

LAPORAN

**HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH II
Tahun Pertama (Tahun Anggaran 2009)**



Tema : Ketahanan Pangan

**PERBAIKAN MUTU SEMEN BEKU SAPI DENGAN
PENAMBAHAN *FERTILITY ASSOCIATED ANTIGEN*
(FAA) DALAM MEDIA PEMBEKUAN**

**Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.
Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh.
Trilas Sardjito, M.Si., Drh.**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Nomor : 300/SP2H/PP/DP2M/VI/2009, tanggal 16 Juni 2009

**Universitas Airlangga
Desember 2009**

Kedokteran Hewan
dan Peternakan

LAPORAN

**HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH II
Tahun Pertama (Tahun Anggaran 2009)**



Tema : Ketahanan Pangan

**PERBAIKAN MUTU SEMEN BEKU SAPI DENGAN
PENAMBAHAN *FERTILITY ASSOCIATED ANTIGEN*
(FAA) DALAM MEDIA PEMBEKUAN**

**Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.
Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh.
Trilas Sardjito, MSi., Drh.**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Nomor : 300/SP2H/PP/DP2M/VI/2009, tanggal 16 Juni 2009

**Universitas Airlangga
Desember 2009**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Perbaikan Mutu Semen Beku Sapi dengan Penambahan *Fertility Associated Antigen (FAA)* dalam Media Pembekuan

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh
 b. Jenis Kelamin : L / P
 c. NIP : 131 877 885
 d. Jabatan Struktural : Penata
 e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 f. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan / Reproduksi Veteriner
 g. Pusat Penelitian : LPPM Universitas Airlangga

1. Tim Peneliti

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

3. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun (seluruhnya)
 Laporan akhir ini merupakan tahun 1 (pertama)

4. Pembiayaan

- a. Jumlah yang diajukan ke Dikti tahun ke-1: Rp 100.000.000,00
 b. Jumlah yang disetujui tahun ke-1 Rp. 83.000.000,00
 c. Jumlah yang diajukan ke Dikti tahun ke-2: Rp 100.000.000,00
 d. Jumlah yang diajukan ke Dikti tahun ke-3: Rp --

Surabaya, 3 Desember 2009

Mengetahui,
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
 Universitas Airlangga

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh
 NIP.130 687 305

Ketua Peneliti,

Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh
 NIP.131 877 885



Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
 Universitas Airlangga

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

RINGKASAN

Pejantan dengan semen yang mengandung *Fertility Associated-Antigen* (FAA) adalah mempunyai tingkat kesuburan yang lebih tinggi bila dibanding dengan semen pejantan tanpa FAA.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi FAA dengan melakukan isolasi, identifikasi, karakterisasi dan kadar FAA dalam semen sapi.

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi secara ilmiah tentang keberadaan FAA dalam semen sehingga bisa diisolasi yang nantinya digunakan untuk suplementasi semen beku.

Secara makroskopis maupun mikroskopis ternyata ada beberapa semen sapi yang dibawah standar protap, antara lain semen no. 5, 6, 9, 10, 12, 14, 18, 23, 24, 29 dan 30. Untuk semen no. 12, volume dan gerakan individunya di bawah standar, tapi untuk pemeriksaan lainnya normal, sedangkan semen yang lainnya umumnya dibawah standar karena gerakan massa, individu dan persentase hidupnya. Protein FAA yang diproduksi dan diekspresikan oleh membrane spermatozoa sapi dapat dideteksi dengan imunositokimia, yaitu adanya warna kecoklatan di membrannya. Identifikasi Protein FAA dari beberapa Sapi dengan SDS-PAGE, baik yang berasal dari membran spermatozoa maupun plasma seminalis menghasilkan beberapa pita yang berjumlah antara 6 sampai 12 pita. Identifikasi Protein FAA dengan Western Blot ternyata hanya pada membran spermatozoa saja yang mengekspresikan FAA. Kadar protein isolat FAA adalah berkisar antara 0,125 sampai 21,25 µg/ml.

Kata kunci : *Fertility Associated-Antigen* (FAA), semen, sapi pejantan, media pembekuan

SUMMARY

Bull with semen containing Fertility-Associated Antigen (FAA) is to have a fertility rate higher when compared with bull semen without FAA.

This study aims to determine the expression of FAA to perform the isolation, identification, characterization and levels of FAA in semen bull.

The benefits of this research is to provide scientific information about the presence of FAA in semen that can be isolated which will be used to supplement the frozen semen

Macroscopic and microscopic in it there are some semen under standard, among others, semen no. 5, 6, 9, 10, 12, 14, 18, 23, 24, 29 and 30. To semen no. 12, volume and movement of individuals under the standard, but for other tests normal, while the other semen generally below the standard for mass movements, individuals and the percentage of his life. FAA protein is produced and expressed by the membrane of spermatozoa can be detected with imunositokimia, namely the brown color on the membrane. FAA protein identification of some bull with SDS-PAGE, both derived from the plasma membrane of spermatozoa and seminal produced several bands, amounting to between 6 to 12 bands. Protein identification by Western blot FAA was only on the membrane of spermatozoa express only FAA. FAA isolate the protein content is between 0,125 – 21,25 µg / ml.

Key word : Fertility Associated Antigen, membrane spermatozoa, plasma seminal, Bull, freeze dilution.

PRAKATA

Dengan mengucapkan syukur alhamdulillah ke hadirat Nya, akhirnya laporan hasil penelitian tahun pertama (anggaran tahun 2009) dengan judul “Perbaikan mutu semen beku sapi dengan penambahan fertility associated antigen (FAA) dalam media pembekuan”, telah selesai.

Fertility Associated Antigen (FAA) 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. Dalam laporan hasil penelitian ini telah dilakukan isolasi, identifikasi dan karakterisasi FAA dalam semen sapi, dan akan dilanjutkan ke penelitian tahun kedua (anggaran tahun 2010) mengenai dosis optimum penambahan FAA ke dalam media pembekuan terhadap kualitas spermatozoa *pasca thawing*, tingkat fertilisasinya secara *in vitro* dan juga secara *in vivo*.

Penulis telah berupaya menyusun laporan hasil penelitian ini dengan sejelas-jelasnya. Namun demikian tiada gading yang tak retak, maka dengan segala kerendahan hati, penulis menyadari hasil penulisan laporan ini masih jauh dari yang diharapkan. Untuk itu penulis akan sangat berterima kasih bila ada yang berkenan memberi saran untuk penyempurnaannya.

Penulis,

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II STUDI PUSTAKA	6
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE-1	16
BAB IV METODE PENELITIAN	17
BAB V HASIL PENELITIAN	21
BAB VI PEMBAHASAN	38
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	45
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	54
B. DAFTAR ARTIKEL ILMIAH	64
C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN	65

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Berat Molekul Pita-Pita Protein Membran Spermatozoa Sapi	32
Tabel 5.2. Berat Molekul Pita-Pita Protein Plasma Semen Sapi	36
Tabel 5.3. Nilai Absorbansi Protein Standar dan Protein FAA	39
Tabel 5.4. Konsentrasi dan Nilai Absorbansi Protein FAA Standar	40
Tabel 5.5. Perhitungan kadar FAA dari beberapa sampel semen sapi.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1. Preparat Imunositokimia FAA Membran Plasma Spermatozoa Sapi	30
Gambar 5.2. Elektroforegram Membran Spermatozoa Sapi.....	31
Gambar 5.3. Kurva Hubungan Antara Rf dengan Log BM Protein Standar	32
Gambar 5.4. Elektroforegram Plasma Semen Sapi.....	35
Gambar 5.5. Kurva Hubungan Antara Rf dengan Log BM Protein Standar	35
Gambar 5.6. Hasil <i>Western Blot</i> Isolat FAA dengan BM 31 kDa	38
Gambar 5.7. Grafik Kurva Baku Protein FAA	40
Gambar 6.1. Proses Denaturasi Protein oleh <i>MerCaptoethanol</i>	45
Gambar 6.2. Terbentuknya Substrat Luminol.....	46

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Peralatan dan Material Penelitian	54
Lampiran 2. Biodata Peneliti	56

BAB I PENDAHULUAN

Upaya pemerintah dalam meningkatkan populasi ternak untuk keperluan peningkatan produksi daging dilakukan melalui penyediaan bibit ternak, khususnya ternak sapi, dan penerapan bioteknologi reproduksi (Direktorat Jenderal Peternakan, 2005). Salah satu bioteknologi reproduksi yang telah diterima oleh masyarakat peternak dalam meningkatkan produksi ternak adalah teknologi inseminasi buatan (IB) (Hafez, 2000).

Keuntungan IB antara lain adalah hanya pejantan yang baik saja dapat dipergunakan meningkatkan seleksi diferensial yang akhirnya dapat menyebabkan peningkatan genetik lebih cepat, dapat menghemat biaya pemeliharaan pejantan lain dan penularan penyakit kelamin dari ternak yang di-IB dapat dibatasi atau dicegah (Tomaszewska dkk., 1991; Olson 2005).

Pelaksanaan inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu upaya pemanfaatan bibit pejantan unggul secara maksimal dalam rangka perbaikan mutu genetik ternak. Tetapi dalam pelaksanaannya angka keberhasilannya berkisar antara 40 – 70% (Direktorat Jenderal Peternakan, 2005). Ada beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan IB, antara lain mutu semen beku, reproduksi ternak betina, keterampilan petugas (inseminator), ketepatan dan pelaporan deteksi berahi serta pemeliharaan ternak betina (Hafez, 2000). Mutu semen beku memegang peranan penting dalam kejadian kebuntingan pada betina. Faktor-faktor lain yang mendukung mempengaruhi kualitas air mani antara lain pakan, musim, suhu, herediter, penyakit, transportasi, frekuensi pengambilan dan *exercise* (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 molekuler, mengingat bahwa dalam membran sel ada kumpulan antigen yang dapat dipakai untuk menunjukkan kesuburan air mani. Menurut penelitian Sprott *et al.* (2000), bahwa pejantan dengan air mani yang mengandung *Fertility Associated-Antigen* (FAA) 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 FAA. Pada tahun 2006 Sprott *et al.* mengatakan bahwa dari 5 populasi (n=468) yang diperiksa ada 65 – 86% air mani dari sapi pejantan muda mengandung FAA. Berarti ada 14 – 35% pejantan yang kurang subur. Hal ini bisa menimpa pada Balai Inseminasi Buatan dimana saja. Untuk itu perlu diupayakan peningkatan kesuburan air mani beku dengan penambahan FAA hasil isolasi dalam media pembekuan.

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 potong dengan populasi tertinggi dan juga merupakan pemasok kebutuhan sapi 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.

Fertility Associated Antigen (FAA) 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 (Aaron, 1980).

Dalam penelitian tahap pertama (tahun pertama) ini dilakukan isolasi, identifikasi dan karakterisasi FAA dalam semen sapi. Untuk selanjutnya digunakan sebagai dasar penelitian tahap kedua (tahun kedua tahun anggaran 2010) sebagai bahan tambahan pada media pembekuan yang mampu meningkatkan angka fertilisasi baik secara *in vitro* maupun *in vivo* yang 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

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). Produksi spermatozoa oleh testes maupun plasma semen oleh kelenjar asesoris keduanya dikontrol oleh hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) yang dihasilkan oleh hipofisis anterior serta hormon testoteron yang dihasilkan oleh sel Leydig dalam testes (Toelihere, 1985).

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). Selanjutnya adanya perbedaan anatomi kelenjar kelamin pada berbagai jenis hewan juga menyebabkan perbedaan volume dan komposisi (Toelihere, 1985).

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.

Karakteristik dan Sifat Kimiawi Spermatozoa

Alat reproduksi primer hewan jantan adalah testes yang mempunyai dua fungsi utama yaitu sebagai penghasil sel spermatozoa dan penghasil hormon jantan terutama adalah testosteron. Proses pembentukan spermatozoa disebut spermatogenesis yang terjadi di dalam tubulus seminiferus. Spermatogenesis dapat dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama adalah spermatositogenesis merupakan serangkaian perubahan spermatogonia menjadi spermatid. Tahap kedua adalah spermiogenesis yaitu proses terjadinya metamorfosis seluler dari spermatid menjadi sel spermatozoa (Hardjopranjoto, 1995). Setelah dibentuk di tubulus seminiferus, spermatozoa akan dikeluarkan melalui saluran reproduksi jantan, yaitu rete testis selanjutnya melalui vas eferen menuju epididymis. Di dalam epididymis spermatozoa mengalami kapabilitas, kemudian masuk ke vas deferens menuju ke ampulla vas deferens, spermatozoa akan ditambah dengan cairan asesoris (plasma semen) yang berasal dari kelenjar asesoris. Spermatozoa yang telah bercampur dengan plasma semen disebut sebagai semen selanjutnya akan siap diejakulasikan melalui urethra (Bearden and Fuquay, 1992).

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, 1993).

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).

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.

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).

Untuk mempertahankan daya hidup dan fertilitas sel spermatozoa dalam pembekuan diperlukan beberapa tahapan, hal ini karena mempengaruhi stabilitas dan fungsi membran spermatozoa (Einarsson, 1992).

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 adalah tirosin kinase (Leyton and Saling, 1989, Bunch *et al.*, 1992, Leyton *et al.*, 1992).

Kesuburan Semen

Kriteria untuk seleksi sapi sangat bervariasi berdasar masing-masing teknik yang digunakan. Namun demikian, sebagian besar prinsip-prinsip seleksi berdasar pada penilaian visual (judging), silsilah, penampilan atau *performans* dan pengujian atau tes produksi. Untuk uji kesuburan semen sapi umumnya hanya ada 2 uji yaitu berdasar silsilah dan produksi (Blakely dan Bade, 1994). Seleksi sapi dengan silsilah didasarkan pada perkiraan prestasi dari nenek moyang sapi itu, yang telah dilakukan orang selama beratus-ratus tahun. Pemanfaatan yang paling berarti dari informasi silsilah adalah sebagai dasar seleksi hewan-hewan muda sebelum penampilannya sendiri atau keturunannya dapat diketahui (Copeland, 1994). Uji produksi meliputi uji penampilan dan keturunan (uji progeni). Cara ini sangat efektif apabila terutama didasarkan pada karakteristik-karakteristik yang secara ekonomis penting, diwariskan dengan derajat yang tinggi. Agar efektif, karakteristik unggul yang akan diseleksi haruslah memiliki arti ekonomis dan memiliki heritabilitas tinggi (Akiko, *et al.*, 1998).

Fertility Associated-Antigen (FAA)

Kesuburan berhubungan *fertility associated antigen* (FAA) 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 (Aaron, 1980).

Ejakulasi dari sapi awal pubertas (n= 468) dari 5 populasi berbeda telah dianalisa secara individu untuk adanya *fertility-associated antigen* (FAA) dengan menggunakan kaset arus cabang samping. Data yang diperoleh dibandingkan antara sapi pejantan dengan dan tanpa FAA dalam satu kali ejakulasi. Persentase dari sapi pejantan yang FAA-positif rata-rata dari 65 - 86% dari 5 populasi (Spratt, 2006).

Saat ejakulasi, spermatozoa diselubungi oleh heparin binding protein (HBP) yang disekresikan oleh kelenjar vesikula seminalis, prostate dan cowper. Produksi yang spesifik HBP pada spermatozoa berhubungan dengan potensi kesuburan, besar kecilnya jumlah produksi berbeda pada tiap pejantan (Spratt, *et al.*, 2000). 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-, 24-, dan 21.5-kDa yang ada hubungannya dengan peningkatan kesuburan air mani sapi. Tujuan studi ini adalah untuk mengidentifikasi itu 31-kDa HBP yang dikenal sebagai antigen *fertility-associated* (FAA). FAA telah terisolasi oleh heparin-affinitas chromatography dan reversed-phase cairan capaian tinggi chromatography dekat homogenitas. Secara biokimia menunjukkan bahwa FAA adalah suatu unglycosylated, protein dasar. FAA protein telah dideteksi dihasilkan oleh kelenjar vesikula dan prostata yang homogenates, dan FAA telah diekstraksi dalam membrane sel spermatozoa dengan media hypertonic adalah cairan yang secara biokimia

mirip dengan cairan plasma yang mengandung FAA. N-Terminal Analisa Urutan dari FAA menghasilkan suatu urutan 26 amino asam (L K I X S F N V R S F G E S K K A G F N A M R V I V) dengan 73% identitas bagi manusia yang dikenal deoxyribonuclease (DNASE) I-like protein. Dua urutan asam amino internal diturunkan dari lys-C mencerna FAA adalah 85% dan 92% identik dengan DNase I-like protein (McCauly, et al., 1999). HBP dengan berat molekul 30-kDa yang selanjutnya diberi nama fertility-associated antigen (FAA) telah dikenali di dalam membran plasma spermatozoa sapi menunjukkan potensi kesuburannya lebih tinggi. Hasil survey menunjukkan bahwa angka kesuburan dari kelompok air mani pejantan yang mengandung FAA-positif rata-rata 88%, sedangkan kelompok FAA-negatif rata-rata 79%. Berarti, sapi pejantan yang air maninya FAA-positif mempunyai angka kesuburan sembilan persen lebih tinggi ($P < 0.01$) bila dibanding sapi pejantan FAA-negatif (Bellin, *et al.*, 1998).

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

TUJUAN UMUM

Meningkatkan mutu semen beku dalam hal ini fertilisasi spermatozoa sapi yang didalam media pembekuannya ditambah FAA.

TUJUAN KHUSUS

1. Untuk mengetahui karakterisasi FAA dari semen sapi berdasarkan ekspresi FAA pada semen.
2. Untuk mengetahui berat molekul FAA dengan metode SDS-PAGE baik pada membran plasma maupun plasma semen.
3. Untuk mengetahui spesifisitas FAA dengan metode Western blotting baik pada membran plasma maupun plasma semen.
4. Untuk mengetahui kadar FAA hasil isolasi dengan metode Biuret baik pada membran plasma maupun plasma semen.

MANFAAT PENELITIAN

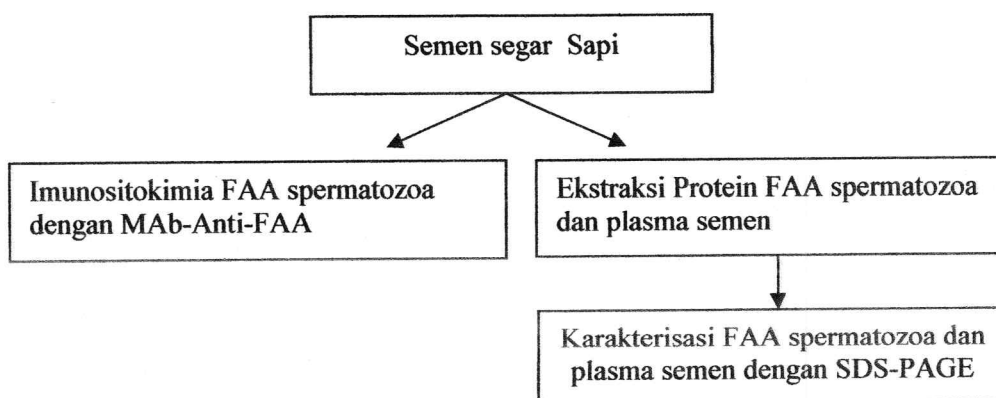
1. Memberikan informasi secara ilmiah tentang keberadaan FAA baik pada membran plasma maupun plasma semen.
2. Bila media pembekuan ini dapat meningkatkan daya fertilisasi maka dapat digunakan sebagai media pembekuan untuk proses pembuatan semen beku sapi sehingga semua pejantan yang dipelihara di Balai Inseminasi Buatan mempunyai tingkat kesuburan yang tinggi dengan demikian angka kebuntingan pada sapi betina juga meningkat.
3. Mempercepat populasi sapi di Indonesia.

BAB IV METODE PENELITIAN

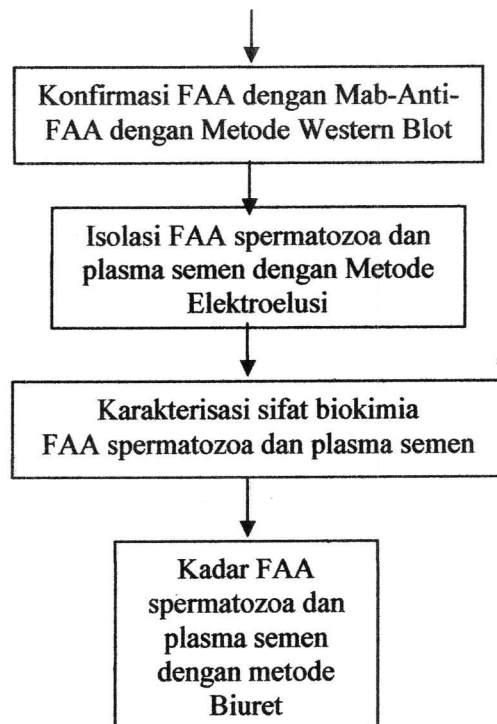
Untuk memecahkan masalah dalam penelitian ini maka dibuat kerangka umum pemecahan masalah yang nantinya akan dijabarkan ke dalam metode yang lebih khusus dan terperinci. Pada garis besarnya penelitian ini merupakan penelitian laboratoris dan lapangan. Penelitian ini dilakukan secara bertahap yang terdiri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

Tahap I (Penelitian Tahun Pertama).

Penelitian tahap pertama ini dilakukan dilaboratorium dengan tahapan-tahapan metode sebagai berikut Karakterisasi biokimiawi terhadap FAA hasil isolasi semen sapi meliputi : ekspresi FAA pada spermatozoa maupun plasma semen sapi menggunakan monoklonal antibodi FAA secara imunositokimia (ABGENT, no. Cat. AP7704b); penentuan berat molekul FAA (dengan metode SDSPAGE yang dikonfirmasi dengan metode Western blot menggunakan monoklonal antibodi FAA (ABGENT, no. Cat. AP7704b), serta pengukuran kadar FAA hasil isolasi semen sapi dengan metode biuret. Bagan alir penelitian tahap I dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Lanjutan Bagan Alir Tahap I.



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 FAA dari semen sapi dan uji spesifisitas anti-FAA.
- Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Brawijaya untuk ekstraksi, karakterisasi, isolasi protein FAA dari semen sapi dan uji spesifisitas anti-FAA.
- Peternakan Sapi potong CV Mustika, Wonosalam Jombang untuk pengambilan semen dan uji lapangan

Populasi dan Sampel Penelitian

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 potong CV Mustika Wonosalam Jombang.

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%, dan sejumlah sampel semen segar sapi tanpa kriteria yang ditetapkan oleh Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Direktorat Jenderal Peternakan dengan kata lain apa adanya.

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 FAA.

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, NaN_3 (Sodium Azide), mAb-FAA (ABGENT), FAA 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), nitroselulosa (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 etylene 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*.

Prosedur Penelitian

Penelitian Tahap Pertama (Sudah dilaksanakan)

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

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

Ad.1. Konfirmasi adanya FAA pada Spermatozoa dan Plasma Semen Sapi dengan Teknik Imunositotokimia

Pemeriksaan imunositokimia dilakukan pada spermatozoa dan plasma semen sapi bertujuan untuk mengetahui ekspresi FAA 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).

Ad. 2. 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).

Ad.3. Karakterisasi dan Identifikasi FAA dengan SDS-PAGE

Identifikasi FAA 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 tisu 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 tisu. 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 μ l dimasukkan ke dalam lubang cetakan dengan tip 200 μ l. 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).

Ad.4. Isolasi FAA dengan Teknik Elektroelusi

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selophan. 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).

Ad.5. Konfirmasi isolat FAA Spermatozoa dan Plasma semen dengan Teknik Immunoblotting

1. Western Blotting

Metoda *Western Blotting* pada penelitian ini digunakan untuk konfirmasi dalam menentukan apakah protein hasil SDS-PAGE sebelumnya adalah benar FAA 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 FAA 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 FAA (MAb-FAA, 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 tirosin kinase (Rantam, 2003).

Ad. 6. Pengukuran kadar FAA dengan metode Biuret

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

Kandungan protein FAA isolat ditentukan dengan menggunakan reagen Biuret dengan penambahan larutan standar BSA. Diambil 0,5 ml sampel FAA isolat 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 mengkonversikan data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA menurut Hamilton (1992) menggunakan rumus :

$$Y = a X, X = \frac{Y}{a} \text{ dimana } X = \text{konsentrasi total protein}$$

BAB V HASIL PENELITIAN

Penelitian Tahun 1.

Bab ini memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang sesuai dengan tujuan 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 FAA dari membran dan plasma semen spermatozoa sapi jantan.
3. Pengukuran kadar isolat protein FAA dari membrane spermatozoa sapi.

5.1. Penelitian I : Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi

5.1.1. Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar Sapi

No.	Volume (ml)	Konsistensi	Warna	Bau	pH
1.	6	kental	putih	khas	6-7
2.	6,3	kental	putih	khas	6-7
3.	6,5	sedang	putih	khas	6-7
4.	11	sedang	kuning	khas	6-7
5.	6,5	sedang	putih	khas	6-7
6.	7,5	sedang	putih	khas	6-7
7.	6,5	kental	putih	khas	6-7
8.	6	kental	putih	khas	6-7
9.	5,3	encer	putih transp	khas	6-7
10.	5	encer	putih transp	khas	6-7
11.	7	kental	putih	khas	6-7
12	3	sedang	putih	khas	6-7
13	6,8	kental	putih	khas	6-7

14.	5	encer	putih transp	khas	6-7
15.	8	kental	putih	khas	6-7
16.	4	sedang	putih	khas	6-7
17.	6,4	kental	putih	khas	6-7
18.	5	encer	putih transp	khas	6-7
19.	6	kental	putih	khas	6-7
20.	6,2	kental	putih	khas	6-7
21.	6,4	sedang	putih	khas	6-7
22.	10	sedang	kuning	khas	6-7
23.	6,5	sedang	putih	khas	6-7
24.	7	encer	putih	khas	6-7
25.	7	kental	putih	khas	6-7
26.	6	kental	putih	khas	6-7
27.	6,5	sedang	putih	khas	6-7
28.	9	sedang	kuning	khas	6-7
29.	6,2	sedang	putih	khas	6-7
30.	7	sedang	putih	khas	6-7

5.1.2. Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar Sapi

No.	Gerakan massa	Gerakan individu	Konsentrasi (juta/ml)	Persentase Hidup (%)	Persentase abnormalitas (%)
1.	++	60/2	1149	72	10
2.	+++	90/4	1179	99	5
3.	+++	85/4	731	94	7
4.	+++	80/4	868	91	7
5.	+	50/3	913	59	12
6.	+	40/1	635	50	12
7.	+++	80/3	1377	90	8
8.	+++	80/3	1311	88	7
9.	+	40/1	253	45	12

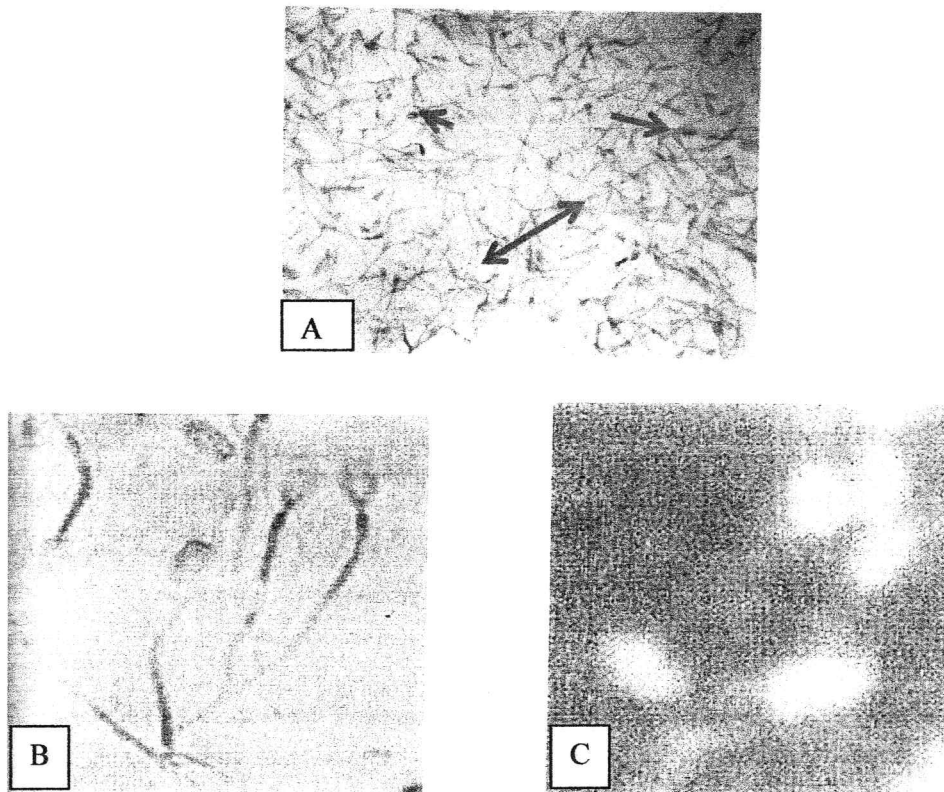
10.	+	40/1	255	47	11
11.	+++	80/3	1397	91	6
12.	++	60/2	513	69	10
13.	+++	80/3	1100	90	6
14.	+	30/1	497	38	13
15.	+++	80/3	1290	93	6
16.	++	60/2	509	70	10
17.	+++	80/3	1137	92	8
18.	+	40/1	427	48	14
19.	++	60/2	1049	71	10
20.	+++	90/4	1169	98	5
21.	+++	85/4	721	95	7
22.	+++	85/4	858	96	9
23.	+	50/2	813	55	12
24.	+	40/1	625	50	13
25.	++	60/2	1049	70	8
26.	+++	90/4	1189	99	4
27.	+++	85/4	831	95	5
28.	+++	85/4	938	97	7
29.	+	50/2	813	64	10
30.	+	40/2	535	52	15

Secara makroskopis maupun mikroskopis ternyata ada beberapa semen sapi yang dibawah standar protap, antara lain semen no. 5, 6, 9, 10, 12, 14, 18, 23, 24, 29 dan 30. Semen-semen tersebut umumnya, dibawah standar karena gerakan massa, individu dan persentase hidupnya, kecuali semen no. 12, untuk volumenya juga di bawah standar.

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

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

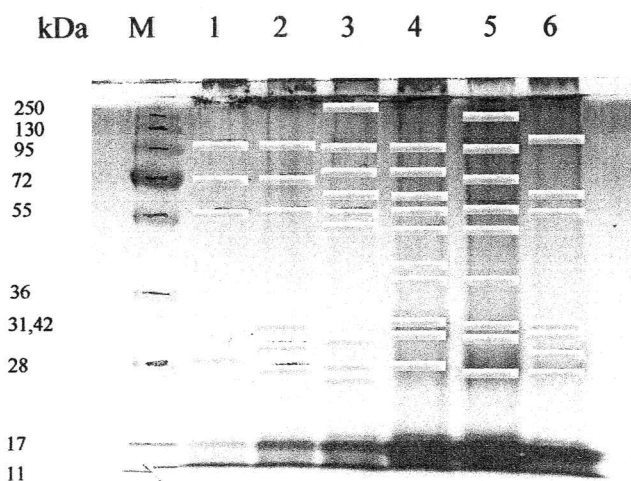
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah protein FAA diproduksi dan diekspresikan oleh membrane spermatozoa sapi melalui tahapan : *embedding*, *coating* obyek gelas, pembuatan preparat dan imunositokimia. Hasil pembuatan preparat dan imunositokimia dari membrane spermatozoa sapi dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 5.2. Preparat Imunositokimia FAA Membran Plasma Spermatozoa Sapi
 Keterangan : A. Tanda \longleftrightarrow : Reaksi positif ikatan protein FAA dengan anti-FAA berwarna kecoklatan (pembesaran 400 kali). B. Reaksi negatif (tidak ada ikatan protein FAA dengan anti-FAA (pembesaran 1000 kali). C. Reaksi positif ikatan protein FAA dengan anti-FAA berwarna kecoklatan (pembesaran 1000 kali).

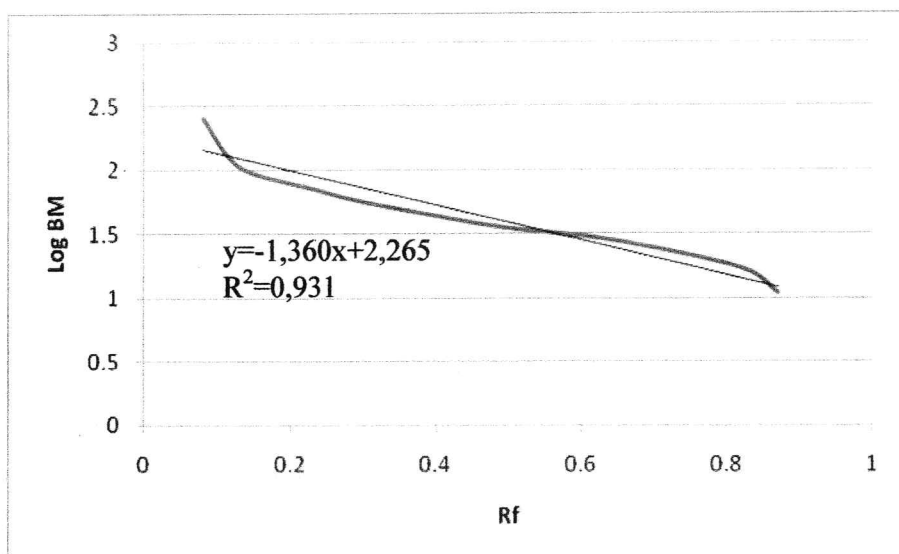
5.2.2. Identifikasi Protein FAA dari beberapa Sapi dengan SDS-PAGE

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 5.3. Elektroforegram Membran Spermatozoa Sapi

Penentuan berat molekul dilakukan dengan bantuan protein standar. Berat molekul isolat FAA ditentukan dengan mengplotkan harga *Retardation Factor* (Rf) yang diperoleh pada persamaan regresi linier $y = -1,360x + 2,265$. Kurva hubungan antara Rf (x) dengan log BM protein standar (y) dapat dilihat pada grafik di bawah ini :



Gambar 5.4. Kurva Hubungan Antara Rf dengan Log BM Protein Standar

Marker

a	b	RF	Log BM	BM (kDa)
0,5	6,2	0,080645	2,397940	250
0,7	6,2	0,112903	2,113943	130
0,9	6,2	0,145161	1,977724	95
1,4	6,2	0,225806	1,857332	72
1,9	6,2	0,306452	1,740363	55
3,0	6,2	0,483871	1,556303	36
4,0	6,2	0,645161	1,447158	28
5,1	6,2	0,822581	1,230449	17
5,4	6,2	0,870968	1,041393	11

Pita protein yang terdapat pada membrane spermatozoa sapi dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 5.1. Berat Molekul Pita-Pita Protein Membran Spermatozoa Sapi

Sampel No.1 Ada 6 pita protein yang teridentifikasi, seperti di bawah ini :

a	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,9	6,2	0,145161	2,067581	116,84
1,4	6,2	0,225806	1,957904	90,76
1,7	6,2	0,274194	1,892096	78,00
3,9	6,2	0,629032	1,409516	25,68
5,2	6,2	0,838710	1,124354	13,31
5,5	6,2	0,887097	1,058548	11,44

Sampel No.2 Ada 8 pita protein yang teridentifikasi, seperti di bawah ini :

a	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,9	6,2	0,145161	2,067581	116,84
1,3	6,2	0,209677	1,979839	95,46
1,8	6,2	0,290323	1,870161	74,16
3,5	6,2	0,564516	1,497258	31,42
3,7	6,2	0,596774	1,453387	28,40
4,0	6,2	0,645161	1,387581	24,41
5,1	6,2	0,822581	1,146290	14,00
5,4	6,2	0,870968	1,080484	12,04

Sampel No.3 Ada 11 pita protein yang teridentifikasi, seperti di bawah ini :

a	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,4	6,2	0,064516	2,177258	150,40
1,0	6,2	0,161290	2,045646	111,08
1,3	6,2	0,209677	1,979839	95,46
1,7	6,2	0,274194	1,892096	78,00
1,9	6,2	0,306452	1,848225	70,51
2,1	6,2	0,338710	1,804354	63,73
3,7	6,2	0,596774	1,453387	28,40
4,0	6,2	0,645161	1,387581	24,41
4,2	6,2	0,677419	1,343710	22,007
5,2	6,2	0,838710	1,124354	13,31
5,5	6,2	0,887097	1,058548	11,44

Sampel No.4 Ada 10 pita protein yang teridentifikasi, seperti di bawah ini :

a	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,3	6,2	0,048387	2,199194	158,20
1,0	6,2	0,161290	2,045646	111,08
1,4	6,2	0,225806	1,957904	90,76
1,7	6,2	0,274194	1,892096	78,00
2,2	6,2	0,354839	1,782419	60,59
2,7	6,2	0,435484	1,672742	47,07
2,9	6,2	0,467742	1,628871	42,54
3,5	6,2	0,564516	1,497258	31,42
3,7	6,2	0,596774	1,453387	28,40
4,1	6,2	0,661129	1,365864	23,22
4,3	6,2	0,693548	1,321774	20,98
5	6,2	0,806452	1,168225	14,73
5,5	6,2	0,887096	1,058548	11,44

Sampel No.5 Ada 12 pita protein yang teridentifikasi, seperti di bawah ini :

a	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,3	6,2	0,048387	2,199194	158,20
0,4	6,2	0,064516	2,177258	150,40
1,0	6,2	0,161290	2,045646	111,08
1,4	6,2	0,225806	1,957904	90,76
1,8	6,2	0,290323	1,870161	74,16
2,1	6,2	0,338710	1,804354	63,73
2,8	6,2	0,451613	1,650806	44,75
3,5	6,2	0,564516	1,497258	31,42
4,1	6,2	0,661129	1,365864	23,22
4,3	6,2	0,693548	1,321774	20,98
5	6,2	0,806452	1,168225	14,73
5,6	6,2	0,903226	1,036613	10,88

Sampel No. 6 Ada 10 pita protein yang teridentifikasi, seperti di bawah ini :

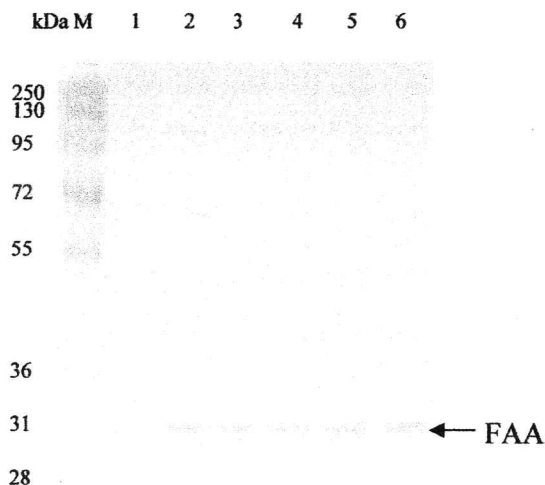
a	b	RF (x)	Log BM (y)	BM (kDa)
0,3	6,2	0,048387	2,199194	158,20
0,9	6,2	0,145161	2,067581	116,84
1,6	6,2	0,258065	1,914032	82,04
1,9	6,2	0,306452	1,848225	70,51
3,5	6,2	0,564516	1,497258	31,42
3,8	6,2	0,612903	1,431452	27,00
4,1	6,2	0,661290	1,365864	23,22
4,3	6,2	0,693548	1,321774	20,98
5,2	6,2	0,838710	1,124354	13,31
5,6	6,2	0,903226	1,036613	10,88

Berat Molekul Pita-Pita Protein dari sampel No. 7 – 18 yang terdeteksi, , seperti di bawah ini :

No7	No8	No9	No10	No11	No12	No13	No14	No15	No16	No17	No18
158,20	116,84	116,84	158,20	150,40	158,20	116,84	158,20	116,84	150,40	116,84	158,20
111,08	95,46	90,76	150,40	111,08	116,84	95,46	111,08	90,76	111,08	95,46	116,84
90,76	74,16	78,00	111,08	95,46	82,04	74,16	90,76	78,00	95,46	74,16	82,04
78,00	31,42	25,68	90,76	78,00	70,51	31,42	78,00	25,68	78,00	31,42	70,51
60,59	28,40	13,31	74,16	70,51	31,42	28,40	60,59	13,31	70,51	28,40	31,42
47,07	24,41	11,44	63,73	63,73	27,00	24,41	47,07	11,44	63,73	24,41	27,00
42,54	14,00		44,75	28,40	23,22	14,00	42,54		28,40	14,00	23,22
31,42	12,04		31,42	24,41	20,98	12,04	31,42		24,41	12,04	20,98
28,40			23,22	22,007	13,31		28,40		22,007		13,31
23,22			20,98	13,31	10,88		23,22		13,31		10,88
			14,73	11,44			20,98		11,44		
			10,88				14,73				
							11,44				

5.2.3. Identifikasi Protein FAA dengan *Western Blot*

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



Gambar 5.7. Hasil *Western Blot* Isolat FAA dengan BM 31 kDa

5.2.4. Pengukuran Kadar Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein Isolat Protein FAA

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan glikoprotein, karbohidrat dan protein dari isolat FAA. Setelah dipastikan bahwa protein yang akan dipotong (elusi) adalah FAA melalui uji *Western Blot*, maka kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein dilakukan dengan menggunakan *Glycoprotein Carbohydrat Estimation Kit 23260*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai absorbansi protein FAA pada bagian endapan(spermatozoa) sebesar 0,171 dan

bagian supernatan (plasma semen) sebesar 0,132. Nilai absorbansi protein standar dan protein FAA dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 5.2. Nilai Absorbansi Protein Standar dan Protein FAA

Protein	Absorbansi-1	Absorbansi-2	Abs rata-rata
Apotransferin	0.125	0.164	0.145
Fetuin	0.144	0.152	0.148
Albumin	0.152	0.145	0.148
Ovalbumin	0.114	0.161	0.137
Lisosim	0.157	0.179	0.168
α Acid Glikoprotein	0.192	0.178	0.185
Isolat FAA (supernatan)	0.126	0.138	0.132
Isolat FAA (endapan)	0,146	0,196	0,171

Penghitungan kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein dengan menggunakan rumus :

$$\text{Glikoprotein} = \frac{\text{Absorbansi sampel} \times \text{konsentrasi protein standar} \times \text{pengenceran}}{\text{Absorbansi standar}}$$

Sehingga kadar glikoprotein isolat FAA adalah $0,71 \times 0,25 \times 54 = 9,585$ mg/ml (supernatan) dan $0,92 \times 0,25 \times 54 = 12,42$ mg /ml (endapan).

Kadar karbohidrat : kandungan glikoprotein \times % total karbohidrat standar, sehingga kadar karbohidrat isolat FAA adalah : $9,585 \times 0,414 = 3,96$ mg/ml (supernatan) dan $12,42 \times 0,414 = 5,14$ mg/ml (endapan).

Kadar protein : kandungan glikoprotein – kandungan karbohidrat, sehingga kadar protein isolat FAA adalah $9,585 - 3,96 = 5,625$ mg/ml (supernatan) dan $12,42 - 5,14 = 7,28$ mg/ml (endapan).

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

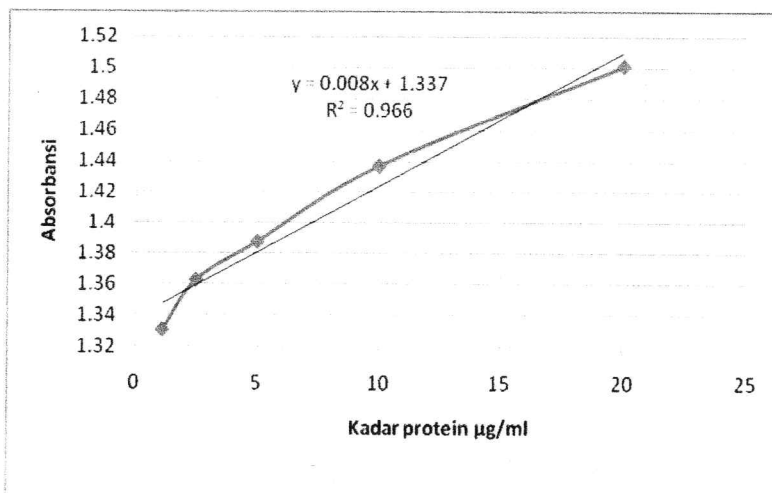
5.3.1. Pengukuran Kadar FAA dengan Metode Biuret

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

Tabel 5.3. Konsentrasi dan Nilai Absorbansi Protein FAA 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 FAA dan nilai absorbansinya dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 5.8. Grafik Kurva Baku Protein FAA

Hasil kadar protein FAA setelah mengkonversi nilai absorbansi dengan rumus $y=0,008x+1,337$. Berdasarkan persamaan garis yang terlihat pada gambar

5.8 diketahui bahwa kadar FAA hasil elektroelusi adalah antara 0,125 sampai 21,25 $\mu\text{g/ml}$. Bisa dilihat pada table 5.4. di bawah ini :

Tabel 5.4. Perhitungan kadar FAA dari beberapa sampel semen sapi

No.	Sampel semen sapi	Absorbansi 550 nm	Konsentrasi $\mu\text{g/ml}$
1.	Nomor 2	1,339	0,25
2.	Nomor 4	1,507	21,25
3.	Nomor 5	1,419	10,25
4.	Nomor 6	1,364	3,375
5.	Nomor 7	1,502	20,625
6.	Nomor 8	1,338	0,125
7.	Nomor 10	1,313	3
8.	Nomor 12	1,383	5,75
9.	Nomor 13	1,340	0,375
10.	Nomor 14	1,427	11,25
11.	Nomor 17	1,341	0,5
12.	Nomor 18	1,372	4,375

Kadar yang terendah dimiliki oleh sampel semen sapi no. 8, sedangkan kadar yang tertinggi dimiliki oleh sampel semen sapi no. 4. Dari hasil ini bisa digunakan sebagai acuan besarnya suplementasi FAA ke dalam media pembekuan (diusulkan untuk penelitian tahun kedua tahun anggaran 2010).

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 FAA dari spermatozoa sapi, kadar FAA hasil isolat protein FAA spermatozoa sapi.

6.1. Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Semen Sapi

Pada pemeriksaan semen segar terutama makroskopisnya pada sapi no. 12 tidak memenuhi standar yaitu volumenya kurang dari rata-rata, hal ini bisa disebabkan karena mungkin belum benar-benar siap untuk ditampung air maninya, sehingga baik spermatozoa maupun cairan asesorisnya belum terkumpul di ampula. Bila dilihat dari konsistensinya maka sapi no. 9, 10, 14, 18, dan 24 dalam keadaan encer. Ini menandakan bahwa semennya terlalu banyak asesoris sehingga konsentrasinya rendah.

Pada pemeriksaan mikroskopis bila dilihat dari gerakan massanya maka sapi no. 5, 6, 9, 10, 14, 18, 23, 24, 29 dan 30 ditandai dengan positif satu (+), hal ini bahwa gerakan secara bersama-sama dari spermatozoa sangat pelan dan jarang. Bila dilihat dari gerakan individu maka sapi no. 1, 5, 6, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 29 dan 30 ternyata dibawah standar (kurang dari 70%). Ini berarti spermatozoa tersebut untuk menuju ke ovum akan lambat, sehingga untuk terjadi fertilisasi akan berkurang. 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 perjalananya 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 FAA dari Spermatozoa Sapi

6.2.1. Uji Pengikatan Anti-FAA dan Protein-FAA 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. FAA sebagai antigen akan terikat oleh antibody melalui dua tahap. Antibodi primer (monoclonal antibody FAA) berikatan langsung dengan FAA, 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 FAA pada spermatozoa (Nurhidayat, 2002).

Hasil konfirmasi adanya ekspresi FAA 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 FAA-monoklonal antibody-FAA (MAb-FAA, 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 *Fertility Associated-Antigen* (FAA) 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 FAA. Lebih lanjut mengatakan bahwa membrane plasma spermatozoa mengandung protein FAA yang berperan utama dalam proses kapasitasi spermatozoa. Hal ini membuktikan bahwa pada membrane spermatozoa sapi adalah benar mengandung FAA yang selanjutnya dapat diisolasi dan dikarakterisasi.

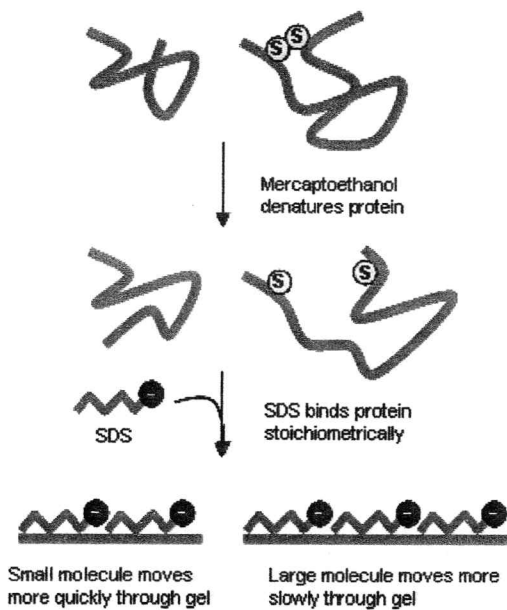
6.2.2. Identifikasi Protein FAA Spermatozoa dengan SDS-PAGE

Hasil SDS-PAGE isolat FAA membran spermatozoa dapat dilihat pada gambar 5.3. Pita-pita protein yang muncul berbeda antara sapi yang satu dengan yang lain. Paling sedikit pita yang muncul sebanyak 6 pita dengan berat molekul antara 11,44-116,84 kDa, dan yang terbanyak ada 12 pita dengan berat molekul antara 14,73-158,20 kDa. Penentuan berat molekul dilakukan dengan bantuan protein standar. Berat molekul protein FAA ditentukan dengan mengplotkan harga *Retardation Factor* (Rf) yang diperoleh pada persamaan regresi linier $Y = -1.360X + 2.265$ kurva hubungan antara Rf (X) dengan log BM protein standar (Y) (gambar 5.4).

Hasil SDS-PAGE isolat FAA plasma semen 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 FAA ditentukan dengan mengplotkan harga *Retardation Factor* (Rf) yang diperoleh pada persamaan regresi linier

$Y = -1.505X + 2.284$ kurva hubungan antara R_f (X) dengan \log BM protein standar (Y) (gambar 5.6).

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. Gambaran *mercaptoethanol* dalam memecah ikatan disulfida dapat dilihat pada gambar di bawah in :



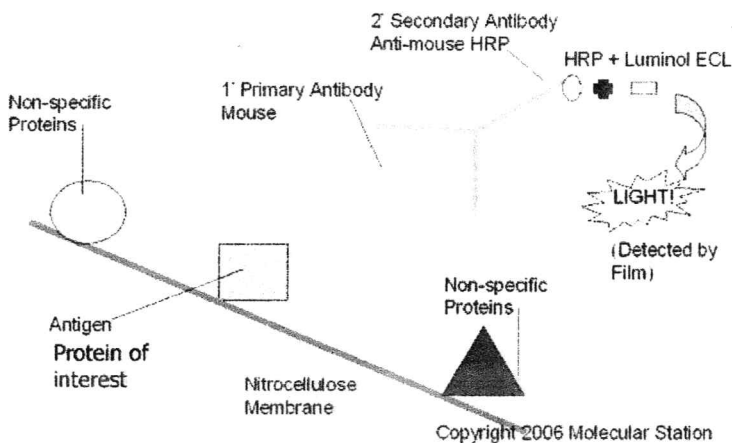
Gambar 6.1. Proses Denaturasi Protein oleh *Mercaptoethanol* (Berg *et al.*, 2006)

6.2.3. Identifikasi Protein FAA 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 5.7. Pita protein yang dikenali oleh antibodi monoklonal anti-FAA diyakini adalah protein FAA dengan berat molekul 31 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. Reaksi pada *western blot* dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 6.2. Terbentuknya Substrat Luminol (Molecular Station, 2006)

Hasil western blot ini mengindikasikan bahwa molekul FAA berikatan secara spesifik dengan anti-FAA sebagai antibodi primer dan anti rabbit IgG sebagai antibodi sekunder. Anti-FAA dan anti rabbit IgG dapat mengenali protein FAA sebagai pita dengan berat molekul 31,42 kDa. Oleh karena itu dapat diyakini bahwa pita yang muncul pada SDS-PAGE adalah pita molekul FAA dengan BM sebesar 31 kDa.

6.2.4. Pengukuran Kadar Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein Isolat Protein FAA

Metode ini bertujuan untuk mengetahui kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein dari isolat FAA spermatozoa sapi. Pengukuran kadar tersebut dilakukan dengan spektrofotometri. Data hasil pemeriksaan absorbansi protein FAA dapat dilihat pada tabel 5.2.

Hasil penghitungan ternyata protein FAA bersifat antigenik, hal ini bisa dijelaskan bahwa dari hasil perhitungan diperoleh persentase kandungan protein isolat FAA spermatozoa sapi adalah 58,68 % dan persentase kandungan karbohidrat isolat FAA adalah 41,32 % dengan perbandingan antara protein dan karbohidrat adalah 3:2. Hasil ini sesuai dengan pendapat Robert dan Peter (1993) menyatakan bahwa kandungan karbohidrat dalam molekul glikoprotein sebesar 0.02-85 %. Oleh karena hasil penelitian ini terletak pada kisaran tersebut maka FAA yang diisolasi dari spermatozoa sapi merupakan molekul glikoprotein (Woodruff dan Pangas, 2000).

6.2.5. Pengukuran kadar FAA Hasil Isolasi Protein FAA 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 FAA. Kadar protein FAA hasil isolasi dihitung dengan mengkonversi pada kurva protein FAA 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 FAA hasil elektroelusi adalah berkisar antara 0,125 sampai 21,25 $\mu\text{g/ml}$. Ini berarti didalam semen sapi tersebut mengandung protein FAA, sehingga bisa dikatakan sapi tersebut lebih subur. Data ini dipakai sebagai dasar untuk penentuan dosis suplementasi FAA 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 2010**).

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Sel-sel spermatozoa sapi terutama membrannya mengekspresikan FAA dengan berat molekul 31,42 kDa dan kadar glikoprotein, karbohidrat, protein masing-masing sebesar 9,585 mg/ml (supernatan) dan 12,42 mg/ml (endapan), 3,96 mg/ml (supernatan) dan 5,14 mg/ml (endapan), 5,625 mg/ml (supernatan) dan 7,28 mg/ml (endapan).
2. Protein FAA dari spermatozoa sapi berifat antigenik.
3. Kadar konsentrasi FAA hasil isolasi membran spermatozoa sapi berkisar antara 0,125 sampai 21,25 µg/ml.

7.2. Saran

Berdasarkan hasil dan kesimpulan dapat diambil suatu saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai hasil isolate FAA spermatozoa sapi untuk ditambahkan dalam media pembekuan, guna meningkatkan kesuburan dari spermatozoa beku.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut apakah protein FAA 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 Sci. 70:195.
- Baratawidjaja, K.G. 1998. *Imunologi Dasar*. Edisi ketiga. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 10, 15 – 16.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay, 1992. *Applied Animal Reproduction*. 3th. Edition Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Berg, J.M, J.L. Tymoczko and L. Stryer. 2006. *The purification of protein is an essential first step in understanding their function*. Biochemistry. 6th ed. Freeman and company. New York. p. 66-70
- Bellin, M. E., J. N. Oyarzo, H. E. Hawkins, H. Zhang, R. G. Smith, D. W. Forrest, L. R. Sprott, and R. L. Ax. 1998. *Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility*. J. Anim. Sci. 76:2032.
- Blakely, J. dan D.H. Bade. 1994. *Ilmu Peternakan*. Cetakan keempat. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. Hal. 156-164
- 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.
- Direktorat Jendral Peternakan, 2005. *Panduan Lomba dan Kontes Ternak Nasional dalam rangka Pekan Peternakan Unggulan Nasional 2005*. Direktorat Jendral Peternakan Departemen Pertanian. Hal. 1.
- 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.

- Goodman, J.W. 1994. *Immunogens and Antigens In Daniel P.S.: Abba, I.T. and Tristran, G.P. Ed. Basic and Clinical Immunology*. Appleton and lange. Norwalk. Connecticut. P. 123-124.
- Gordon, I.,1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. The UK. University Press. Cambridge.
- Hafez,E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th.Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Hardjopranto. 1995. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya. 63-64
- 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.
- Ismudiono. 2004. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.7-8, 12, 21.
- 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.
- Leyton L. and P.M. Saling, 1989. *Evidence that Aggregation of Mouse Sperm Receptors by ZP3 Triggers The Acrosome Reaction*. J.Cell.Biol. 108.2163 – 2168.
- Leyton,L.,P.Leguen, D.Bunch and P.M. Saling., 1992. *Regulation of Mouse Gamete Interaction by a Sperm Tyrosin Kinase*. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 89. 11692 – 11695
- Mancini, R.E. dan Andrada. 1978. *Imunological Factors. In Human Male and Female Infertility*. In max Samter. Ed. Immunological Diseases 3 rd. Ed. Vol. II. Little Brown and Company United State of America. 1308 – 1324.
- Maslich, D. 1992. *Peranan Antibodi Antispermatzoa (Antisperm antibody : ASA Terhadap Timbulnya Infertilitas Pada Pria*. Laporan Penelitian. Fakultas KedokteranUniversitas Airlangga. Surabaya. Hal. 15
- McCauley, T. C., G. R. Dawson, J. N. Oyarzo, J. McVicker, S. H. F. Marks, and R. L. Ax. 1999. *Purification and Characterization of Fertility-Associated Antigen (FAA) in Bovine Seminal Fluid*. Molecular Reproduction and Development 54 : 145-153,.
- Olson, K. C.: 2005. *Range management for efficient reproduction*. J. Anim. Sci. 83 : 107-116.

- Pablo, E.V., J.L. Bailey, G.D. Moore, Dieyun Pan, P.O. Clarke and G.S. Kopf. 1995. *Capacitation of Mouse Spermatozoa : Correlation Between The Capacitation 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.
- 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.
- Sprott, L R, Gallino, J L, Novosad, A M, Forrest, D W. 2006. *Fertility-Associated Antigen in Peripubertal Beef Bulls*. *Professional Animal Scientist*. 56 : 37.
- Steel, R.G.D and Trrie. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Penerbit P.T. Gramedia Pustaka Utama Jakarta. Hal. 168-181.
- Supriatna I. dan R.H. 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, I.K., Putu, I.G dan Chaniago, T.D. 1991. *Reproduksi, Tingkah laku, dan Produksi Ternak Indonesia*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 88.
- Voisin, G.A. 1984. *Active Immunization Against Sperm and Sperm Autoantigen*. In. D.B. Chughton and Immunological Aspect of reproduction in Mammals, Butter Woeth. London. P. 7 – 8.

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.

LAMPIRAN

A. Peralatan

No	Peralatan	Spesifikasi	Kegunaan
1	Disposable syringe 20 ml	Terumo, Terumo corporation, japan	Penyuntikan vitamin dan obat
2	Vagina buatan sapi	Minitube, Germany	Penampungan air mani sapi
3	Inner liner VB	Minitube, Germany	Penampungan air mani sapi
4	Corong VB	Minitube, Germany	Penampungan air mani sapi
5	Glove panjang	Minitube, Germany	Penampungan air mani sapi
6	Adjustable-volume pipetors	Eppendorf, Cole-Palmer Internasional, USA	Pengambilan sample pada uji ELISA
7	Tabung berskala 1 – 15 ml	Minitube, Germany	Tempat tampung air mani sapi
8	96-well microplate	Nunc TM , Denmark	Pemeriksaan antibodi
9	Tabung sentrifuge	Nunc TM , Denmark	Pemisahan air mani sapi
10	IB gun	Iffamireux, Perancis	Inseminasi buatan
11	Plastk Sheath	Iffamireux, Perancis	Inseminasi buatan
12	Cryocan	Taylor Wharton DR 3	Penyimpanan semen beku

B. Material penelitian

No	B a h a n	Kegunaan
A	Alat Tulis Kantor	
1	Kertas HVS 70 dan 80 g	Rekording, penulisan laporan
2	Tinta komputer hitam	Printing
3	Tinta komputer warna	Printing
B	Bahan Kimia	
1	Aceton pro analisa	Pemisahan protein FAA

2	Reagen untuk SDS-PAGE	Karakterisasi protein FAA
3	Reagen untuk Elusi	Isolasi FAA
4	Reagen untuk sonikasi	Ekstraksi protein FAA
5	Reagen Biuret	Pemeriksaan kadar protein FAA
6	Monoklonal anti-FAA	Uji ikatan antigen antibody FAA
7	Reagen Western Blot	Uji spesifisitas anti-FAA
8	Media pembekuan	Pembekuan air mani
9	Straw	Tempat air mani beku
10	N2 cair	Media penyimpanan semen beku
C	Hewan Coba	
1	Sewa sapi pejantan	Diambil air maninya untuk ekstraksi FAA
2	Sewa sapi betina	Untuk di IB

Biodata Peneliti

DAFTAR RIWAYAT HIDUP KETUA PENELITI

1. Nama Lengkap dan Gelar : Tempat/Tanggal Lahir :
 Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh. Gresik, 1 April 1963

2. Pendidikan (dari Sarjana Muda/yang sederajat ke atas)

UNIVERSITAS/INSTITUT DAN LOKASI	GELAR	TAHUN SELESAI	BIDANG KEAHLIHAN
Universitas Airlangga Surabaya	Sarjana Kedokteran Hewan	1988	Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga Surabaya	Dokter Hewan	1989	Kedokteran Hewan
Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya	Magister Sains	2001	Biologi Reproduksi

3. Pengalaman kerja dalam penelitian dan pengalaman professional serta kedudukan saat ini (diusulkan secara kronologis)

a. Pengalaman Kerja dalam Penelitian

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA (Tahun)
Lembaga Penelitian Unair OPF	Anggota Hubungan antara kadar fruktosa dengan kualitas air mani domba	1990
Lembaga Penelitian Unair OPF	Anggota Kualitas, kuantitas semen serta gambaran testis ayam jantan dewasa setelah penyuntikan ekstrak hipofisa ayam dengan berbagai dosis	1992
Lembaga Penelitian Unair OPF	Anggota Pengaruh waktu terhadap kualitas spermatozoa sapi PO dalam testis terpisah yang disimpan pada temperatur 4° Celsius	1992
Lembaga Penelitian Unair OPF	Ketua Peneliti Penyimpanan sel mani kambing dengan menggunakan cairan mukosa servik dari limbah alat kelamin kambing yang dipotong di rumah potong hewan pegirian Surabaya (Penelitian Pendahuluan)	1993
Lembaga Penelitian Unair OPF	Ketua Peneliti Keberhasilan inseminasi buatan pada kambing dengan menggunakan sel mani kambing yang telah ditambah bahan pengencer cairan mukosa servik uteri kambing	1994
Lembaga Penelitian Unair OPF	Anggota Daya fertilisasi spermatozoa ayam dalam pengencer sari buah pisang sitrat terhadap telur ayam buras	1994
Lembaga	Anggota	1994

Penelitian Unair OPF	Pengamatan hematologi dan berat badan setelah pemberian serbat lempuyang (<i>Zingiber aromaticum val</i>) pada ayam pedaging	
Lembaga Penelitian Unair OPF	Anggota Pengaruh pemberian hormon steroid sintetis nadrolone decanoate terhadap fertilitas <i>Mus musculus</i>	1994
Lembaga Penelitian Unair DIK Rutin	Ketua Pengaruh waktu penyimpanan bahan pengencer kuning telur sitrat terhadap daya fertilisasi sel mani sel amni domba	1997
Lembaga Penelitian Unair DIK Rutin	Anggota Induksi kelahiran kembar domba ekor gemuk dengan menggunakan hormon PMSG dosis rendah dan teknik sinkronisasi birahi serta inseminasi buatan	1997
Lembaga Penelitian Unair DIK Suplemen	Anggota Pengaruh suplementasi vitamin E dalam diet asam lemak tak jenuh ganda terhadap kualitas daging ayam broiler	1998
Pascasarjana Unair (BPPS)	Peneliti (Tesis) : Penggunaan larutan lugol intra uterin terhadap kejadian birahi dan angka konsepsi kambing lokal	2001
Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Hibah Due-Like Batc III	Anggota Pembuatan Anti-PGF ₂ α Terlabel AP : Suatu Upaya Penelusuran Jalur Luteolitik PGF ₂ α sebagai Hormon Gertak Birahi dengan Menggunakan Teknik Imunohistokimia	2003
Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Hibah Due-Like Batc III	Anggota Separasi Spermatozoa dengan Teknik Column Albumin dan Sexing berdasarkan Berat Molekul dengan Teknik SDS-PAGE	2004
Lembaga Penelitian Unair DIK Rutin	Ketua Imunisasi Spermatozoa terhadap Daya Fertilitas Mencit Jantan dan Betina	2004
DP3M	Ketua Pengaruh Imunisasi Sperma Terhadap Angka Kebuntingan, Kematian Dini dan Efek Teratogenik pada Tikus Putih	2005
Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Hibah Due-Like Batc III	Anggota Produksi Kit Diagnostik Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) microtitre Strip Untuk Tes Kebuntingan Dini Pada Kuda	2005
Lembaga Penelitian DIPA-UNAIR	Ketua Pengaruh Pencucian pada Proses Pembekuan Air Mani Kambing dengan Berbagai Konsentrasi Kuning Telur terhadap Viabilitas dan Integritas Membran Spermatozoa	2007

b. Pengalaman Profesional

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA (Tahun)
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Tenaga Pengajar	1990-sekarang
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Tenaga Pengajar pada program D3 Jurusan kesehatan Ternak Terpadu	1997-sekarang
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Peserta Kursus Singkat ELISA	2000
Unit Semen Beku Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Staf Produksi Semen Beku	2001-sekarang
Job Placement Center Unair	Staf Kemitraan dan Sumber Daya Manusia	2003-sekarang

4. Daftar publikasi yang relevan dengan proposal penelitian yang diajukan

NO	JUDUL	MEDIA
1.	Pengaruh ekstrak hipofisa ayam terhadap kualitas semen ayam jantan buras dan gambaran histologis testis	MKH Vol. 17 No.3 Desember 1993
2.	Pengaruh Hormon Steroid Sintesis Nandrolone Decanoate Terhadap Fertilitas Mencit Betina	MKH Vol. 20 No.2 Desember 1996
3.	Pengaruh waktu penyimpanan beberapa bahan pengencer (kuning telur sitrat, air susu masak dan sari buah sitrat) terhadap daya hidup sel mani domba (MKH,1997)	MKH Vol. 20 No.1. Januari 1997
4.	Penggunaan Larutan Lugol Intra Uterin terhadap Kejadian Birahi pada Kambing Lokal	MKH Vol. 20 No.1. Januari 2004.
5.	Pemberdayaan Peternak Melalui Penerapan Inseminasi Buatan Untuk Meningkatkan Produktivitas Reproduksi Sapi Betina di Kecamatan Merak Urak Kabupaten Tuban Jawa Timur	Berkala Ilmiah Kependudukan. Vol. 7 No. 2. Juli - Desember 2005.
6.	Peningkatan Pengetahuan dan ketrampilan Santri Pondok Pesantren Al Habibah Melalui Penerapan Inseminasi Buatan Kambing Peranakan Ettawa	Berkala Ilmiah Kependudukan. Vol. 8 No.1. Januari - Juni 2006.
7.	Characterization of Fertility Associated Antigen (FAA) on Bull Spermatozoa	International Seminar. November 18, 2009. Surabaya Indonesia

Surabaya, 4 Desember 2009



Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.

NIP. 131 877 885

DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI I

1. Nama Lengkap dan Gelar : Tempat/Tanggal Lahir :
 Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh. Mojokerto, 8 Mei 1964
2. Pendidikan (dari Sarjana Muda/ yang sederajat ke atas)

UNIVERSITAS/INSTITUT DAN LOKASI	GELAR	TAHUN SELESAI	BIDANG KEAHLIHAN
Universitas Airlangga Surabaya	Sarjana Kedokteran Hewan	1988	Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga Surabaya	Dokter Hewan	1989	Kedokteran Hewan
Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya	Magister Sains	2001	Biologi Reproduksi
Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya	Doktoral	2007	Ilmu Kedokteran

3. Pengalaman kerja dalam penelitian dan pengalaman professional serta kedudukan saat ini (diusulkan secara kronologis)

a. Pengalaman Kerja dalam Penelitian

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA (Tahun)
Bappeda Tk. II Surabaya	Ketua Peneliti : Pemanfaatan tepung isi rumen untuk pakan bebek, ayam dan ikan	2000
Pascasarjana Unair (BPPS)	Peneliti (Tesis) : Uji biopotensi antibodi poliklonal anti PMSG pada mencit	2001
Lembaga penelitian Unair. PHB X	Ketua Peneliti : Pembakuan epitop spesifik PMSG sebagai bahan bioaktif untuk perbaikan reproduktivitas sapi di Indonesia (Pembakuan Epitop Spesifik PMSG untuk Pembuatan Bahan Bioaktif Antibodi Monoklonal Anti-PMSG)	2002
Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Hibah Due-Like Batch III	Ketua Peneliti : Anti-androstenedione sebagai bahan bioaktif untuk perbaikan fertilitas ternak di Indonesia	2002
Lembaga penelitian Unair. PHB X	Ketua Peneliti : Pembakuan epitop spesifik PMSG sebagai bahan bioaktif untuk perbaikan reproduktivitas sapi di Indonesia (Uji	2003

	Biopotensi Antibodi Monoklonal Anti-PMSG Berdasarkan Epitop Spesifiknya Pada Mencit dan Sapi Perah)	
Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Hibah Due-Like Batc III	Peneliti : Protein Spesifik Insulin Like Growth Factor sebagai bahan bioaktif untuk perbaikan fertilitas ternak	2003
Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Hibah Due-Like Batc III	Ketua Peneliti : Separasi dan seksing spermatozoa sapi perah dengan metota columns albumin dan berat molekul dengan SDS-PAGE	2004
DIPA PNBP Unair	Ketua peneliti : Deteksi Kebuntingan Kambing dengan Melihat Protein Spesifik Kebuntingan Early Poregnancy Factor	2005

b. Pengalaman Profesional

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA (Tahun)
Koperasi Susu Dana Mulya Pacet Mojokerto	Tenaga Medis Dokter Hewan	1989-1991
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Tenaga Pengajar	1990-sekarang
Surabaya	Dokter Hewan Praktek	1991-sekarang
Taman Ternak Pendidikan, FKH Unair	Penanggungjawab Hewan Besar	1991-2000
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Tenaga Pengajar pada program D3 Jurusan kesehatan Ternak Terpadu	1997-sekarang
TDC-Unair	Peserta Kursus Polymerase Chain Reaction (PCR)	1998
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Pesrta Kursus Singkat ELISA	1999
Puslit Bioenergi, Lembaga penelitian Unair	Tenaga Peneliti	1999-2000

4. Daftar publikasi yang relevan dengan proposal penelitian yang diajukan

NO	JUDUL	MEDIA
1.	Uji Biopotensi Antibodi Poliklonal Anti-PMSG pada Mencit	MKH Vol. 17 Edisi Khusus I, Agustus 2001
2.	Pembakuan Epitope Spesifik PMSG untuk Pembuatan Antibodi Monoklonal Anti-PMSG	Seminar Nasional Biologi 3, Prodi Biologi-FMIPA ITS, Desember 2002
3.	Anti-Androstenedione sebagai Bahan Bioaktif untuk Perbaikan Fertilitas Ternak	Seminar Nasional Biologi 3, Prodi Biologi-FMIPA ITS,

4.	Produksi dan uji potensi biologis bahan bioaktif anti-androstenedione untuk peningkatan kesuburan ternak	Desember 2002 MKH Vol. 19 N0 3 Desember 2003
5.	Uji potensi biologis IGF-1 dan IGFBP thd perolehan korpus luteum kambing lokal	MKH Vol. 24 N0 2 Desember 2004

Surabaya, 4 Desember 2009



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

NIP. 131 925 904

DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI II

1. Nama Lengkap dan Gelar : Tempat/Tanggal Lahir :
Trilas Sardjito, M.Si., Drh. : Madiun, 30 Mei 1955

2. Pendidikan (dari Sarjana Muda/yang sederajat ke atas)

UNIVERSITAS/INSTITUT DAN LOKASI	GELAR	TAHUN SELESAI	BIDANG KEAHLIHAN
Universitas Airlangga Surabaya	Sarjana Kedokteran Hewan	1984	Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga Surabaya	Dokter Hewan	1985	Kedokteran Hewan
Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya	Magister Sains	2003	Biologi Reproduksi

3. Pengalaman kerja dalam penelitian dan pengalaman professional serta kedudukan saat ini (diusulkan secara kronologis)

a. Pengalaman Kerja dalam Penelitian

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA (Tahun)
Fakultas Kedokteran Unair. Hibah Due-Like Batc III	Anggota Produksi Protein Tyrosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Sapi. Alternative Meningkatkan Kualitas Produksi Semen Beku	2004
Fakultas Kedokteran Unair. Hibah Due-Like Batc III	Anggota Isolasi Dan Uji Potensi Protein Tyrosin Kinase Spermatozoa Sapi Perah Pada Proses Fertilisasi In Vitro	2005
DP3M Unair	Ketua Peneliti Penggunaan Protein Membran Plasma Spermatozoa Kambing Sebagai Bahan Imunokontrasepsi.	2005
Pemprov Jatim	Anggota Kajian Penanggulangan Penyebaran Penyakit Avian Influenza di Jawa Timur	2007
Pemprov Jatim	Anggota Pengaruh Closed House Dan Non Closed House Terhadap Kejadian Avian Influenza Pada Broiler Dan Layer.	2007
Pemprov Jatim	Anggota Kajian Budidaya Ayam Ras dengan	2007

	Sistem CLOSED HOUSE terhadap Pencegahan Penyakit Avian Influenza.	
--	-------------------------------------------------------------------	--

b. Pengalaman Profesional

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA (Tahun)
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Tenaga Pengajar	1987-sekarang
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Kepala Taman Ternak Pendidikan	2003-sekarang
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Petugas prosesing pada Laboratorium Semen Beku	2001-sekarang
Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Tenaga Pengajar pada program D3 Jurusan kesehatan Ternak Terpadu	1997-2007
Universitas Brawijaya Malang	Pelatihan Artificial Insemination Database Application (AIDA)	2001
Puspitnak Jakarta	Pelatihan Manager BIBD	2001
Puspitnak Jakarta	Pelatihan Laboran dan Bull Master	2003

4. Daftar publikasi yang relevan dengan proposal penelitian yang diajukan

NO	JUDUL	MEDIA
1.	Isolasi dan Uji Potensi Protein Tyrosin Kinase Spermatozoa Sapi Perah pada Proses Fertilisasi InVitro	Prosiding Seminar Nasional Revitalisasi Bidang Kesehatan Hewan dan Manajemen Peternakan Menuju Ekonomi Global. FKH Unair, 15 – 16 April 2005
2.	Antibodi Poliklonal Protein Tyrosin Kinase pada Serum Kelinci Lokal Jantan	Prosiding Seminar Nasional Basic Science III MIPA-Unibraw, 25 Februari 2006
3.	Surveilans dan upaya penanggulangan Mewaspadai Penyakit Avian Influenza Demam Berdarah Dengue Dan Malaria	Prosiding Seminar Mewaspadai Penyakit Avian Influenza Demam Berdarah Dengue Dan Malaria. TDC UNAIR 2007

Surabaya, 4 Desember 2009



Trilas Sardjito, M.Si., Drh.

NIP. 131 653 455

B. DAFTAR ARTIKEL ILMIAH

Telah dipublikasikan hasil penelitian ini di seminar internasional pada tanggal 18 Nopember 2009. (Naskah terlampir)

**Characterization of Fertility Associated Antigen (FAA)
on Bull Spermatozoa**

Tri Wahyu Suprayogi, MSi., Drh.



Is Submitted at International Seminar

**“From Ocean for Food Security, Energy and Sustainable Resources and
Environment”**

November 18, 2009-Surabaya, Indonesia

Characterization of Fertility Associated Antigen (FAA) on Bull Spermatozoa

Tri Wahyu Suprayogi

Departement of Veterinary Reproduction
Faculty of Veterinary Medicine
University of Airlangga-Surabaya



ABSTRACT

Bull with semen containing Fertility-Associated Antigen (FAA) is to have a fertility rate higher when compared with bull semen without FAA. This study aims to determine the expression of FAA to perform the isolation, identification and characterization of semen FAA in cows.

Macroscopic and microscopic in it there are some semen under standard, among others, semen no. 5, 6, 9, 10, 12, 14, 18, 23, 24, 29 and 30. To semen no. 12, volume and movement of individuals under the standard, but for other tests normal, while the other semen generally below the standard for mass movements, individuals and the percentage of his life. FAA protein is produced and expressed by the membrane of spermatozoa can be detected with imunositokimia, namely the brown color on the membrane. FAA protein identification of some bull with SDS-PAGE, both derived from the plasma membrane of spermatozoa and seminal produced several bands, amounting to between 6 to 12 bands. Protein identification by Western blot FAA was only on the membrane of spermatozoa express only FAA. FAA isolate the protein content is $8,235-2,63 = 5.605$ mg / ml (supernatan) and $11,205-3,86 = 7.345$ mg / ml (sediment).

Key word : Fertility Associated Antigen, membrane spermatozoa, plasma seminal, Bull.

INTRODUCTION

In general, as a male fertility test is based on genealogy (Pedigree), the selection is based on the reputation of the ancestors represented by the cow in question, but this test is less accurate, because of a Bloodline or descendants of individuals who either does not always mean that the good characteristics will pass through the selection and marriage (Blakely and Bade, 1994; Copeland, 1994). Male fertility test that is based on Progeny testing is a test to see the nature of the heritability but these tests take a long time approximately 4 - 6 years so that no efficient (Tomaszewska et al., 1991; Akiko, 1998).

Fertility Associated Antigen (FAA) is a specific protein produced by the accessory sex glands and secreted in the fluid that may bind heparin and accelerate capacitation of spermatozoa after ejaculation cells, producing improved cow fertility because it can produce proteins that can provide signals to the cell so that cell ova also gave responses that finally happened fertilization (Aaron, 1980).

This study aims to determine the characterization of semen cow FAA based on the expression of FAA in semen immunositokimia method, to determine molecular weight FAA with SDS-PAGE method in both plasma and the plasma membrane of semen, to know the specificity of FAA Western blotting with both methods on the plasma membrane and plasma semen, to prove the FAA in antigenitas proteins stimulate humoral immune responses to form antibodies to the FAA.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted with at laboratory stages following methods of biochemical characterization of insulating semen FAA cows results include: the expression of FAA in the spermatozoa using monoclonal antibodies cows are immunositokimia FAA (ABGENT, no. Cat. AP7704b); determination of molecular weight FAA (SDSPAGE method which was confirmed by dot blot method and followed by Western blot using monoclonal antibodies FAA (ABGENT, no. Cat. AP7704b), and characterization of the anti-FAA from FAA induction of protein isolates from plasma and the plasma membrane of bull semen..

Confirmation of the FAA in spermatozoa and plasma Cattle Semen with Immunocytochemia Technique

Imunocytochemia examination performed on spermatozoa and semen plasma cow aims to determine the expression of FAA in the plasma membrane of spermatozoa and semen plasma. Stages of the examination include:

1. Making preparations spermatozoa review semen dripped in the middle of the glass objects, flattened on the surface of glass objects. Aged over 30 - 45 minutes, then drops with 95% methanol, dried for 15 minutes. Discard the remaining methanol and preparations are stored in the box where the histological preparations. Further preparations box kept in the refrigerator at a temperature of 4°C until done coloring immunositokimia (Partodihardjo, 1992)
2. Imunocytochemia preparations washed in PBS pH 7.4 for 3 x 5 minutes. Furthermore soaked in 3% hydrogen peroxide (in DI water) for 5 - 10 minutes.

Washed in PBS pH 7.4 for 3 x 5 minutes. Added primary antibody MAB-FAA (ABGENT) for 1 hour at room temperature. Washed with PBS pH 7.4 for 3 x 5 minutes. Added anti-rabbit secondary antibody IgG biotin-labeled for 1 hour at room temperature. Washed in PBS pH 7.4 for 3 x 5 minutes. Added SA-HRP (Horseradish Peroxidase-Streptavidin) for 30 - 60 minutes at room temperature. Washed in PBS pH 7.4 for 3 x 5 minutes. Added kromogen 3.3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) for 10 - 20 minutes at room temperature. Washed in 3 x aquades for 5 minutes. Performed with haematoxylin counterstain for 5 minutes at room temperature. Washed with 3 x aquades for 5 minutes. Next mounting with entellan. Observations using optical microscope with 400x magnification (Nurhidayat, 2002).

Separation of spermatozoa and Plasma Protein Cattle Semen

Semen samples collected in a test tube after macroscopic examination (volume, color, consistency and pH) and microscopic (motility, and percentage of the mass movement of spermatozoa of life) then the centrifugation at 1000 rpm for 10 minutes to separate the pellet (spermatozoa) with plasma Seminal. Then both pellets and semen plasma BO medium supplemented with 1 ml-cafein, disentrifugasi at 3000 rpm for 10 minutes. Supernatan discarded, the sediment plus PBS-tween with 5 times the volume, plus Phenylmethenesulfonyl fluoride (PMSF) as protease inhibitor of the enzyme 5 times the volume, the next in-vortex for 10 minutes, followed by sonikasi for 20 minutes. Centrifugation at 6000 rpm for 10 minutes. Sediment removed, supernatan cold ethanol supplemented with 1: 1, stored in the refrigerator for 1 hour until it forms white spots, centrifugation at 6000 rpm for 10 minutes, put into the refrigerator for another 5 minutes, then ethanol was removed and dried using paper tissue and left until the smell of ethanol lost. Further supplemented with Tris-HCl. The end result is a crude isolate proteins from the plasma membrane of spermatozoa and semen plasma (Aulanni'am, 2004).

Characterization and identification of FAA by SDS-PAGE

FAA identification with SDS-PAGE aims to find the picture a few bands of protein. Stages of work are as follows: insert (separating gel) into the electrophoresis

instrument through the wall below the upper limit. Next add up to the upper limit aquades separating gel so well. Furthermore paper tissue aquades absorbed and add the stacking gel over the wall to the full, enter the comb (the printer sinks from the gel) and the expected form a gel. Next comb taken and cleaned from the remaining gel with paper tissue. Gel mold that had already been removed and inserted into the chamber, and then soaked in running buffer. The next set of samples printed guide will be running. Sample of protein isolate plasma membrane of spermatozoa and cattle semen for 35 μ l inserted into the hole with the tip mold 200 μ l. The next step chamber connected to a Biorad, power supply with the power turned on 130 V, 30 mA for 1.5 hours. If the reaction has reached the gel bottom and then turned off and the plate is opened and separated. The next result is a sheet-shaped gel was colored with blue and coomasie in sacker (shaken) for 30 minutes. Then removed and added to the liquid in destaining and sacker again for 30 minutes. If fluid is visible blue destaining replaced with new fluid so on until the liquid is white and the results of several bands of protein. Molecular weight will be visible on the print SDS-PAGE gel (Rantam, 2003).

Isolation Technique Elektroelusi

FAA with SDS-PAGE gel that is not colored ribbon was cut along the desired. Each piece of gel inserted into the bag selophan. Further included in the glass block containing PBS, after which the stirrer for 24 hours. Every 6 hours is the replacement of the PBS. To know that the protein was experience elusi the gel pieces were colored with silver coloring, if there is no means of protein bands was too elusi (Aulanni'am. 2004).

Confirmation of isolates FAA spermatozoa and semen plasma with Immunoblotting Technique (Western blotting)

Western blotting method in this research are used to confirm the results determine whether the protein before SDS-PAGE is true FAA intended. Western blotting techniques can be used to confirm Molecular Weight (MW) of the protein in question. The next step is to confirm the results of Western blotting, SDS-PAGE, if the molecular weight arising from the two methods were similar, it is said that these proteins are referred to correct FAA.

Protein bands that emerged from the results of running the SDS-PAGE 12% in the reduced state and one marker and sinks are transferred to the membrane nitrocellulosa. Membranes were blocked with 3% BSA in 20 mM Tris-Cl pH 7.5 and 150 mM NaCl for 1 hour, then incubated in Tris / NaCl containing 1% BSA with FAA Monoclonal antibodies (MAB-FAA, ABGENT) as primary antibody. Then washed in Tris-Cl containing 0.05% Tween 20. Next membrane incubated with secondary antibody (anti-IgG Anti-Rabbit Alkaline Phosphatase conjugated, dilution 1:2500) and added western blue substrate. Bands that emerged was the ribbon FAA (Rantam, 2003).

FAA Determination levels with ELISA method

Performed coating antigen (FAA standards, SIGNAL CHEM) in mikroplate of 50 μ l per well then incubated at a temperature of 4°C for 24 hours. Then performed washing with PBS-0.05% Tween 20 as much as 4 times, after it carried out the blocking buffer included in the mikroplate of 50 μ l per well, incubated for 2 hours at room temperature. Then washed again with PBS-0.05% Tween 20 as much as 4 times, reacted with MAB-FAA (ABGENT) dissolved in blocking buffer 1% BSA with serial dilutions of 1 / 250, 1 / 500, 1 / 1000, 1 / 2000 , 1 / 4000, and 1 / 8000, and then inserted into the mikroplate each 50 μ l per well and incubated at a temperature of 4°C for 24 hours. Mikroplate washed again with PBS-0.05% Tween 20 4 times, then reacted with secondary antibodies (anti-Rabbit IgG Biotin labeled), dissolved in TBS with Tween -20 dilution 1 / 2500, incubated at room temperature for 1 hour, washed again with PBS-0.05% Tween 20 4 times. Last added SA-HRP substrate included each mikroplate as many as 50 μ l per well. incubated at room temperature for 30 minutes in a dark room, added HCl (as the stop reaction). The reading is done by seeing the results of Elisa titer reader with a wavelength of 450 nm (Aulanni'am, 2005).

RESULTS

This chapter includes data research and analysis of research results in accordance with the purpose of research. Research data presented in the form of tables, graphs, photos or drawings prepared in accordance with the stages of research:

1. Macroscopic and microscopic examination of fresh semen cow

2. Isolation and biochemical characterization of proteins from the FAA on the plasma membrane of spermatozoa and semen plasma bull semen.
3. Characterization of anti-FAA FAA induction of protein isolates on the plasma membrane of spermatozoa and semen plasma bull semen.

1. Macroscopic and microscopic examination of fresh semen cow

Table 1. Macroscopic examination of fresh semen

No.	Volume (ml)	Consistency	Color	Odor	pH
1.	6	viscous	white	typical	6-7
2.	6,3	viscous	white	typical	6-7
3.	6,5	semiviscous	white	typical	6-7
4.	11	semiviscous	yellow	typical	6-7
5.	6,5	semiviscous	white	typical	6-7
6.	7,5	semiviscous	white	typical	6-7
7.	6,5	viscous	white	typical	6-7
8.	6	viscous	white	typical	6-7
9.	5,3	watery	white transp	typical	6-7
10.	5	watery	white transp	typical	6-7
11.	7	viscous	white	typical	6-7
12.	3	semiviscous	white	typical	6-7
13.	6,8	viscous	white	typical	6-7
14.	5	watery	white transp	typical	6-7
15.	8	viscous	white	typical	6-7
16.	4	semiviscous	white	typical	6-7
17.	6,4	viscous	white	typical	6-7
18.	5	watery	white transp	typical	6-7
19.	6	viscous	white	typical	6-7
20.	6,2	viscous	white	typical	6-7
21.	6,4	semiviscous	white	typical	6-7
22.	10	semiviscous	yellow	typical	6-7
23.	6,5	semiviscous	white	typical	6-7
24.	7	watery	white	typical	6-7
25.	7	viscous	white	typical	6-7
26.	6	viscous	white	typical	6-7
27.	6,5	semiviscous	white	typical	6-7
28.	9	semiviscous	yellow	typical	6-7
29.	6,2	semiviscous	white	typical	6-7
30.	7	semiviscous	white	typical	6-7

Table 2. Microscopic examination of fresh semen

No.	Movement of the mass	Movement of individuals	Concentration (million/ml)	Percentage of Life (%)	Percentage of abnormalities (%)
1.	++	60/2	1149	72	10
2.	+++	90/4	1179	99	5
3.	+++	85/4	731	94	7
4.	+++	80/4	868	91	7
5.	+	50/3	913	59	12
6.	+	40/1	635	50	12
7.	+++	80/3	1377	90	8
8.	+++	80/3	1311	88	7
9.	+	40/1	253	45	12
10.	+	40/1	255	47	11
11.	+++	80/3	1397	91	6
12.	++	60/2	513	69	10
13.	+++	80/3	1100	90	6
14.	+	30/1	497	38	13
15.	+++	80/3	1290	93	6
16.	++	60/2	509	70	10
17.	+++	80/3	1137	92	8
18.	+	40/1	427	48	14
19.	++	60/2	1049	71	10
20.	+++	90/4	1169	98	5
21.	+++	85/4	721	95	7
22.	+++	85/4	858	96	9
23.	+	50/2	813	55	12
24.	+	40/1	625	50	13
25.	++	60/2	1049	70	8
26.	+++	90/4	1189	99	4
27.	+++	85/4	831	95	5
28.	+++	85/4	938	97	7
29.	+	50/2	813	64	10
30.	+	40/2	535	52	15

Macroscopic or microscopic evaluation in it there are some semen cow under standard, among others, semen no. 5, 6, 9, 10, 12, 14, 18, 23, 24, 29 and 30. To semen no. 12, volume and movement of individuals under the standard, but for other tests normal, while the other semen generally below the standard for mass movements, individuals and the percentage of his life.

2. Isolation and Characterization of the FAA Protein Biochemistry from the plasma membrane of bull spermatozoa

2.1. Test Binding of Anti-FAA and FAA protein from bull sperm membrane.

This study aims to determine whether the FAA protein is produced and expressed by the cow through the membrane of spermatozoa, stages: embedding, coating the glass objects, making preparations and immunocytochemistry. Making preparations and the results of the membrane of spermatozoa immunocytochemistry cows can be seen in the image below:

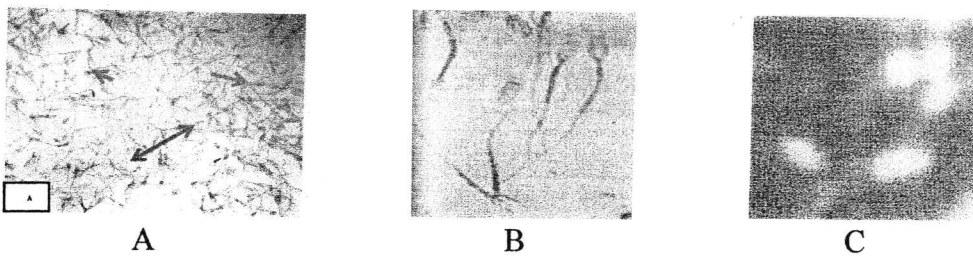


Figure 1. Preparations Immunocytochemistry spermatozoa plasma membrane FAA Cow
Description: A. Signs: \leftrightarrow positive reaction with the protein binding of anti-FAA FAA brown (magnification 400 times). B. Negative reaction (no FAA protein binding with the anti-FAA (1000 times magnification). C. The positive reaction with the protein binding of anti-FAA FAA brown (1000 times magnification).

2.2. FAA protein identification of some cattle with SDS-PAGE

This study aims to determine the profile of proteins on the plasma membrane of spermatozoa and semen plasma. Identification of proteins based on protein ribbons that appear on elektroforegram plasma membrane of spermatozoa and plasma semen. The results of SDS-PAGE of the membrane of spermatozoa cows can be seen in the image below:

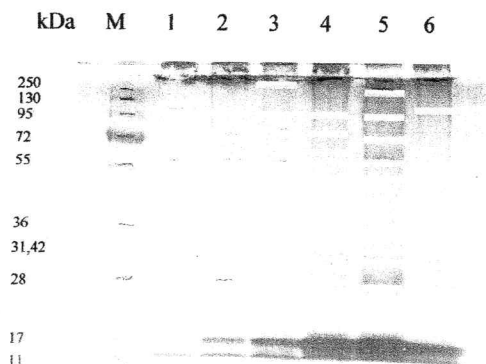


Figure 2. Cattle Spermatozoa Membrane Elektroforegram

Determination of molecular weight protein made with the help of the standard. FAA isolate molecular weight determined by the price retardation factor (Rf) obtained in the linear regression equation $y = -1.360x + 2.265$. Protein bands present in sperm membrane cows can be seen in below:

Sample No.1 There are 6 bands identified proteins with molecular weight 116,84, 90,76, 78,00, 25,68, 13,31, and 11,44 kDa. Sample No.2 There are 8 bands identified proteins with molecular weight 116,84; 95,46; 74,16; 31,42; 28,40; 24,41; 14,00 and 12,04 kDa. Sample No.3 There are 11 bands identified proteins with molecular weight 150,40; 111,08; 95,46; 78,00; 70,51; 63,73; 28,40; 24,41; 22,007; 13,31 and 11,44 kDa. Sample No.4 There are 10 bands identified proteins with molecular weight 158,20; 111,08; 90,76; 78,00; 60,59; 47,07; 42,54; 31,42; 28,40; 23,22; 20,98; 14,73 and 11,44 kDa. Sample No.5 There are 12 bands identified proteins with molecular weight 158,20; 150,40; 111,08; 90,76; 74,16; 63,73; 44,75; 31,42; 23,22; 20,98; 14,73 and 10,88 kDa. Sample No.6 There are 10 bands identified proteins with molecular weight 158,20; 116,84; 82,04; 70,51; 31,42; 27,00; 23,22; 20,98; 13,31 and 10,88 kDa.

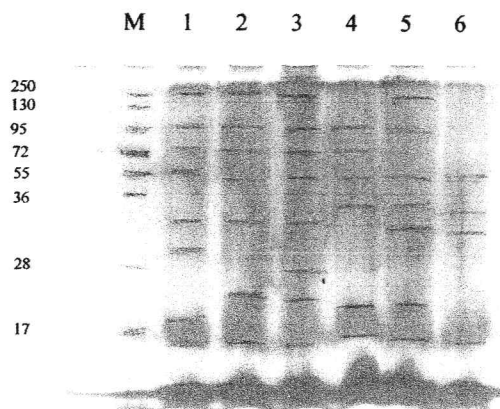


Figure 3. Cattle Semen Plasma Elektroforegram

Determination of molecular weight protein made with the help of the standard. FAA isolate molecular weight determined by the price retardation factor (Rf) obtained in the linear regression equation $y = -1.505x + 2.284$. Protein bands present in cow's plasma semen can be seen in the table below:

Sample No.1 There are 6 bands identified proteins with molecular weight 150,14; 103,57; 86,03; 67,16; 40,93; and 13,44 kDa. Sample No.2 There are 6 bands identified

proteins with molecular weight 150,14; 103,57; 80,86; 63,13; 40,93 and 18,31 kDa. Sample No.3 There are 8 bands identified proteins with molecular weight 141,13; 103,57; 80,86; 63,13; 38,48; 23,46; 18,31 and 15,21 kDa. Sample No.4 There are 6 bands identified proteins with molecular weight 103,57; 80,86; 63,13; 46,33; 16,18 and 12,63 kDa. Sample No.5 There are 7 bands identified proteins with molecular weight 141,13;103,57; 63,13; 46,33; 36,17; 17,21 and 11,87 kDa. Sample No.6 There are 4 bands identified proteins with molecular weight 63,13; 43,55; 36,17 and 11,16 kDa.

2.3. FAA protein identification by Western blot

This study aims to determine the protein molecule FAA specifically reacted spermatozoa cow with anti-FAA. Western blot results can be seen in the picture below:

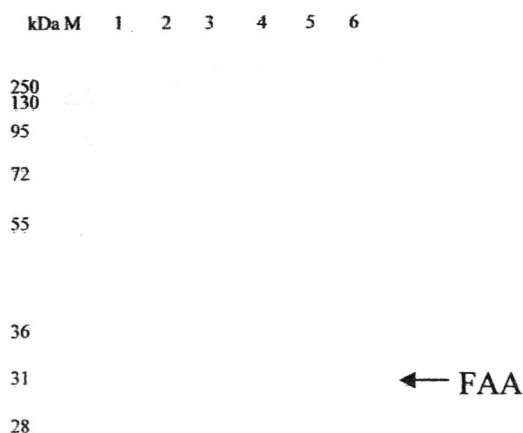


Figure 4. The results of Western blot FAA isolates with 31 kDa molecular weight

2.4. Glycoprotein content measurements, carbs and protein isolates FAA Protein

This study aims to determine the content of glycoproteins, carbohydrates and proteins from isolates FAA. Having confirmed that the protein would be cut (eluti) is the FAA through Western blot test, the levels of glycoproteins, carbohydrates and proteins is done using Glycoprotein Carbohydrat Estimation Kit 23,260. The results showed that the absorbance values of the FAA protein deposits of 0.171 for sediment and 0.132 for supernatan part. Absorbance value of protein standards and protein FAA can be seen in the table below:

Table 3. Absorbance values Standards Protein and Protein FAA

Protein	Absorbance-1	Absorbance-2	Abs average
Apotransferin	0.125	0.164	0.145
Fetuin	0.144	0.152	0.148
Albumin	0.152	0.145	0.148
Ovalbumin	0.114	0.161	0.137
Lisosim	0.157	0.179	0.168
α Acid Glikoprotein	0.192	0.178	0.185
Isolat FAA (supernatan)	0.126	0.138	0.132
Isolat FAA (endapan)	0,146	0,196	0,171

Calculation of levels of glycoproteins, carbohydrates and proteins by using the formula:

$$\text{Glycoprotein} = \frac{\text{Absorbance of sample} \times \text{standard proteins concentration} \times \text{dilution}}{\text{Standard absorbance}}$$

So the FAA isolate glycoprotein levels are $0.61 \times 0.25 \times 54 = 8.235 \text{ mg / ml}$ (supernatan) and $0.83 \times 0.25 \times 54 = 11.205 \text{ mg / ml}$ (sediment).

Carbohydrates: glycoproteins contain X % of total carbohydrate standard, so the FAA isolates carbohydrates are: $6.360 \times 0.414 = 2.63 \text{ mg / ml}$ (supernatan) and $9.324 \times 0.414 = 3.86 \text{ mg / ml}$ (sediment).

Levels of proteins: glycoprotein content - the content of carbohydrates, so the levels of protein isolates FAA is $8,235 - 2,63 = 5.605 \text{ mg / ml}$ (supernatan) and $11,205 - 3,86 = 7.345 \text{ mg / ml}$ (sediment).

3. Anti-FAA characterization Induction Results FAA protein isolate spermatozoa Cow.

3.1. Measurement of Optical Density (OD) Anti-FAA

This study aims to determine whether the FAA is able to induce imunogen that humoral immune system and anti-FAA formed. Value of Optical Density (OD) of the measurements of all samples can be seen in the table below:

Table 4. Optical Density averaging Mab-FAA (diluted 10 x)

Sampling	Absorbance average	Sampling	Absorbance average
B1	0,195	B6	0,250
B2	0,321	B7	0,333
B3	0,547	B8	0,583
B4	0,316	B9	0,349
B5	0,189	B10	0,207

3.2. Measurement of Anti-FAA titer with Standard Curve

Titer of anti-FAA obtained by converting the value of Optical Density (OD) with a standard curve of anti-FAA as shown in the table below:

Table 5. Concentration and absorbance values of anti-FAA Standards

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance
20	1,731
10	1,680
5	1,635
2,5	1,605
1,25	1,581

Based on the titer of anti-FAA standards and absorbance values, then the obtained picture of the standard curve of anti-FAA and the linear regression equation. Results titer of anti-FAA after converting the optical density values with the formula $y = 0.007x + 0.586$ can be seen in the table below:

Table 6. Average titer anti-FAA (mcg / ml) in all samples

Sampling	Anti-FAA average ($\mu\text{g/ml}$)	Sampling	Anti-FAA average ($\mu\text{g/ml}$)
B1	55,60	B6	130,17
B2	231,12	B7	248,03
B3	553,08	B8	605,89
B4	224,22	B9	271,36
B5	43,74	B10	68,74

Protein standard curve, and FAA absorbansinya value can be seen in the picture below:

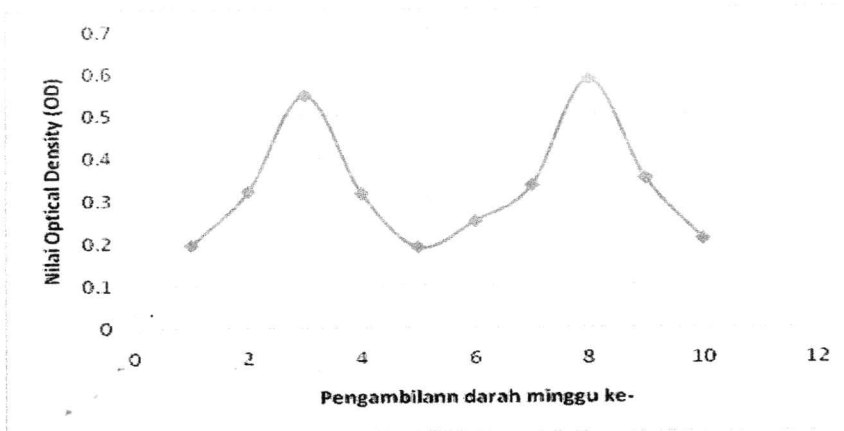


Figure 5. Protein Standard Curve Graph FAA

DISCUSSION

In this section are discussed in sequence based on the stage of the research results from macroscopic and microscopic examination of semen, Isolation and biochemical characterization of proteins from spermatozoa cow FAA, the characterization of anti-FAA FAA induced protein isolate spermatozoa cows.

1. Macroscopic and microscopic examination Cattle Semen

In the examination macroscopic of fresh semen in cattle primarily no. 12 did not meet that standard is less than the volume average, this can be caused by not really ready for semen collected, so both the spermatozoa and the fluid had accumulated in accessories ampulla. When viewed from the cow is no consistency. 9, 10, 14, 18, and 24 in a state diluted. This indicates that the semen was too much accessories so that low concentration.

On microscopic examination when viewed from the mass movement of the cow no. 5, 6, 9, 10, 14, 18, 23, 24, 29 and 30 marked by a positive one (+), it is that the movement together of the spermatozoa is very low and rare. When viewed from the cow's individual movement no. 1, 5, 6, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 29 and 30 were below the standard (less than 70%). This means that the spermatozoon into an ovum to be slow, so that to happen would be reduced fertilization. This is because that to fertilize an ovum cell movement of individuals who need a lot of that on his way there can be up to fertilize. Movement of individuals who may be bad due to the level of fructose in semen is low, so the energy required for movement of spermatozoa is less lot of dead spermatozoa. Also might also spermatozoa from cows that are genetically low in quality.

2. Isolation and Characterization of Biochemistry of Protein FAA spermatozoa Cow

2.1. Test Binding of Anti-Protein-FAA and FAA spermatozoa with Immunocytochemistry

Immunocytochemistry is a method of coloring an antigen (protein) in the tissues or cells by using the basic principles of immunology-specific antigen binding by an antibody. The results of antigen and antibody reactions can be identified because the antigen antibody bound by a marker that can be visualized.

Imunocytochemistry can be used to detect the presence of an antigen in the tissues or cells and can detect the location of antigen accumulated. Techniques used in this research is a method of Avidin-Biotin complex. FAA as the antigen will be bound by the antibody through two stages. Primary antibody (monoclonal antibody FAA) binds directly to the FAA, then the primary antibody binds to the secondary antibody (Rabbit anti-IgG biotin labeled). In each hand has conjugated secondary antibody with biotin which can bind to the avidin molecule. The primary antibody binds to the hands of secondary antibody bound biotin. Avidin-complex bond-biiotin These antibodies can identify the location of the spermatozoa FAA (Nurhidayat, 2002).

The results confirm the expression of FAA in cows spermatozoa can be identified with immunocytochemistry techniques that can be seen in the picture. 1. visualization of brown on the head of spermatozoa showed that the complex bonding occurs between the FAA-FAA-monoclonal antibody (MAB-FAA, ABGENT) - Rabbit anti-IgG labeled with biotin-SA-HRP with kromogen 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). According to research Sprott et al. (2000), that males with semen containing Fertility-Associated Antigen (FAA), namely that the semen plasma membrane protein with a molecular weight of 31 kDa is a level higher fertility between 9 - 40% when compared with male semen without the FAA. Further said that the sperm plasma membrane protein that plays a key role FAA in the process of capacitation of spermatozoa. This proves that the membrane of spermatozoa is a true cattle contains further FAA can be isolated and characterized.

2.2. Identification of spermatozoa FAA protein with SDS-PAGE

The results of SDS-PAGE FAA isolate spermatozoa membrane can be seen in the figure 2. Bands of different proteins that arise between the cows with one another. At least as much as the ribbon that came with 6 molecular weight bands between 11,44-116,84

kDa, and most have 12 bands with molecular weights between 14,73-158,20 kDa. Determination of molecular weight protein made with the help of the standard. FAA protein molecular weight determined by the price of retardation factor (Rf) obtained in the linear regression equation $Y = 1.360X + 2265$ -curve relationship between R (X) with the log of protein molecular weight standards (Y). The results of SDS-PAGE of plasma FAA isolates semen can be seen in the figure 4. Bands of different proteins that arise between the cows with one another. At least as much as the ribbon that comes with 4 molecular weight bands between 11,16-63,13 kDa, and most have 8 bands with molecular weights between 15,21-141,13 kDa. Determination of molecular weight protein made with the help of the standard. FAA protein molecular weight determined by the price of retardation factor (Rf) obtained in the linear regression equation $Y = 1.505X + 2284$ -curve relationship between R (X) with the log of protein molecular weight standards (Y).

Mercaptoethanol is used to destroy and break the disulfide bonds of proteins. SDS is used to fill natural proteins, so that all the protein content mempunyai with mass ratio (1.4 SDS per amino acid). If the protein is populated into the gel and by using electricity, proteins migrate through the hole Polyacrylamide gel, the gel separates proteins based on molecular size. Dengan small protein molecules will move more quickly to the bottom, while large molecules move more slowly. Elektroforegram results on SDS-PAGE protein bands appeared with the smallest molecular weight in the bottom while the proteins with molecular weights were greatest at the top. Preview mercaptoethanol in breaking disulfide bonds can be seen in the picture below

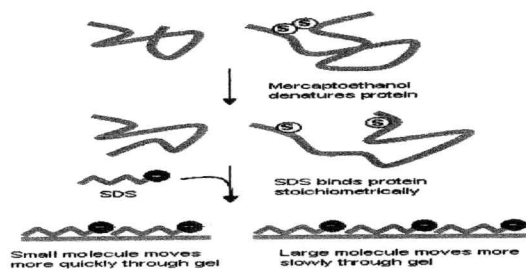


Figure 6. Protein Denaturation process by Mercaptoethanol (Berg et al., 2006)

2.3. FAA protein identification by Western blot

Protein molecule in the membrane nitroselulose visible through SDS-PAGE method was not specific. Therefore specificity required chemical tests that found a specific

protein molecule in accordance with the wishes. One of the specificity test is commonly used western blotting (Murray et al., 2003). Western blot results can be seen in the figure 4. Protein bands recognized by monoclonal antibody anti-FAA is a protein believed to FAA with 31 kDa molecular weight. Protein bands of molecular weight are separated by dielektroelusi to other proteins and further examination glycoprotein levels, carbohydrates and protein.

Western blot depends on the primary antibody to detect proteins on the membrane or gel. The addition of secondary antibody complex will form an antibody-protein-antibody sandwich. Secondary antibodies bind denagn horse radish peroxydase enzyme that can transform into subtrat luminal light-colored substance. This substance can be measured levels of proteins and molecular size relative to the comparison of protein markers. Reaction to the western blot can be seen in the picture below:

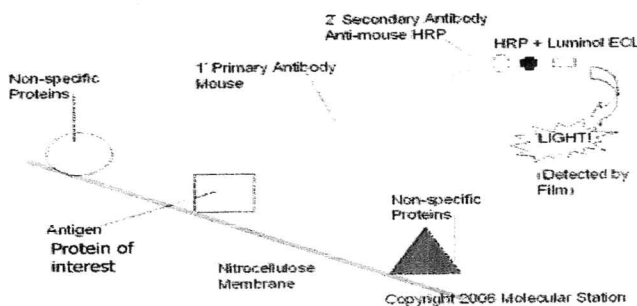


Figure 7. Substrate formation of luminol
(Molecular Station, 2006)

The results of this western blot mengeindikasikan that FAA molecules bind specifically with the anti-FAA as the primary antibody and anti-rabbit IgG as secondary antibody. FAA and the anti-anti-rabbit IgG can recognize a protein band with the FAA as a 31 kDa molecular weight. Can therefore believed that the bands that appeared in SDS-PAGE is a band with a molecular weight molecules FAA of 31 kDa.

2.4. Glycoprotein content measurements, carbs and protein isolates FAA Protein

This method aims to determine the level of glycoproteins, carbohydrates and proteins from cow isolate spermatozoa FAA. Level measurement is performed by spectrophotometry. Data results FAA protein absorbance can be seen in table 5.2.

FAA protein calculation results can be used as an antigen. Calculation results obtained from the protein content percentage of spermatozoa FAA cow isolates were

56.40% and the percentage of isolates FAA carbohydrate content was 39.30% with a ratio between proteins and carbohydrates is 3:2. These results are in accordance with the opinion of Robert and Peter (1993) states that the content of carbohydrates in glycoprotein molecules of 0.02-85%. Because the results of this research lies in the range of the FAA spermatozoa isolated from a cow molecule glycoprotein (Pangas and Woodruff, 2000).

3. *Anti-FAA characterization Induction Results FAA protein isolate spermatozoa Cow.*

3.1. *Optical Density Measurements Anti-FAA*

Absorbance measurements with ELISA at 1:10 dilution obtained optical density values (OD) of anti-FAA and rataannya as listed in Table 5.3. From the table it shows that the OD of anti-FAA is not listed there (absorbance = 0) in the sample no.1, 3, 9, 11 and 16. This means in concrete cows FAA does not contain protein, so that it can be said is less fertile cows. Reaction that produces color changes in the indirect ELISA can be seen in the picture below:

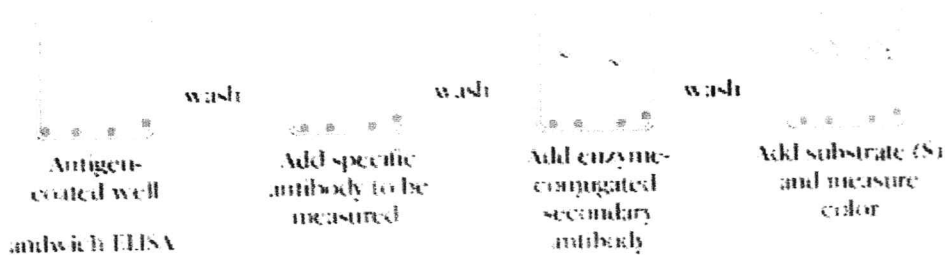


Figure 8. Antibody and antigen reaction in Indirect ELISA with russet Results ([home.inje.ac.kr / ~ lecture/immunollab/lab03.htm](http://home.inje.ac.kr/~lecture/immunollab/lab03.htm))

3.2. *Measurement of Anti-FAA titer with Standard Curve Anti-FAA*

Titer of anti-FAA mengeplotkan obtained with absorbance values on the standard curve equation of anti-FAA with the equation $Y = 0.007 X + 0.586$. Levels of anti-FAA absorbansinya standards and values can be seen in Table 5. While the standard curve graph of anti-FAA standards can be seen in the figure 6.

Average titer of anti-FAA obtained can be seen in Table 6. In the table the lowest titer was obtained at 0.586 mcg / ml. Whereas the highest titer obtained at 0.5881 mcg / ml. Titer of anti-FAA showed measurable immune response due to exposure to the FAA protein. This shows that the FAA is immunogenic.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

1. Conclusion

Based on the research results can be drawn the following conclusions:

1. Spermatozoa cells expressing membrane mainly cattle FAA with 31 kDa molecular weight and the levels of glycoproteins, carbohydrates, proteins, each for 8.235 mg / ml (supernatan) and 11.205 mg / ml (sediment), 2.63 mg / ml (supernatan) and 3.86 mg / ml (sediment), 5.605 mg / ml (supernatan) and 7.345 mg / ml (sediment).
2. FAA protein of spermatozoa able to bind anti - FAA.

2. RECOMMENDATIONS

Based on the results and conclusions can be drawn a following suggestions:

1. To do further research on the results of FAA Isolate cattle spermatozoa to the freezing media is added in order to improve kseburan of frozen spermatozoa.
2. To do further research if the FAA protein can be used as a marker detection cow fertility spermatozoa.

REFERENCES

- Aaron M., 1980. *Pubertal changes in the expression of fertility associated antigen in Bos indicus and Bos taurus bulls*. J. Anim. Sci. 17:420.
- 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.
- Berg, J.M, J.L. Tymoczko and L. Stryer. 2006. *The purification of protein is an essential first step in understanding their function*. Biochemistry. 6th ed. Freeman and company. New York. p. 66-70
- Bellin, M. E., J. N. Oyarzo, H. E. Hawkins, H. Zhang, R. G. Smith, D. W. Forrest, L. R. Sprott, and R. L. Ax. 1998. *Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility*. J. Anim. Sci. 76:2032.
- Blakely, J. dan D.H. Bade. 1994. *Ilmu Peternakan*. Cetakan keempat. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. Hal.156-164

- 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.
- Direktorat Jendral Peternakan, 2005. *Panduan Lomba dan Kontes Ternak Nasional dalam rangka Pekan Peternakan Unggulan Nasional 2005*. Direktorat Jendral Peternakan Departemen Pertanian. Hal.1.
- Goodman, J.W. 1994. *Immunogens and Antigens In Daniel P.S.: Abba, I.T. and Tristran, G.P. Ed. Basic and Clinical Immunology*. Appleton and lange. Norwalk. Connecticut. P. 123-124.
- Gordon, I., 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. The UK. University Press. Cambridge.
- Hafez, E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Herrero MB., E. de Lamirande and C. Gagnon, 1999. *Nitrit Oxide Regulates Human Sperm Capacitation and Protein Tyrosine*. Biol. of Reprod. 61:575-581.
- 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.
- Leyton L. and P.M. Saling, 1989. *Evidence that Aggregation of Mouse Sperm Receptors by ZP3 Triggers The Acrosome Reaction*. J. Cell. Biol. 108:2163 – 2168.
- Leyton, L., P. Leguen, D. Bunch and P.M. Saling., 1992. *Regulation of Mouse Gamete Interaction by a Sperm Tyrosin Kinase*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89. 11692 – 11695.
- Mancini, R.E. dan Andrada. 1978. *Imunological Factors. In Human Male and Female Infertility*. In max Samter. Ed. Immunogical Diseases 3 rd. Ed. Vol. II. Little Brown and Company United State of America. 1308 – 1324.
- McCauley, T. C., G. R. Dawson, J. N. Oyarzo, J. McVicker, S. H. F. Marks, and R. L. Ax. 1999. *Purification and Characterization of Fertility-Associated Antigen (FAA) in Bovine Seminal Fluid*. Molecular Reproduction and Development 54 : 145-153,.
- Olson, K. C.: 2005. *Range management for efficient reproduction*. J. Anim. Sci. 83 : 107-116.

- 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.
- 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.
- Sprott, L R, Gallino, J L, Novosad, A M, Forrest, D W. 2006. *Fertility-Associated Antigen in Peripubertal Beef Bulls*. *Professional Animal Scientist*. 56 : 37.

C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN (ANGGARAN TAHUN 2010)

Setelah dapat di isolasi dan diketahui kadar dari FAA, maka dilakukan penelitian lanjutan mengenai dosis optimum penambahan FAA (P0 = 0 µg/ml; P1 = 10 µg/ml; P2 = 20 µg/ml dan P3 = 30 µg/ml) ke dalam media pembekuan terhadap kualitas spermatozoa *pasca thawing* meliputi : persentase motilitas, viabilitas, membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh, penurunan kadar ROS spermatozoa berdasarkan kadar MDA, peningkatan kapasitas spermatozoa berdasarkan ion kalsium spermatozoa serta pengamatan kapasitas spermatozoa dengan pewarnaan chlortetracyclin (CTC), dan juga tingkat fertilisasinya baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Tujuan dari penelitian tahap kedua ini adalah untuk memperoleh bukti bahwa penambahan isolat protein FAA 31 kDa ke dalam media pembekuan dapat meningkatkan kualitas spermatozoa *post thawing*, serta untuk membuktikan bahwa semen beku yang ditambah isolat protein FAA 31 kDa dalam media pembekuannya dapat meningkatkan angka fertilisasinya baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Manfaat yang diharapkan adalah bila media pembekuan ini dapat meningkatkan daya fertilisasi spermatozoa sapi, maka media pembekuan ini dapat digunakan sebagai media pembekuan untuk proses pembuatan semen beku sapi. Dengan demikian semua pejantan yang dipelihara di Balai Inseminasi Buatan mempunyai tingkat kesuburan yang tinggi, dan akhirnya angka kebuntingan sapi betina juga meningkat, yang selanjutnya dapat mempercepat populasi sapi di Indonesia.

Adapun diagram alir dari penelitian lanjutan (anggaran tahun 2010) bisa dilihat di bawah ini :

