

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LAPORAN PENELITIAN



INSENTIF RISET DASAR 2008

PERAN INSULIN LIKE GROWTH FACTOR – I PADA EKSPRESI RECEPTOR
DAN GEN RECEPTOR LUTEINIZING HORMON SELAMA PROSES
SPERMATOGENESIS

Oleh :

Dr. Suherni Susilowati MKes, Drh
Prof. Dr. Imam Mustofa, MKes, Drh
Indah Norma Triana, MSi, Drh.

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN
MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA

UNIVERSITAS
AIRLANGGA
KK

LP.227/10

Sus

p

2008

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LAPORAN PENELITIAN



KFC
KIC
LP.227/10
SUS
P

INSENTIF RISET DASAR 2008

**PERAN INSULIN LIKE GROWTH FACTOR – I PADA EKSPRESI RECEPTOR
DAN GEN RECEPTOR LUTEINIZING HORMON SELAMA PROSES
SPERMATOGENESIS**

Oleh :

**Dr. Suherni Susilowati MKes, Drh
Prof. Dr.Imam Mustofa, MKes, Drh
Indah Norma Triana,MSi, Drh.**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN
MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2008

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Riset : PERAN INSULIN LIKE GROWTH FACTOR – I
PADA EKSPRESI RESEPTOR DAN GEN RESEPTOR LUTEINIZING
HORMON SELAMA PROSES SPERMATOGENESIS

Program : Dasar
Bidang : Biologi Reproduksi
Peneliti Utama : Dr. Suherni Susilowati MKes, Drh.
Jenis Kelamin : Perempuan
Lama Riset : 2 Tahun
Tahun Mulai Riset : 2007
Total Biaya Riset : Rp.153.000.000,-
Tahun I (2007) : Rp. 75.500.000,-
Tahun II (2008) : Rp. 77.500.000,-

Surabaya, 3 Desember 2008

Mengetahui
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
UNIVERSITAS AIRLANGGA



Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., Drh
NIP.130 687 305

Penanggung Jawab Riset

Dr. Suherni Susilowati MKes, Drh
NIP. 131653734

Ketua Lembaga Penelitian
Dan Pengabdian Kepada Masyarakat
UNIVERSITAS AIRLANGGA



Prof. Dr. Bambang Sektiari L., DEA., Drh
NIP.131 837 004

RINGKASAN

Akhir-akhir ini sejumlah penelitian pada bidang reproduksi difokuskan pada penambahan growth factor. Salah satu growth factor plasma seminalis adalah insulin like growth factor I (IGF-I) dengan berat molekul 7,6 kDa. Insulin Like Growth Factor - I hampir 80% berikatan dengan enam macam Insulin Like Growth Factor Binding Protein (IGFBP). IGF-I berbentuk kompleks yang berikatan dengan molekul lain dengan berat molekul kurang lebih 150 kDa yang terdiri dari 3 molekul protein yaitu satu molekul Insulin Like Growth Factor- I (subunit α) dengan berat molekul 7,6 kDa, satu molekul Insulin Like Binding Protein (subunit β) dengan berat molekul 53 kDa dan satu molekul Acid Label Subunit dengan berat molekul 150 kDa (subunit γ). (Kostecha and Blanovec, 1999). Di dalam plasma seminalis IGF - I berikatan dengan IGFBP-3 dependent. Insulin Like Growth Factor Binding protein merupakan suatu growth hormon dependent yang mempunyai afinitas yang tinggi, berfungsi sebagai inhibitor atau activator sintesa IGF-I dan memperpanjang half life (Kostecha and Blanovec, 1999; Anastasia *et al.*, 2000). Insulin Like Growth Factor adalah factor penting untuk perkembangan dan maturasi spermatozoa.

Pada plasma seminalis manusia, sapi terdiri dari IGF-I, IGF II dan IGFBP. Menurut Birkenmeier *et al.*, (1996) IGF-I dalam plasma seminalis dapat mempengaruhi perkembangan sel germinatif dan mengatur fungsi spermatozoa sebelum dan sesudah ejakulasi terutama dalam meningkatkan motilitas dan kapasitas. Dengan demikian IGF-I dapat menambah motilitas spermatozoa dengan mengatur pergerakan sel. Didalam plasma semen IGF -I telah diidentifikasi di dalam testes (Roser and Hess, 2001) yang disekresi oleh sel leydig dan sel sertoli. Reseptor IGF I telah diidentifikasi pada sel sertoli, sel leydig, spermatosit II, spermatid dan spermatozoa (Balboni *et al.*, 1988; Blanchard *et al.*, 2002). Menurut Donald *et al.*, (1998) IGF-I berfungsi pada proses spermatogenesis dan berfungsi sebagai steroidogenesis (Macpherson *et al.*, 2002). IGF-I merangsang steroidogenesis dengan bertambahnya ekspresi reseptor gonadotropin (LH/HCG) (Donald *et al.*, 1998). Dengan demikian sel-sel interstitial (sel leydig) dirangsang untuk mensekresi androgen. Oleh karena itu peneliti ingin meneliti peran IGF - I pada ekspresi reseptor dan gen reseptor luteinizing hormon (LH) selama proses spermatogenesis.

Adapun tujuan penelitian ini adalah : Mengetahui kadar testosteron setelah pemberian IGF-I Complex Plasma Seminalis Kambing. Mengetahui apakah ada mutasi nukleotida pada testes tikus setelah pemberian IGF-I Complex .

Manfaat Penelitian ini adalah Isolat protein IGF-I dapat dipakai untuk memperbaiki kualitas spermatozoa Mengetahui informasi ilmiah tentang ekspresi reseptor IGF-I dan gen reseptor luteinizing hormon (LH) selama proses spermatogenesis

Adapun hiipotesis Penelitian ini adalah pemberian IGF-I plasma seminalis kambing dapat meningkatkan kadar testosteron pada tikus putih jantan. Pemberian IGF-I plasma seminalis kambing tidak mempengaruhi gen reseptor luteinizing hormon pada tikus putih jantan

Penelitian ini dilakukan dalaboratorium dan di lapangan. Tahap pertama dilakukan penampungan semen kambing, pemisahan plasma semen, purifikasi protein plasma semen, identifikasi protein plasma semen, uji Western Blot, isolasi protein IGF-I Complex, Running ulang, aplikasi pada tikus putih. Kemudian diperiksa kadar testosteron dan uji imunohistokimia, tahap kedua dilakukan sekuens pada testes tikus putih kelompok kontrol dan perlakuan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein Insulin Like Growth Factor I Complex mempunyai berat molekul 150,288 kDa. Kadar estrogen pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Mutasi nukleotida pada kelompok kontrol dan perlakuan sebesar 0,7 %. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian IGF-I Complex dapat meningkatkan hormon testosteron dan tidak menunjukkan adanya mutasi nukleotida pada pemberian IGF-I Complex pada testes tikus putih

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadidhirat Allah S.W.T bahwa atas rahmad, taufiq dan hidayahNya maka penelitian sampai pada penyusunan laporan ini dapat dilaksanakan dengan lancar. Pada kesempatan ini disampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada;

1. Menteri Riset Dan Teknologi atas kepercayaannya mengabulkan proposal penelitian ini untuk dilaksanakan.
2. Rektor Universitas Airlangga yang telah mengizinkan memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini
3. Ketua Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat atas kelancaran administrasi mulai dari proses pengajuan proposal sampai dengan pelaporan hasil penelitian ini
4. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian ini.

Sebagai suatu karya manusia, sudah barang tentu ada beberapa kekurangan di beberapa bagian laporan ini. Saran dan kritik yang konstruktif sangat diharapkan untuk kematangan peneliti sendiri agar laporan ini memberi manfaat kepada pihak-pihak yang berkepentingan.

Surabaya, 3 Desember 2008

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
BAB.1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis	3
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat	4
BAB.2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Semen Kambing	5
2.2. Spermatozoa Kambing	5
2.3. Plasma Seminalis Kambing	7
2.4. Alat Reproduksi Tikus Jantan	8
2.5. Spermatogenesis Pada Tikus Putih	10
2.6. Tinjauan Insulin Like Growth Factor I Complex.....	11
BAB.3.KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN	14
BAB.4. METODOLOGI	15
4.1. Jenis Penelitian	15
4.2. Rancangan Penelitian	15
4.3. Sampel Penelitian	15
4.4. Variabel Penelitian	15
BAB.5. HASIL PENELITIAN	24
5.1.Karakteristik Semen Segar Untuk Isolasi dan Identifikasi Insulin Like Growth Factor I Complex	24
5.2.Native PAGE Plasma Seminalis Kambing	24
5.3.Perhitungan Berat Molekul (BM) Protein Plasma Seminalis Kambing	25
5.4. Spesifisitas Protein IGF-I Complex menggunakan Western Blot	27
5.5. Hasil Pemeriksaan Kadar Protein IGF-I Complex	28
5.6. Uji Imunohistokimia	28
5.7. Kadar Hormon Testosteron	29
5.8. Sekuensing	30
BAB.6. PEMBAHASAN	34
6.1.Pemeriksaan semen segar kambing	34
6.2. Identifikasi Protein Insulin Like Growth Factor I Complex	35
6.3. Berat Molekul (BM) Protein Plasma Seminalis Kambing.....	37
6.4. Kadar IGF-I Complex Plasma Seminalis Kambing	38
6.5. Spesifisitas protein IGF-I Complex Plasma Seminalis Kambing	38

6.6. Uji Imunohistokimia	39
6.7. Kadar Testosteron Pada Tikus Putih Setelah Perlakuan.....	40
BAB. 7. KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1. Kesimpulan Penelitian	41
7.2. Saran Penelitian	41
DAFTAR PUSTAKA	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Karakterisasi semen segar kambing	24
Tabel 2. Statistik deskriptif berat molekul	27
Tabel 3. Hasil pemeriksaan kadar protein	28
Tabel 4. hasil pemeriksaan testosteron	30

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Gel hasil analisis dengan Native PAGE	25
Gambar 2. Kurva nilai logaritma berat molekul	26
Gambar 3. Uji Western Blot	28
Gambar 4.1.a. Uji Imunohistokimia tubulus seminiferus 100x	29
Gambar 4.1.b. Uji Imunohistokimia tubulus seminiferus 400x.....	29
Gambar 4.2.a. Uji Imunohistokimia tubulus seminiferus 100x	29
Gambar 4.2.b. Uji Imunohistokimia tubulus seminiferus 400x	29

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Laju fertilitas yang semakin menurun dari waktu ke waktu dapat karena factor kesengajaan atau diinginkan misalnya penggunaan kontrasepsi, tetapi dapat juga karena masalah infertilitas. Penyebab infertilitas meliputi factor nongenetik dan factor genetic, maka berkembanglah apa yang disebut dengan bayi tabung (Fertilisasi InVitro). Begitu pula dibidang kedokteran hewan, bioteknologi reproduksi yang telah terbukti dapat meningkatkan produktifitas ternak adalah transfer embrio. Pembuahan InVitro adalah suatu teknik pembuahan untuk memproduksi embrio secara buatan diluar tubuh induk betina. Tetapi meskipun banyak penelitian di bidang transfer embrio tetapi masih belum bisa memenuhi embrio secara kuantitas maupun kualitas. Hal ini berdasarkan pada hasil angka kebuntingan yang rendah. Masih rendahnya angka kebuntingan perlu dikaji secara molekuler reproduksi, mengingat pada proses pematangan spermatozoa banyak protein plasma seminalis diduga berperan terhadap kualitas spermatozoa dan sampai saat ini sintesa, reseptor dan fungsi protein tersebut secara molekuler masih belum banyak diketahui.

Akhir-akhir ini sejumlah penelitian pada bidang reproduksi difokuskan pada penambahan growth factor. Salah satu growth factor plasma seminalis adalah insulin like growth factor I (IGF-I) dengan berat molekul 7,6 kDa. Insulin Like Growth Factor - I hampir 80% berikatan dengan enam macam Insulin Like Growth Factor Binding Protein (GFBP). IGF-I berbentuk kompleks yang berikatan dengan molekul lain dengan berat molekul kurang lebih 150 kDa yang terdiri dari 3 molekul protein yaitu satu molekul Insulin Like Growth Factor- I (subunit α) dengan berat molekul 7,6 kDa, satu molekul

Insulin Like Binding Protein (subunit β) dengan berat molekul 53 kDa dan satu molekul Acid Label Subunit dengan berat molekul 150 kDa (subunit γ). (Kostecha and Blanovec, 1999). Di dalam plasma seminalis IGF – I berikatan dengan IGFBP-3 dependent. Insulin Like Growth Factor Binding protein merupakan suatu growth hormon dependent yang mempunyai afinitas yang tinggi, berfungsi sebagai inhibitor atau activator sintesa IGF-I dan memperpanjang half life (Kostecha and Blanovec, 1999; Anastasia *et al.*, 2000). Insulin Like Growth Factor adalah factor penting untuk perkembangan dan maturasi spermatozoa. Pada plasma seminalis manusia, sapi terdiri dari IGF-I, IGF II dan IGFBP. Menurut Birkenmeirer *et al.*, (1996) IGF-I dalam plasma seminalis dapat mempengaruhi perkembangan sel germinatif dan mengatur fungsi spermatozoa sebelum dan sesudah ejakulasi terutama dalam meningkatkan motilitas dan kapasitas. Dengan demikian IGF-I dapat menambah motilitas spermatozoa dengan mengatur pergerakan sel. Didalam plasma semen IGF -I telah diidentifikasi di dalam testes (Roser and Hess, 2001) yang disekresi oleh sel leydig dan sel sertoli. Reseptor IGF I telah diidentifikasi pada sel sertoli, sel leydig, spermatosit II, spermatid dan spermatozoa (Balboni *et al.*, 1988; Blanchard *et al.*, 2002). Menurut Donald *et al.*, (1998) IGF-I berfungsi pada proses spermatogenesis dan berfungsi sebagai steroidogenesis (Macphersonet *et al.*, 2002).IGF-I merangsang steroidogenesis dengan bertambahnya ekspresi reseptor gonadotropin (LH/HCG) (Donald *et al.*, 1998). Dengan demikian sel-sel interstitial (sel leydig) dirangsang untuk mensekresi androgen.

Androgen tersebut bersama dengan Follicle Stimulating Hormon (FSH) berperan dalam proses fase akhir spermatogenesis (Ismudiono, 1996). Spermatozoa dihasilkan didalam tubulus seminiferus testes. Fungsi testes tergantung dari gonadotropin dari

pituitary dan testosteron, tetapi hormon ini tidak secara langsung beraksi terhadap sel-sel germinatif, tetapi efeknya diperantarai oleh factor-faktor local yang mengatur system parakrin didalam testes . Beberapa penelitian menyatakan bahwa terdapat suatu growth factor yang diproduksi oleh testes dan mengatur perkembangan berbagai sel di dalam testes. Tetapi pengaturan secara fisiologis berbagai factor ini di dalam testes belum diketahui (Olof Soder *et al.*, 200). Oleh karena itu peneliti ingin meneliti peran IGF – I pada ekspresi reseptor dan gen reseptor luteinizing hormon (LH) selama proses spermatogenesis.

1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah yang diajukan pada penelitian ini adalah :

1. Apakah pemberian IGF-I plasma seminalis kambing meningkatkan kadar testosteron pada tikus putih jantan
2. Apakah pemberian IGF-I plasma seminalis kambing mempengaruhi gen reseptor luteinizing hormon pada tikus putih jantan

Dalam rangka menjawab masing-masing rumusan masalah dalam penelitian diatas terlebih dahulu harus dilakukan penelitian kualitatif eksploratif untuk mengidentifikasi, mengisolasi dan karakterisasi Insulin Like Growth Factor –I (IGF-I) plasma seminalis kambing.

1.3. Hipotesis Penelitian

Dari pokok permasalahan yang diajukan maka dapat ditarik suatu hipotesis dalam penelitian ini adalah :

1. Pemberian IGF-I plasma seminalis kambing dapat meningkatkan kadar testosteron pada tikus putih jantan.
2. Pemberian IGF-I plasma seminalis kambing tidak mempengaruhi gen reseptor luteinizing hormon pada tikus putih jantan.

1.4. Adapun tujuan umum penelitian ini adalah :

a. Tujuan Khusus :

1. Mengetahui kadar testosteron setelah pemberian IGF-I Complex Plasma Seminalis Kambing
2. Mengetahui apakah ada mutasi nukleotida pada testes tikus setelah pemberian IGF-I Complex

b. Tujuan Umum :

Mengetahui gen reseptor luteinizing hormon pada testes tikus putih setelah pemberian IGF-I Complex

1.5. Manfaat Penelitian:

1. Isolat protein IGF-I dapat dipakai untuk memperbaiki kualitas spermatozoa
2. Mengetahui informasi ilmiah tentang ekspresi reseptor IGF-I dan gen reseptor luteinizing hormon (LH) selama proses spermatogenesis

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Semen Kambing

Semen adalah hasil sekresi kelamin jantan secara normal yang diejakulasikan ke saluran kelamin betina pada waktu kopulasi atau ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan (Hafez, 2000). Pada kambing semen terdiri dari dua bagian yaitu plasma semen dan spermatozoa. Plasma semen diproduksi oleh kelenjar-kelenjar epididimis, vas deferens, vesica seminalis, prostat, kelenjar bulbourethralis (Cowper's) dan kelenjar urethra, sedangkan spermatozoa diproduksi di dalam tubulus seminiferus testis melalui proses spermatogenesis. Pada kambing plasma semen mengandung gliseril fosforil kolin dalam kadar yang tinggi dibanding sapi, babi dan kuda. Semen kambing mengandung spermatozoa sebanyak sepertiga bagian dan dua bagian adalah plasma semen (Hardjopranjoto, 1981). Plasma semen mengandung berbagai persenyawaan organik termasuk fruktosa, asam sitrat, sorbitol, inositol, gliseril fosforil kolin, ergotionin, phospholipid, prostaglandin, asam amino dan asam oksalat. Fruktosa merupakan karbohidrat yang siap dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi utama. Plasma semen kambing mengandung enzim fosfolipase A dari kelenjar bulbourethralis yang dapat mengkoagulasikan lesitin dari kuning telur pada bahan pengencer (Evans and Maxwell, 1987).

2.2. Spermatozoa Kambing

Spermatozoa merupakan sel berukuran kecil, kompak dan sangat khas, yang tidak bertumbuh atau membagi diri. Secara morfologis spermatozoa terdiri dari kepala yang membawa materi genetik, dan ekor yang mengandung sarana penggerak. Spermatozoa tidak memegang peranan apapun dalam fisiologi hewan jantan yang menghasilkan dan hanya melibatkan diri dalam proses pembuahan di dalam saluran alat kelamin betina untuk membentuk individu baru yang sejenis dari mana ia berasal (Toelihere, 1981).

Menurut Frandson (1992), spermatozoa terdiri dari kepala, bagian tengah (midpiece) dan ekor. 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 flagellum. Dua sentriol terletak dalam bagian tengah (midpiece). Dari sini fibril-fibril yang serupa dengan silia terentang dalam ekor. Terdapat dua fibril sentral yang dikelilingi oleh sebuah cincin yang terdiri dari 9 pasangan fibril perifer. Fibril-fibril ini bersifat kontraktile dan menimbulkan gerakan ekor spermatozoa. Fibril ini merupakan kerangka untuk berkontraksi dan berelaksasi, sama seperti kerjanya aktomiosin dari urat daging pada tubuh, yang menyebabkan gerakan ekor seperti cambuk dan mendorong spermatozoa bergerak kedepan di dalam cairan. Bagian leher juga mengandung sentriol proksimal sebagai pusat kinetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak. Bagian badan memiliki panjang 8-10 mikron, tetapi tebalnya hanya 1 mikron. Bagian badan ini banyak mengandung enzim dan bahan lipoid. Bagian ini berakhir pada cincin sentriol yang kemungkinan berfungsi mengkoordinir rentetan kontraksi-kontraksi dari serabut-serabut fibril itu. Ekornya yang berkurang garis tengahnya secara bertahap dari sambungan dengan bagian badan dicincin sentriol ke ujungnya, kira-kira panjangnya 40-44 mikron. Panjang keseluruhan spermatozoa 70 sampai 72 μm .

Banyak abnormalitas terdapat pada spermatozoa waktu perkembangannya secara morfologik dan waktu penanganan pada waktu dan sesudah pengambilan air mani.

Bentuk-bentuk abnormalitas primer spermatozoa terdapat di dalam testes karena kesalahan pada waktu spermatogenesis, disebabkan oleh faktor keturunan, penyakit, defisiensi makanan dan pengaruh-pengaruh lingkungan yang jelek. Kejutan yang disebabkan oleh suhu yang dingin (cold shock) dan tekanan osmosa (osmotic shock) terhadap spermatozoa yang diejakulasikan dapat menyebabkan perubahan-perubahan pada waktu pembentukan spermatozoa yang dapat menyebabkan abnormalitas primer (Mercier, 1984). Spermatozoa yang memiliki abnormalitas morfologik, kemungkinan tidak subur, Kesuburan kambing jantan tergantung pada proporsi spermatozoa yang abnormal terhadap spermatozoa normal di dalam air mani. Meski demikian beberapa spermatozoa yang memiliki morfologi normal dapat terjadi kekurangan kandungan DNA yang menyebabkan berkurangnya kesuburan

2.3. Plasma Seminalis Kambing

Sekitar 90% volume semen kambing terdiri dari plasma semen. Sifat-sifat fisik dan kimiawi semen sebagian besar ditentukan oleh plasma semen. Plasma semen mempunyai pH sekitar 7,0 dan tekanan osmotik sama dengan darah. Fungsi plasma semen adalah sebagai suatu medium pembawa sperma dari saluran reproduksi hewan jantan ke dalam saluran reproduksi hewan betina. Fungsi ini dapat dijalankan dengan baik karena pada banyak spesies plasma semen mengandung bahan-bahan penyanggah dan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa baik yang digunakan secara langsung maupun secara tidak langsung (Ismudiono, 1996). Natrium dan kalium merupakan kation-kation utama dalam semen mamalia yang mengandung konsentrasi rendah kalsium dan magnesium. Konsentrasi kalium lebih tinggi di dalam sperma dari

pada di dalam plasma semen sedangkan konsentrasi natrium adalah sebaliknya (Toelihere, 1981).

Plasma semen secara biokimiawi mengandung senyawa-senyawa organik termasuk fruktosa, asam sitrat, sorbitol, gliserilphosphoril-cholin, ergotionin dan prostaglandin. Senyawa-senyawa ini dihasilkan oleh kelenjar asesoris atas dorongan hormon testosteron dari testes (Hafez, 1993). Plasma semen terdiri dari bermacam-macam komponen biokimia yang spesifik mengatur fungsi spermatozoa. Telah dilaporkan bahwa faktor-faktor yang terdapat di dalam seminal plasma mempengaruhi viabilitas spermatozoa. Seminal plasma dapat memelihara motilitas spermatozoa pada sapi dan domba serta viabilitas spermatozoa domba. Komponan seminal plasma juga dapat memperbaiki integritas membran spermatozoa domba pada keadaan cold shock . Beberapa protein seminal plasma domba yang telah terfraksinasi mempunyai kemampuan untuk memperbaiki integritas membran plasma spermatozoa pada keadaan cold shock (Cebrian Perez, et al, 2000). Telah dilaporkan terdapat komponen-komponen protein yang terdapat didalam seminal plasma antara lain : IGF-I , IGF II, IGFBP dan BSP protein (Donald, et al, 1998).

2.4. Alat Reproduksi Tikus Jantan

Alat reproduksi kambing jantan terdiri dari tiga komponen, yaitu testes, kelenjar asesoris beserta salurannya dan alat kopulatoris yaitu penis. Testes merupakan alat kelamin primer berbentuk terutama berisi masa tubulus yang melingkar-lingkar (Toelihere, 1985). Adapun fungsi dari testis sebagai alat reproduksi yaitu memproduksi gamet jantan (spermatozoa) yang dihasilkan oleh bagian tubulus seminiferus dari testes. Spermatozoa merupakan bentuk terakhir sel gamet jantan setelah mengalami proses

perkembangan (spermatogenesis). Proses spermatogenesis secara sempurna baru dimulai setelah hewan mencapai masa pubertas. Spermatozoa yang dihasilkan sementara disimpan di dalam epididimis. Sedangkan fungsi endokrinologis dari testes memproduksi hormon seks jantan (androgen) yang mempunyai pengaruh terhadap sifat jantan (Hardjopranjoto, 1995). Kedua fungsi ini saling berhubungan dan produksi spermatozoa tergantung dari produksi androgen (Evans dan Maxwell, 1987). Testis merupakan alat reproduksi primer hewan jantan, pada hewan menyusui. Lokasi testis yang wajar terdapat dalam kantong di luar tubuh yang disebut skrotum. Skrotum sebagai pembungkus testis memberikan perlindungan terhadap gangguan luar.

Saluran-saluran alat kelamin merupakan alat reproduksi sekunder yang berasal dari testis menuju ke vasa efferentia, epididimis, vasa deferentia dan penis dengan saluran yang merupakan saluran bersama tempat dialirkannya urin dan plasma semen beserta spermatozoa. Alat reproduksi sekunder yang lain adalah kelenjar aksesoris yaitu vesikula seminalis (Toelihere, 1985). Kelenjar tersebut merupakan kelenjar yang terbesar pada kambing yang menghasilkan cairan dan disekresikan ke dalam saluran reproduksi dan bercampur dengan spermatozoa dari tubulus seminiferus membentuk semen atau air mani (Evans dan Maxwell, 1988).

Spermatozoa diproduksi pertama kali waktu pubertas, produksi ini terjadi di dalam pembuluh pembuluh di testis. Sesudah melewati pembuluh testis spermatozoa yang terbentuk akan melalui rete testis, ductus eferentia dan urethra. Sekresi kelenjar vesikula seminalis membentuk sebagian besar plasma seminalis. Epididimis adalah pembuluh darah yang muncul dari bagian dorsal testis, yang berasal dari ductus eferentia. Epididimis terdiri dari tiga bagian yaitu kepala, badan dan ekor (Salisbury dan

VanDemark, 1985). Adapun fungsi epididimis ada empat yaitu sebagai transportasi dari tubulus seminiferus ke dunia luar, konsentrasi, maturasi, penyimpanan spermatozoa sedangkan epitelnya untuk absorpsi dan sebagian sekretoris (Toelihere, 1985 ; Partodihardjo, 1987).

2.5. Spermatogenesis pada Tikus Putih

Spermatogenesis terjadi di dalam tubuli seminiferi, berasal dari spermatogonia epitel germinalis yang terdapat dilapisan luar tubuli. Pertumbuhan sel-sel ini dengan suatu seri pembelahan sel yang berurutan diikuti berpindahannya sel tersebut ke arah lumen tubuli. Spermatogenesis adalah proses perkembangan spermatogonia menjadi spermatozoa yang terjadi didalam tubulus seminiferus dari testes. Hormon FSH dan LH berasal dari kelenjar hipofisa anterior mempunyai peranan penting dalam mengatur proses spermatogenesis. FSH mengatur proses spermatogenesis sehingga terbentuk spermatid sedang LH melalui pengaruhnya terhadap sel Leydig dapat menghasilkan hormon testosteron yang berfungsi mengatur proses spermiogenesis sehingga spermatid berubah menjadi spermatozoa (Garner and Hafez, 2000).

Jumlah spermatogonia dari tikus jantan berumur 30 hari berkisar antara 18,4 sampai 23,6 juta per testes. Jumlah spermatosit I kira-kira 54,6 juta per testes, setelah umur 70 hari jumlahnya menjadi 73,6 juta. Spermatid pertama muncul pada umur 25 hari kemudian bertambah banyak menjadi 85,7 juta per testes pada umur 40 hari kemudian mencapai 151,9 juta per testes pada umur 70 hari (Zhengwei et al, 1990).

2.6. Tinjauan Insulin Like Growth Factor I Complex (IGF –I Complex)

Growth factor adalah polipeptida yang bekerja sebagai pengatur sistem parakrin, autokrin dan endokrine pada pertumbuhan dan differensiasi sel (Clenmons, Dr and Jone, J.I, 1995). Berdasarkan perbedaan struktur aktifitas biologisnya, growth factor diklasifikasikan menjadi 1) *Epidermal Growth Factor* (EGF), 2) *Fibroblast Growth Factor* (FGF), 3) *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), 4) *Transforming Growth Factor* (TGF – β), 5) *Haemopoetic Growth Factor* (Cytokines) (Monget, et al, 1993).

Insulin Like Growth Factor –I (IGF-I) Complex merupakan glikoprotein yang terdiri dari kombinasi molekul dengan berat molekul 85 kDa, binding protein dengan berat molekul 53 kDa dan IGF yang membentuk kompleks. Pada spesies primata tingkat tinggi, kompleks protein tersebut ditemukan di cairan amnion, cairan cerebrospinal dan plasma seminalis (Baxter, 1990). *Insulin Like Growth Factor –I Complex* dengan berat molekul 150 kDa juga ditemukan di dalam plasma seminalis kelinci yang mempengaruhi fungsi sperma (Minelli, et al ; 2001). Pada manusia IGF –I Complex mempunyai sifat *dependent* dan bersirkulasi di dalam darah membentuk ikatan kompleks yang terdiri dari *Insulin Like Growth Factor I* (IGF-I) , *Insulin Like Growth Factor Binding Protein* (IGFBP-3) dan *Acid Label Subunit* (ALS) dengan berat molekul \pm 150 kDa (Barreca, et al, 1995 ; Dai and Baxter, 1992) atau 125 – 150 kDa (Robert, et al ; 1989). *Insulin Like Growth Factor Binding Protein* (IGFBP) merupakan suatu *growth hormon dependent* yang mempunyai afinitas yang tinggi dan dapat berfungsi sebagai inhibitor atau aktivator sintesa IGF–I (Kostecha and Blanovec; 1999; Anastasia, et al; 2000) yang mempunyai berat molekul antara 47 – 53 kDa (Robert, et al ; 1989). Berat molekul IGFBP tergantung dari tingkat glikosilasi. Dalam bentuk terglykosilasi

mempunyai berat molekul 54 kDa, sedang dalam bentuk tidak terglykosilasi mempunyai berat molekul 29,5 kDa. Insulin Like Growth Factor Binding Protein - 3 yang terglykosilasi saja yang berikatan dengan permukaan sel. Insulin Like Growth Factor Binding Protein - 3 juga terdapat di dalam cairan cerebrospinal manusia, cairan limfe tikus, susu dan colostrum tikus, susu dan colostrum tikus dan babi, plasma seminalis manusia dan cairan amnion (Kostecha and Blanovec; 1999).

Pada manusia Insulin Like Growth Factor dikenal dengan sebutan Somatomedins (Robert, et al; 1989) dan hampir 80% di dalam sirkulasi, IGF - I dibawa oleh IGFBP - 3 suatu ternary kompleks yang terdiri dari satu molekul IGF - I, satu molekul IGFBP-3 dengan berat molekul 47 - 53 kDa, satu molekul ALS dengan berat molekul 88 kDa (Laron, 2001).

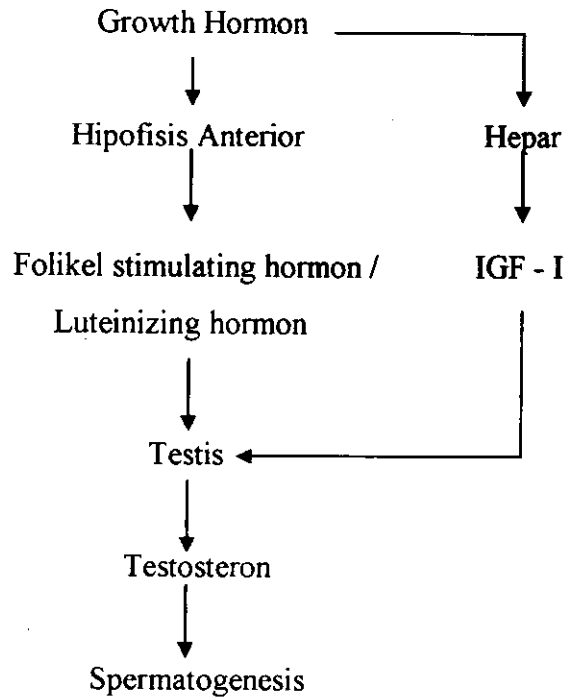
Insulin Like Growth Factor - I adalah suatu peptida yang terdiri dari 70 asam amino dengan berat molekul 7649 Da . Sama dengan insulin, IGF - I mempunyai rantai A dan B yang dihubungkan dengan rantai disulfida (Laron, Z, 2001). Dari 70 asam amino ,IGF - I tersebut, 29 asam amino homolog dengan insulin rantai B, 12 asam amino analog dengan proinsulin C peptida dan 21 asam amino homolog dengan insulin rantai A, sedangkan 8 asam amino lainnya tidak mempunyai fungsi yang sama dengan insulin (Gill, et al, 1999).

Insulin Like Growth Factor (IGF -I dan IGF - II) adalah peptida yang bersifat growth factor yang berpotensi pada proses mitogenik, metabolisme dan proliferasi sel pada beberapa bagian tubuh (Clenmons, and Jones, 1995). Insulin Like Growth Factor - I disekresi oleh beberapa jaringan terutama di liver dan ditransformasikan ke jaringan lain bertindak sebagai hormon endokrin. Insulin Like Growth Factor - I juga disekresi oleh

jaringan lain termasuk sel-sel kartilago dan berfungsi lokal sebagai hormon parakrin. Insulin Like Growth Factor-I dapat bertindak sebagai autokrin dalam hal peristiwa onkogen (Laron, 2001). Di dalam plasma semen IGF- I telah diidentifikasi di dalam testes yang disekresi oleh sel leydig dan sel sertoli (Roser and Hess, 2001). Fungsi IGF diatur oleh suatu kelompok dari 6 binding protein yang mempunyai afinitas tinggi (IGFBP). Binding protein tersebut fungsinya diatur oleh adanya interaksi dengan matrix ekstraseluler dan permukaan sel yaitu protease. (Macpherson, et al ; 2002). Reseptor IGF-I telah diidentifikasi pada sel sertoli, sel leydig, spermatosit II, spermatid dan spermatozoa (Balboni, et al, 1988 ; Macpherson, et al, 2002). Hasil penelitian Donald, et al (1998) membuktikan bahwa receptor IGF-I yang utama terletak pada daerah akrosom membran plasma spermatozoa. Insulin Like Growth Factor I selain berfungsi pada proses spermatogenesis juga berfungsi sebagai steroidogenesis (Macpherson, et al, 2002) dengan bertambahnya ekspresi reseptor gonadotropin (Luteinizing Hormon / Human Chorionic Gonadotropin (Donald, et al, 1998). Pada manusia telah diteliti, terdapat korelasi positif antara IGF- I plasma seminalis dengan kualitas semen (Birkenmeirer, et al, 1996).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN



Sekresi IGF-I dikontrol oleh banyak factor tetapi yang paling kuat adalah Growth Hormon. Ekspresi IGF-I hepar juga sangat tergantung dari Growth Hormon. Hipofisa anterior dipengaruhi oleh growth hormon sehingga akan mengeluarkan hormon FSH atau LH. Hormon FSH tersebut mempengaruhi proses spermatogenesis sampai tahap spermatid sedangkan LH akan berpengaruh pada fase akhir yaitu pembentukan spermatozoa. Selain hormon tersebut juga terdapat protein yang disebut dengan IGF-I yang selain disintesa oleh hepar juga disintesa oleh testes yang berfungsi pada sel leydig pada testes untuk memproduksi testosteron . Dimana testosteron tersebut mempunyai fungsi bersama-sama LH untuk fase akhir spermatogenesis.

BAB 4

METODOLOGI

4.1. Jenis Penelitian : Eksperimental Laboratoris

4.2. Rancangan Penelitian : Rancangan Acak Lengkap

4.3. Sampel Penelitian : Tahun I : Plasma Seminalis

Tahun II : Testes tikus

4.4. Variabel Penelitian :

Variabel bebas : Dosis IGF-I

Variable tergantung : Karakter IGF-I plasma seminalis, testosteron Sequensing

Variable kendali : Umur kambing jantan, pakan dan pemeliharaan serta umur tikus putih.

Penelitian Tahap I :

Isolasi dan Karakterisasi Insulin-Like Growth Factor-I Plasma Seminalis Kambing

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratorik, terdiri dari : preparasi I plasma seminalis dan purifikasi, Native atau nondenaturasi PAGE pada seminal plasma kambing, elektroelusi untuk isolasi IGF-I plasma seminalis, untuk mengetahui kadar protein diperiksa dengan metode Biuret, kemudian dilanjutkan dengan Western Blot .

a. Bahan Dan Alat Penelitian

Semen kambing, larutan fosfat saline(PBS), ammonium peroxo disulphate (APS),N,N,N,N-tetra methyl ethylene diamine (TEMED), Napthol, larutan Na Cl fisiologis Laemli buffer (1:1), marker High Range SDS-PAGE Standards (Bio-Rad),

silver stain SDS-PAGE Standards (Bio-Rad), antibodi primer dan antibodi sekunder, kit testosteron.

Alat-alat yang diperlukan pada penelitian ini meliputi gelas bekker, Erlenmeyer, tabung sentrifus dan alat sentrifus, pipet eppendorf, seperangkat alat gel elektroforesis horizontal, Alat Elektroelusi

b. Prosedur Pengumpulan Data

Semen atau air mani ditampung dari kambing jantan dengan menggunakan vagina buatan. Sebelum ditampung semennya, kambing jantan diadaptasikan lebih dahulu selama ± 2 minggu. Semen kemudian dimasukkan kedalam tabung sentrifus dan dilakukan sentrifugas 1800 rpm selama 10 menit supernatannya ditampung kemudian dipurifikasi dengan menambahkan etanol dingin dan disentrifus kembali dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, presipitatnya ditambah dengan PBS dan selanjutnya disimpan pada suhu -20° Celcius sampai dilakukan Native-PAGE.

1. Native Polyacrylamide Gel Electroforesis

Penentuan masing-masing fraksi protein plasma seminalis dilakukan dengan Native Polyacrylamide Gel Elektroforesis, menggunakan alat elektroforesis set mini protein (Bio-Rad). Pada penelitian ini menggunakan running gel dengan konsentrasi 12%. Running gel dibuat dengan mencampur semua bahan kecuali ammonium peroxo disulphate (APS) dan N,N,N,N-tetramethyl ethylene diamin (TEMED), kemudian didiamkan selama 10 menit. APS dan TEMED ditambahkan sampai 1 cm dari ujung atas plate. Kedalamnya kemudian ditambahkan butanol sampai penuh dan dibiarkan 10-30 menit sampai gel mengeras.

Disini tidak perlu stacking gel, protein langsung dituang diatasnya sebanyak 15-20 μ l dan dipasang sisiran kemudian diinkubasi selama 25 menit sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. Plate dipasang pada saat elektroforesis dan running buffer sebanyak 800 ml dituangkan pada alat tersebut.

Marker standar range Bio-Rad dengan volume yang sama juga dimasukkan ke salah satu sumuran. Running dilakukan dengan arus konstan 40mA dengan tegangan 125 volt selama 2 jam atau sampai sample turun semua diatas dasar gel.

Gel hasil running dicuci dan dilakukan pewarnaan dengan AgNO₃ atau Comassie blue. Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining selama 30-60 menit. Penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan destaining sambil digoyang sampai gel menjadi jernih, kemudian hasil elektroforesis difoto atau di scan.

2. Identifikasi IGF-I Plasma Seminalis Kambing Dengan Metode Western Blot.

Disiapkan kertas Whatman yang sudah dibasahi dengan transfer buffer pada blotter sebanyak 4-5 lapis, kemudian membran nitroselulose diletakkan diatas lapisan terakhir dan dihindarkan adanya rongga udara. Diletakkan gel agarose hasil elektroforesis tepat diatas membran nitrosellulose . Membran nitrosellulose ditutup dengan 4-5 lapis kertas Whatman yang sudah dibasahi dengan transfer buffer dan seluruh lapisan dibasahi sehingga kelihatan basah.

Blotter ditutup kuat-kuat dan lakukan running dengan 100 volt, 40mA selama jam. Membran nitrosellulose diambil pelan-pelan dan dimasukkan ke dalam Tris Buffer Saline (TBS), membran nitrosellulose dicuci satu kali dengan TBS dan dipindahkan ke

dalam cawan petri baru. Dilakukan bloking membran nitroselulose dengan 1% BSA dalam TBS Tween 0,5%. Diinkubasi pada suhu kamar 1 jam atau semalam pada 4°C Membran nitroselulose dicuci dengan TBS Tween 0,05% lima kali masing-masing selama 10 menit dengan shaker. Kemudian ditambahkan antibodi primer dalam buffer inkubasi atau PBS I, diinkubasi pada suhu ruang dengan shaker selama 1 jam. Membran nitroselulose dicuci dengan TBS Tween 0,05% lima kali masing-masing 10 menit dengan shaker.

Ditambahkan antibodi sekunder (conjugate) dalam buffer inkubasi (PBS I), inkubasi pada suhu ruang dengan shaker selama 1 jam. Membran nitroselulose dicuci dengan TBS Tween 0,05% lima kali, masing-masing selama 10 menit dengan shaker. Ditambahkan substrat dan diinkubasi pada suhu kamar di ruang gelap dengan penggoyangan sampai terlihat warna. Pindahkan membran nitroselulose ke dalam aquabidest non deionized, kemudian keringkan membran nitroselulose pada suhu ruang.

3. Isolasi IGF-I Plasma Seminalis Kambing Dengan Cara Elektroelusi

Proses preparasi gel ini diawali seperti proses SDS-PAGE, akan tetapi setelah proses running, gel hasil running tidak diwarnai seperti halnya pada prosedur SDS-PAGE. Elektroelusi dilakukan dengan memasukkan potongan band pada gel Native-PAGE ke dalam kantong selofan sepanjang kurang lebih 10 cm dengan tetap dijaga agar posisi gel tidak melengkung. Bagian atas dan bawah selofan diikat dengan benang, kemudian dimasukkan alat elektroforesis horizontal (Bio-Rad). Alat elektroforesis Bio-Rad diisi dengan E buffer sebanyak 500 ml dalam posisi buffer melebihi kawat. Running elektroelusi dilakukan pada kondisi 150 Volt, 40 mA selama 2 jam. Tujuan dari proses ini adalah memisahkan protein antigen dengan gel sehingga

nantinya didapatkan cairan hasil protein antigen yang telah dimurnikan dari gel. Cairan hasil elektroelusi ditampung dalam tabung Eppendorf, disimpan pada suhu -7° Celcius, siap dipakai untuk penelitian berikutnya (Rantam, 2003)

4. Running Ulang

Cairan hasil elektroelusi (protein murni) di-running ulang dalam *SDS PAGE* untuk konfirmasi apakah protein yang diisolasi benar-benar berasal dari *band* pertama gel hasil running pertama terhadap plasma seminalis kambing.

5. Penentuan Kadar Protein Dengan Metode Biuret

Penentuan protein menggunakan metode Biuret diawali dengan pembuatan kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA). Preparasi pengukuran protein dari sampel dilakukan sebagai berikut :

Kandungan protein IGF-I Complex ditentukan dengan menggunakan reagen biuret dengan penambahan larutan standar BSA. Diambil 0,5 ml sampel IGF-I Complex ditambah 1 ml larutan standar BSA 5000 ppm dan 4 ml reagen biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV – Vis pada λ maksimum yaitu 550 nm. Sebagai blanko dipipet 1,5 ml air dan ditambah 4 ml reagen biuret, dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian diukur serapannya dan diulangi 3 kali. Kandungan protein diperoleh dengan cara mengkonversi data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA. Langkah-langkah penentuan kadar protein dengan metode biuret ini adalah dengan tahapan sebagai berikut: penyiapan larutan stock BSA

dan penentuan panjang gelombang BSA, pembuatan kurva baku BSA, penghitungan kadar protein sampel (Aulani'am, 2005).

6.Uji Imunohistokimia

Pembuatan preparat testes tikus dilakukan sebagai berikut : testes diambil dipotong tipis kemudian diletakkan pada obyek glass. Untuk pemeriksaan imunohistokimia, preparat dicelup dalam Xylol 2 kali kemudian dalam alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%), dan aquadest secara berurutan. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Direndam dalam larutan Hidrogen Peroksida selama 5-10 menit kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit . Direndam dalam 1% BSA dalam PBS selama 10-30 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambah antibodi primer Rabbit Anti IGF-I selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan antibodi sekunder Anti-Rabbit-IgG Biotin Labelled selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan SA-HRP (Strep Avidin-Horseradish Peroxidase) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Cuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan Chromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) 10-20 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquadest selama 3x5 menit. Dilakukan counterstain dengan hematoksilin eosin selama 5 menit pada suhu ruang. Cuci dalam aquadest selama 3x5 menit. Dilakukan mounting dan dilakukan pengamatan dengan mikroskop pembesaran 400x (Sudiana, 2004).

6. Perlakuan pada hewan tikus

Tikus putih sebanyak 40 ekor dibagi menjadi 2 kelompok :

Kelompok I : terdiri dari 20 ekor tikus disuntik dengan Na Cl phis

Kelompok II : terdiri dari 20 ekor tikus yang disuntik dengan Isolat IGF I sebesar 100 ng/minggu selama 6 minggu (6 kali suntikan)

Dua minggu setelah penyuntikan 10 ekor tikus dilakukan pengambilan darahnya untuk diperiksa testosteronnya dengan metode RIA dan pembedahan untuk diambil testesnya, kemudian dilakukan imunohistokimia. Sedangkan 10 ekor tikus yang lain diambil testesnya untuk sequencing.

Penelitian Tahap II

1. Ekstraksi DNA dari testes tikus

Untuk mendapatkan DNA penyandi sintesis IGF-I Complex tikus dilakukan dengan cara mengambil testesnya kemudian dipotong dengan ukuran 1 cm² dan ditimbang sebanyak 1 gram, selanjutnya dibuat suspensi 10-20% (W/V) dengan pelarut Phosphat Buffer saline (PBS) dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 700 rpm. Pellet yang tersisa ditambah dengan 50 µl Lysing buffer kemudian dibiarkan pada 70°C selama 10 menit.

2. Isolasi DNA

Sampel dimasukkan microtubeyang berisi 500 µl 10% chelex 100, ditambahkan 5 µl proteinase K, selanjutnya divortex, dipanaskan dalam water bath selama 3-4 jam pada suhu 55°C sampai jaringan hancur dengan sambil divortex beberapa kali. Dipanaskan kembali ke water bath selama 8 menit pada suhu 89°C selanjutnya didinginkan pada suhu kamar. Setelah dingin ditambah Tris EDTA (TE) sebanyak 55 µl dan divortex, disentrifus

dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu kamar. Supernatan yang ada dipindahkan ke microtube dan disimpan pada freezer -20°C untuk dilakukan analisis lebih lanjut.

3. Amplifikasi DNA IGF-I Complex

Sebanyak 5 µl sampel DNA IGF-I Complex dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 0,5 ml. Ditambah master Mix Fermentas (yang sudah mengandung enzim, buffer dan dNTP); 2 µl primer sense IGF-I Complex; 2 µl primer antisense, 10 µl template DNA IGF-I Complex dan 11 µl DW. Campuran dipanaskan (pre-heat) 94°C selama 4 menit. Sampel dimasukkan dalam mesin PCR 35 cycle, terdiri dari denaturasi 94°C 1 menit, annealing 55°C 1 menit dan 72°C 2 menit. Pada cycle terakhir suhu dipertahankan 72°C 5 menit. Hasil PCR diperoleh 451 bp, dimana divisualisasi dengan gel agarose 1% yang mengandung ethidium bromide dan didokumentasikan.

4. Isolasi dan Purifikasi Produk PCR untuk Sekuensing

DNA IGF-I Complex hasil amplifikasi PCR kemudian dimurnikan dengan fenol-kloroform untuk kepentingan sekuensing menggunakan Big Dye Terminator Cycle Sekuensing Kit. Data sekuen yang diperoleh kemudian dihomologikan antara kelompok perlakuan dan kontrol dengan menggunakan program komputer software GENETIX MAC

5. Sekuensing

Ekstrak kering DNA ditambah dengan 20 µl Template Suppression Reagent (TSR) divortex dan dipanaskan pada 95°C selama 2-5 menit, diinkubasi pada es, kemudian

divortex lagi dan kemudian sampel dipindahkan pada tabung ependorf 0,5 ml kemudian di running pada Sequencer Machine ABI Prism 310 untuk mendapatkan nukleotida sekuens IGF-I Complex.

Analisis Data

Data yang diperoleh dicatat dan ditabulasikan kemudian dianalisis dengan T Test, sedangkan pemeriksaan imunohistokimia dan hasil sekuensing ditampilkan secara deskriptif (Santoso dan Fandy, 1992).

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1. Karakteristik semen segar untuk isolasi dan identifikasi *Insulin Like Growth Factor-I Complex*.

Sebagai bahan untuk isolasi dan identifikasi *Insulin Like Growth Factor-I Complex* (IGF-I Complex), semen ditampung dari 8 ekor pejantan kambing etawa yang berumur 3-5 tahun, penampungan semen dengan menggunakan vagina buatan. Sebagai dasar untuk menentukan kelayakan semen segar untuk diisolasi proteinnya adalah dilakukan pemeriksaan kualitasnya. Data hasil pemeriksaan semen segar dari 8 kali penampungan ditampilkan pada tabel 1.

Tabel 1: Karakterisasi semen segar kambing untuk isolasi dan identifikasi *Insulin Like Growth Factor-I (IGF-I) Complex*.

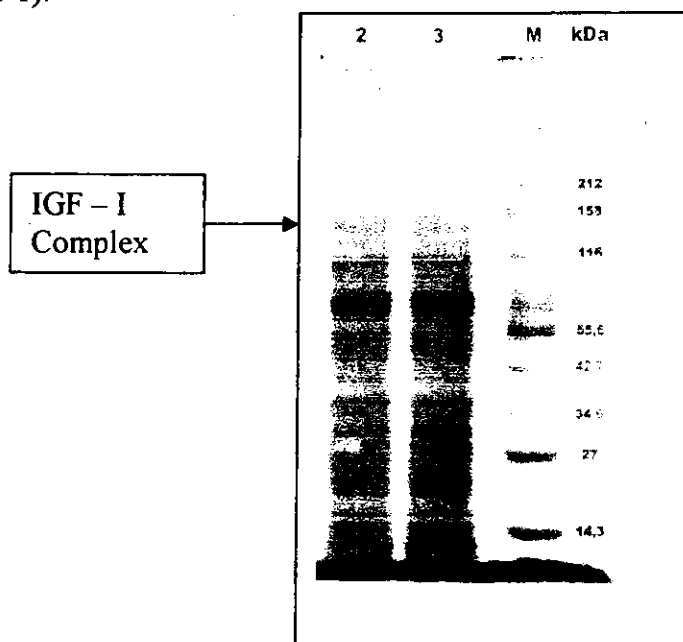
Parameter	Rata-rata \pm SD
Warna	Putih kekuningan
Bau	Khas
Konsistensi	Kental
PH	7,00
Volume (ml)	1,1
Konsentrasi (juta)	3950×10^6
Motilitas massa	+++
Motilitas individu	Progresif (91%)
Hidup (%)	93%

5.2. Native-PAGE Plasma Seminalis Kambing

Identifikasi konstituen - konstituen protein plasma seminalis kambing dilakukan dengan *Native-PAGE (Native-Polyacrylamid Gel Electrophoresis)* konsentrasi 12% dalam elektroforesis set mini protein gel (Bio Rad). Sebagai marker digunakan *High*

Range SDS-PAGE Standards (Bio-Rad) dan pewarnaan hasilnya dengan *Comassie Blue stain SDS-PAGE Standars* (Bio-Rad).

Plasma seminalis kambing dalam proses *electrophoresis* dengan *Native-PAGE* menghasilkan 7 *band*. Berdasarkan urutan Berat Molekulnya selanjutnya ketujuh *band* tersebut berturut-turut adalah *band* pertama (BM 150,288 kDa), *band* kedua (BM 103,486 kDa), *band* ketiga (BM 76,155 kDa), *band* keempat (BM 53,249), *band* kelima (BM 35,378 kDa), *band* keenam (BM 14,099kDa) dan *band* ketujuh (BM 11,492 kDa) (Gambar 1).



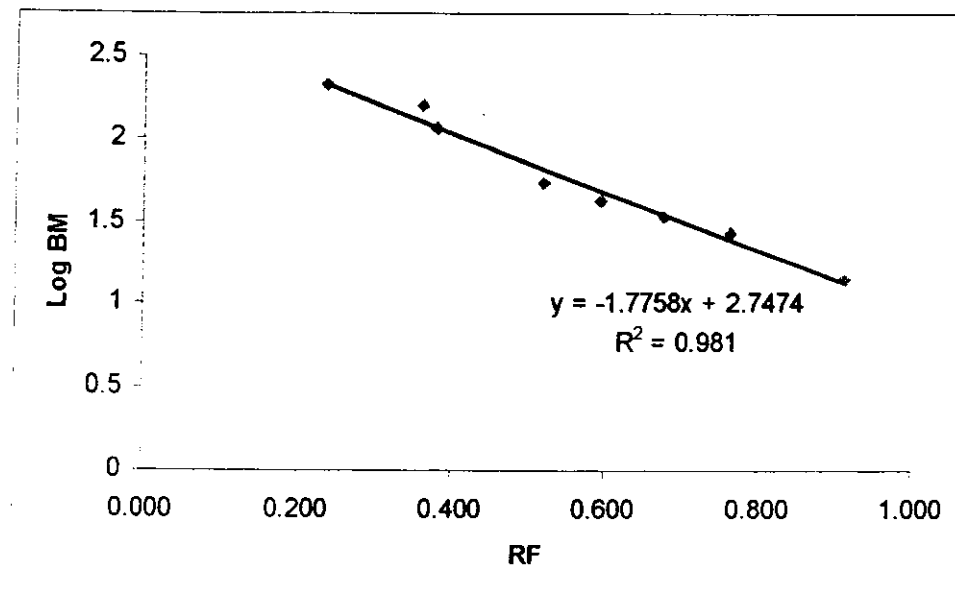
Gambar 1. Gel hasil Analisis dengan Native – PAGE 12 % pada plasma seminalis kambing (M: marker, 2, 3 : sampel plasma seminalis kambing).

5.3. Perhitungan Berat Molekul (BM) Protein Plasma Seminalis Kambing

Penghitungan Berat Molekul (BM) protein plasma seminalis kambing dilakukan berdasarkan Manual *Native-PAGE Molecular Weight Standards* (Biorad). Analisis

regresi menggunakan data jarak antar *band marker* pada gel hasil Native-PAGE dan data BM masing-masing marker, diperoleh persamaan regresi linier : $-1,7758 x + 2,7474$

Gambaran kurva nilai logaritma berat molekul (Log BM) protein marker *High Range Standard* mobilitas relatif molekul protein (Rf) dalam Native-PAGE 12% sebagaimana dimaksud persamaan matematis diatas dapat dilihat pada gambar 2. Pada persamaan tersebut, nilai x adalah nilai Relative mobility (Rf) sampel, yaitu jarak migrasi sample dibagi jarak migrasi pewarna, sedangkan y adalah nilai logaritma BM sampel.



Gambar 2. Kurva nilai logaritma berat molekul (Log BM) protein marker High Range Standard terhadap Mobilitas Relatif Molekul Protein (Rf) dalam Native-PAGE 12%

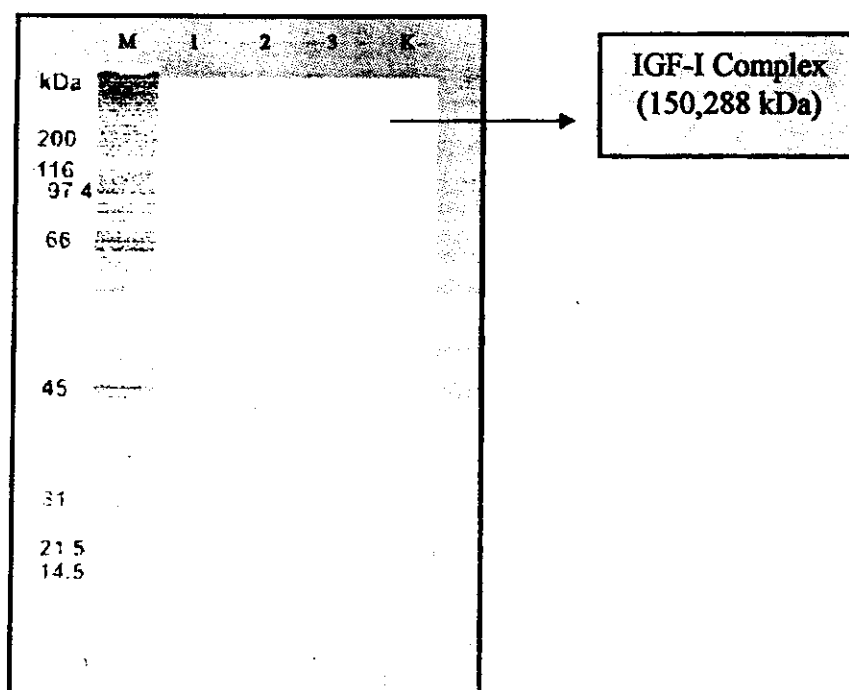
Perhitungan BM masing-masing konstituen plasma seminalis kambing dilakukan pada 2 lane (n=2) yang jelas terbaca pada gel hasil *Native-PAGE*. Dengan menggunakan persamaan regresi tersebut diatas, dari 2 lane yang dianalisis secara deskriptif didapat hasil sebagai berikut : BM konstituen I adalah 150, 288 ; BM konstituen II adalah 103,486; BM konstituen III adalah 76, 155 ; BM konstituen IV adalah 53, 299; BM konstituen V adalah 35, 378; BM konstituen VI adalah 14, 099 dan BM konstituen VII adalah 11, 492. kDa. (Tabel 2).

Tabel 2. Statistik deskriptif berat molekul (BM) konstituen plasma seminalis kambing berdasarkan migrasi protein pada Native PAGE.

Konstituen	Rentangan	Rataan (kDa)
Konstituen I	149,633 – 151,326	150,288
Konstituen II	103,480 – 103,501	103,486
Konstituen III	75,699 – 76,202	76,155
Konstituen IV	52,499 – 53,303	53,299
Konstituen V	35,009 – 35,418	35,378
Konstituen VI	14,118 – 14,018	14,099
Konstituen VII	11,561 – 11,503	11,492

5.4. Spesifisitas protein *IGF-I Complex* menggunakan *Western Blot*.

Untuk mengetahui bahwa molekul *IGF-I Complex* plasma seminalis kambing peranakan ettawa yang mempunyai BM 158,288 kDa bereaksi spesifik dengan anti *IGF-I Complex* monoklonal dilakukan dengan *Western Blot*. Hasil uji *Western Blot* nampak seperti Gambar 3 bahwa anti *IGF-I Complex* mengenali *IGF-I Complex* dengan BM 150,288 kDa. Hasil *Western Blot* mengindikasikan bahwa molekul *IGF-I Complex* plasma seminalis kambing peranakan ettawa berikatan spesifik dengan anti *IGF-I Complex* pada *band* protein. Artinya tidak ada kontaminasi dengan protein lain



Gambar 3. Uji Western Blot molekul *IGF-I Complex* plasma seminalis kambing peranakan ettawa terhadap anti *IGF-I Complex*.

5.5. Hasil pemeriksaan kadar protein Insulin Like GrowthFactor-I (IGF-I) Complex

Tabel 3. Kadar Protein Insulin Like Growth Factor-I (IGF-I) Complex

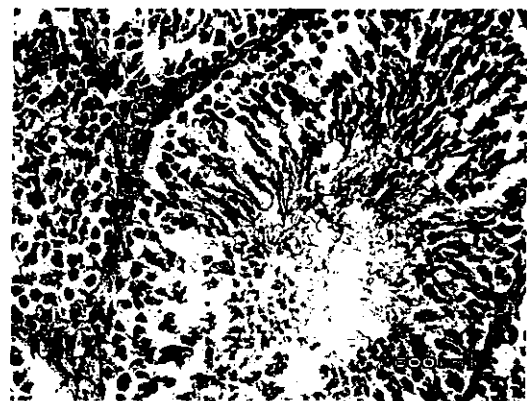
Absorbansi	Konsentrasi ppm ($\mu\text{g/ml/ng}/\mu\text{l}$)
0,023	22000
0,033	42000
0,032	40000

5.6. Uji Imunohistokimia

Uji ini dilakukan untuk mengetahui ekspresi IGF-I Complex plasma seminalis kambing terhadap sel di dalam testes tikus putih yang telah diberi perlakuan IGF-I Complex. Reaksi positif menunjukkan adanya warna kecoklatan, sedangkan reaksi negatif menunjukkan adanya warna kebiruan. Hasil ekspresi IGF-I Complex plasma seminalis kambing pada testes tikus putih.



Gambar 4.1.a



Gambar 4.1.b.



Gambar 4.2.a.



Gambar 4.2.b.

Keterangan

Tanda huruf a adalah reaksi positif (terdapat ikatan antara protein dengan sel sertoli, sel leydig, spermatosit sekunder dan spermatozoa)

Tanda huruf b adalah reaksi negatif (tidak terdapat ikatan antara protein dengan spermatogonia)

5.7. Kadar testosteron tikus putih setelah perlakuan

Hasil pengukuran kadar testosteron serum darah tikus putih jantan dengan menggunakan teknik RIA (Radioimmunoassy) fase padat pada 10 ekor tikus seperti pada tabel berikut :

Tabel 4. Kadar hormon testosteron serum darah tikus (ng/dl).

Kadar Testosteron (ng/dl)		
	Kontrol	Perlakuan
Rata – rata + SD (n=10)	410,4 ± 19,5 ^a	495,9 ± 21,49 ^b

Superscript yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan (p<0,05)

Pada tabel diatas menunjukkan bahwa kadar testosteron pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang tertinggi adalah pada kelompok perlakuan dengan rata-rata 505,9 ± 11,94 ng/dl, sedangkan pada kelompok kontrol dengan rata-rata 420,4 ± 16,20 ng/dl.

5.8. Analisis sekuen IGF-I Complex perlakuan dan kontrol

Data sekuens yang diperoleh antara kelompok kontrol dan perlakuan dibandingkan kemudian akan dihitung besar mutasinya. Pada penelitian ini diperoleh besar mutasi nukleotida yaitu 0,7%. Terdapat homologi nukleotida antara kelompok kontrol dan perlakuan adalah sebesar 89,5%.

```

kontrol          gctcactgcctgcctgcggccagctctgtacaaggaacaatggctctgag
perlakuan        |||...|||
                  gctcactgcctgcctgcagccagctctgtacaaggaacaatggccctgag

                  aacaggaagcccagccctgggggtgcttctggcttctgggtggcactgg
                  .|||...|||
                  gacaggaggcccagccctgggggtgcttctggcttctgggtggcactgg

                  gccctgttacctgcaggggacagatcctggagcagcagcagatgccgag
                  |||...|||.|||.|||.|||.
                  gccctgtcacctgcaggggacagatcccggagcgtcggcagatgccgag

                  ggccccagtgccctgtcacctgtacctgcagcgtatgatgactacacaga
                  |||...|||.|||.|||.|||.
                  ggccccagtgccccgtcgcctgtacctgcagccatgatgactacacaga
    
```

tgagctcagcgtcttttgagcttcaaggaacctcactcagctgccccgata
|||||||.|.|||||||.||.|||||.|||.
tgagctcagcgtcttttgagcttcaaagaacctcacacatctgcctgatg

gcatcccagttagcaccagggtctgtggcttgaccgaaacaacctgtcc
.|.|||||||.||.|||||||.||.|||||||.||.
acatcccagttagcaccagagccctgtggcttgatggcaacaacctctct

tccatcccctcagcgacctccagaacctgtccagccttagacttccctcaa
||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.
tctatcccctcagcgacctccagaacctgtccagcctggacttctcaa

cctgcagggcagctggctgaggagcctggagccacaggcactgctggggcc
|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.||.
cctgcagggcagctggctgaggagcctggagccacaggcactgctggggc

tgagaatctctaccatctgcacctggaacggaacctgctccggagccta
|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||.
tgagaacctctactatctgcacctggaacggaaccggctccggaacctc

gctgcaggtgttcagacacacaccaagtctggcttcaactcagtttggg
|||.||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.||.||
gccgtgggctgttcacacacacaccaggtctggcttcaactcagcctgag

caacaacctcctgggccggtggaagaagggtgttccggggcctcagtc
|.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.
cagcaacctctgggccggtggaagaagggtgttccagggcctcagtc

accttgggacctcaacctgggttgaacagcctagtggtcctgcctgac
|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.
accttgggacctcaacctgggttgaacagcctagtggtcctgcctgac

acggtgttccaggcctgggcaacctccatgagctggtgcttgcctggcaa
||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.
acagtgctccaggactgggcaacctccacgagctggtgctggctggcaa

caaaactgacttacctgcagcctgcgctcttctgtgtgcttggcgagctgc
|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.
caaaactgacttacctgcagcctgcgctcttctgtgtgcttggcgagctgc

gggagctggacctgagcaggaacgctctccgagcgtcaaagctaatgtc
|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.
gggagctggactgagcaggaacgcactccgaagcgtcaaagctaacgtc

tttatacatctgccccggctgcagaagctctacctggaccgcaacctcat
|||.|||||.|||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.
ttgtacatttgcccaggctgcagaagctgtacctggaccggaacctcat

cacagctgtggcccccgctgccttccctgggatgaaggcactgagttggc
.|.|||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.
tacagcagtgggccccggtgccttctgggatgaaggcctgagttggc

tggacctgtcacacaacctgtggctggcctcctggaggacaccttccct
|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.|||||||.
tggacctgtgcacaacctgagtgctggcctcatggaggacaccttccca

ggcctgctgggtctgcatgtcctgcgcctggcacacaacgccatcactag
|||||...|||...|||...
ggcctgctgggcctgcacgtcctgcgcctggcacacaatgcatcgctag

cttgcggccgctactttcaaagatctacacttctggaggactgcagc
|||||...|||...
cttgcggccgctactttcaaagacctgacttctggaggactgcagc

tcggccacaatcgtatcaggcagttaggtgagaagacgttgaggcctg
|...|||...
tggccacaatcgaatcaggcagctcggggagaggacattcgaggcctg

gggcagctggaggactgacgctcaatgacaatcagatccatgaggtcaa
|||||...|||...
gggcagctggaggctgacgctcaatgacaaccagatcactgaggtcag

ggtgggcgccttcttgccctcttcaacgtggctggtatgaatctctccg
|||||...|||...
ggtgggcgccttctctggccttctcaatgtggcggtatgaatctctccg

gcaactgtctgaggagcctcccagcatgtgtccaaggctgggcagg
|||||...|||...
gcaactgtctgaggagcctcccagcggggtgttccagggtctggacaaa

ctgcacagcttgacactggagcacagctgcctgggccgcatccgctgca
|||||...|||...
ctgcacagcctgacactagagcacagctgcctgggtcacgtccgctgca

cactttcgccggcctctcagggctgcgaggctcttctccgggacaaca
|||||...
cactttgctggcctctcagggctgcgaggctcttctcagggacaaca

gcatctccagcatcgaagaacagagcctggcagggtctcagagctcctg
|||||...|||...
gcatctccagcatcgaagaacagagcctggcagggtctcagagctcctg

gaactgatcttaccgccaaccagctcacgcctgtccccgccagctttt
|||||...
gaactggatcttactaccaaccgctcacacatctccccgccagctctt

ccagggccttggccagctggaatatctgcttctgtccaacaaccaactga
|||||...
ccagggcctcgccacctggagtacctgcttctctcctacaaccaactga

caatgctctctgaggatgtcctgggcctctgcagcgggccttctggctg
|...|...|||...
cgacttatccgagggtcctgggcctctgcagcgggccttctggctg

gacctctcacacaaccgctcgagaccggctgaaggccttttctcatc
||...
gatctctcacacaaccacctggagacgctggccgaaggccttttctcatc

tctggggcggttcgctacctcaacctcaggaataactcctgacagctt
|||||...
tctggggcggttcgctacctcagcctcaggaataactcctgacagctt

ttgtgccgcagcctggcctggagcgctgtggctcgatgccaacccctgg
||..||.||||.|||||||||||||||||||.|||||||||||||||
ttcaccacagcccggcctggagcgctgtggcttgatgccaacccctgg

gactgcagttgtcccctcaaggcgcttcgtgactttgcctacagaaccc
|||||||.|||||||||||||||||||.|||||||||||.|||||||
gactgcagctgtcccctcaaggcgcttcgagactttgcctgcagaaccc

tgggtgtgtcccccgcttggcagactgtctgtgagggagatgactgcc
|||||||||||||||||||||||.||.|||||||
tgggtgtgtcccccgcttggcagactgtctgtgagggggacgactgcc

agccggtgtacacttacaacaacatcacttgtgctggccccgccaacgtc
|||||||||||.|||||||.|||||||.|||||||||||||||
agccggtgtacacctacaacaatatcacttgcgctggccccgccaacgtc

tcaggcctcgaccttcgagacatcagtgaaacactcttggcactgctg
||.|||||||||||.|||||.||.|||||||||||.|||||||||||||||
tcgggcctcgacctaaagagacgtagtgaaacacatttggcactgctg

acct-gctacttactggcctggctctggctgaacactgccttatggccag
||.||.|||||||||||||||.|||||||.|||||||.||.|||||||
aactggctacttactggcccgtctggccgaacactgtctcatggccag

gatagtgttctactggt-acagaataagctggctctggaatacttaccba
||..||||.||||.||||.|||||||||||||||||||.|||||.|||||
gacggtgtctcattgttaacagaataagctggctctcaaattcctaccba

tctcaaggggataggctcatggctgctcacttctggatgcagggcagtac
||||.|||||.|||||.|||||||||||||||||||.||||.|||||
tctctaggggacaggtctggctgctcacttctggaagca-ggctgtac

cggaaagcgtatgtggcctaaatagggtgggcacaggccaagtgcccgagg
.|||||||.|||||||||||.||.|||||||||.|||||||||||.|||||
tggaaagctatgtggcctagaaagggtggctcaggccaagtgtccaagg

cccaaaggaggagggtgctcagcagca---cacctgctgg-caac---
||||||| ||||||||| |||.|||.||.|||||.||.||
cccaaagga-gggagggtgctc-gctgaatttaagcatattagtcagcgga

--aattaaagcaaatctgaa
||..||.||||.||||.||||
ggaaaagaaactaaccagga

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1. Pemeriksaan kualitas semen segar kambing peranakan etawa yang digunakan untuk identifikasi, isolasi dan karakterisasi protein *Insulin Like Growth Factor I Complex* plasma seminalis.

Sebagai dasar untuk menentukan kelayakan semen segar untuk diisolasi proteinnya adalah hasil pemeriksaan kualitas semen awal. Penilaian kualitas semen segar baik secara makroskopis maupun mikroskopis yang dilakukan segera setelah penampungan sangat penting artinya sebelum melakukan proses lebih lanjut terhadap semen tersebut seperti penambahan volume, pada proses pembekuan, pemisahan spermatozoa dari plasma seminalis untuk proses isolasi protein maupun untuk keperluan pembuahan *in vitro*. Kualitas semen yang baik menggambarkan pentingnya peran protein dalam plasma seminalis terhadap fungsi spermatozoa. Hal tersebut dibuktikan juga oleh Macpherson *et al.*, (2002), bahwa ada korelasi positif antara kadar protein *IGF-I* plasma seminalis kuda dengan konsentrasi, morfologi dan motilitas spermatozoa, sehingga dapat disimpulkan bahwa semen yang mempunyai kualitas baik mempunyai korelasi positif dengan kadar protein *IGF-I*.

Volume semen yang dihasilkan dari seekor pejantan sangat bervariasi. Hal ini dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain kondisi masing-masing individu, seperti kualitas reproduksi, umur dan kondisi manajemen peternakan (Gordon, 2000). Selain itu teknik dan metode penampungan serta persiapan alat penampungan akan mempengaruhi juga volume semen yang dihasilkan. Warna semen merupakan gambaran dari kekentalan

semakin tinggi konsentrasi spermatozoa yang terkandung dalam semen, semakin kental konsistensi semen dan semakin pekat warnanya. Demikian juga sebaliknya pada semen yang berwarna agak pucat akan didapatkan konsentrasi dan konsistensinya yang relatif rendah (Donald's, 2003).

Derajat keasaman sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin rendah atau semakin tinggi pH semen dari normal akan membuat spermatozoa lebih cepat mati. Perubahan pH ke arah yang lebih asam terjadi karena penimbunan asam laktat yang merupakan hasil metabolisme spermatozoa dalam kondisi anaerob (Toelihere, 1985).

Ciri utama spermatozoa yang berkualitas baik adalah mempunyai gerakan massa dan motilitas dengan daya gerak yang progresif. Gerakan massa spermatozoa merupakan gambaran dari motilitas atau gerakan individu spermatozoa. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak kedepan, maka gerakan massa akan semakin baik (semakin tebal dan pergerakannya akan semakin cepat).

Berdasarkan hasil penilaian kualitas semen segar kambing peranakan etawa yang ditampung (Tabel 5.1), dapat disimpulkan bahwa semen segar kambing yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam proses isolasi protein plasma seminalis. Hal ini sesuai dengan apa yang dikemukakan oleh Toelihere (1985).

6.2. Identifikasi protein *Insulin Like Growth Factor I Complex* plasma seminalis kambing dengan Native PAGE

Semen terdiri dari plasma seminalis yang secara biokimia mengandung senyawa organik dan anorganik. Salah satu senyawa tersebut adalah protein (Garner and Hafez,

2000). Protein dapat dipisahkan dengan cara *electrophoresis*. *Electrophoresis* dengan larutan detergen tidak hanya memisahkan berbagai subunit protein secara individu akan tetapi juga memberi kemungkinan untuk memperkirakan berat molekul suatu protein. Ini karena detergen yang dipakai yaitu *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS) mengelilingi molekul protein menetralkan seluruh muatan alamiah dan merusak struktur sekunder dan tertier. Akibatnya molekul-molekul protein terpisahkan menurut ukurannya masing-masing ketika melewati pori-pori gel *electrophoresis*, protein-protein yang lebih kecil bergerak lebih cepat dari pada molekul protein yang lebih besar (Dorothy, 1993). Pada *Native-PAGE* sama dengan *SDS-PAGE*, hanya saja pada *Native-PAGE*, *mercaptoetanol* (2ME) diganti dengan *Iodoacetanol* yang diperlukan untuk mencegah perubahan ikatan disulfida dari protein yang akan dielusi (Aulani'am, 2005). Pada penelitian ini menggunakan *Native-PAGE*, protein mengalami *electrophoresis* dalam deterjen ionik sehingga detergen akan mengikat residu hidrofobik peptida.

PAGE merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul (BM) protein, struktur subunit dan kemurnian protein. Protein adalah molekul yang amphotheric mengandung kedua grup karboksil negatif dan grup amino positif. Protein dalam *Native-PAGE* akan bermigrasi sesuai dengan berat molekul (BM) dan akan terkonsentrasi pada band pada gel. Protein dengan berat molekul yang lebih besar pada gel akan tertahan pada posisi yang lebih tinggi dari pada protein dengan berat molekul yang lebih rendah (Rantam, 2003).

6.3. Berat Molekul (BM) Protein Plasma Seminalis Kambing

Analisis regresi berdasarkan data marker pada hasil *Native-PAGE* dan data BM masing-masing marker pada manual *Native-PAGE Molecular Weight Standards* (No. cat. 161-0317 Bio Red) diperoleh persamaan regresi linier $y = -1,7758x + 27474$. Perhitungan pada masing-masing *band* hasil *Native-PAGE* didapat hasil bahwa selanjutnya disebut fraksi pertama (I) dengan BM 150,288 kDa, fraksi kedua (II) dengan BM 103,468 kDa, fraksi ketiga (III) dengan BM 76,155 kDa, fraksi keempat (IV) dengan BM 53,249 kDa, fraksi kelima (V) dengan BM 35,378 kDa, fraksi keenam (VI) dengan BM 14, 099 kDa dan fraksi ketujuh (VII) dengan BM 11,492 kDa.

Sebagai pembanding, fraksi protein plasma seminalis kuda yang dipaparkan dengan teknik *Blotting*, terbagi dalam 14 fraksi protein dengan berat molekul (BM) berkisar antara 14-120 kDa (Macpherson *et al.*, 2002). Penelitian lain membuktikan bahwa plasma seminalis domba dengan menggunakan metode *SDS-PAGE* menunjukkan 20 fraksi protein dengan berat molekul (BM) berkisar antara 12–200 kDa (Beatriz *et al.*, 2000). Nomenklatur protein plasma seminalis didasarkan atas mobilitas protein tersebut pada gel *Native-PAGE* dari atas kebawah dengan BM berturut-turut makin kecil. Identifikasi fraksi protein plasma seminalis kambing peranakan ettawa pada penelitian ini dengan menggunakan metode *Native-PAGE* 12% pewarnaan *Comassie Blue* menghasilkan 7 *band* dengan BM yang berkisar antara 11-150 kDa.

Hasil ini ditunjang pula dengan pendapat Dai dan Baxter (1992), bahwa fraksi pertama (I) dengan BM 150,288 kDa adalah *Insulin Like Growth Factor-I Complex*. *Insulin Like Growth Factor-I* berbentuk kompleks dengan BM antara 120-150 kDa.

Protein *Insulin Like Growth Factor-I* berbentuk kompleks yang terdiri dari 3 macam protein yaitu *IGF-I*, *IGFBP* dan *ALS*. *Insulin Like Growth Factor I* dalam bentuk bebas mempunyai BM 7,5 kDa. *IGFBP* berikatan dengan *IGF-I* dimana *IGFBP* berfungsi mengatur aktifitas dan membawa *IGF-I* kedalam target sel. *Insulin Like Growth Factor Binding Protein* dalam bentuk terglykosilasi dapat berikatan dengan permukaan sel dengan ikatan nonkovalen sugar (Kostecka dan Blanovec, 1999). Secara fungsional protein *IGF-I* plasma seminalis mengatur fungsi spermatozoa. Sumber protein *IGF* plasma seminalis pada kuda adalah testis, epididimis dan kelenjar asesoris (Macpherson *et al.*, 2002). Dari hasil penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa banyaknya fraksi protein dalam plasma seminalis tergantung dari masing-masing spesies dan metodenya.

6.4. Kadar *IGF-I Complex* Plasma Seminalis kambing

Kadar *IGF-I Complex* yang dihitung dalam penelitian ini adalah 1,179183 $\mu\text{g/ml}$. Sampai saat ini belum ada penelitian kadar *IGF-I Complex* plasma seminalis baik pada manusia maupun pada hewan, tetapi sebagai perbandingan bahwa kadar *IGF-I* plasma seminalis sapi berkisar $194 \pm 26 \text{ ng/ml}$ (Hoeflich *et al.*, 1999).

6.5. Spesifisitas protein *Insulin Like Growth Factor -I Complex* plasma seminalis kambing peranakan ettawa menggunakan Western Blot.

Metode *Imunoblotting* merupakan metode yang digunakan untuk membuktikan *band* protein *IGF-I Complex* yang muncul saat melakukan running *Native-PAGE*. Pengujian *Imunoblotting* melalui metode *Western Blot* dengan menggunakan anti *IGF-I Complex* (standart) ternyata yang muncul pada saat melakukan pemeriksaan melalui *electrophoresis Native-PAGE* adalah benar *band IGF-I Complex* dan bukan protein lain.

Anti *IGF-I Complex* yang digunakan sebagai antibodi primer akan berikatan dengan *band IGF-I Complex* sebagai antigennya. Anti rabbit IgG AP *Conjugate* sebagai antibodi sekunder akan mengikat antibodi primer. *Western Blue* solution akan berikatan dengan antibodi sekunder sehingga menghasilkan *band* yang berwarna keunguan pada membran

6.6. Uji Imunohistokimia

Uji imunohistokimia hádala untuk identifikasi receptor *IGF-I Complex* plasma seminales kambing pada sel-sel tubulus seminiferus. Prinsip reaksi ini hádala reaksi spesifik receptor dan ligan, antigen-antibodi dan antibodi-anti terhadap antibodi tersebut (antibodi sekunder). Hasil penelitian ini menunjukkan adanya ikatan antara protein *IGF-I Complex* dengan spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, sel sertoli, sel leydig dan spermatozoa (warna kecoklatan pada gambar 5.1 dan 5.2). Sedangkan pada sel spermatogonia tidak ada ikatan (receptor tidak ada) warna pada gambar 5.1 dan 5.2 berwarna keabuan. Hal ini sesuai dengan pendapat Rosser and Hess (2001) bahwa *IGF-I* disintesa oleh sel sertoli dan sel leydig , sedangkan reseptornya ada pada spermatosit primer, sekunder, spermatid dan spermatozoa (Macpherson *et al*, 2002). *IGF-I Complex* berperan pada spermatogenesis dan steroidogenesis.

6.7. Kadar testosteron pada tikus putih setelah perlakuan

Hasil pengukuran kadar hormon testosteron tikus yang didapat dari 10 ekor menunjukkan bahwa kadar testosteron tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan yaitu $505,9 \pm 11,94$ ng/dl, sedangkan pada kelompok control kadar testosteron sebesar $420,4 \pm 16,20$ ng/dl. Dengan T Test antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat perbedaan ($p < 0,05$).

menstimulir hipotalamus yang selanjutnya menstimulir pengeluaran FSH (Folikel Stimulating Hormon) dan ICSH (Interstitial Cell Stimulating Hormon), sehingga akan menstimulir target sel pada tubulus seminiferus. IGF-I Complex bekerja pada spermatogenesis dan steroidogenesis.

6.8. Sekuensing

Pada penelitian ini dilakukan eksplorasi untuk menemukan sekuens peptida asal IGF-I Complex pada testes tikus antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang homolog, sehingga diharapkan bila mutasi tidak terlalu besar maka protein dapat digunakan untuk keperluan invitro pada bidang reproduksi.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan Penelitian

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian IGF-I Complex dapat meningkatkan hormon testosteron dan tidak menunjukkan adanya mutasi nukleotida pada pemberian IGF-I Complex pada testes tikus putih

7.2. Saran Penelitian

Saran dari penelitian ini adalah, IGF-I Complex dapat digunakan untuk memperbaiki fertilitas

DAFTAR PUSTAKA

- Aulani'am, 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang. 53-85.
- Baxter, R.C, 1990. Circulating Levels and Molecular Distribution of The Acid labile (Alpha) Subunit of The High Molecular Weight Insulin Like Growth Factor Binding Protein Complex. Australia.J.Clin. Endocrinol.metab.70(5).
- Beatriz,B; R.Perez-Pe, M. Gallego,A. Tato, J.Osada,T. Muino Blanco and J.A. Cebrian-Perez, 2000. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold Shock damage on Ran Sperm Membrane. Biology Reproduction.63: 1531-1537.
- Birkenmeier,G; Glander,H.J, Kratzsch and Weisbrich,C., 1996. Insulin Like Growth Factor I and Alpha-2 Macroglobulin in Seminal Plasma. Human Reprod. 11(11): 2454-2460.
- Clenmons,D.R and Jones, J.L, 1995. insulin Like Growth Factor and Their Binding Protein Biological Action. Endocrinology. Rev.16 : 3-34.
- Dai,J and R.C. Baxter , 1992. Molecular Cloning of The Rat Insuline Like Growth factor Binding Protein Complex. Australia.J.Biochem. Biophys.Res.Commun 188 (1).
- Donald, M.H; J.Andrew, Kouba; R,Brett, Lackey; R,William,, Boone and Sandra,L,Gray., 1998. Identification of Insulin Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa : Influence on Sperm Motility.59 : 330-337.
- Donald'S, Mc, 2003. Veterinary Endocrinology And Reproduction. Fifth Edition. Edited by : Maurico H Pineda,Michael p Dooley. Hal 154-225, 265, 325,447.
- Evans, G and M.W.C.Maxwell, 1988. Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat. Butherworths, Sydney.
- Frandsen, R.D, 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Edisi Ke empat. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Garner and Hafez, E.S.E, 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th Edition. Philadelphia.baltimore.New York London.
- Gill,R ; C,Verma, B,Wallach ; B,Urso ; J,Pitts ; A,Wollmer ; P, De Meyts and M,Wood., 1999. Modelling of the Disulphide Swapped Isomer of Human Insulin Like Growth Factor I : Implication for Receptor Binding,Oxford. J. Prot.Eng.12(4) : 297-303.
- Glander, H.J; J.Kratzsch, C. Weisbrich, G. Birkenmeier, 1996. Insulin Like Growth Factor – I and Alph 2-Macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. Hum Reprod.11(11) : 2454-60.

- Gordon, I, 2000. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB.International Cambride.170-179.
- Hardjopranto, S, 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Cetakan I. Airlangga University Press. Surabaya 55-80.
- Kostecka,Z and J. Blanovec, 1999. Insulin Like Growth Factor Binding Protein And Their Fuctions (Minireview). Endocrine regulations. Vol.33. 90-94.
- Laron, Z; 2001. Insulin Like Growth Factor I (IGF -I): a Growth Hormon. J. Clinical Pathol : Mol pathol(54) : 311-316.
- Macpherson,M.L; R.C.M Simmen; F.A. Simmen; J.Hernandes; B.R. Sheerin; D.D, Varner; P.Loomis; M.E Cadario; C.D , Miller; S.P, Brinsko; S.Rigby and T.L,Blanchard, 2002. Insulin Like Growth factor I and Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2 and 5 Equine Seminal Plasma : Associationwith Sperm Characteristics and Fertility. Biology of Reproduction. 67: 648-654.
- Minelli,A; M.Moroni and C.Castellini., 2001. Isolation and Purification of the IGF-I Protein Complex From Rabbit Seminal Plasma : Effect on Sperm Motility and Viability.
- Monget, P and D. Monniaux, 1995. Growth Factor and The Control of Folliculogenesis. J. Reproduction and Fertility supplement. 49: 321-333.
- Partodihardjo, S, 1987. Ilmu Reproduksi Hewan. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Mutiara sumber Widyaa,. Jakarta. 44-45.
- Rantam.F.A. 2003.Metode Imunologi.Airlangga University Press.145-147.
- Robert,C; Baxter, L.Janet.; Martin and A.B.Virginia., 1989. High Molecular Weight Insulin Like Growth Factor Binding Protein Complex. Biological Chemistry. 264 (20): 11843-11848.
- Roser, J.F and M.F.Hess, 2001. The Effect of Age and Fertility Status on Plasma and Intratesticular insulin Like Growth Factor I Concentration in Stallion. Theriogenology.56: 723-733.
- Salisbury,G.W dan N.L, Van Demark, 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi.Gadjah Mada University Presss.269-371.
- Santoso, S dan Fandy T, 2001. Reset Pemasaran. Concep dan Aplikasi dengan SPSS. PT Gramedia Yakarta.

Toelihere, M.R, 1985. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung. 98-254.