatozoa sapi untuk ditambahkan dalam media pembekuan, guna meningkatkan kesuburan dari spermatozoa beku.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut apakah protein Osteopontin bisa digunakan sebagai penanda deteksi kesuburan spermatozoa sapi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aaron M., 1980. *Pubertal changes in the expression of fertility associated antigen in Bos indicus and Bos taurus bulls*. J. Anim. Sci. 17:420.
- Akiko, N., Satoshi, M., Kazuyuki, M. and Yoshiyuki, S. 1998. Study of progeny test of young bull for beef by field test. Bulletin of Beef Cattle Science. 12 (66). 4 – 5.
- Anonimous, 2005. *Semen, Processing, Storage, Thawing and Handling*. <File:///F:\chapter 16 htm.download 9/27/2005>
- Aulanni'am, 2005. *Protein dan Analisisnya*. Cetakan pertama. Penerbit Citra Mentari Group. Malang. Hal. 19-27
- Ax, R. L., G. R. Gilbert, and G. E. Shook. 1987. Sperm in poor quality semen from bulls during heat stress have a lower affinity for binding hydrogen-3 heparin. J. Dairy.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay, 1992. *Applied Animal Reproduction*. 3th. Edition Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Blakely, J. dan D.H. Bade. 1994. Ilmu Peternakan. Cetakan keempat. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. Hal. 156-164.
- Brunner, M.A. 1984. Repeat Breeding, Dairy Integrated Reproductiv Management. Cornell University.
- Caballero, J.; G. Frenette and R. Sullivan. 2010. Post Testicular Sperm Maturational changes an Protosome. Vet. Medicine International 1 – 25 Cambridge.
- Cancel. A.M; David A. Chapman and G.J. Killian. 1997. Osteopontin is the Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. Department of Dairy and Animal Sci and The Department of Biology. University park. Pennsylvania. 1293-1301.
- Copeland, L. 1994. Pedigree Analysis as a Basis of Selecting Bull Calves. Journal Of Dairy Science. 17 (2) 93-102.
- Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore, 1990. *Molecular of Biology*. 2nd. edition. Sci. Am. Books. Pp 491-527.
- Denhardt, D.T., 2004. The third international conference on osteopontin and related proteins, San Antonio, Texas, Calcif. Tiss. Int. 74: 213–219.
- Direktur Jendral Peternakan. 2005. Produksi Daging, Telur dan Susu. http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak/isi_infoekse_nak.htm.
- Erikson D.W., A.L. Way, R.P. Bertolla, D.A. Chapman and G.J. Killian. 2007. Influence of osteopontin, casein and oviductal fluid on bovine sperm capacitation. Anim. Reprod 4:103-112
- Esteves, S.C., D.M. Spaine, A.P. Cedenho, and M. Srough., 2005. Effects of The Technique of Cryopreservation and Dilution/Centrifugation After Thawing on The Motility and Vitality of Spermatozoa of Oligoasthenozoospermic Men. International Braz. J. Urol. 29 : 133-40.
- Gabler, C. D.A. Chapman and G.J. Killian. 2003. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the estrous cycle. Reproduction 126: 721–729.
- Ghosh, P.S. Chattopadhyay and S. Batabyal. 2008. Immunobiochemical characterization of 55 kDa fertility associated protein of Garole Sheep (*Ovis aries*) seminal plasma. The Indian Journal of Veterinary Research 17.
- Gordon, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. The UK. University Press.
- Hafez, E.S.E., 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th. Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Hao Y, C.N. Murphy, L. Spate, D. Wax, Z. Zhong, M. Samuel, N. Mathialagan, H. Schatten and R.S. Prather. 2007. Osteopontin Improve in Vitro Development of Porcine Embryos and Decreases Apoptosis. Mol. Reprod and Development. 75:291-298.

- Hardjopranjoto S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press.
- Herrero MB., E. de Lamirande and C.Gagnon, 1999. *Nitrit Oxide Regulates Human Sperm Capacitation and Protein Tyrosine*. Biol. of Reprod.61:575-581.
- Hunter, RHF., 1995. Fisiologi dan Teknologi Hewan Betina Domestik. Penerbit ITB Bandung.
- Jones, R.T. Mann and R.J. Sherins, 1989. *Peroxidative Breakdown of Phospholipids by Human Spermatozoa, Spermocidal Properties of Fatty Acids Peroxides and Protective of Seminal Plasma*. Fertil Steril. 31:531-537.
- Kasai, M., 1996. Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos. Animal Reproduction Sciences.
- Kim S and T Shin. 2007. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis. J. Vet. Sci. 8: 107-110.
- Moura, A.A., H. Koc, D.A. Chapman and G.J. Killian, G.J., 2007. A comprehensens proteomic analysis of the accessory sex gland fluid of mature Holstein bulls. Anim. Reprod. Sci. 98: 169-188.
- Moura, A.A., H. Koc, D.A. Chapman and G.J. Killian. 2006. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. J. Androl. 27: 201-211.
- Pablo, EV., JL. Bailey, GD. Moore, Dieyun Pan, PO. Clarke and GS. Kopf. 1995. *Capatitation of Mouse Spermatozoa : Correlation Between The Capatitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation Development* 121. 1129-1137.
- Park, J.E. and J.K. Graham, 1992. *Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes*. J. Theriogenology 38 : 2009-222
- Partodihardjo, S., 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Cetakan ketiga. Mutiara Sumber Widya. Jakarta. Hal. 522 - 556.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Immunologi*. Cetakan pertama, Airlangga University Press, Surabaya. Hal. 79-98.
- Rodriguez, C.M; Jonathan R.D and G.J. Killian. 2000. Osteopontin Gene Expression in The Holstein Bull Reproductive Tract. Department of Dairy and Animal Sci and The Department of Biology. University park. Pennsylvania. 414-419.
- Santoso, G., 2005. *Metodologi Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif*. Cetakan pertama. Prestasi Pustaka Publisher. Hal. 27-44.
- Sprott, L. R., M. D. Harris, D. W. Forrest, J. Young, H. M. Zhang, J. N. Oyarzo, M. E. Bellin, and R. L. Ax. 2000. *Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen*. J. Anim. Sci. 78:795.
- Steel, R.G.D and Trrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika. Penerbit P.T. Gramedia Pustaka Utama Jakarta. Hal. 168-181.
- Supriatna I. dan RH.Pasaribu, 1992. *In Vitro Fertilisasi. Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. DepdikBud Dirjen Dikti IPB.
- Susilawati, T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Toelihere, M.R., 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. 6th.Ed. Penerbit Angkasa Bandung.
- Toelihere, M. R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa Bandung. Bandung. Indonesia. Hal. 46 - 48.

- Tomaszwaska, M.W.,utama, IK., Putu, IG dan Chaniago, T.D. 1991. Reproduksi, Tingkah laku, dan Produksi Ternak Indonesia. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 88.
- Yanagimachi, 1994. *Mammalian Fertilization*. In : *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, J. Neil, L.L. GS. Greenwald,C.L.Market ,DW. Plaff. Raven Pers LTD. New York.
- Zemjanis R. 1980. Repeat Breeding or Conception Failure in Cattle : Current Theraphy in Theriogenology, Morrow. W.B. Saunders Company Philadelphia. Pp. 205.

Lampiran 1. RENCANA PENELITIAN TAHUN II

Penelitian tahun II akan dilakukan dengan metode seperti terlihat pada bagan penelitian di bawah ini :

TAHUN II

