

**PENGARUH SUPLEMENTASI OSTEOPONTIN DALAM SEMEN BEKU  
SAPI PERAH *FRIESIAN HOLSTEIN* TERHADAP ANGKA FERTILISASI  
SECARA INVITRO**

**PENELITIAN EXPERIMENTAL LABORATORIS**

**TESIS**

**Untuk memperoleh gelar Magister  
Dalam Program Magister Ilmu Biologi Reproduksi  
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Surabaya**

**Oleh :**

**INTAN PURWA DEWANTARI**

**061141008**

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2014**

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul:

### **PENGARUH SUPLEMENTASI OSTEOPONTIN DALAM SEMEN BEKU SAPI PERAH *FRIESIAN HOLSTEIN* TERHADAP ANGKA FERTILISASI SECARA INVITRO**

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan maupun gelar magister di suatu perguruan tinggi dan sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain,kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

**Surabaya, 18 Juni 2014**

**Intan Purwa Dewantari, drh**

**NIM. 061141008**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL Juni 2014

Oleh :

Pembimbing Ketua



**Dr. Sri Pantja Madyawati, Drh., M.Si.**  
NIP. 196310021989032003

Pembimbing



**Dr. Widjiati, Drh., M. Si.**  
NIP. 196209151990022001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



**Prof. Dr. Wurlina, Drh., M.S.**  
NIP. 195409181983012001

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal: 21 Juli 2013

**PANITIA PENGUJI TESIS**

Ketua : Prof. Dr. Wurlina, Drh., MS.

Anggota : 1. Prof. Dr. Pudji Srianto, Drh., M.Kes.

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

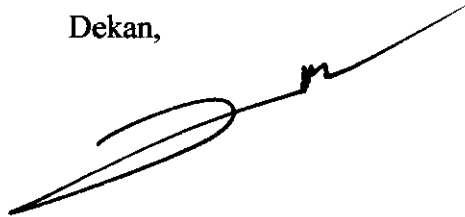
3. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.

4. Dr. Widjiati, Drh., M. Si.

Surabaya, Juli 2013

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D.

NIP.195312161978062001

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirobbil'alamiin., Puji syukur kehadiran Allah SWT atas karunia dan Rahmat-Nya yang telah dilimpahkan sehingga peneliti dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul **Pengaruh Suplementasi Osteopontin Dalam Semen Beku Sapi Perah *Friessian Holstein* Terhadap Angka Fertilisasi Secara *In Vitro***. Dengan selesainya tesis ini, maka dengan rasa syukur peneliti sampaikan rasa terima kasih yang sebesar –besarnya kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D., dan Ketua Program Studi Magister Universitas Airlangga Prof. Dr. Wurlina, drh., MS. beserta staf atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan peneliti untuk menyelesaikan pendidikan program Magister Ilmu Biologi Reproduksi pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, Drh., M.Si. selaku pembimbing utama dan Dr. Widjiati, Drh., M. Si., sebagai pembimbing kedua, yang telah memberikan banyak saran dan bimbingan, serta diskusi selama masa penelitian sampai dengan selesainya tesis ini. Sebagai pembimbing beliau senantiasa menyediakan waktunya untuk membimbing dengan segala kesabaran dan mendorong semangat serta meningkatkan rasa percaya diri peneliti. Prof. Dr. Wurlina, Drh., MS. selaku ketua penguji dan Prof. Dr. Pudji Srianto, Drh., M.Kes selaku sekretaris penguji yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membimbing, menguji dan menilai,

serta memberikan saran dan kritik pada penulisan tesis ini. Dr. Abdul Samik., Drh., M.Si. selaku penguji yang telah membimbing, memberikan ide dan perkembangan keilmuan pada penelitian ini serta meluangkan banyak waktunya untuk berdiskusi dengan peneliti selama penelitian.

Ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya saya sampaikan kepada ibu Tatik Hernawati, Drh., M.Si., yang telah memberi dorongan moril maupun materiil, bimbingan penelitian dengan penuh kesabaran dan kepercayaan peneliti untuk dapat melaksanakan penelitian ini sehingga peneliti dapat menempuh pendidikan yang lebih tinggi.

Terima kasih kepada Bapak Trilas Sarjito, Drh., M.Si selaku Kepala *Teaching Farm* beserta Dr. Tri Wahyu Suprayogi, Drh., M. Si. dan pak Koko yang telah membimbing dan mengizinkan peneliti di laboratorium semen beku serta membantu dalam pelaksanaan penelitian.

Kepada Prof. Dr. Aulanni'am, Drh., DES. selaku Ketua Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya beserta staf mbak Nita, mbak Ninik dan mas Anton yang telah sudi memberikan fasilitas, membimbing dan mengarahkan penelitian.

Sahabat Program Studi Magister Fakultas Kedokteran Hewan angkatan 2011, Yudit Oktanella., Drh, M.Si., Yayuk Kholifah, Drh., M.Si., Waode Karmila., Drh, M.Vet., Drh. Pradita Enggar dan segenap pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih atas kebersamaan, bantuan, dan saling menyemangati untuk menyelesaikan pendidikan ini. Terima kasih juga peneliti

sampaikan kepada Kholik, drh., M.Vet yang telah membantu dalam pengolahan data dalam penyusunan penulisan ini.

Terima kasih yang tak terhingga saya ucapkan kepada Ayahanda tercinta, H. Pamuji dan Ibunda, Hj. Sri Joeda Andajani, yang telah membesarkan, memberikan dorongan dengan penuh kesabaran dan mengarahkan dengan penuh kasih sayang untuk keberhasilan saya selama ini. Serta kepada ibunda dan ayahanda mertua yang senantiasa memberikan dorongan dan doa restu keberhasilan peneliti.

Tidak lupa kepada suami tercinta Fajar Bimo Laksono, yang dengan tulus, sabar dan kasih sayang memberikan dorongan moril dan semangat sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Kepada semua pihak yang tidak bisa peneliti sebutkan satu per satu dengan tulus ikhlas saya ucapkan terima kasih yang sebesar – besarnya, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan karunia-Nya dan membalas baik kita semua. Amin

Surabaya, 19 Juni 2014

## RINGKASAN

**PENGARUH SUPLEMENTASI OSTEOPONTIN DALAM SEMEN BEKU SAPI PERAH *FRIESIAN HOLSTEIN* TERHADAP ANGKA FERTILISASI SECARA INVITRO**

*In vitro Fertilization* atau IVF dapat menjadi program yang menguntungkan untuk membantu strategi seleksi genetik dan *breeding plans* dalam sistem reproduksi sapi. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memperbaiki aspek teknis yang meliputi aspek maturasi oosit, perlakuan spermatozoa, faktor fertilisasi, lingkungan kultur embrio, kualitas resipien serta sinkronisasi (Hanson, 2006).

Killian *et al.*, (1993) mendeteksi adanya protein dalam plasma semen yang berhubungan dengan fertilitas pejantan pada sapi Holstein. Penelitian yang menggunakan metode (2D) SDS-PAGE tersebut menemukan adanya empat macam protein yang berkaitan dengan fertilitas, Salah satu dari keempat protein tersebut dengan berat 55-kDa setelah diidentifikasi oleh Cancele *et al.*, (1997) adalah osteopontin (OPN). Protein ini merupakan protein yang banyak ditemukan pada pejantan dengan fertilitas tinggi dan rendah kadarnya pada pejantan dengan fertilitas rendah. Latar belakang inilah yang mendasari peneliti melakukan penelitian untuk mencari tahu pengaruh osteopontin pada spermatozoa terhadap angka fertilisasi (*fertilization rate*) oosit sapi hasil maturasi *in vitro*.

Penelitian ini secara umum bertujuan mengetahui pengaruh osteopontin dalam meningkatkan kualitas spermatozoa sapi yang dapat meningkatkan angka fertilisasi secara *in vitro*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovarium yang didapatkan dari sapi *Friesian Holstein* yang dipotong di RPH Bajangan, Gondangwetan Pasuruan. Pada proses maturasi oosit digunakan medium HTF yang ditambah dengan 0,01 µg/ml FSH, 0,01 µg/ml LH 3% BSA dan 50 µg/ml gentamycin sulfat. Fertilisasi *in vitro* dipergunakan semen beku sapi FH berdasarkan kelompok perlakuan P0 tanpa suplementasi osteopontin (0µg/50 juta spermatozoa dan P1 dengan suplementasi osteopontin 10µg/50 juta spermatozoa).

Sebelum dilakukan fertilisasi *In vitro* dilakukan identifikasi protein pasca *swim up* pada semen beku tanpa suplementasi Osteopontin (P0) dan dengan suplementasi Osteopontin (P1). Hal ini ditandai dengan melihat BM-protein dengan metode elektroforesis SDS-PAGE.

Perbedaan yang terjadi pada pemeriksaan profil protein P0 dan P1 disebabkan karena adanya pengaruh suplementasi Protein OPN pada semen beku Sapi FH P1 sehingga pada semen beku P1 ditemukan 13 pita protein dan pada P0 hanya ditemukan 11 pita protein. Pemeriksaan profil protein P0 tidak ditemukan pita protein yang terdapat pada profil protein P1 yaitu 55,84 dan 68,08 kDa.



Hasil identifikasi protein pada semen beku pasca swim up spermatozoa sapi FH pada P0 dan P1 berdasarkan perhitungan diidentifikasi berat molekul osteopontin pada P0 dan P1 adalah 61,66 kDa. Studi yang meneliti tentang protein mengidentifikasi bahwa ampulla dan kelenjar vesicular merupakan sumber utama OPN dalam plasma semen, sedangkan ekspresi gen terdapat pada sel epitel dari ampulla dan germinal sel dalam tubulus seminiferus yang mengandung spermatid memanjang (Rodriguez *et al.*, 2000).

Fertilisasi *in vitro* dilakukan menggunakan semen beku tanpa OPN dan yang telah di suplementasi dengan osteopontin dengan dosis 10 µg/ 50 juta spermatozoa. Kemudian, keberhasilan fertilisasi *in vitro* berdasarkan hasil pengamatan lepasnya *polar body* 2 atau terbentuknya 2 pronukleus yang setelah fertilisasi. Kelompok tanpa suplementasi OPN dengan suplementasi OPN terdapat perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Hal ini dapat dijelaskan bahwa suplementasi OPN dalam spermatozoa memiliki pengaruh positif terhadap angka fertilisasi oosit sapi dalam fertilisasi *in vitro*, bila dibandingkan spermatozoa yang tidak disuplementasi OPN. Osteopontin dalam spermatozoa memicu aktivasi peningkatan signal transduksi yakni CD44 yang mengikat integrin, yang selanjutnya mengakibatkan reseptor ovarium (zona pellusida-3 (ZP3)) lebih mudah mengenali spermatozoa tersebut sehingga spermatozoa mudah mengalami fusi ke dalam sel ovum.

## SUMMARY

### The Effect of Osteopontin Supplementation in Friessian Holstein Dairy Cattle Frozen Semen to fertilization Rate *In vitro*

*In vitro* fertilization (IVF) could become profitable program to help genetic strategy selection and breeding plans in cattle production system. Further research was needed to improve technical aspect including oocyte maturation, spermatozoa treatment, fertilization factor, embryo cultur environment, recipient quality and synchronization aspect (Hanson, 2006).

Killian et al., (1993) detected some proteins in seminal plasma related with male fertility in Holstein. This research used (2D) SDS-PAGE to find four kind of protein related to fertility. One of this four proteins with 55-kDa molecular weight being identified by Cancel *et al.*, (1997) was osteopontin (OPN). High level of this protein found in male with high fertility but the level is low in less fertile male. This reason lead to reseacher to evaluate the effect of osteopontin supplementation in spermatozoa of frozen semen to fertilization rate of bovine oocyte *in vitro*.

The aim of this research was to know effect of OPN to improve the quality of bovine spermatozoa in order to increase fertilization rate *in vitro*. Sample used in this research were ovarium collected from FH cows that have been sloughered in Bajangan Slaughterhouse, Gondang wetan Pasuruan. Maturation of oocyte conducted by using HTF medium with supplementation of 0,01 µg/ml LH, 3% BSA, and 50 µg/ml Gentamycin sulfat. Frozen semen of FH bull used for fertilize oocyte *in vitro* were divided into two groups, P0 without supplementation of OPN 0 µg/ 50 million spermatozoa and P1 with supplementation of OPN 10 µg/ 50 million spermatozoa).

Before *In Vitro* fertilization, post swim up protein identification of frozen semen without and with supplementation (P0 and P1) was conducted protein molecular weight was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis method.

The differenses between protein profile evaluation of P0 & P1 was caused by the effect of OPN protein supplementation in Friessian Holstein (FH) bulls frozen semen (P1). In the P1 groups 13 protein bands were found while P0 groups only 11 protein bands were found. There were two kinds of proteins that could be found in P1 groups but not P0 groups. The proteins weight molecular weight were 55,84 and 68,08 kDa.

The result of protein identification on post swim up frozen semen of FH bulls in P0 and P1 groups showed that OPN molecular weight was 61,66 kDa. This indicate that OPN supplemented in diluter before freezing keep attach to spermatozoa even post swim up. Study of this protein identified that ampulla and vesicular seminalis gland was the main resource of OPN in seminal plasm, while

gen expression was found in epithelial cells of ampulla and germinal cells of seminiferous tubules with elongated spermatid (Rodriguez *et al*, 2000).

Fertilization rate evaluated by release of second polarbody or formation two of pronucleus after fertilization initiation. There was significant difference between group without and with OPN supplementation ( $P < 0,05$ ). OPN supplementation in frozen semen has positive effect to fertilization rate of cow oocyte *in vitro*. OPN in spermatozoa triggers the activator of signalling transductor CD44 that bound to integrin that cows ovarium receptors (ZP3) more sensitive in identifying spermatozoa, so that spermatozoa easier to fuse with the ovum.

## **The Effect of Osteopontin Supplementation in Friessian Holstein Dairy Cattle Frozen Semen to fertilization Rate *In vitro***

**Intan Purwa Dewantari**

### **ABSTRACT**

This research was aim to know the influence of osteopontin to increase the quality of bull spermatozoa in order to improve *in vitro* fertilization rate. Sample used in this research were ovarium of Friesian Holstein cows sloughered in Bajangan slougherhouse, Gondangwetan Pasuruan. The mediu used to mature oocytes was HTF added with 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , FSH 0,01  $\mu\text{g/ml}$  LH, 3% bull with two groups treatment (P0 without osteopontin supplementation 0  $\mu\text{g}/50$  million spermatozoa) and (P1 with osteopontin supplementation 10 $\mu\text{g}/50$  million spermatozoa). Before *In Vitro* fertilization, post swim up protein identification of frozen semen without and with supplementation (P0 and P1) was conducted protein molecular weight was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis method. The differenses between protein profile evaluation of P0 & P1 was caused by the effect of OPN protein supplementation in Friessian Holstein (FH) bulls frozen semen (P1). In the P1 groups 13 protein bands were found while P0 groups only 11 protein bands were found. The result of protein identification on post swim up frozen semen of FH bulls in P0 and P1 groups showed that OPN molecular weight was 61,66 kDa. Fertilization rate evaluated by release of second polar body or formation of 2 pronucleus after fertilization process. There was significant difference between group without and with OPN supplementation ( $P < 0,05$ ). OPN supplemtation in frozen semen has positive effect to fertilization rate of cow oocyte *in vitro*.

**Keyword : Osteopontin, frozen semen, *in vitro* fertilization, fertilization rate**

## DAFTAR ISI

Halaman Sampul Dalam.....	i
Prasyarat Gelar .....	ii
Pernyataan .....	iii
Lembar Pengesahan .....	iv
Penetapan Panitia Penguji .....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan .....	ix
Summary.....	xi
Abstract.....	xiii
Daftar Isi .....	xiv
Daftar Tabel .....	xvi
Daftar Gambar .....	xvii
Daftar Lampiran .....	xviii
Daftar Singkatan dan Arti Lambang .....	xix
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1 Tujuan Umum .....	4
1.3.2 Tujuan Khusus .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
1.4.1 Manfaat Keilmuan .....	5
1.4.2 Manfaat Praktis .....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Struktur Spermatozoa .....	6
2.1.1 Kepala Spermatozoa .....	7
2.1.2 Flagella Spermatozoa .....	9
2.2 Oosit .....	10
2.3 Osteopontin .....	13
2.4 Peran Osteopontin pada sistem Reproduksi .....	15
2.5 Plasma Semen .....	17
2.6 Kapasitas Spermatozoa .....	18
2.7 Rekasi Akrosom .....	21
2.8 Proses Fertilisasi .....	23
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS .....	27
3.1 Kerangka Konseptual .....	27
3.2 Bagan Kerangka Konseptual .....	29
3.3 Hipotesis .....	30

BAB 4. MATERI DAN METODE .....	31
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....	31
4.2 Subyek Penelitian .....	31
4.2.1 Populasi Penelitian .....	31
4.2.2 Besar Sampel .....	32
4.3 Variabel Penelitian .....	32
4.3.1 Variabel Bebas .....	32
4.3.2 Variabel Tergantung .....	32
4.3.3 Variabel Terkendali .....	32
4.3.4 Definisi Operasional Variabel.....	33
4.4 Bahan Penelitian .....	33
4.5 Waktu dan Tempat Penelitian .....	33
4.6 Instrumen Penelitian.....	34
4.7 Prosedur Penelitian .....	34
4.8 Koleksi Oosit .....	35
4.9 Maturasi Oosit .....	35
4.10 Preparasi Fertilisasi In Vitro.....	35
4.11 Kerangka Operasional .....	37
4.12 Evaluasi Hasil .....	38
4.13 Analisis Data.....	39
BAB 5. ANALISIS HASIL PENELITIAN .....	40
5.1 Identifikasi Profil Protein seminal plasma Semen Beku sapi FH Pasca <i>Swim up</i> dengan SDS-PAGE .....	40
5.2 Suplementasi Osteopontin dalam Semen Beku Spermatozoa Sapi FH terhadap Fertilisasi <i>In Vitro</i> (%) .....	42
BAB 6. PEMBAHASAN .....	46
6.1 Pemeriksaan Profil protein Seminal Plasma pada Semen Beku sapi FH pasca <i>swim up</i> dengan metode SDS-PAGE.....	46
6.2 Pengaruh Suplementasi Osteopontin dalam Semen Beku Spermatozoa Sapi FH terhadap Fertilisasi <i>In Vitro</i> .....	47
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
7.1 Kesimpulan .....	54
7.2 Saran .....	55
DAFTAR PUSTAKA .....	56
LAMPIRAN .....	62

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Angka Fertilisasi ( <i>Fertilisasi rate</i> ) Sapi hasil Maturasi <i>In Vitro</i> .....	45
-----------	---	----

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Spermatozoa Mammalia .....	7
Gambar 2.2	Folikel Mammalia .....	12
Gambar 2.3	Model untuk Interaksi Osteopontin dengan Angka Ejakulasi Spermatozoa dan Oosit .....	16
Gambar 2.4	Reaksi Akrosom Spermatozoa .....	23
Gambar 2.5	Fase Fertilisasi Mamalia .....	24
Gambar 2.6	Proses Fertilisasi .....	25
Gambar 3.1	Kerangka Konseptual .....	29
Gambar 4.1	Kerangka Operasional .....	37
Gambar 4.2	Morfologi Oosit Hasil Koleksi Ovarium Sapi.....	38
Gambar 5.1	Hasil Konfirmasi Osteopontin <i>After Swim up</i> (P0).....	40
Gambar 5.2	Hasil Konfirmasi Osteopontin <i>After Swim up</i> (P1) .....	41
Gambar 5.3	Morfologi Oosit setelah Maturasi yang digunakan pada Proses Fertilisasi <i>In Vitro</i> adalah Oosit Kualitas A dan Oosit Kualitas B .....	42
Gambar 5.4	Oosit yang Mengalami Pelepasan <i>Polar Body</i> II .....	43
Gambar 5.5	Hasil Oosit yang terfertilisasi .....	44
Gambar 5.6	Angka Fertilisasi Oosit Sapi dengan Spermatozoa Beku ....	45



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi Larutan pada Elektroforesis SDS-PAGE .....	63
Lampiran 2.	Penentuan Berat Molekul dengan Elektroforesis SDS-PAGE.....	65
Lampiran 3.	Diagram Alir Metode dengan Elektroforesis SDS-PAGE	67
	3.1.1 Profil Protein dengan Teknik SDS-PAGE persiapan Gel .....	68
	3.1.2 Injeksi Sampel dan <i>Running</i> .....	67
	3.1.3 Perhitungan Konfirmasi Berat Molekul Osteopontin	69
Lampiran 4.	Komposisi media HTF ( <i>Human Tubal Fluid</i> )	74
Lampiran 5.	Data Persentase Fertilisasi dari Hasil Fertilisasi <i>In Vitro</i> ...	75
Lampiran 6.	Dokumentasi Penelitian .....	82
Lampiran 7.	Data Penelitian .....	84

## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

2D	= 2 dimensi
$\mu\text{l}$	= mikroliter
$\mu\text{g}$	= mikrogram
$\mu\text{M}$	= micrometer
AGF	= Accesory Gland Fluid
ATP	= Adenosin triphosphate
BM	= Berat Molekul
BO	= Brackett Oliphant
BSP 1	= Bone Sialoprotein 1
BSP A1.A2.A3	= Bovine Seminal Plasma Protein
CEF	= Cauda Epididimal Fluid
$\text{Ca}^{2+}$	= Calsium
$\text{CO}_2$	= Carbon dioksida
DNA	= Deoxiribonucleic acid
EBSS	= Earle's Balanced Salt Solution
FH	= Friesian Holstein
FSH	= Follicle Stimulating Hormone
GV	= Germinal Vesicle
HEPES	= 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HTF	= Human Tubal Fluid
H0	= Hipotesis
HBP	= Heparin Binding Protein
IVF	= In Vitro Fertilization
IL-1 $\beta$	= Interleukin-6
kDa	= kiloDalton
LH	= Luteinizing Hormone
LPS	= Lipopolisakarida
ml	= milliliter
$\text{Na}^{2+}$	= Natrium
NaCl	= Natrium Clorida
$\text{N}_2$	=Nitrogen
NO	= Nitrogen Oksida
NPC	=Nuclear Pore Complexes
NE	= Nuclear Envelope
OPN	= Osteopontin
PT	= Perinuclear Theca
PGC	= Primordial germ Cells
PGDS	= Prostaglandin D-Synthase
PLC	= Phopolipase C
PLA <sub>2</sub>	= Phopholipase A <sub>2</sub>
PBS	= Phosphate Buffer Saline
pH	= Power of Hydronium
Pn	= Pronucleus

RAL	= Rancangan Acak Lengkap
RNA	= Ribonucleic acid
RGD	= Argynine Glycine-Aspartic
RPH	= Rumah Pemotongan Hewan
Rf	= Retardation factor
SDS-PAGE	= Sodium Dedocyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis
SP	= Seminal Plasma
TNF $\alpha$	= Tumor Nekrosis Factor $\alpha$
TGF $\beta$	= Transforming Growth Factor $\beta$
TIMP <sub>2</sub>	= Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2
ZP	= Zona Pellusida
ZP3	= Zona Pellusida 3

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1.Latar Belakang

Data yang diperoleh dari Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan tahun 2010 menunjukkan jumlah populasi sapi perah di Jawa Timur mulai tahun 2008-2012 berturut-turut yaitu: tahun 2008 (212.322 ekor), tahun 2009 (221.743 ekor), tahun 2010 (231.408 ekor), tahun 2011 (296.350 ekor), tahun 2012 (309.775 ekor). Berdasarkan angka tersebut dapat terlihat terjadinya peningkatan jumlah populasi ternak sapi perah hingga tahun 2012 dengan laju pertumbuhan 4,53%. Peningkatan populasi ini ternyata masih belum mampu mencukupi kebutuhan konsumsi susu masyarakat serta kebutuhan bahan baku susu bagi kelompok industri di Jawa Timur. Mengatasi masalah tersebut, program pemerintah ditujukan pada usaha peningkatan laju pertumbuhan sapi perah di Jawa Timur melalui berbagai teknik reproduksi (Ditjennak, 2010).

Menurut Lubis (2000) kemajuan teknologi yang berhubungan dengan produksi dan manipulasi embrio telah berkembang dengan pesat. Telah dilaporkan bahwa penggunaan metode kawin suntik, transfer embrio, serta fertilisasi secara *in vitro* telah menjadi hal yang rutin dilakukan guna meningkatkan populasi sekaligus menghasilkan perbaikan mutu genetik ternak.

Pada fertilisasi *in vitro*, embrio dapat dihasilkan di luar tuba fallopii induk betina. Setelah embrio terbentuk, embrio tersebut ditanam dalam uterus betina dari spesies yang sama untuk membantu mempercepat peningkatan populasi ternak yang unggul dan meningkatkan performan sapi perah (Hidayat, 2000). Faktor – faktor yang memegang peranan penting dalam

keberhasilan pelaksanaan fertilisasi *in vitro* adalah lingkungan, kematangan oosit serta motilitas spermatozoa yang digunakan pada pembuahan oosit. Motilitas spermatozoa yang progressif ini memiliki kemampuan untuk menembus sel telur, tetapi sebelumnya harus mengalami kapasitas dan reaksi akrosom (Kim *et al*, 2008).

*In vitro Fertilization* atau IVF dapat menjadi program yang menguntungkan untuk membantu strategi seleksi genetik dan *breeding plans* dalam pengembangan sistem reproduksi sapi. Program ini dapat digunakan untuk meningkatkan angka kebuntingan pada kelompok ternak. Fertilisasi *in vitro* memungkinkan penggunaan semen beku kualitas tinggi dengan lebih efisien, meskipun demikian, terdapat beberapa kelemahan sistem fertilisasi *in vitro* jika dibandingkan dengan embrio hasil produksi secara *in vivo*, di antaranya biaya yang mahal serta prosedur operasional yang rumit. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memperbaiki aspek teknis yang meliputi aspek maturasi oosit, perlakuan spermatozoa, faktor fertilisasi, lingkungan kultur embrio, kualitas resipien serta sinkronisasi (Hanson, 2006).

Secara *in vivo* spermatozoa mamalia, harus mengalami kapasitas dan reaksi akrosom untuk mencapai fertilisasi. Kejadian kompleks tersebut memungkinkan spermatozoa mampu melakukan fertilisasi pada saat dan waktu yang tepat. Hal ini penting mengingat hanya sedikit sel spermatozoa yang benar-benar mencapai tempat fertilisasi *in vivo* (Fraser, 1998). Therien *et al.*, (1998) menyebutkan kapasitas spermatozoa merupakan proses yang melibatkan beberapa perubahan biokimia dan ultrastruktur dari membran spermatozoa.

Banyak studi telah menunjukkan bahwa kapasitas spermatozoa diikuti oleh perubahan komposisi lemak dari membran plasma spermatozoa.

Killian *et al.*, (1993) mendeteksi adanya protein dalam plasma semen yang berhubungan dengan fertilitas pejantan pada sapi Holstein. Penelitian yang menggunakan (2D) SDS-PAGE tersebut menemukan adanya empat macam protein yang berkaitan dengan fertilitas, dua dari protein ini (berat molekul 26-kDa dan 55-kDa) diketahui tinggi kadarnya pada pejantan dengan fertilitas tinggi, sedangkan dua lainnya dengan berat molekul 16 kDa tinggi kadarnya pada pejantan yang kurang fertil. Salah satu dari keempat protein tersebut dengan berat 55-kDa setelah diidentifikasi oleh Cancele *et al.*, (1997) adalah osteopontin (OPN). Protein ini merupakan protein yang banyak ditemukan pada pejantan dengan fertilitas tinggi dan rendah kadarnya pada pejantan dengan fertilitas rendah.

Osteopontin (OPN) telah terbukti memiliki pengaruh terhadap fertilitas. Erikson (2006) melaporkan bahwa OPN mampu menginduksi kapasitas dalam konsentrasi rendah. Efek yang ditimbulkan OPN bahkan lebih tinggi daripada heparin. Selain itu osteopontin juga meningkatkan reaksi akrosom pada sel spermatozoa sapi. Sel spermatozoa yang diinkubasi dengan anti-OPN sebelum bertemu oosit mengalami penurunan angka fertilisasi serta peningkatan kejadian polispermi. Hal ini secara tidak langsung menunjukkan bahwa OPN memiliki pengaruh positif terhadap angka fertilisasi oosit sapi dalam fertilisasi *in vitro*.

Penelitian Moura *et al.*, (2007) mengungkapkan bahwa osteopontin yang berada dalam cairan kelenjar asesoris sapi Holstein dengan fertilitas tinggi

memiliki keterkaitan dengan peningkatan penetrasi spermatozoa ke oosit. Selain itu, OPN juga dikatakan sebagai ligand yang potensial untuk reseptor integrin pada oosit sapi perah Friesian Holstein selama fertilisasi (Erickson *et al.*, 2007).

Penelitian Hao *et al.*, (2006) yang menyelidiki pengaruh osteopontin dalam fertilisasi *in vitro* babi berhasil menemukan bahwa osteopontin dapat menurunkan polispermia serta meningkatkan efisiensi fertilisasi selama fertilisasi *in vitro* pada babi.

Latar belakang inilah yang mendasari peneliti melakukan penelitian untuk mencari tahu pengaruh osteopontin pada spermatozoa terhadap angka fertilisasi (*fertilization rate*) oosit sapi hasil maturasi *in vitro*.

## **1.2. Rumusan Masalah**

1. Bagaimana profil protein seminal plasma semen beku sapi Friesian Holstein pasca *swim up* berdasarkan BM-nya?
2. Apakah suplementasi osteopontin pada pengencer semen beku sapi Friesian Holstein (FH) sebelum pembekuan dapat meningkatkan angka fertilisasi (*fertilization rates*) secara *in vitro*?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan Umum**

Penelitian ini secara umum bertujuan membuktikan osteopontin dalam meningkatkan kualitas spermatozoa sapi yang dapat meningkatkan angka fertilisasi secara *in vitro*.



### 1.3.2. Tujuan Khusus:

1. Membuktikan Profil Osteopontin pada semen beku sapi Friessian Holstein pasca *swim up* berdasarkan BM-nya.
2. Membuktikan bahwa penambahan osteopontin pada spermatozoa sapi Friesian Holstein (FH) sebelum pembekuan dapat meningkatkan angka fertilisasi (*fertilization rate*) oosit sapi hasil maturasi *in vitro*.

### 1.4. Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Keilmuan

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan referensi tentang potensi osteopontin dalam meningkatkan kualitas spermatozoa sapi.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan referensi mengenai peran osteopontin dalam proses fertilisasi sapi baik *in vitro* maupun *in vivo*.

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

1. Suplementasi Osteopontin ke dalam media pengencer semen beku Friesian Holstein (FH) dapat dikembangkan sebagai suplementasi media pengencer dalam pembuatan semen beku.
2. Penerapan teknologi reproduksi dengan menggunakan transfer embrio dari hasil fertilisasi secara *in vitro* dalam usaha peningkatan mutu genetik dan performans reproduksi sapi perah.

## **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

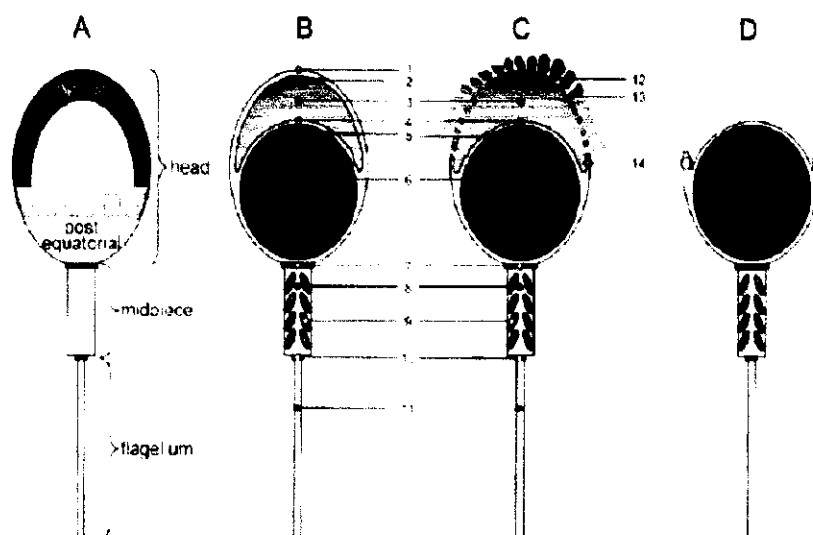
### 2.1. Struktur Spermatozoa

Spermatozoa terdiri dari kepala spermatozoa dan ekor spermatozoa atau flagellum. Baik ekor maupun kepala, keduanya tertutup oleh membran plasma, atau plasmalemma. (Jonge and Barratt, 2006).

Spermatozoa mamalia memiliki struktur yang serupa (gambar 2.1): diameter kepala antara 2-5  $\mu\text{M}$  yang berisi nukleus dan akrosom, ekor yang panjangnya 10-100  $\mu\text{M}$  terdiri dari "9+2" kompleks mikrotubulus dengan karakteristik flagella dan silia, serta bagian leher (*midpiece*) yang mengandung mitokondria. Kepala tersambung ke leher oleh *connecting piece* dan leher tersambung dengan ekor oleh annulus. Volume sitoplasmik spermatozoa sangatlah sedikit dan terutama terletak pada kepala spermatozoa. Spermatozoa sedikit memiliki organel sel untuk mensintesis protein atau asam nukleat dan hanya bertugas mengantarkan materi genetik ke oosit.

Saat spermatid pertama terbentuk, sel belum memiliki sifat sel epitheloid yang biasanya, namun segera setelah terbentuk sel akan berdeferensiasi dan memanjang membentuk spermatozoa. Kepala spermatozoa mengandung nukleus yang terkondensasi dengan sitoplasma yang hanya sedikit dan membran sel yang melapisi di sekelilingnya. Pada bagian luar anterior dua per tiga kepala berupa tudung tebal yang disebut akrosom yang terbentuk dari aparatus golgi. Bagian ini mengandung sejumlah enzim yang sama dengan yang ditemukan dalam lisosom, yakni meliputi enzim hyaluronidase (yang mampu mencerna filamen proteoglikan

dari jaringan) serta enzim proteolitik (yang mampu mencerna protein). Enzim ini memainkan peran penting dalam memungkinkan spermatozoa memasuki ovum dan memfertilisasi (Guyton, 2006).



Gambar 2.1. Struktur Spermatozoa Mammalia (Erikson, 2006)

Keterangan gambar:

1: membran plasma, 2: membran akrosom, 3: isi akrosom, 4: membran akrosom dalam, 5: lapisan nuklear, 6: nukleus berisi DNA yang padat, 7: cincin posterior, 8: leher, 9: mitokondria, 10: cincin anuler, 11: flagela, 12: campuran vesikel, 13: sekresi akrosomal, 14: struktur hairpin.

### 2.1.1. Kepala Spermatozoa

Sel-sel spermatozoa adalah sel-sel terpolarisasi dengan kepala, flagellum dan leher. Kepala spermatozoa dapat dibagi menjadi empat daerah: apikal, pre equatorial, equatorial, serta daerah post-equatorial. Akrosom terletak di daerah apikal dari nukleus (B). setelah binding sel spermatozoa dengan oosit melalui plasma membran apikalnya, membran plasma kemudian mengalami fusi dengan membran akrosom di bawahnya (C). Kandungan akrosom (enzim hyaluronidase)

akan disekresikan. Hal ini kemudian akan memungkinkan sel spermatozoa untuk mencerna/melarutkan matriks ekstraselular sel telur (zona pellusida/ZP). Setelah reaksi akrosom terlengkapi, membran dalam akrosom membentuk ikatan antara sel spermatozoa dengan oolemma. Bagian (B), (C), dan (D) pada Gambar 2.1 di atas merepresentasikan potongan melintang tipis dari sel spermatozoa (Erikson, 2006).

Selain itu, Erikson (2006) juga menyebutkan kepala spermatozoa mamalia terdiri dari nukleus, akrosom serta daerah post-akrosomal yang termasuk segmen equatorial. Nukleus sel spermatozoa berisi kromatin yang sangat padat (terkondensasi) yang sifatnya sangat stabil karena ikatan disulfida yang ekstensif. Tingginya level kondensasi membuat nukleus spermatozoa berada pada kondisi istirahat metabolik (*metabolic rest*). Kondensasi nukleus ini dan juga bentuk kepala spermatozoa yang lonjong dapat membantu penetrasi ke dalam zona pelusida (ZP) pada spesies mamalia. Uniformitas antar sel spermatozoa yang diproduksi satu hewan adalah signifikan.

Daerah *post-akrosomal* dari kepala spermatozoa terletak di belakang bagian posterior akrosom, berisi segmen equatorial yang terbentuk setelah reaksi akrosom, dan merupakan daerah dimana ikatan dan fusi dengan oosit terjadi.

Dilihat dari dalam ke luar, kepala spermatozoa tersusun atas satu nukleus, dimana *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang terkondensasi dan *linker histone* telah diganti sebagian saat spermiogenesis oleh protamin, yang membuat hiperkondensasi nukleus spermatozoa menjadi kompak, dengan bentuk hidrodinamik dan memungkinkan motilitas spermatozoa dan penetrasi

spermatozoa selama berhubungan dengan sel telur. nukleus spermatozoa tertutupi oleh *reduced nuclear envelope* (NE), dimana *nuclear pore complexes* (NPC) telah dikeluarkan selama spermiogenesis. Perlindungan nukleus spermatozoa didapatkan dari perinuclear theca (PT) atau kadang-kadang disebut '*perinuclear matrix*,' yang membentuk cangkang kaku (Jonge and Barratt, 2006).

### 2.1.2. Flagella spermatozoa

Ekor atau flagella spermatozoa menyediakan penggerak bagi spermatozoa, yang didapat dari susunan unik mikrotubulus pada axonema spermatozoa yakni susunan 9+2. Susunan 9+2 ditujukan pada susunan sembilan mikrotubulus perifer yang tersusun simetris. Pasangan-pasangan mikrotubulus ini disebut *doublets*, yang mana pada bagian luarnya bersambung dengan sembilan serabut tebal yang memberikan dukungan fleksibel namun kokoh bagi pergerakan ekor spermatozoa. Secara topografi, ekor spermatozoa dapat dibagi menjadi empat segmen, dari depan ke belakang segmen-segmen ekor adalah *connecting piece*, *midpiece* (yang mengandung mitokondria sebagai sumber energi), *principal piece* serta *end piece* yang mengandung doublet axonemal dan ujung dari serabut tebal luar (Erikson, 2006).

Guyton (2006) menyebutkan ekor spermatozoa, yang disebut flagellum, memiliki tiga komponen utama yaitu: 1. Rangka tengah yang tersusun atas 11 mikrotubulus, semuanya disebut axonema, strukturnya mirip dengan yang ada pada silia yang ditemukan pada permukaan sel tipe lain. 2. Membran sel tipis yang menutupi axonema, dan 3. Sejumlah mitokondria yang mengelilingi axonema

pada bagian proksimal ekor. Gerakan maju mundur ekor memberikan motilitas pada spermatozoa. Gerakan ini dihasilkan dari gerakan longitudinal ritmis antara posterior dan anterior tubulus yang menyusun axonema. Energi untuk proses ini dihasilkan dalam bentuk adenosin triphosphate (ATP) yang disintesis oleh mitokondria dalam leher spermatozoa.

## 2.2. Oosit

Gamet berkembang dari *Primordial Germ Cells* (PGC) yang telah dipersiapkan selama masa embriogenesis awal. Perkembangan sel telur dimulai dari pembentukan prekursor sel germinal disebut oogenesis. Setelah gonad tersusun dari sel-sel somatik dan sel germinal, populasi sel-sel germinak akan berdiferensiasi dan berproliferasi. Saat itu, PGC memiliki potensi untuk memulai proses spermatozoatogenesis ataupun oogenesis tergantung pada lingkungan gonadalnya. Pada *genital ridge* betina, PGC berdiferensiasi menjadi oosit, sedang pada jantan *Gonadal Somatic Cells* mendorong PGC untuk menjadi spermatozoatogenik sel (Adams and McLaren, 2002 dalam Voronina and Wessel, 2003).

Sel-sel germinal yang berproliferasi disebut oogonia pada betina atau spermatozoatogonia pada jantan dan merupakan sel stem yang pluripoten. Oogonia berdiferensiasi menjadi oosit primer dimana oosit akan memulai miosis dengan mereplikasi DNA dan tetap bertahan pada fase profase dari meiosis pertama. Pada ovarium, transisi dari mitosis ke meiosis diatur oleh sinyal dari sel somatik. Oosit profase bertahan dalam waktu yang bervariasi antar spesies. Sel-sel somatik dari gonad nantinya akan menstimulasi oosit primer untuk melanjutkan

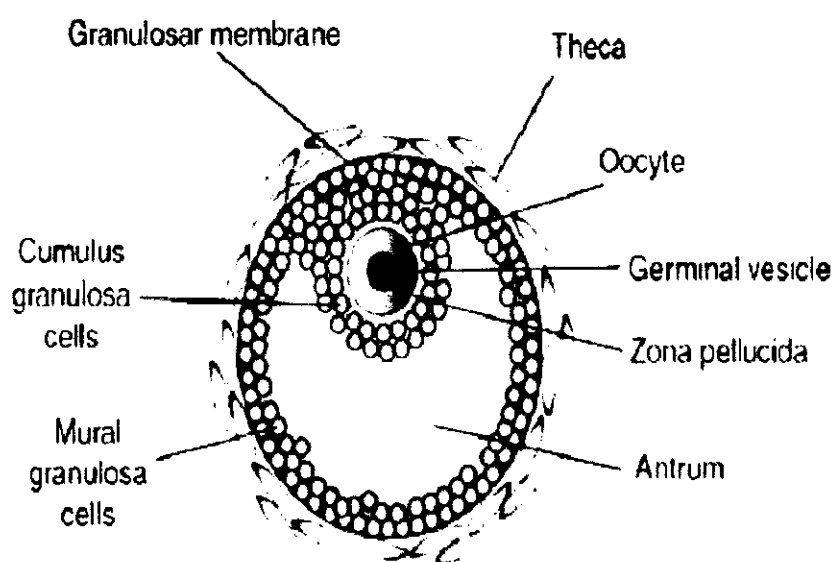
perkembangan. Oosit yang tumbuh dengan nukleus yang mengalami pembesaran disebut germinal vesicle (GV). Selama oogenesis, oosit akan memiliki RNA, protein-protein, organel, seperti *cortical granules*, *yolk vesicles*, ribosom, dan mitokondria (Wessel *et al.*, 2001 dalam Voronina and Wessel, 2003).

Saat terjadi fertilisasi, pengikatan oleh spermatozoa dan penetrasi ke oosit menyebabkan peningkatan kalsium intraseluler. Akibat dari *oscillasi* kalsium adalah penyimpanan kalsium intraseluler oosit. Kalsium memainkan peran dalam pelepasan granul kortikal yang menyebabkan blok polispermia serta progressi siklus sel dalam oosit. Kejadian ini secara keseluruhan disebut aktivasi sel telur, yang terjadi setelah fertilisasi dan menginisiasi pertumbuhan embrio (Erikson, 2006).

Pawshe *et al.* (1996), dikutip oleh Supriatna dan Pasaribu (1992) dalam Madyawati,(2008), membagi tingkat kematangan oosit berdasarkan penilaian morfologi kompleks oosit- korona radiata – cumulus ooforus. Oosit yang diisolasi dari folikel antral dapat dibagi menjadi (1) Oosit yang belum matang (*immature oocyte*) yang terdiri atas 4 grade : (A) Kumulus ooforus kompak dan tebal. Korona radiata kompak, oosit tidak jelas. (B) Kumulus ooforus kompak, korona radiata kompak, oosit tidak jelas, (C) cumulus ooforus sedikit sekitar 2 lapis dan korona radiata kompak, oosit tampak samar – samar, (D) Oosit denute tanpa cumulus ooforus. (2), Oosit matang (*mature oocyte*) terbagi atas 2 fase yaitu (A) kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar dan meluas, sedikit berlendir (musefinikasi), oosit tampak jelas tetapi belum memiliki benda kutub I, (B) Kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar,



cukup berlendir, oosit tampak jelas dan sudah memiliki benda kutub I (metaphase II), (C) Korona radiate lepas, kumulus ooforus yang tampak berlendir sedikit atau sama sekali tanpa kumulus, oosit memiliki benda kutub I (metaphase II), dan (D) (*Degenerated oocyte*) korona radiate bervariasi, kumulus lepas atau sama sekali tanpa kumulus, dan oosit mengalami degenerasi atau piknosis.



Gambar 2.2: Folikel Mamalia (Voronina and Wessel, 2003)

### 2.3. Osteopontin

Osteopontin pertama kali dijelaskan oleh Senger *et al.*, (1979) sebagai phosphoprotein spesifik transformasi 60 kDa, selanjutnya OPN ditemukan dengan cara kloning molekuler. Setelah itu, OPN teridentifikasi independen, bersama dengan *bone sialoprotein* (BSP) sebagai sialoprotein utama dalam matriks ekstraseluler tulang dan kedua protein ini disebut *bone sialoprotein* I (BSP I) untuk OPN and *bone sialoprotein* 11 (BSP 11) untuk BSP (Sodek *et al.*, 2000).

Nama osteopontin diperkenalkan untuk merefleksikan potensi protein tulang untuk menjadi pen jembatan antara sel-sel dan *hydroxyapatite* melalui motif RGD dan asam poliaspartik yang ditemukan dalam *sequence* protein ini. Namun, produk gen yang sama teridentifikasi sebagai limfokin yang diduga diproduksi oleh limfosit dan makrofag aktif dan disebut Eta-1, dan kemudian pola ekspresi OPN yang lebih general muncul. Karenanya, *secreted phosphoprotein 1* (SPP 1) diperkenalkan sebagai nama alternatif OPN, untuk merefleksikan peran fungsional yang lebih luas dari osteopontin. Meski demikian, nama osteopontin masih tetap dipertahankan untuk menjaga nomenklatur yang dipakai pada gen manusia (Sodek *et al.*, 2000).

Menurut Mazzali *et al.*, (2002) OPN adalah protein asam yang hidrofobik dengan sekitar 300 asam amino, dan disekresikan ke dalam cairan tubuh. cDNA osteopontin dari berbagai spesies mamalia menunjukkan bahwa *sequence* OPN sangat homolog antar spesies. Molekulnya mengalami modifikasi post-translasional, serta terphosphorilasi dan terglisosilasi. OPN memiliki *sequence* pengikat sel yakni asam RGD (arginine-glycine-aspartic), situs pengikat kalsium dan dua domain pengikat heparin.

Sel-sel dapat mengikat OPN via multi reseptor integrin termasuk reseptor vitronectin ( $\alpha_v\beta_3$ ) juga integrin  $\beta_1$  dan  $\beta_5$ . Pengikatan integrin dapat tergantung pada RGD ataupun tidak (contoh: melalui motif SVVYGLR). OPN dapat juga terikat oleh *trombin cleavage* (Mazzali *et al.*, 2002).

Sodek *et al.*, (2000) menjelaskan bahwa OPN diekspresikan dengan protein *single-copy gen* dengan berat 34 kDa yang sangat termodifikasi oleh

kejadian *post-translational*. Osteopontin pada mamalia dan avian memiliki jumlah asam amino yang sama, ukuran OPN yang dilaporkan bervariasi antara 44 kDa hingga 75 kDa, karena perbedaan dalam modifikasi post-translasi dan perbedaan saat dilakukan SDS-PAGE. Protein ini kaya akan asam glutamat, aspartat dan serin, serta memiliki motif asam poliaspartat, yang memungkinkan protein untuk mengikat ion kalsium dan *hidroksiapatite*, serta *sequence* RGD yang mampu memediasi perlekatan sel. Selain itu, multi situs fosforilasi Thr dan Ser serta situs rantai glikosilasi N- dan O- juga ada, bersama dengan situs *thrombin cleavage*. Variasi fosforilasi, glikosilasi dan sulfasi memberikan bentuk fungsional yang berbeda pada OPN yang mungkin ditemukan pada jaringan yang sama ataupun jaringan yang berbeda.

Regulasi ekspresi OPN belum sepenuhnya dimengerti saat ini dan mungkin regulasinya berbeda antar berbagai tipe sel. Studi-studi mengindikasikan bahwa promotor OPN mengandung berbagai motif termasuk *sequence* kaya purin, *sequence* seperti *ets*, elemen respon vitamin D dan glukokortikoid, serta elemen *interferon-inducible*. Sitokin proinflamatori mampu menstimulasi transkripsi gen OPN dan ekspresinya. Contohnya, aktivasi makrofag dengan lipopolisakarida (LPS) dan nitrogen oksida (NO) menginduksi ekspresi gen dan sekresi protein OPN. Mediator klasik inflamasi akut seperti tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) dan interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sangat menginduksi ekspresi OPN, sedangkan mediator lain yang dapat menginduksi upregulasi OPN adalah angiostatin II, *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ), hiperglikemia dan hipoksia (Mazzali *et al.*, 2002).

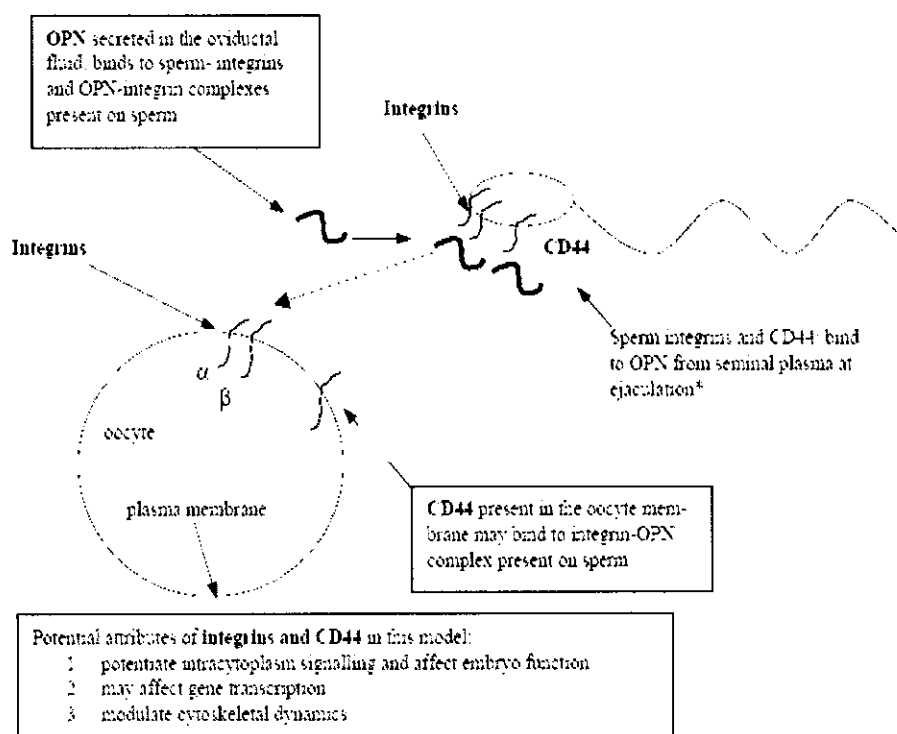
#### 2.4. Peran Osteopontin Pada Sistem Reproduksi

Brown *et al.* (1992) yang meneliti ekspresi OPN dalam jaringan manusia dewasa menemukan bahwa OPN ada pada permukaan lumen sel-sel epitel dari saluran cerna, kandung kemih, pankreas, dan saluran reproduksi dan urin. Ekspresi osteopontin telah diobservasi selama periode pre-implantasi pada berbagai spesies yakni manusia, kambing, babi, dan kelinci. Protein ini juga telah ditemukan dalam cairan dan epitel uterus, dengan konsentrasi tertinggi didapatkan selama fase luteal dari siklus birahi (Williams, 2009).

Osteopontin (OPN) adalah glikoprotein asam yang tersebar di seluruh tubuh. OPN ditemukan dalam konsentrasi yang lebih tinggi pada semen sapi jantan yang memiliki angka konsepsi yang tinggi. Osteopontin disekresi dalam ampula dan vesika seminalis saluran reproduksi sapi pejantan dan dipercaya mampu mengikat spermatozoa hasil ejakulasi dan terbawa ke tempat fertilisasi, protein ini akan memiliki peran yang penting dalam interaksi antara spermatozoa dan sel telur serta kejadian fertilisasi melalui sinyal pada sistem *secondary messenger*. Studi *in vitro* telah menemukan bahwa pre-treatment oosit sapi dengan OPN yang dimurnikan dapat meningkatkan laju fertilisasi, perkembangan embrio, dan menurunkan kejadian polispermia (Williams *et al.*, 2011).

Penelitian Moura *et al.*, (2007) mengungkapkan bahwa osteopontin yang berada dalam cairan kelenjar asesoris sapi Holstein dengan fertilitas yang tinggi memiliki keterkaitan dengan peningkatan penetrasi spermatozoa ke oosit. Selain itu, OPN juga dikatakan ligand yang potensial untuk reseptor integrin pada oosit sapi selama fertilisasi (Erikson *et al.*, 2007). OPN mengikat heterodimer  $\alpha_v\beta_3$

integrin pada jaringan melalui sekuens asam amino *Argine-Glycine-Aspartic acid* (RGD) untuk menyelenggarakan ikatan antar sel dan komunikasi matriks ekstraseluler. Melalui ikatannya dengan reseptor integrin  $\alpha_v\beta_3$ , OPN mampu mempengaruhi proliferasi sel, pengaturan sistem sitoskeletal, motilitas, apoptosis, dan fagositosis pada berbagai sel (Sodek *et al.*, 2000). Selain integrin, OPN terikat pada molekul permukaan membrane CD44 (Weber *et al.*, 1996).



Gambar 2.3 model untuk interaksi osteopontin dengan ejakulasi spermatozoa dan oosit (Moura, 2005). Studi ini menunjukkan bahwa OPN mempengaruhi tingkat perkembangan embrio pada tahap awal seperti yang diuji dengan fertilisasi *in vitro*.

Menurut Novack *et al.*, 2010, pada kuda protein plasma semen dengan berat 72-kDa telah teridentifikasi sebagai osteopontin kuda, dan memiliki hubungan dengan fertilitas. Osteopontin juga telah terlokalisasi pada spermatozoa ejakulat sapi dan dapat berperan dalam fertilisasi serta blok polispermia (Erikson

*et al*, 2007). Pada babi, penambahan osteopontin selama fertilisasi *in vitro* juga menurunkan laju polispermia dan meningkatkan daya kembang embrio setelah fertilisasi (Hao *et al*, 2008).

## 2.5. Plasma Semen

Menurut Novack *et al.*, 2010, plasma semen tersusun dari hasil sekresi kelenjar asesoris jantan dan epididimis, yang mengandung banyak komponen organik dan inorganik yang memiliki efek pada kualitas spermatozoa. Protein yang disekresi ke dalam plasma semen dapat berperan penting dalam kapastasi dan fertillisasi, serta dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan atau mempertahankan daya hidupnya.

Protein plasma semen memiliki keterkaitan dengan beberapa fungsi spermatozoa, termasuk kapasitasi dan reaksi akrosom. Terdapat hubungan antara protein-protein ini dengan penetrasi *in vitro* oosit sapi. Souza (2011) menyebutkan beberapa laporan tentang protein yang berpengaruh terhadap fertilitas dari cairan kelenjar asesoris (*accessory gland fluid/AGF*) seperti osteopontin, BSP-30kDa dan BSP-A1/A2 mampu mengikat membran spermatozoa ejakulat dan tetap terikat pada sel spermatozoa bahkan setelah kontak dengan cairan oviduk.

Analisis komprehensif proteome cairan kauda epididimis sapi berhasil mengidentifikasi berbagai protein seperti *lipocalin-type prostaglandin D synthase* (PGDS), albumin, transferrin dan nucleobindin. PGDS dilaporkan lebih prevalen pada plasma semen sapi dengan fertilitas yang tinggi. Selain itu, albumin menjadi 21% dari semua protein yang terdeteksi pada cairan kauda epididimis (*cauda epididymal fluid/CEF*) dan transferrin merupakan salah satu protein epididimis

yang utama. Protein ini berhubungan dengan kualitas spermatozoa dan fertilitas pada berbagai spesies, namun mekanisme terkait aksi protein ini masih belum sepenuhnya diketahui. Selain protein-protein yang disebutkan di atas, ada juga nukleobindin yang terdapat pada AGF dan CEF. Protein ini adalah protein multifungsi yang mengikat kalsium dan berpartisipasi dalam aktivasi jalur pensinyalan intraseluler, interaksi antar sel serta apoptosis, namun perannya dalam saluran reproduksi masih belum diketahui. Protein PGDS, nukleobindin dan BSP-A3 ditemukan mengikat spermatozoa ejakulat, namun albumin atau transferin tidak ditemukan (Souza, 2011).

## **2.6. Kapasitas Spermatozoa**

Spermatozoa mamalia tidak langsung mampu memfertilisasi sel telur setelah diejakulasikan. Setelah spermiasi, atau pelepasan spermatozoa ke dalam lumen tubulus seminiferus, spermatozoa dibawa ke rete testis dalam saluran testis ke epididimis dimana spermatozoa mengalami tahap akhir maturasi (Erikson, 2006). Setelah ejakulasi, spermatozoa mamalia tidak langsung mampu memfertilisasi sel telur. Sel spermatozoa mulai mampu memfertilisasi setelah serangkaian kompleks modifikasi selama periode waktu tertentu saat berada pada saluran reproduksi betina (Grasa *et al.*, 2009).

Chang (1951) dan Austin (1951) mendemonstrasikan bahwa spermatozoa mendapatkan kemampuan memfertilisasi setelah berada dalam saluran reproduksi betina selama beberapa saat. Setelah observasi mereka, banyak studi yang mengkonfirmasi bahwa lingkungan saluran reproduksi betina menginduksi serangkaian perubahan fisiologis spermatozoa, perubahan ini disebut dengan

“kapasitasi”. Berbagai bukti menunjukkan bahwa perubahan fungsional yang terjadi pada spermatozoa selama kapasitasi bukanlah satu kejadian saja, namun merupakan kombinasi serangkaian proses (Salicioni *et al.*, 2007). Selama proses kapasitasi, spermatozoa mengalami proses remodelling yang dicirikan dengan sejumlah transformasi biokimia dan biofisik sehingga spermatozoa mendapatkan kemampuannya memfertilisasi ovum (Grasa *et al.*, 2009).

Salicioni *et al.*, (2007) membagi proses kapasitasi menjadi dua kejadian: 1. Kejadian cepat seperti inisiasi motilitas spermatozoa, terjadi segera setelah spermatozoa dilepaskan dari epididimis, dan 2. Kejadian lambat seperti perubahan pola motilitas (contoh: hiperaktifasi) dan akuisisi kemampuan spermatozoa untuk mengalami reaksi akrosom yang terstimulasi agonist, yang hanya diaktifkan setelah periode waktu tertentu dalam kondisi yang mendukung kemampuan spermatozoa untuk memfertilisasi sel telur. Selain kejadian-kejadian tersebut, kapasitasi juga merupakan hasil proses-proses yang terjadi bersamaan yang melibatkan perubahan pada level molekuler yang terjadi pada kepala dan ekor spermatozoa (Salicioni *et al.*, 2007).

Erikson (2006) menyebutkan selama kapasitasi, spermatozoa mengalami perubahan substansial. Perubahan ini meliputi modifikasi atau lepasnya antigen permukaan, perubahan distribusi partikel intra membran, perubahan “charge” permukaan jaringan, perubahan moieties karbohidrat dari glikoprotein permukaan, serta perubahan sterol membran, perubahan ion intrasel, *siste adenilat siklase* cAMP dan membran plasma.



Lokasi *in vivo* kapasitasi belum dapat ditemukan, proses ini bisa terjadi di uterus dan dipercepat dengan terpaparnya spermatozoa uterus dan oviduk. Studi terakhir menggunakan cairan oviduk dari berbagai regional dan stadium serta media terkondisi dari kultur epitel oviduk, telah menunjukkan bahwa istmus merupakan tempat dimana kapasitasi spermatozoa mungkin terjadi (Erikson, 2006). Meskipun kapasitasi secara alami terjadi di saluran reproduksi betina, namun kapasitasi dapat dibuat secara *in vitro* menggunakan media tertentu dan kondisi fisik tertentu (Ded *et al.*, 2010).

Salah satu kemajuan penting dalam hal kapasitasi adalah ditemukannya bahwa *heparin-like glycosaminoglikan* dalam cairan oviduk merupakan agen kapasitasi yang potensial dan bahwa spermatozoa dapat dikapasitasi buatan dengan heparin. Meskipun metode lain kapasitasi juga ada, namun kapasitasi dengan heparin adalah metode yang lebih disukai. Mekanisme bagaimana heparin mengkapasitasi spermatozoa telah diketahui dan meliputi regulasi fosforilasi protein tyrosine, peningkatan pH intraseluler, dan peningkatan kalsium intraseluler. Perubahan dalam kalsium intraseluler diatur oleh sistem ekstrusi  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, *antiporter/changer*  $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ , channel kalsium yang diaktifkan voltase dan kalsium tersimpan intraseluler, termasuk influks kalsium ke dalam reservoir akrosom. Peningkatan pH intraseluler mungkin dikarenakan pergerakan ion bikarbonat ke dalam spermatozoa. Bikarbonat telah teridentifikasi sebagai zat penting untuk kapasitasi spermatozoa, namun hanya sedikit yang diketahui tentang trasportnya melalui membran spermatozoa. Bikarbonat mengatur metabolisme cAMP spermatozoa dengan menstimulasi adenil siklase. Perubahan

sistem adenil siklase telah didemonstrasikan dalam kapasitas spermatozoa (Erikson,2006).

Kapasitasi juga melibatkan *effluks* kolesterol dari membran spermatozoa, dengan albumin yang ada di oviduk maupun media kapasitas in vitro bertindak kolesterol dengan mengeluarkannya dari membran spermatozoa. Induksi parsial kolesterol effluks dapat distimulasi oleh protein-protein BSP secara in vitro. Pengeluaran kolesterol menyebabkan perubahan rasio kolesterol/fosfolipid dari membran spermatozoa, hal ini juga mengakibatkan redistribusi komponen membran: karakteristik redistribusi ini adalah meningkatnya motilitas fosfolipid membran, konsentrasi pospatidilkolin ke bagian dalam membran dan produksi lisoposolipid fusogenik (Erikson 2006).

## **2.7. Reaksi Akrosom**

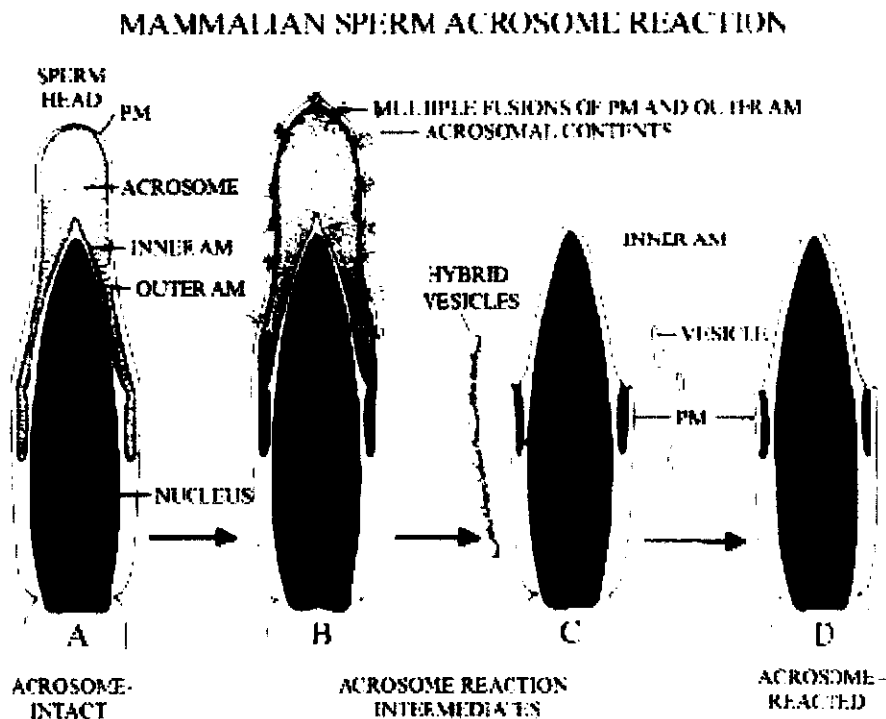
Akrosom adalah struktur mirip tudung pada bagian anterior kepala spermatozoa. Terdapat tiga lapisan pada akrosom spermatozoa sapi: membran dalam, membran luar, dan lapisan tengah. Membran dalam dan luar saling bersambung pada tepi posterior akrosom dengan isi akrosom terkandung sepenuhnya dalam membran ini. Membran luar terletak dekat dengan membran plasma sel, sedangkan membran dalam sangat dekat dengan penutup nukleus. Analisa akrosom menyatakan bahwa akrosom kaya akan karbohidrat, termasuk glukosa, manosa, fruktosa, galaktosamin, glukosamin, dan asam sialik. Isi akrosom, dibebaskan saat lengkapnya reaksi akrosom, termasuk asam phosphate,

$\beta$ -glucuronidase, n-acetylglucosaminidase, trypsin-like protease serta akrosin (Erikson, 2006).

Reaksi akrosom adalah kejadian eksositotik khusus dimana terjadi fusi membran akrosom luar dan plasma membran di atasnya pada sejumlah titik, yang mengakibatkan pelepasan enzim hidrolitik dan didapatkannya domain membran yang baru, kedua proses ini sangat penting untuk proses fertilisasi (Grasa *et al.*, 2009). Fisiologi reaksi akrosom terjadi saat interaksi spermatozoa dengan protein zona pellusida ZP3. Hal ini diikuti oleh pembebasan beberapa enzim akrosom dan unsur-unsur lain yang memfasilitasi penetrasi zona dan lepasnya molekul pada segmen equatorial spermatozoa yang memungkinkan fusi membran spermatozoa dengan oolemma (Erickson *et al.*, 2007).

Menurut Erikson (2006), kejadian utama dalam reaksi akrosom adalah influks kalsium terus menerus secara langsung bertanggung jawab akan eksositosis. Studi-studi telah menunjukkan bahwa eksositosis isi akrosom memiliki beberapa kesamaan dengan pembentukan vesikel eksositotik pada sel-sel sekretori. Pengikatan spermatozoa pada ZP3 menghasilkan pembukaan channel kalsium teraktifasi voltase rendah, menyebabkan influks kalsium yang sementara dan aktifasi protein G seperti  $G_{i1}$  dan  $G_{i2}$ . Phospholipase C (PLC) kemudian diaktifkan, peningkatan pH intraseluler dan menghasilkan influks kalsium yang terus-menerus. Aktifasi adenil siklase serta peningkatan cAMP juga terjadi, menyebabkan aktivasi protein kinase dan  $Ca^{2+}$  serta phospholipid-dependent kinase. Peningkatan kalsium menstimulasi phospholipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) suatu enzim yang dapat membelah asam lemak dari phospholipid, membentuk

lisophospholipid. Hal ini akan mendorong fusi dan vesikulasi membran spermatozoa, membentuk vesikel hibrid dari plasma dan membran akrosom luar. Pada akhirnya ini akan memungkinkan pelepasan isi akrosom pada tempat binding antara spermatozoa dan zona, menghasilkan penetrasi spermatozoa melalui ZP.

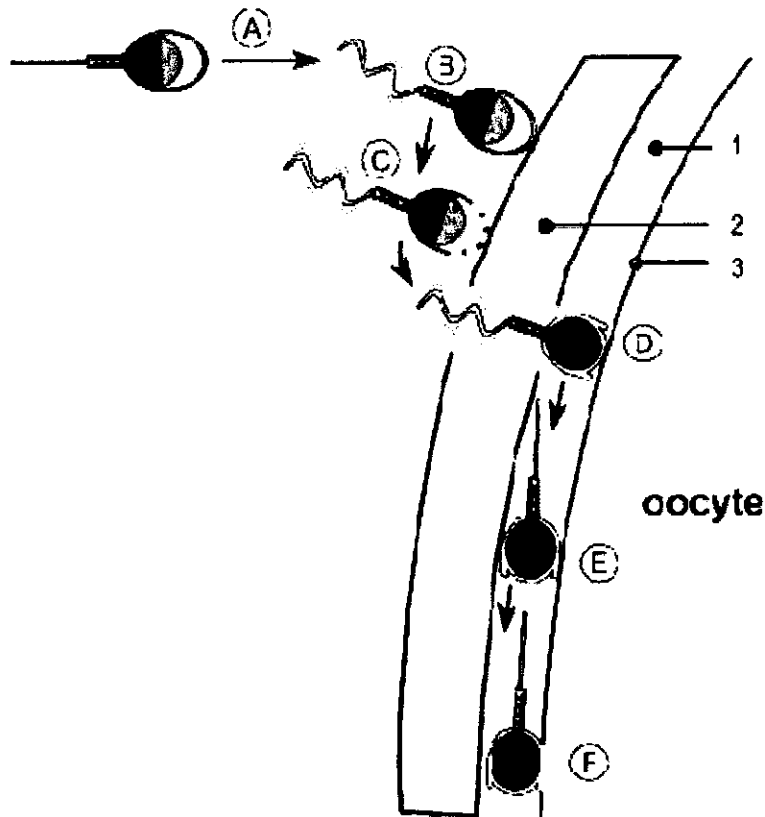


Gambar 2.4. Reaksi Akrosom Spermatozoa (Wassarman, 1999)

## 2.8. Proses Fertilisasi

Menurut Wassarman (1999) fertilisasi diartikan sebagai proses penggabungan dua sel germinal, sel telur dan spermatozoa, jumlah kromosom somatik kembali dan perkembangan individu baru yang mencirikan spesiesnya dimulai. Jika fertilisasi gagal terjadi, baik spermatozoa dan sel telur berdegenerasi

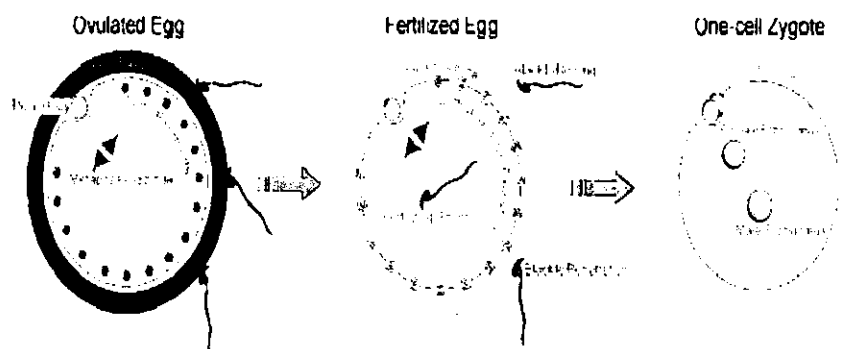
dengan cepat dalam saluran reproduksi betina, karena sel-sel yang sangat terdeferensiasi tidak mampu bertahan sendiri dalam waktu lama.



Gambar 2.5 fase fertilisasi mamalia. (A) proses ejakulasi sel spermatozoa dalam saluran kelamin betina yang disebut kapasitasi. (B) sel spermatozoa yang motil dan mampu mengikat matriks ekstraselular (ZP). (C) Pengikatan sel spermatozoa ke ZP memicu terjadinya reaksi akrosom dan ekskresi enzim. (D) enzim hidrolitik dikeluarkan dari akrosom oleh sel spermatozoa untuk menembus ZP, memasuki *perivitelline space* dan mengikat oolemma dengan ujung apikal. (E) Setelah ujung apikal terikat, oolemma merubah dan terjadi ikatan akrosom bereaksi dengan sel spermatozoa. (F) Setelah struktur permukaan spermatozoa mengikat oolemma, sel spermatozoa dengan oosit dan sel spermatozoa kemudian bergabung dalam oosit. (1): *perivitelline space*; (2) ZP; (3) oolemma (membran plasma telur). Sumber: Erikson, 2006.

Proses fertilisasi dapat dibagi menjadi tujuh kejadian berbeda yang meliputi: 1. *Binding* spermatozoa ke ZP, 2. Reaksi akrosom, 3. Penetrasi ZP, 4.

*Binding* spermatozoa pada membran plasma oosit, 5. Fusi membran spermatozoa dan oosit, 6. Inkorporasi kepala spermatozoa ke dalam ooplasma dan pembentukan pronukleus jantan, 7. Singamy, fusi pronukleus jantan dan betina. Setelah terlengkapinya semua tahap, oosit telah difertilisasi dan menjadi sebuah zigot, dan spermatozoa lain tidak bisa lagi berinteraksi dengan ZP (Erikson, 2006).



Gambar 2.6 Proses Fertilisasi (Hoodbhoy, 2004)

Keterangan :

- Spermatozoa menembus ke sel kumulus dan korona radiate, melekat pada zona pelusida
- Spermatozoa menembus zona pelusida dan berfusi dengan selaput vitelin. Reaksi Zona diawali dengan hilangnya granula kortikal
- Spermatozoa masuk dalam sitoplasma oosit. Vitellin block terbentuk.
- Sitoplasma menyusut, benda kutub kedua terdesak masuk keruang perivitellin, pro nukelus jantan dan betina terbentuk.
- Terjadi syngami
- Terbentuk zygot.

Erikson (2006) juga menjelaskan bahwa spermatozoa berikatan dengan oosit dalam tiga tahap kejadian. Pertama spermatozoa kontak dengan sel-sel kumulus dan matriks ekstraseluler hyaluronik dari sel telur, kedua spermatozoa

kontak dengan struktur yang mengelilingi oosit yakni zona pellusida. Terakhir, spermatozoa mengikat dan fusi dengan membran plasma oosit.

Penelitian tentang fertilisasi *in vitro* menunjukkan adanya barrier untuk mencegah fertilisasi interspesies dan ZP menjadi barrier utamanya. Pengeluaran ZP dari sel telur akan membuat membran plasma sel telur berhubungan langsung dengan spermatozoa, hal ini akan menurunkan barrier bagi fertilisasi antar spesies *in vitro* (Wassarman, 1999).

## **BAB 3**

# **KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS**



## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

### 3.1 Kerangka Konseptual

Kriopreservasi spermatozoa merupakan teknik yang berperan penting untuk kebanyakan mamalia dalam kelestarian jenisnya. Kesuksesan kriopreservasi spermatozoa ditunjukkan oleh kualitas spermatozoa beku yang dicairkan kembali. Penggunaan semen beku sebagai sumber spermatozoa pada teknologi fertilisasi *in vitro* telah banyak dilakukan, namun demikian kualitas spermatozoa pasca *thawing* sangat menentukan keberhasilan fertilisasi *in vitro*. Beberapa studi menunjukkan bahwa spermatozoa hasil kriopreservasi dengan kualitas yang baik masih dapat membuahi ovum yang telah dilakukan dengan sukses secara IVF diikuti kultur embrio dan transfer embrio (Sztein *et al.*, 2000).

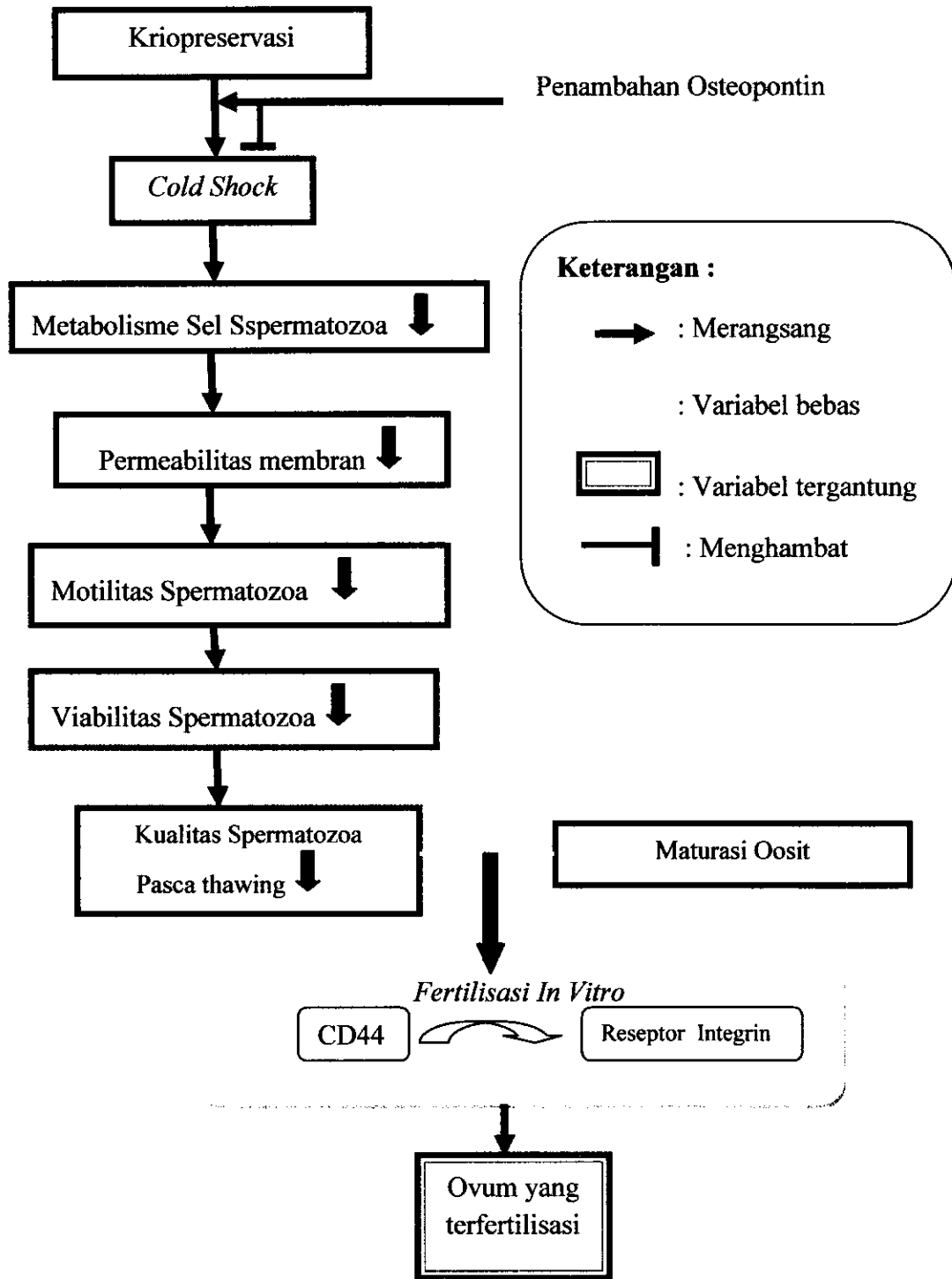
Kerusakan berbagai organel spermatozoa sapi akibat kriopreservasi berpengaruh terhadap fungsi dan fertilitas spermatozoa. Manifestasi akibat *cold-shock* secara umum antara lain yaitu penurunan metabolisme sel, perubahan permeabilitas membrane, hilangnya motilitas spermatozoa secara *irreversible* dan menurunnya viabilitas spermatozoa (Lemma, 2011). Kerusakan membran, motilitas, dan penurunan viabilitas spermatozoa merupakan variabel penting yang diamati sehubungan dengan proses kriopreservasi (Martin *et al.*, 2004).

Kemampuan spermatozoa untuk hidup dan matang serta konsentrasi dan motilitas progresif spermatozoa dalam medium *in vitro* sangat menentukan tingkat keberhasilan fertilisasi *in vitro* dan perkembangan embrio tahap praimplantasi. Oleh karena itu dibutuhkan senyawa yang dapat mendukung proses kapasitasi dan

fertilisasi secara *in vitro*. Studi sebelumnya telah membuktikan bahwa spermatozoa yang telah diinkubasi dengan senyawa tertentu ternyata mampu meningkatkan kualitasnya pasca *thawing*.

Osteopontin merupakan ekstraselular matriks phosphoprotein yang disekresikan oleh kelenjar ampula dan tuba falopii dan berhubungan dengan fertilitas pejantan. Osteopontin dapat menstabilkan membran plasma karena dapat menstabilkan ikatan kovalen penyusun protein membrane plasma. Membran plasma yang utuh akan mengakibatkan metabolisme spermatozoa berjalan lancar sehingga hasil metabolisme yang berupa ATP dapat digunakan untuk mempertahankan kondisi spermatozoa tetap hidup dan bergerak aktif (Erikson, 2006).

Osteopontin memiliki fungsi dalam *cell adhesion* dan komunikasi *matriks cell-extracellular*, karena itulah osteopontin berperan pada interaksi spermatozoa-ooosit dan proses fertilisasi. Osteopontin dalam spermatozoa memicu aktivasi peningkatan signal transduksi yakni CD44 yang mengikat integrin, yang selanjutnya mengakibatkan reseptor ovarium (zona pellusida-3 (ZP3)) lebih mudah mengenali spermatozoa tersebut sehingga spermatozoa mudah mengalami fusi ke dalam sel ovum. Meningkatnya kualitas spermatozoa ini diharapkan angka fertilisasi juga meningkat (Moura, 2005).



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

### 3.3. Hipotesis

Suplementasi osteopontin pada spermatozoa sapi Friesian Holstein (FH) sebelum pembekuan dapat meningkatkan angka fertilisasi (*fertilization rate*) oosit sapi hasil maturasi *in vitro*.

## **BAB 4**

# **MATERI DAN METODE**

## BAB 4 MATERI DAN METODE

### 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Sampel penelitian dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol (P0) dan kelompok perlakuan (P1). Kelompok (P0) menggunakan semen beku tanpa suplementasi osteopontin, sedangkan kelompok (P1) menggunakan semen beku yang telah disuplementasi osteopontin dengan dosis 10 µg/50 juta spermatozoa (Erikson, 2006).

### 4.2 Subyek Penelitian

#### 4.2.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah semen sapi perah FH segar yang berumur 3-4 tahun yang terdapat di Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Semen diperoleh dengan penampungan menggunakan vagina buatan.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovarium yang didapatkan dari sapi *Friesian Holstein* yang dipotong di RPH Bajangan, Gondangwetan Pasuruan. Adapun kriteria oosit yang digunakan adalah oosit dari sapi *Friesian Holstein* (FH) dewasa, dengan sitoplasma bergranul dan memiliki membran sel yang masih utuh.

#### 4.2.2 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 2 macam perlakuan berbeda, dengan demikian ulangan yang diperlukan adalah sebanyak :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$2(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 7,5$$

$$n \geq 8,5$$

Keterangan: t = perlakuan; n = ulangan

Jumlah pengulangan yang diperlukan adalah 9 untuk masing-masing perlakuan (Kusriningrum. 2008), dengan jumlah oosit untuk satu ulangan adalah 6 pada masing-masing perlakuan.

### 4.3 Variabel Penelitian

**4.3.1 Variabel bebas** : dosis suplementasi OPN yaitu tanpa suplementasi osteopontin 0 $\mu$ g/50 juta spermatozoa dan dengan suplementasi osteopontin dosis 10 $\mu$ g/50 juta spermatozoa (Samik, 2013).

**4.3.2 Variabel tergantung** : Angka fertilisasi

**4.3.3 Variabel terkontrol** : *diluter* semen beku, pembuatan *diluter*, umur pejantan, volume semen, suhu sampel, kualitas oosit, prosedur Fertilisasi *in vitro*, media Fertilisasi *in vitro* dan kelembapan Inkubator CO<sub>2</sub>.

#### 4.3.4 Definisi Operasional Variabel

- a. Osteopontin adalah protein dengan berat molekul 55-75 kDa yang diisolasi dari plasma semen sapi perah dan dikenali oleh monoklonal antibodi OPN dan berfungsi sebagai *bio-marker* kesuburan semen.
- b. Angka fertilisasi adalah perbandingan antara jumlah sel telur yang dibuahi (ditandai dengan lepasnya *polar body* atau terbentuknya 2 pronukleus atau zygot) dengan jumlah keseluruhan sel telur yang difertilisasi.

#### 4.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: air suhu 45-55°C, vaselin, semen segar, NaCl fisiologis, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7, susu skim, kuning telur, akuades, gliserol, antibiotika penicillin dan streptomycin, akuades, N<sub>2</sub> cair, zat warna eosin-negrosin, Skim 5%, protein osteopontin (semen beku tanpa penambahan OPN dan dengan penambahan OPN) (Samik, 2013), media BO-cafein, PBS-tween, media HTF, BSA (bovine serum albumin), pronase 0,5% , Follicle Stimulating Hormone (FSH), Luteinizing Hormone (LH), PBS, NaCl fisiologis, gentamicin sulfat, Brackett dan Oliphant, kafein, HEPES, BSA, hyaluronidase, paraformaldehyde.

#### 4.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April - Oktober 2013 di Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya dan laboratorium *in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.



#### 4.6 Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: vagina buatan, tabung berskala, kertas label, aluminium foil, *thermometer*, kertas lakmus, tabung Erlenmeyer, pipet hisap volume 10ml, gelas ukur 100 ml, *beaker glass* (10 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml), pipet Pasteur (Volac), spuit, jarum 20G, cawan steril, mikroskop bisecting, mikroskop inverted, tabung reaksi, sentrifus, inkubator, dan pembakar api Bunsen. pengaduk gelas, pipet Pasteur, cawan petri, pipet mikro, *autoclave*, timbangan analitik, mikrotube, mikroskop cahaya, obyek *glass*, sentrifus, lemari es, *vortex*, tabung reaksi, *waterbath*, tisu, straw, *filling* dan *sealing box*, spektrofotometer, incubator CO<sub>2</sub>.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

- a. Semen beku tanpa suplementasi OPN (0 µg/50 juta spermatozoa) dan yang tersuplementasi OPN (10µg/50 juta spermatozoa) (Samik, 2013).
- b. Semen Beku dilakukan *swim up* dan dilanjutkan dengan pemeriksaan profil protein seminal plasma semen beku sapi FH dengan menggunakan SDS-PAGE.
- c. Koleksi oosit.
- d. Maturasi Oosit
- e. Preparasi Fertilisasi In Vitro.
- f. Melakukan pemeriksaan terhadap pembentukan pro-nukleus hasil FIV yang berasal dari spermatozoa dengan pemberian OPN dan tanpa pemberian OPN.

g. Melakukan pemeriksaan terhadap hasil FIV yang berasal dari spermatozoa dengan tanpa suplementasi OPN dan suplementasi OPN.

#### 4.8 Koleksi Oosit

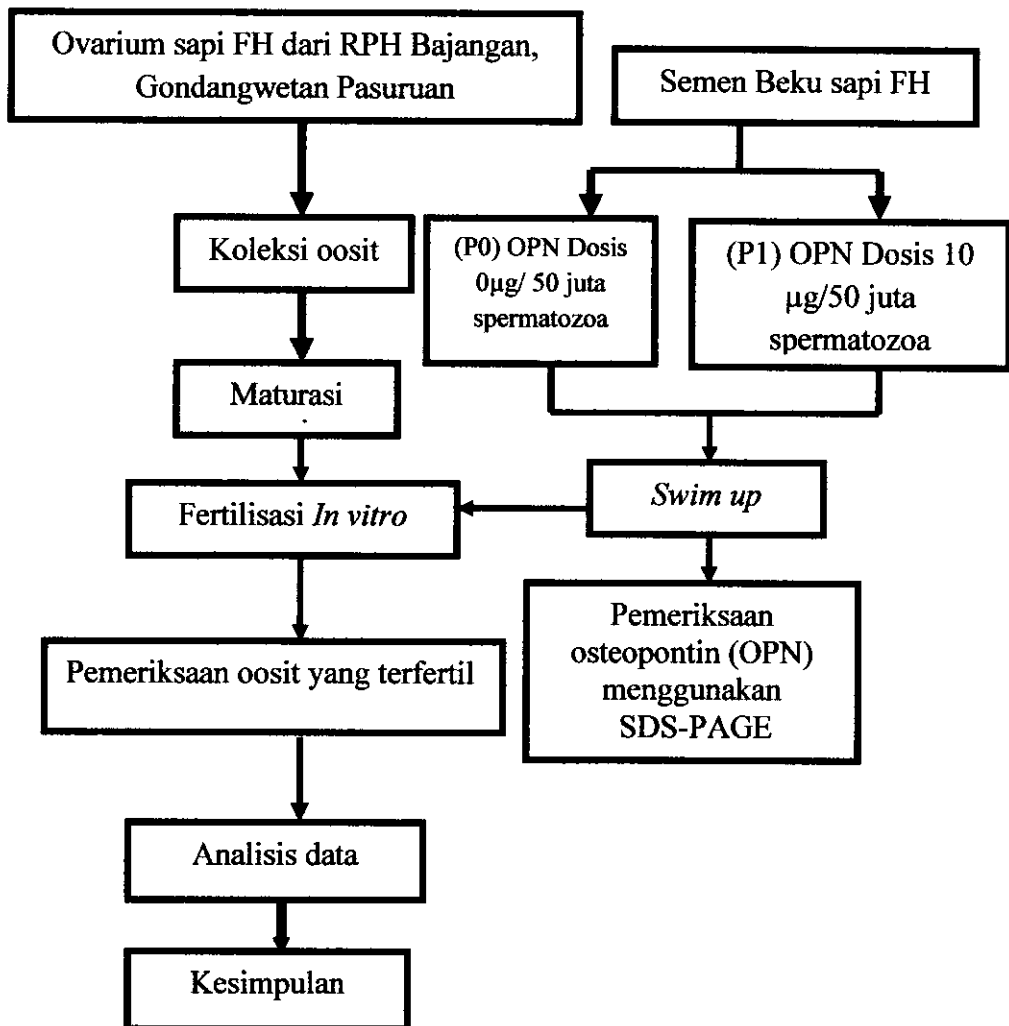
Ovarium sapi diperoleh dari rumah potong hewan dan disimpan dalam NaCl 0,89% yang telah diberi tambahan gentamycin sulfat 50 µg/ml pada suhu 30 – 35°C. Ovarium yang berasal dari RPH Bajangan, Gondang wetan Pasuruan dicuci dengan NaCl fisiologis yang telah ditambah dengan gentamycin sulfat beberapa kali sampai cairan pencuci menjadi jernih. Koleksi oosit dilakukan dengan metode aspirasi follikel berukuran diameter antara 2 sampai 5 mm menggunakan jarum berukuran 20G yang dihubungkan dengan spuit 5 ml yang sebelumnya telah diisi 0,5 ml larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Selanjutnya oosit dicuci secara berturut-turut sebanyak tiga kali di dalam medium PBS dan tiga kali di dalam HTF. Oosit yang masuk dalam kelompok A dan B saja yang di maturasi secara *in vitro* (Widjiati dkk., 1998).

#### 4.9 Maturasi Oosit

Pada proses maturasi oosit digunakan medium HTF yang ditambah dengan 0,01 µg/ml FSH, 0,01 µg/ml LH, 3% BSA dan 50 µg/ml gentamycin sulfat. Selanjutnya oosit ditempatkan dalam cawan petri yang telah berisi medium tetes atau drop 50 µl dan ditutup dengan mineral *oil*, tiap tetes berisi 10 oosit. Pematangan oosit dilakukan pada suhu 38,5 °C di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 20 - 22 jam (Widjiati dkk., 2012).

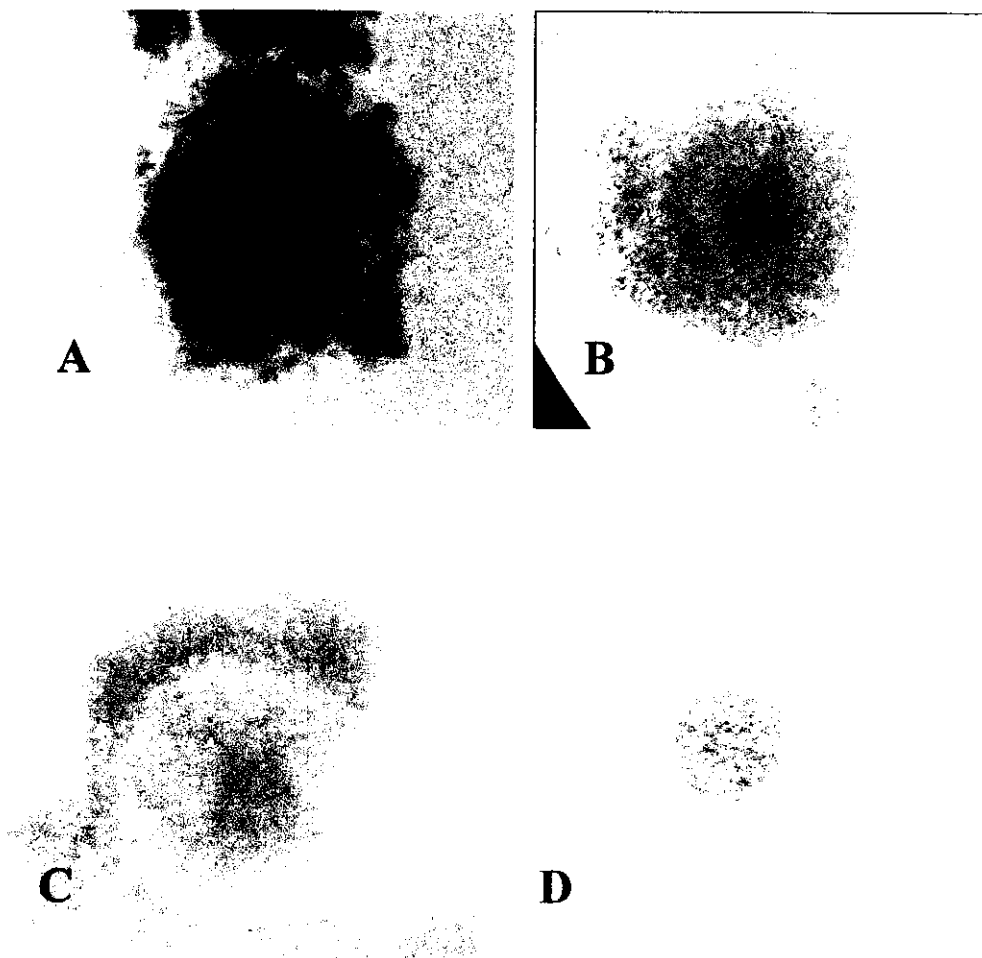
#### 4.10 Preparasi Fertilisasi In Vitro

Persiapan fertilisasi *in vitro* dipergunakan semen beku sapi FH berdasarkan kelompok perlakuan (P0 dan P1), semen dicuci dalam medium HTF 1 ml sebanyak dua kali. Selanjutnya, semen diencerkan dalam medium fertilisasi dan diinkubasi dalam incubator CO<sub>2</sub> 5% 30 menit untuk optimalisasi motilitas spermatozoa. Spermatozoa yang telah diinkubasi kemudian diinjeksikan ke dalam oosit yang telah dimaturasi dengan dosis  $1 \times 10^6$ /drop. Oosit yang sudah tercampur dengan spermatozoa kemudian diinkubasi kembali ke dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% ,suhu 38,5°C selama 24 jam. Angka fertilisasi diamati setelah diinkubasi selama 24, 48 dan 72 jam dengan melihat jumlah sigot, embrio dua sel dan embrio empat sel yang berkembang (Yanagimachi, 1994). Indikator terjadinya fertilisasi adalah terlihat badan kutub kedua dan bersatunya pronukleus jantan dengan pronukleus betina dan terbentuknya zigot (Toelihere, 1985).



**Gambar 4.1 Kerangka Operasional peneliti**

#### 4. 12 Evaluasi Hasil



Gambar 4.2 Morfologi oosit hasil koleksi ovarium sapi (A) oosit kualitas A, (B) oosit kualitas B, (C) oosit kualitas C, (D) oosit kualitas D, (1) kumulus oophorus, (2) ooplasma oosit.

Penilaian terhadap kualitas oosit yang dilakukan dalam penelitian ini mengacu pada Amer *et al.* (2008). Kualitas oosit diklasifikasikan menjadi 4 tipe, yaitu :

- Kualitas A : kumulus berlapis padat dengan lebih dari tiga lapisan dan ooplasma homogen

- Kualitas B : lapisan kumulus padat, satu sampai tiga lapis dengan ooplasma homogeny, memiliki penampakan kasar dan zona pellusida yang berwarna lebih gelap
- Kualitas C : lapisan cumulus tidak terlalu padat dengan bentuk ooplasma yang tidak beraturan dan memiliki lapisan gelap
- Kualitas D : oosit gundul tanpa lapisan kumulus

Oosit dievaluasi dengan melihat jumlah pronukleus yang terbentuk. Oosit dihitung terfertilisasi apabila memiliki lebih dari satu pronukleus (>1PN). Angka fertilisasi didapatkan dengan rumus berikut:

$$\text{Angka fertilisasi} = \frac{\text{Jumlah oosit yang terdapat polar body 2 (ootid) atau 2 pronukleus}}{\text{Jumlah total oosit yang dipakai dalam satu perlakuan}} \times 100\%$$

#### 4.13 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji-t *independent*. Hasil analisa uji-t akan didapat t hitung, apabila t hitung > t table pada tingkat kepercayaan 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) berarti hipotesis ( $H_0$ ) ditolak, artinya terdapat perbedaan nyata (significant differences), dan apabila t hitung < t table ( $\alpha = 0,05$ ) maka hipotesis  $H_0$  diterima, maka dua perlakuan yang dibandingkan tidak terdapat perbedaan yang nyata.

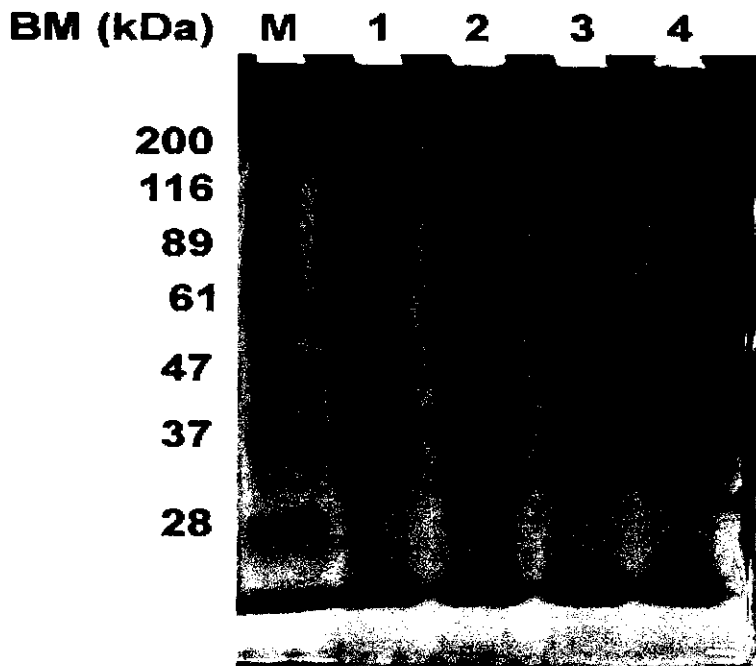
## **BAB 5**

# **ANALISIS HASIL PENELITIAN**

## BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN

### 5.1 Identifikasi profil protein seminal plasma pada Semen beku FH pasca *swim up* dengan SDS-PAGE

Spermatozoa sapi FH yang telah dibekukan dengan media yang telah ditambahkan OPN dilakukan *swim up* sebelum difertilisasikan secara in vitro. Hasil *swim up* spermatozoa dilakukan uji untuk mengetahui beberapa profil protein yang terdapat pada spermatozoa dari semen beku dengan menggunakan metode SDS page.

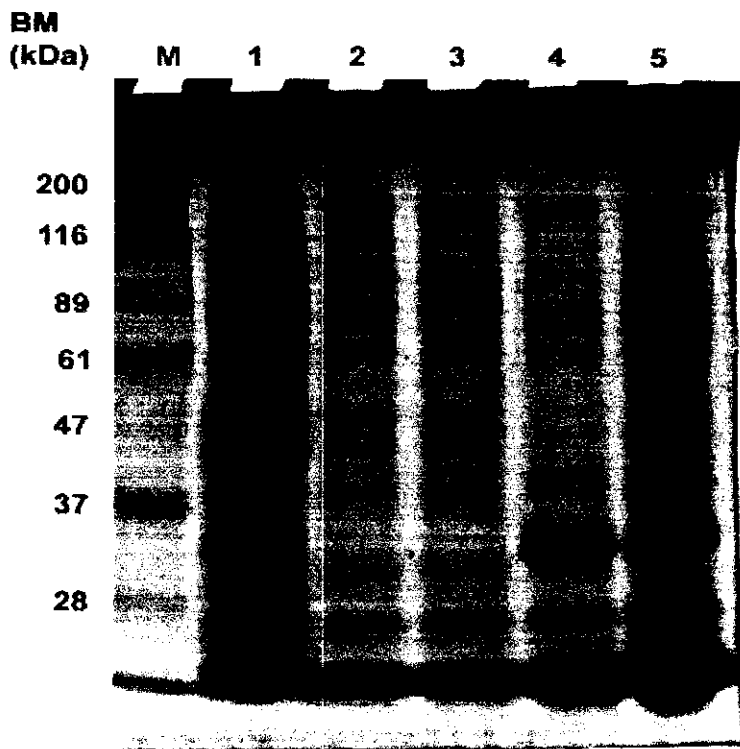


Gambar 5.1. Hasil Konfirmasi Osteopontin (OPN) *after swim up* (P0)

Keterangan : M = Marker Protein

1- 4 = Sampel semen beku (P0) tanpa Suplementasi OPN





Gambar 5.2. Hasil Konfirmasi Osteopontin (OPN) *after swim up* (P1)

Keterangan : M = Marker Protein

1-5 = Sampel Beku semen beku dengan Suplementasi OPN

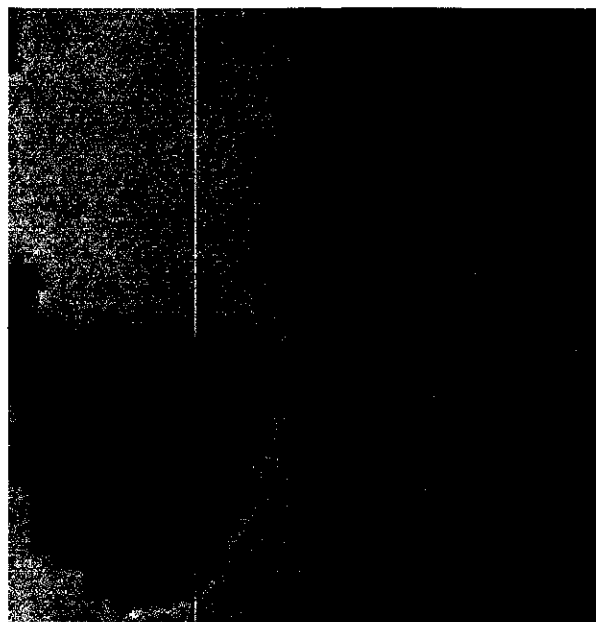
Hasil *running* pada penelitian ini kualitas pitanya kurang jelas, hal ini kemungkinan disebabkan cara fraksinasinya kurang sempurna sehingga banyak protein yang saling berikatan. Hasil *running* yang baik akan mempengaruhi kualitas pita protein dan gambaran pita protein yang baik. Kualitas dari pita protein yang baik dapat dihasilkan dari adanya kebersihan isolat saat *running*. Gambaran pita protein yang baik dapat dihasilkan oleh tingkat kemurnian isolat dan fraksinasi protein yang baik (Fujiwati, dkk., 2008).

## 5.2 Suplementasi OPN dalam semen beku Spermatozoa sapi *Friesian Holstein* (FH) terhadap fertilisasi *In Vitro* (%)

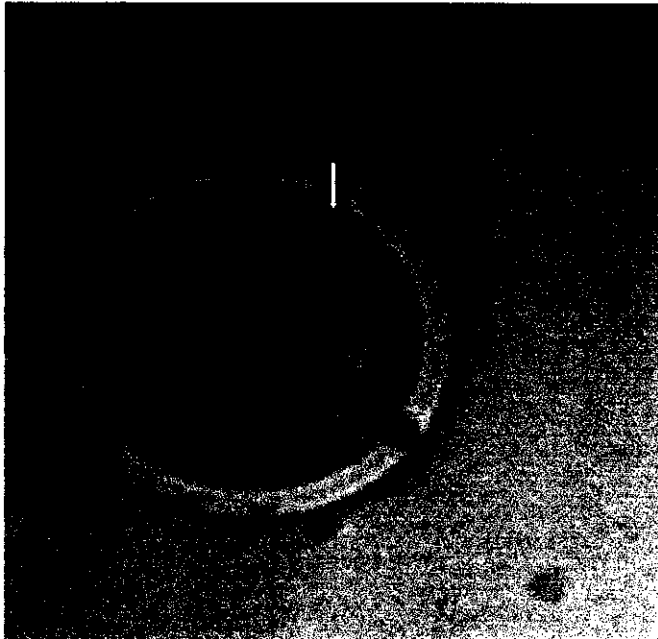
Oosit yang telah difertilisasi, diamati setelah 18 jam untuk melihat jumlah sel oosit yang terfertilisasi. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel, grafik foto atau gambar yang disusun sesuai dengan tahapan penelitian yaitu:

sebelum dilakukan fertilisasi *in vitro* (Gambar 5.3). Fertilisasi *in vitro* dilakukan menggunakan semen beku tanpa OPN dan yang telah di suplementasi dengan osteopontin dengan dosis 10 µg/ 50 juta spermatozoa. Kemudian, keberhasilan fertilisasi *in vitro* dilihat berdasarkan lepasnya *polar body* 2 atau terbentuknya 2 pronukleus yang setelah fertilisasi.

Angka fertilisasi pada kedua perlakuan yakni P0 dan P1 dilakukan setelah inkubasi oosit dan spermatozoa selama 18 jam unuk mengetahui pengaruh osteopontin pada spermatozoa sapi terhadap laju fertilisasi (*fertilization rate*) oosit sapi hasil maturasi *in vitro*. Angka fertilisasi didapatkan dengan membandingkan antara jumlah sel telur yang dibuahi (ditandai dengan lepasnya *polar body* 2) dengan jumlah keseluruhan sel telur yang difertilisasi (Gambar 5.4 dan Gambar 5.5).

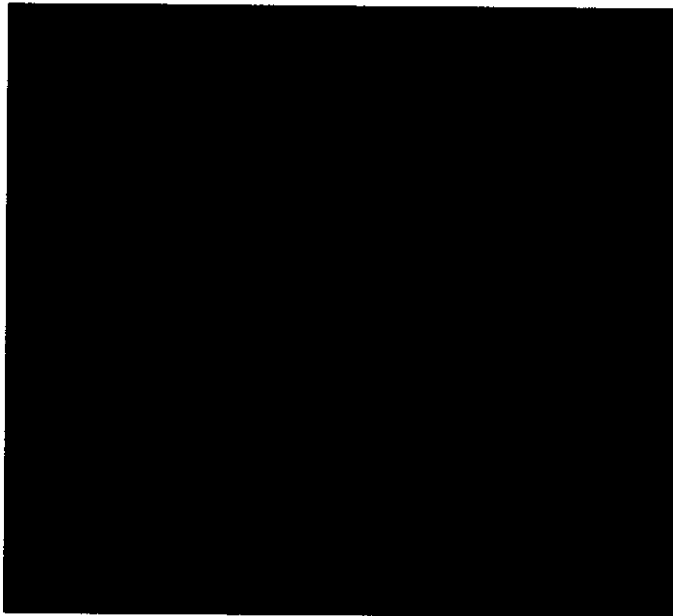


Gambar 5.3. Morfologi oosit setelah maturasi yang digunakan proses IVF adalah oosit sapi kualitas A dan oosit sapi Kualitas B.



Gambar 5.4. oosit yang mengalami pelepasan polar body II, polar body II ditunjukkan oleh tanda panah, (pembesaran 100X Nikon Japan)





Gambar 5.5. (1) Oosit dengan 2 Pronukleus (terfertilisasi), (2) Oosit dengan 1 Pronukleus (Tidak terfertilisasi), (A) Pronukelus Jantan ♂, (B) Pronukelus Betina ♀, (C) Zona Pellusida, (D) Spermatozoa. (E) 1 Pronukelus. (Pembesaran 100x, Nikon Japan).

Hasil analisis data angka fertilisasi (*fertilization rate*) oosit sapi hasil maturasi *in vitro* dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

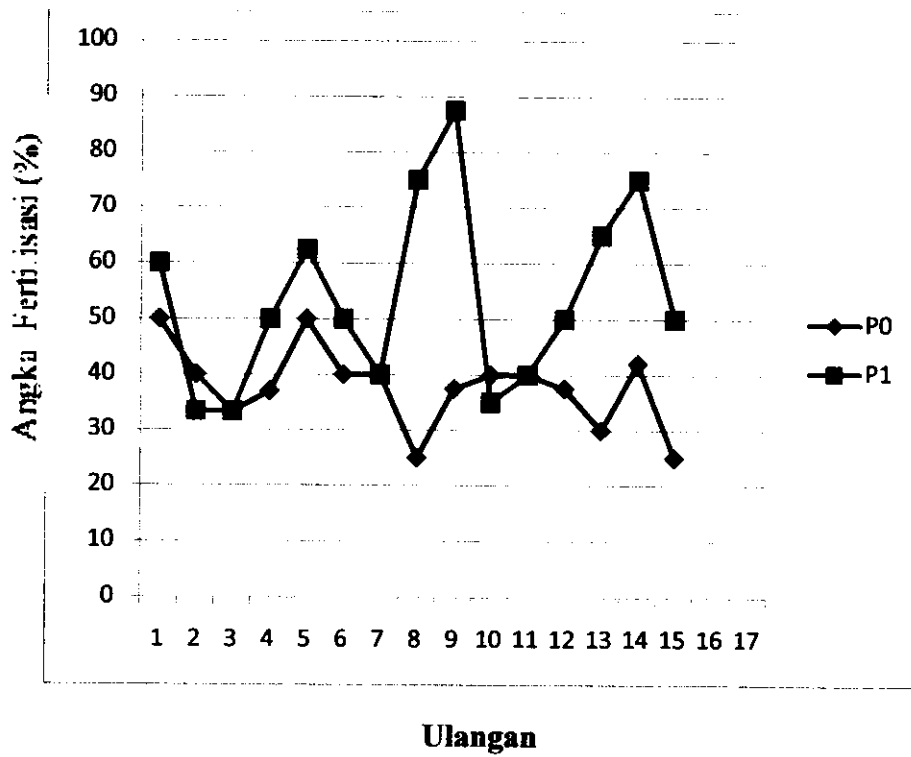
Tabel 5.1. Rerata dan Simpangan Baku Angka fertilisasi (*fertilization rate*) oosit sapi hasil maturasi *in vitro*

Perlakuan	Ulangan	Rerata Angka Fertilisasi (%) ( $\bar{X} \pm SD$ )
P0	15	37.8267 <sup>a</sup> ± 7.31051
P1	15	53.7867 <sup>b</sup> ± 16.68733

Keterangan : superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ )

P0: Oosit dengan zona utuh + spermatozoa beku tanpa suplementasi osteopontin

P1: Oosit dengan zona utuh + spermatozoa beku dengan suplementasi osteopontin



Gambar 5.6. Angka fertilisasi oosit sapi dengan spermatozoa beku yang tidak disuplementasi OPN (P0) dan dengan suplementasi OPN (P1)

# **BAB 6**

## **PEMBAHASAN**

## BAB 6 PEMBAHASAN

### 6.1 Pemeriksaan profil protein seminal plasma pada semen beku sapi FH Pasca *Swim up* dengan Metode SDS-PAGE

Sebelum dilakukan fertilisasi *In vitro* dilakukan pemeriksaan profil protein pada seminal plasma pasca *swim up* pada semen beku tanpa suplementasi Osteopontin (P0) dan dengan suplementasi Osteopontin (P1). Hal ini ditandai dengan melihat BM dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. Metode ini berdasarkan pada pergerakan partikel yang bermuatan melalui suatu gel disebabkan oleh pengaruh medan listrik yang dikutip dalam (Madyawati, 2008). Prinsip dari elektroforesis ini adalah kecepatan gerak dari protein dipengaruhi oleh berat molekul yaitu bila suatu protein mempunyai berat molekul kecil maka lajunya akan lebih cepat daripada protein yang memiliki berat molekul besar.

Hasil pemeriksaan profil protein semen beku sapi *Friessian Holstein* pasca *swim up* menggunakan metode SDS-PAGE (lampiran 2.1.3) secara keseluruhan P0 dan P1 ditemukan tiga belas pita protein yaitu 15,4 ; 19,74 ; 22,9 ; 30,82 ; 37,58 ; 48,13 ; 55,84 ; 61,66 ; 68,08 ; 75,17 ; 91,63 ; 111,71 ; 129,6 kDa. Hal ini sama dengan hasil penelitian sebelumnya yang dikutip oleh (Suprayogi, 2013) bahwa dalam plasma seminalis banyak protein yang terkandung, antara lain *bovine seminal plasma proteins* (BSP)-A1, BSP-A2, BSP A-3, Heparin binding protein (HBP) (Gwathmey, *et al.*, 2006), Osteopontin (Erikson *et al.*, 2007), clusterin, albumin, phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), nucleobindin, Prostaglandin-D synthase (Moura *et al.*, 2007), tirosin kinase (Leyton *et al.*, 1989; Madyawati, 2008) spermatozoadhesin Z13, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (TIMP-2)

(Odhiambo dan Dalley, 2011). Identifikasi profil protein menggunakan tehnik SDS – PAGE pada semen beku pasca *swim up* spermatozoa sapi FH menunjukkan pita – pita protein dengan mengkonversikan harga *Retardation Factor* (Rf) yang diperoleh pada persamaan regresi linier  $y = -1.290x + 2.349$ . Kurva hubungan antara Rf (sumbu X) dengan logaritma berat molekul protein standar (sumbu Y) (Lampiran 2.1.3). Pita protein pada P0 memiliki sebelas pita protein dan P1 berjumlah tiga belas pita protein dan selanjutnya dicocokkan dengan pita protein standar yang telah diketahui berat molekulnya.

Hasil pemeriksaan profil protein pada semen beku sapi FH pasca swim up tanpa suplementasi OPN (P0) ditemukan sebelas pita protein, yaitu 15, 4; 19,74; 22,9; 30,82; 37,58; 48,13; 61,66; 75,17; 91,63; 111,71; 129,6 kDa. Sedangkan suplementasi OPN (P1) ditemukan tiga belas pita protein, yaitu : 15,4; 19,74; 22,9; 30,82; 37,58; 48,13; 55, 84; 61,66; 68,08; 75,17; 91,63; 111,71; 129,6 kDa. Perbedaan yang terjadi pada pemeriksaan profil protein P0 dan P1 disebabkan karena adanya pengaruh suplementasi Protein OPN pada semen beku Sapi FH P1 sehingga pada semen beku P1 ditemukan 13 pita protein dan pada P0 hanya ditemukan 11 pita protein. Pemeriksaan profil protein P0 tidak ditemukan pita protein yang terdapat pada profil protein P1 yaitu 55,84 dan 68,08 kDa.

Protein dalam seminal plasma (BSP) *Bovine seminal plasma* mempengaruhi sifat sperma (Killian, 1992; Bellin et al, 1994 dikutip dari Chacur, 2012). Killian *et al.*, (1993) mendeteksi adanya protein dalam plasma semen yang berhubungan dengan fertilitas pejantan pada sapi Holstein. Penelitian yang menggunakan (2D) SDS-PAGE tersebut menemukan adanya empat macam protein yang berkaitan dengan



fertilitas, dua dari protein ini (berat molekul 26-kDa dan 55-kDa) diketahui tinggi kadarnya pada pejantan dengan fertilitas tinggi, sedangkan dua lainnya dengan berat molekul 16 kDa tinggi kadarnya pada pejantan yang kurang fertil. Salah satu dari keempat protein tersebut dengan berat 55-kDa setelah diidentifikasi oleh Cancele *et al.*, (1997) adalah osteopontin (OPN).

Sodek *et al.*, (2000) menjelaskan bahwa OPN pada mamalia dan avian memiliki jumlah asam amino yang sama, ukuran OPN yang dilaporkan bervariasi karena perbedaan dalam modifikasi post-translasional dan perbedaan saat dilakukan SDS-PAGE. Monaco *et al.*, (2008) Osteopontin pertama kali dijelaskan pada matriks tulang, tetapi juga telah terdeteksi pada sel epitel dan sekresi dari saluran pencernaan, ginjal, tiroid, kelenjar susu, saluran telur, rahim, plasenta, ovarium, dan testis. Secara struktural, OPN adalah satu rantai glikoprotein terfosforilasi asam yang memiliki panjang berkisar antara 264-301 asam amino dan mengalami modifikasi pasca-translasional yang menghasilkan berat molekul berkisar antara 25-75 kDa (Johnson, 1999). Killian *et al.*, (1993) Protein dengan berat molekul 55 kDa, ditemukan pada pejantan sapi FH yang memiliki tingkat fertilitas tinggi, yaitu OPN.

Hasil Identifikasi profil protein seminal plasma pada semen beku pasca *swim up* spermatozoa sapi FH pada P0 dan P1 (gambar 5.2 dan 5.1) dan berdasarkan perhitungan pada lampiran 2.1.3 diidentifikasi berat molekul osteopontin pada P0 dan P1 adalah 61,66 kDa dicocokkan dengan *range* BM standart OPN yaitu antara 55- 75 kDa. Erikson (2006) yang mengutip (Killian *et al.*, 1993 ; cancel *et al.*, 1997) menerangkan bahwa OPN terdapat pada plasma

semen sapi Friesian Holstein yang memiliki tingkat fertilitas tinggi, Plasma semen yang mengandung OPN pada sapi dengan tingkat kesuburan tinggi 2,5 kali lebih besar dibandingkan dengan sapi dengan tingkat kesuburan yang rendah . Studi yang meneliti tentang protein mengidentifikasi bahwa ampulla dan kelenjar vesicular merupakan sumber utama OPN dalam plasma semen, sedangkan ekspresi gen terdapat pada sel epitel dari ampulla dan germinal sel dalam tubulus seminiferus yang mengandung spermatid memanjang (Rodriguez *et al.*, 2000).

Pada penelitian ini identifikasi OPN pada semen beku pasca *swim up* sapi FH hanya dilakukan dengan tehnik SDS-PAGE yang seharusnya dilanjutkan identifikasi Protein dengan tehnik Western-Blot untuk memastikan bahwa protein dengan berat molekul 61,66 kDa tersebut benar – benar OPN. Hal ini dikarenakan, tidak tersedianya antibodi monoklonal yang akan direaksikan dengan protein OPN.

## **6.2 Pengaruh Supplementasi OPN dalam semen beku Spermatozoa sapi *Friesian Holstein* (FH) terhadap fertilisasi *In Vitro* (%)**

Fertilisasi *in vitro* adalah pembuahan sel telur oleh spermatozoa diluar tubuh, yaitu penetrasi sel telur oleh spermatozoa dalam suatu media biakan. Hal ini merupakan suatu cara untuk memproduksi embrio di luar tubuh suatu individu hewan dengan cepat dan murah, dibandingkan bila embrio diperoleh dari induk donor yang harganya mahal dan biaya pakan yang tinggi. Fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan cara memanfaatkan oosit dari ovarium yang berasal induk betina yang dipotong di rumah pematangan hewan (Yanamigachi, 1998 : Hunter, 1992 ; Triwulaningsih, 1992; Hafez, 1993 yang dikutip oleh Hernawati, 1998).

Faktor yang memegang peranan penting dalam keberhasilan pelaksanaan fertilisasi *in vitro* adalah lingkungan, kematangan oosit serta motilitas spermatozoa yang digunakan pada pembuahan oosit. Motilitas spermatozoa yang progressif ini memiliki kemampuan untuk menembus sel telur, tetapi sebelumnya harus mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom (Kim *et al*, 2008).

Rata-rata persentase oosit yang berhasil dibuahi dalam media HTF 5% masing-masing adalah tanpa suplementasi OPN (P0) sebesar  $37.8267^a \pm 7.31051$ , sedangkan dengan suplementasi OPN  $10\mu\text{g}$  (P1) sebesar  $53.7867^b \pm 16.68733$ . Setelah diuji statistik maka antara kelompok tanpa suplementasi OPN dengan suplementasi OPN terdapat perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Hal ini dapat dijelaskan bahwa suplementasi OPN dalam spermatozoa memiliki pengaruh positif terhadap angka fertilisasi oosit sapi dalam fertilisasi *in vitro*, bila dibandingkan spermatozoa yang tidak disuplementasi OPN. Penelitian Moura *et al.*, (2007) mengungkapkan bahwa osteopontin yang berada dalam cairan kelenjar asesoris sapi Holstein dengan fertilitas yang tinggi memiliki keterkaitan dengan peningkatan penetrasi spermatozoa ke oosit. Selain itu, OPN juga dikatakan ligand yang potensial untuk reseptor integrin pada oosit sapi selama fertilisasi (Erikson *et al*, 2007). Osteopontin mengikat heterodimer  $\alpha_v\beta_3$  integrin pada jaringan melalui sekuens asam amino *Argine-Glycine-Aspartic acid* (RGD) untuk menyelenggarakan ikatan antar sel dan komunikasi matriks ekstraseluler. Melalui ikatannya dengan reseptor integrin  $\alpha_v\beta_3$ , OPN mampu mempengaruhi proliferasi sel, pengaturan sistem sitoskeletal, motilitas, apoptosis, dan fagositosis pada

berbagai sel (Sodek *et al.*, 2000). Selain integrin, OPN terikat pada molekul permukaan membran CD44 (Weber *et al.*, 1996).

Osteopontin merupakan ligan yang terdapat pada plasma membran di reseptor CD44. CD44 dan varian lainnya yang merupakan *family* reseptor asam *hyaluronic* dan dapat mengikat protein matriks ekstraselular, seperti OPN selain ligan utama yaitu *hyaluronic acid* (Goodison *et al.*, 1999). Sementara Smith *et al* (1999) menyatakan bahwa interaksi CD44-OPN tidak umum pada fertilisasi *in vivo* dan Katagiri *et al* (1999) telah menunjukkan bahwa OPN hanya pada varian CD44 secara RGD-independen, beberapa studi menyatakan bahwa OPN, CD44, dan RGD-mengikat integrin ( $\text{Av}\beta 3$ ,  $\beta 1$  subunit) dapat bekerja sama dalam adhesi, *signaling*, dan stimulasi dalam motilitas berbagai jenis sel (Chellaiah *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003; Marroquin *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004). CD44 diekspresikan pada daerah akrosom sel sperma manusia (bains *et al.*, 2002), pada oosit babi (Kimura *et al*, 2002) dan sel-sel kumulus (Yokoo *et al.*, 2002). Glikoprotein transmembran CD44 ada dalam spermatozoa sapi, selain itu sub-unit integrin  $\alpha_v$  dan  $\alpha_5$  telah diidentifikasi terdapat pada spermatozoa sapi (Erikson *et al.*, 2003).

Jarak antara integrin dan ligand RGD-link yaitu OPN, membuat kuat salah satu sisi, dan memungkinkan membentuk struktur yang cocok pada pengikatan sel spermatozoa dan sel telur. Selain itu, pada OPN terjadi interaksi dengan glikoprotein transmembran CD44 yang terdapat dalam spermatozoa sapi (Bains *et al.*, 2002) dan oosit (Schoenfelder dan Einspanier, 2003). CD44 merupakan *family* dari *hyaluronic acid* yang berikatan dengan protein asam disebut *hyaludherins*, memiliki afinitas tinggi terhadap *hyaluronic acid* dan

komponen lainnya dari matriks ekstraseluler seperti kolagen, osteopontin dan metaloproteinase (Cichy dan Murni, 2003). Selain itu, CD44 menengahi adhesi sel dan sinyal transduksi yang mengarah ke aktivasi gen. OPN dalam spermatozoa mengikat dan berinteraksi dengan CD44 pada oosit sapi selama proses fertilisasi untuk memfasilitasi adhesi dan *signaling fertilization* (Erikson, 2007).

Pada membran spermatozoa terdapat OPN dan integrin, di oosit terdapat CD44 dan integrin yang ditunjukkan pada Gambar. 6.1 dan juga dilakukan uji fertilisasi *In vitro*. Inkubasi oosit sapi dengan cairan folikel oviduct dan antibodi agen 36 kDa terhadap OPN signifikan spermatozoa dapat mengikat zona pelusida dan perkembangan embrio (Gonçalves *et al.*, 2004).

Pengaruh OPN pada proses pengikatan antara interaksi sel spermatozoa dan oosit dapat memicu sinyal intra-selular melalui jalur utusan kedua. Ekspresi osteopontin baik dalam plasma semen dan cairan oviduct menunjukkan fungsi redundansi meskipun spermatozoa tidak dalam cairan spermatozoa ketika spermatozoa disimpan dalam saluran reproduksi betina. Ketersediaan OPN di oosit, sebagai tempat terjadi fertilisasi, menjadikan integrin dan reseptor CD44 bersaturasi pada permukaan spermatozoa, memaksimalkan terjadinya fusi oosit. Sebagai alternatif untuk melakukan *splicing*-MRNA, modifikasi pasca-translasi, dan fleksibilitas dari OPN, sekresi OPN dalam saluran betina mempengaruhi oosit sebelum terjadi kontak dengan spermatozoa. Osteopontin memiliki fungsi dalam *cell adhesion* dan komunikasi *matriks cell-extracellular*, karena itulah osteopontin berperan pada interaksi spermatozoa-ooisit dan proses fertilisasi. Osteopontin

dalam spermatozoa memicu aktivasi peningkatan signal transduksi yakni CD44 yang mengikat integrin, yang selanjutnya mengakibatkan reseptor ovarium (zona pellusida-3 (ZP3)) lebih mudah mengenali spermatozoa tersebut sehingga spermatozoa mudah mengalami fusi ke dalam sel ovum. Dengan meningkatnya kualitas spermatozoa ini diharapkan angka fertilisasi juga meningkat (Moura, 2005). Penelitian Hao *et al.*, (2006) yang menyelidiki pengaruh osteopontin dalam fertilisasi *in vitro* babi berhasil menemukan bahwa osteopontin dapat menurunkan polispermia serta meningkatkan efisiensi fertilisasi selama fertilisasi *in vitro* pada babi.

## **BAB 7**

# **KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh suplementasi Osteopontin (OPN) dalam semen beku sapi Friesian Holstein (FH) terhadap angka fertilisasi *in vitro* dapat diambil beberapa kesimpulan.

1. Perbedaan yang terjadi pada pemeriksaan profil protein P0 dan P1 disebabkan karena adanya pengaruh suplementasi Protein OPN pada semen beku Sapi FH P1 sehingga pada semen beku P1 ditemukan 13 pita protein dan pada P0 hanya ditemukan 11 pita protein. Pemeriksaan profil protein P0 tidak ditemukan pita protein yang terdapat pada profil protein P1 yaitu 55,84 dan 68,08 kDa.
2. Suplementasi OPN dalam spermatozoa dapat meningkatkan angka fertilisasi oosit sapi dalam fertilisasi *in vitro*, bila dibandingkan spermatozoa yang tidak disuplementasi OPN.



## 7.2 Saran

Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik pada penelitian ini perlu dilanjutkan beberapa saran :

1. Pada penelitian ini identifikasi OPN pada semen beku pasca *swim up* sapi FH hanya dilakukan dengan tehnik SDS-PAGE yang seharusnya dilanjutkan identifikasi Protein dengan tehnik Western-Blot untuk memastikan bahwa protein dengan berat molekul 61,66 kDa tersebut benar – benar OPN. Hal ini dikarenakan, tidak tersedianya antibodi monoklonal yang akan direaksikan dengan protein OPN.
2. Fertilisasi *in vitro* dilanjutkan hingga ke tingkat 2 sel sampai 4 sel
3. Penambahan OPN dalam pembuatan semen beku sapi Perah Friesian Holstein

# DAFTAR PUSTAKA

**DAFTAR PUSTAKA**

- Amer, H.A., A.O. Hegab, and S.M. Zaabal. 2008. Effect of Ovarian morphology on oocyte quantity and quality, granulose cells, *in vitro* maturation, and steroid hormone production in buffaloes. Faculty of veterinary medicine. Zagazig. Egypt
- Barrat, L.R. C. 2006. Diagnostic tools in male infertility- the question male of dysfunction. Reproductive and Developmental Biology, Maternal and Child Health Science Laboratories, Centre for Oncology and Molecular Medicine, Ninewells Hospital, University of Dundee, Dundee, DD1 9SY, Scotland, UK.
- Bains, R.,J. Adeghe,. And R. J. Carson. 2002. Human Sperm Cells Express CD44. *Fertility and Sterility*.78 : 307-312.
- Bellin. (1994). Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absenced of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluids. *J. Anim. Sci.*, 702 : 173-182.
- Brown, F. L. 1992. Expression and distribution of Osteopontin in Human tissue: widespread association with luminal epithelial surfaces. Departments of pathology, Beth Israel Hospital and Harvard medical school. Boston, Massachusset.
- Budiyanto, A., S. Gustari., D. Anggoro., D. Jatmoko., S. Nugraheni., E.W. nugraha, dan D. Asta. 2013. Kualitas Morfologi Oosit Sapi Peranakan Ongole yang dikoleksi Secara *In Vitro* Menggunakan Variasi Waktu Transportasi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gajah Mada.
- Cancel, A.M., D.A. Chapman, and G.J. Killian. 1997. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein Bulls seminal plasma. *Biol Reprod*.57(6) : 1293-301.
- Chang.M.C and R.C. Austin. 1951. The meaning of sperm Capacitation. The Worcester foundation for experimental biology. Massachusetts.
- Chacur, M.G.M. (2012). Seminal plasma proteins as potential Markers of Relative Fertility in Zebu Bulls (*Bos taurus indicus*). *Anim. Reprod*. Vol.5 : 552.
- Cheema, S. R. and B. K. Babbar. 2008. Sperm Membrane Seminal Plasma Proteins Reflects Semen Quality in Cross-Bred Cattle Bulls. *Indian J. Anim. Res.*, 42(4):242-247.

- Chellaiyah, M.A., Kizer N., Biswas, R., Alvarez, U., Strauss-S.J., Rifas. L., Rittling, S.R., Denhardt, D.T. and Hruska, K.A. 2003. Osteopontin deficiency produces Osteoclast Dysfunction due to Reduced CD44 Surface Expression. *Molecular Biology of the Cell* 14 : 173-189.
- Erikson, D.W. 2006. Role of Osteopontin in Bovine Sperm Capacitation and Fertilization [Dissertation]. The Pennsylvania State University.
- Erikson, D.W., A. L. Way, R.P. Bertolla, A. D. A. Chapman and G. J. Killian. 2007. Detection of Osteopontin on Holstein Bull Spermatozoa, in Cauda Epididymal Fluid and Testis Homogenates, and Its Potential Role in Bovine Fertilization. [www.reproduction-online.org](http://www.reproduction-online.org). 1741-7899 (online).
- Ded, L., P. Dostalova, A. Dorosh, K. Dvorakova-Hortova and J. Peknikova. 2010. Effect of Estrogens on Boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Academy of science of the Czech Republic.
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2012. Ketersediaan Konsumsi Daging, Telur dan Susu 2006 - 2010. [www.deptan.go.id](http://www.deptan.go.id)
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2012. Ketersediaan Konsumsi Susu Menurut Provinsi 2006 - 2010. [www.deptan.go.id](http://www.deptan.go.id)
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2012. Populasi Sapi Perah Menurut Provinsi 2008-2012. [www.deptan.go.id](http://www.deptan.go.id).
- Fraser. L.R. 1998. Fertilization promoting peptide : an important regulator of sperm function *in vivo* . *Anatomy and Human Biology*, King college London, strand, London WC2R 2LS. UK.
- Fujiwati, A.S. Sofro dan Sudjadi. 2002. Diagnosis Molekular Ovalositosis dan Kaitannya dengan Haplotipe Globin-b. *Technoscience* 15:351-364.
- Furnus, C.C., Valcarel, A., Dulout, F.N. and Errecalde, A.L. 2003. The Hyaluronic Acid Receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early Stages Embryos. *Theriogenology*. 60 : 1633-1644.
- Gao, C., H. Guo., L. Downey., C. Marroquin., J. Wei., and P.C. Kuo. 2003. Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell in HepG2 cell. *Carcinogenesis*. 24 : 1871-1878.
- Grasa. P., C. Young., K. coward., L. C. Davis and J.Parrington. 2009. Phospholipase C zeta undergoes dynamic Change in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. Department of pharmacology, University of oxford: United Kingdom.

- Goodison, S., V. Urquidi., and D. Tarin. 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Molecular pathology*.52.189-196.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall. 2006. *Textbook of Medical Physiology 11<sup>th</sup> Edition*. Elsevier Inc. Philadelphia, Pennsylvania.
- Gwathmey, T.M., G.G. Ignatz, J.L. Mueller, P. Manjunath, and S.S. Suarez. 2006. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. *Biology of Reproduction*. 75:501-507.
- Hafez, E.S.E, 1993. *Reproduction In Farm Animals*. Ed 6. Lea and Febiger. Philadelphia. P 114-188.
- Hao, Y., N. Mathialagan., E. Walters., J. Mao., L. Lai., D. Becker., W. Li., J. Critser., and R. S. Prather. 2006. Osteopontin Reduces Polyspermy During In Vitro fertilization of Porcine Oocytes. Division of animal, Comparative Medicine center and Microbiology : University of Missouri – Columbia.
- Hernawati, T. 1998. Peranan Heparin, Hipotaurin dalam Media Kapasitansi Terhadap Persentase Hidup, Motilitas Spermatozoa dan Pembuahan *In Vitro* Pada Sapi Perah. Tesis. Universitas Airlangga
- Hansen. P.J. 2006. Realizing The Promise of IVF in Cattle- an overview. Department of animal sciences, University of Florida.
- Hoodbhoy, T. and J. Dean. 2004. Insight into the molecular basis of sperm - egg recognition in mammals. Laboratory of Cellular and Developmental Biology. National Institutes of Health : Maryland, USA.
- Katagiri, Y.U., J. Sleeman., H. Fujii., P. Herrlich., H. Hotta., K. Tanaka., S. Chikuma., H. Yagita., K. Okumura., and M. Murakami. 1999. CD44 Variants but not CD44s Cooperate with beta1-containing integrins to permits cell to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer research*. 59: 219-226.
- Kimura, N., Y. Konno., K. Miyoshi., H. Matsumoto., and E. Sato. 2002. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complex during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction*. 6 : 707-717.
- Johnson, G.A., R.C. Burghardt., F.W. Bazer., T.E. Spencer. 2003. Osteopontin : Role in Implantation and Placentation. *Biol Reprod* ;69 : 1458 -71.

- Killian, G.J., D.A. Chapman and L. A. Rogowski. 1993. Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. *Biology of Reproduction* 49:1202-1207.
- Kim, E., M. Yamashita., M. Kimura., A. Honda., S. Kashiwabara., and T. Baba. 2008. Sperm Penetration through Cumulus Mass and Zona Pellusida. *International Journal of Developmental Biology*. 52: 677-682.
- Kusriningrum, 2008. Buku Ajar Perancangan Percobaan. Cetakan Pertama. Dani Abadi. Surabaya.
- 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.
- Lubis, A.M. 2000. Pemberdayaan Bioteknologi Reproduksi Untuk Mutu Genetik Ternak. Balai Penelitian ternak : Bogor Indonesia.
- Madyawati, S.P. 2008. Suplementasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi *Friesian Holstein* (FH) terhadap Kualitas Semen Beku. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Marroquin, C.E., L. Downey.,H. Guo., and P.C. Kuo. 2004. Osteopontin increase CD44 expression and cell adhesion in RAW 264.7 murine leukemia cell. *Imunology Letter*. 95: 109-112.
- Martin, G., O. Sabido., P. Durand and R. Levy. 2004. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. *Biology of Reproduction* 71: 28-37.
- Mazzali, M., T. Kipari, V. Ophascharoensuk, J.A. Wesson, R. Johnson and J. Hughes. 2002. A molecule for all Seasons. The Baylor college of medicine. Houston. Texas. USA.
- Monaco, E., B. Gasparini., L. Boccia., A. De Rosa., L. Attanasio., L. Zicarelli., G. Killian. 2008. Effect of Osteopontin (OPN) on *in vitro* embryo development in cattle. Departement of Animal Sciences. University of illnois. USA.
- Moura, A.A. 2005. Seminal Plasma proteins and fertility indexes in the bull : The Case for Osteopontin. Pennsylvania State University. USA.
- Moura, A. A., D.A. Chapman., H. Koc and G. J. Killian. 2006. Proteins of the Cauda Epididymal Fluid Associated With Fertility of Mature Dairy Bulls. *Journal of Andrology*,27 (4).

- Novack.S., A. Ruiz-Sa'nchez, W.T. Dixon, G.R. Foxcroft, and M.K. Dyck. 2010. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in Boars. Swine reproduction - development program. University of Alberta. Canada.
- Rusdiana, S. 2009. Upaya Pengembangan Agribisnis Sapi Perah dan Peningkatan Produksi Susu Melalui Pemberdayaan Koperasi Susu. Pusat Penelitian dan Pengembangan : Bogor.
- Rodriguez, C.M., J.R. Day, and G.J. Killian. 2000. Osteopontin gene expression in the Holstein bull Reproductive Tract. *J Androl.*21(3) : 414-20.
- Salicioni.M.A. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. Department of veterinary and animal sciences. University of massachusset. USA.
- Samik, A., Hernawati, T., dan Suprayogi, T.W. 2013. Perbaikan Mutu Semen Beku Sapi Perah Friesian Holstein Melalui Penambahan OPN dalam Media Pembekuan. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Smith, L.L., B.W. Greenfield., A. Aruffo., and C.M. Giachelli. 1999. CD44 is not an adhesive receptor for Osteopontin. *Journal of cellular Biochemistry.*73.20.30.
- Sodek, J., B. Ganss and M.D. McKee. 2000. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *Journal of cellular physiologi.* 184 (1) : 118-113.
- Suprayogi, T.W. 2013. Potensi Fertility Associated Antigen (FAA) Plasma Seminalissapi Pejantan dalam Menambah Peningkatan Kesuburan Semen Beku Sapi Simental. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Supriatna I. dan R.H. Pasaribu. (1992). In Vitro Fertilisasi. Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio. Depdikbud Dirjen Dikti IPB.
- Souza.C.E.A. A.A. Moura, A.C. Lima-Souza, and G.J. Killian. 2011. Binding Pattern of seminal plasma proteins on bovine epididymal and ejaculated sperm membrane. Department of dairy and animal science. University park:USA.
- Sztein. J.M., Farley. J.S. and Mobraaten. L.E. 2000. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol Reprod* 63:1774-1780

- Thérien, I., R. Moreau, and P. Manjunath. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 59:768–776. [PubMed]
- Toelihere, M.R., 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. 6<sup>th</sup>.Ed. Penerbit Angkasa Bandung.
- Triwulanningsih, 1992. *Fertilisasi In Vitro Pada Sapi*. Kumpulan Materi Kursus. Balai Penelitian Ternak. Ciawi-Bogor.
- Wassarman, M. Paul. 1999. Contribution of Mouse egg Zona Pellusida Glycoproteins to gamete recognition during fertilization. Brookdale Department of Molecular, cell, and developmental Biology. New York.
- Weber, G.F., S. Ashkar., M. Jm. Glimcher., and H. Cantor. 1996. Receptor Ligand Interaction Between CD44 and Osteopontin (Eta-1). *Science*, 271:509-512.
- Widjiati., Rimayanti., A. Boediono., dan A. Setiadi. 1998. Peran *Transforming Growth Factor  $\beta$*  terhadap Tingkat Kematangan dan kejadian Apoptosis Oosit Sapi pada Kultur *In Vitro*. Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Widjiati., S.E. Pusporini dan M.Z. Arifin. 2012. Perbandingan Angka Fertilitas dan Hambatan Perkembangan Embrio Mencit yang Dikultur dalam Medium M16 dan *Human Tubal Fluid*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Williams. L.C. 2011. Effect Osteopontin Single Nucleotide Polymorphisms on Bull semen Quality. Texas tech university. Bachelor of science in animal science: University of Arkanas.
- Yanagimachi, R, 1994. Mammalian Fertilization. In: E. Knobil and J. Neil (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. Ltd. New York. P 135-185.
- Yokoo, M., Y. Miyahayashi., T. Naganuma., N. Kimura., H. Sasada., and E. Sato. 2002. Identification of Hyaluronic acid-binding proteins and their expressions in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction*. 67 : 1165-1171.
- Zhu, B., K. Suzuki., H.A. Goldberg., S.R. Rittling., D.T. Denhardt., C.A. McCulloch., And J. Sodek. 2004. Osteopontin Modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal Macrophages through G-proteins-coupled receptors: evidence of a role for an Intracellular form of Osteopontin. *Journal of Cellular Physiology*. 198 : 155-167.



# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Komposisi Larutan pada Elektroforesis SDS PAGE

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
Running Buffer pH 8,3	Tris base Glisin SDS ddH <sub>2</sub> O	3,03 g 14,4 g 1,0 g Sampai 1 L
T-Acrl 30 %	Bisakrilamid (di vortex hingga larut) Akrilamid ddH <sub>2</sub> O	0,08 g 2,92 g 7 ml
LGB pH 8,8	Tris base SDS ddH <sub>2</sub> O	1,82 g 0,04 g 10 ml
UGB pH 6,8	Tris base SDS ddH <sub>2</sub> O	0,75 g 0,04 g 10 ml
RSB 1 ml	UGB (10%) Gliserol SDS 10% β merkaptoetanol Bromophenol blue dH <sub>2</sub> O	0,125 ml 0,2 ml 0,2 ml 0,05 ml 0,025 ml 0,4 ml
APS 10 %	Amonium persulfat dH <sub>2</sub> O	0,1 g Sampai 1 ml
Staking gel 3% (1 plate)	ddH <sub>2</sub> O UGB T-Acrl (30%) APS 10 % Temed	1475 µl 625 µl 400 µl 15 µl 10 µl
Separating gel 10 % (1 plate)	LGB T-Acrl (30%) ddH <sub>2</sub> O (Berurutan di di-degas 10 menit) APS 10% Temed	1500 µl 1987,5 µl 2510 µl 30 µl 15 µl

Separating gel 12% (1 plate)	LGB T- Acryl (30%) ddH <sub>2</sub> O (Berurutan, di-degas 10 menit) APS 10% Temed	1300 $\mu$ l 2000 $\mu$ l 1700 $\mu$ l 70 $\mu$ l 7 $\mu$ l
Staining	Coomasie Brilliant blue Metanol absolute Asam asetat glasial ddH <sub>2</sub> O	0,25 g 45,4 ml 9,2 g Hingga 100 ml
Destaining	Metanol Absolut Asam asetat glacial ddH <sub>2</sub> O	70 ml 70 ml Hingga 1 L

## Lampiran 2. Penentuan Berat Molekul dengan Elektroforesis SDS-PAGE

**Persiapan gel.** Plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antara plat 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). Campuran *separating gel* dimasukkan hati-hati ke dalam plate (tempat lapisan gel) menggunakan mikropipet. Dibiarkan 10 – 30 menit hingga terbentuk gel. Berikutnya *stacking gel* dituang di atas *separating gel* sambil dipasang sisir hingga terbentuk gel berikut sumurannya. Didiamkan selama 30 menit. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati – hati. Selanjutnya plate dipasang pada alat elektroforesis, berikutnya buffer dituangkan pada bejana elektroforesis (Hernawati, 2014).

**Injeksi sampel.** Sejumlah 10  $\mu$ l sampel isolate protein ditambah 10  $\mu$ l Tris+cl+20 $\mu$ l RSB (*Reducing Sample Buffer*), dan dimasukkan ke dalam mikrotube, kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 3 menit. Setelah didinginkan sampel dimasukkan dalam sumur – sumur gel dengan volume 20  $\mu$ l untuk tiap sumur. Setelah itu anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30mA dan 130 V. Proses pemisahan (*running*) dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian 0,5cm dari batas awal plat gel.

**Pewarnaan dan pencucian gel.** Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* selama 30 – 60 menit. Penghilangan warna dilakukan

dengan merendam gel dalam larutan *destaining* sambil digoyangkan dengan penggoyang otomatis sampai gel menjadi jernih. Kemudian hasil elektroforesis discan.

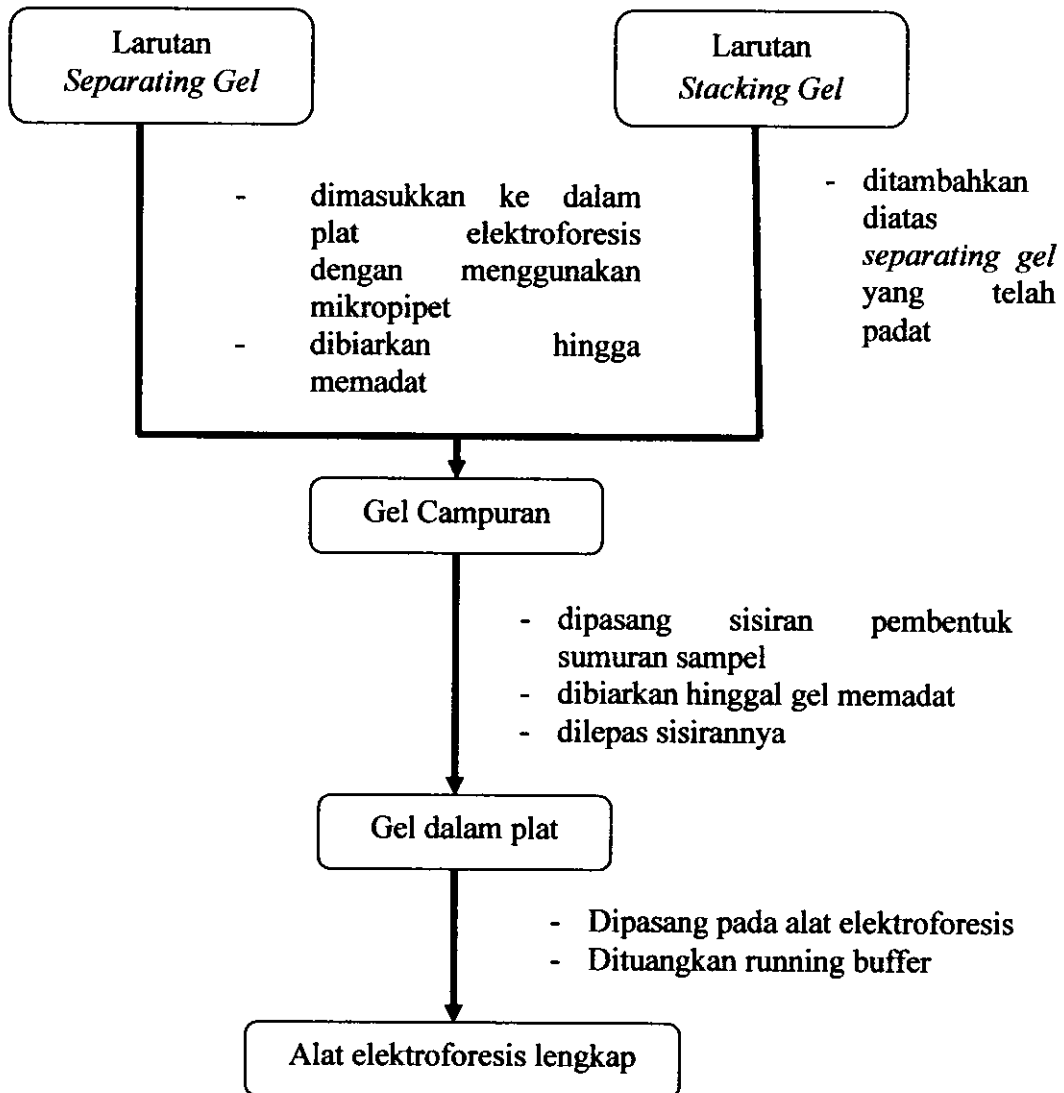
**Penentuan berat molekul.** Dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardain factor*) dari masing – masing pita dimana :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

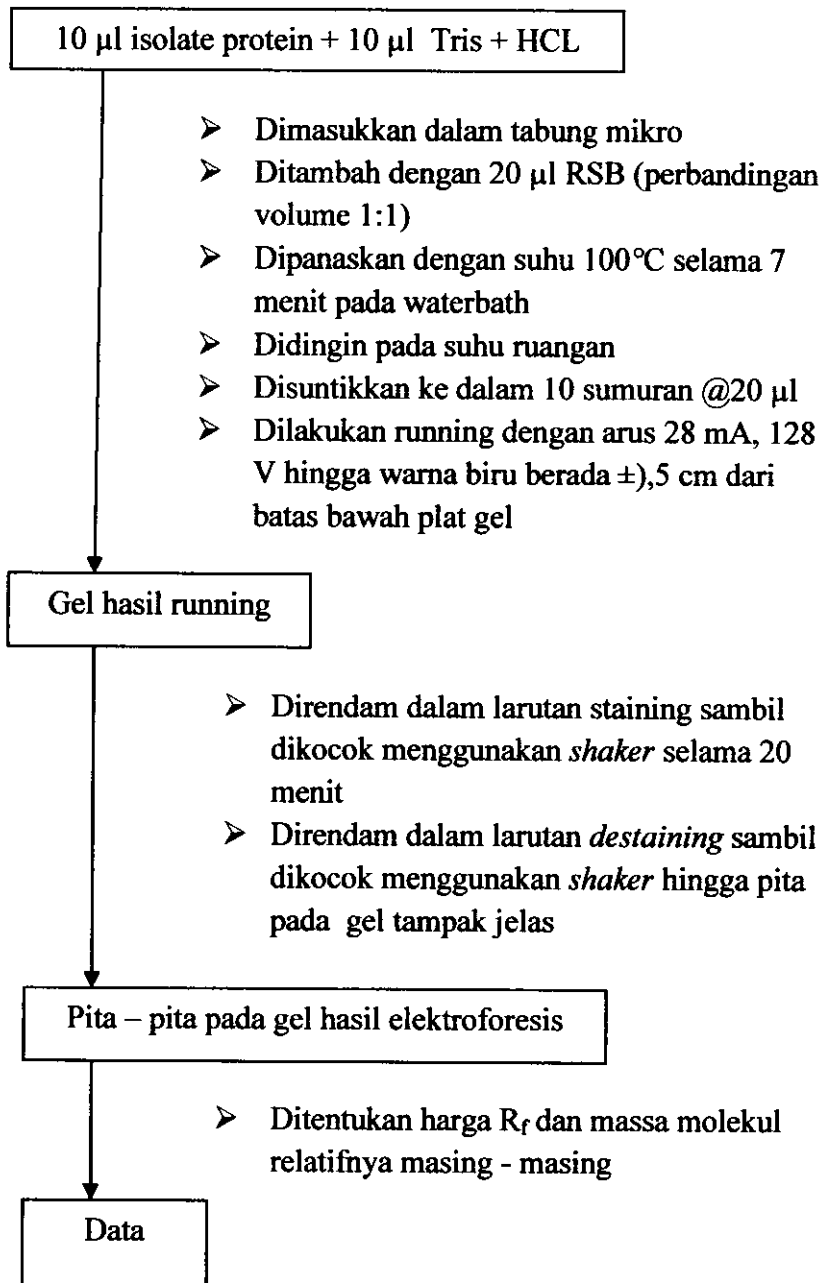
Kemudian dibuat kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y. Berat molekul sampel ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar dari protein marker.

## Lampiran 3. Diagram Alir Metode Elektroforesis SDS-PAGE

## 3.1.1 Profil Protein dengan Teknik SDS PAGE Persiapan Gel



### 3.1.2 Injeksi Sampel dan Running

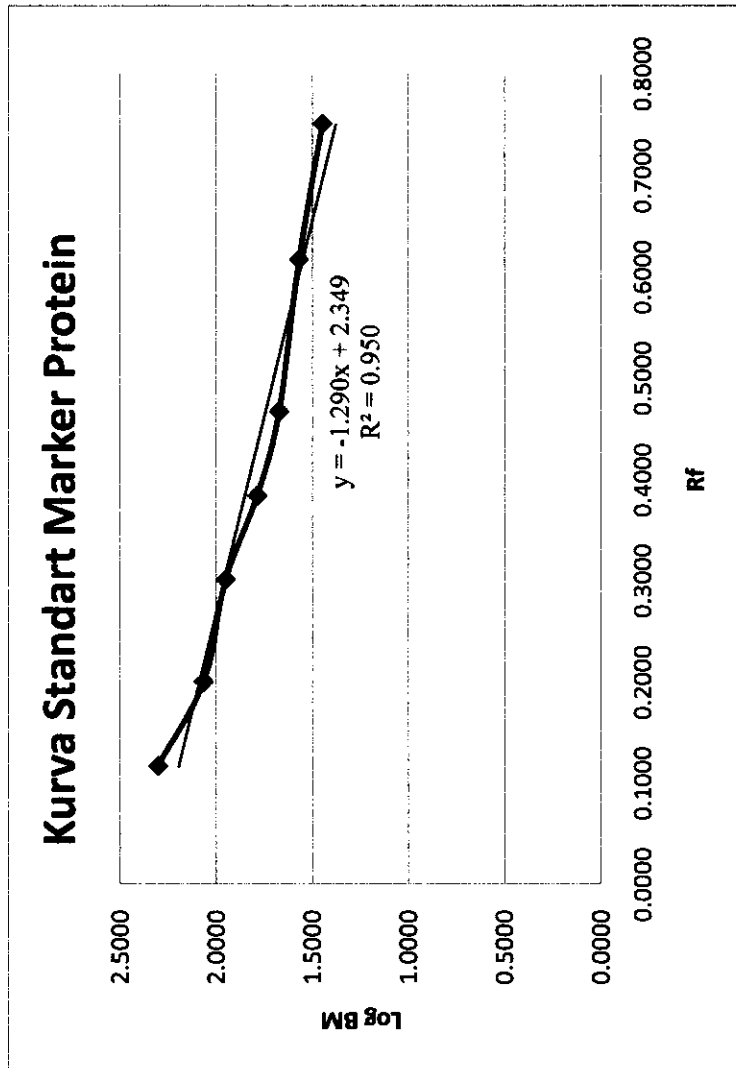


## 3.1.3. Perhitungan Konfirmasi Berat Molekul Osteopontin

Kurva Standard Marker Protein

Pita ke	BM	log BM	a	b	Rf
1	200	2,3010	0,7	6	0,1167
2	116	2,0645	1,2	6	0,2000
3	89	1,9494	1,8	6	0,3000
4	61	1,7853	2,3	6	0,3833
5	47	1,6721	2,8	6	0,4667
6	37	1,5682	3,7	6	0,6167
7	28	1,4472	4,5	6	0,7500





Jarak Yang Ditempuh Oleh Pita (a)						Rf				
S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	b	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5
1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	6,00	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	6,00	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	6,00	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	6,00	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
			2,40	2,40	6,00				0,40	0,40
2,60	2,60	2,60	2,60	2,60	6,00	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
2,8	2,8	2,8			6,00	0,47	0,47	0,47		
3,10	3,10	3,10	3,10	3,10	6,00	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
3,60	3,60	3,60	3,60	3,60	6,00	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	6,00	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67
			4,60	4,60	6,00				0,77	0,77
4,90	4,90	4,90			6,00	0,82	0,82	0,82		
5,40	5,40	5,40	5,40	5,40	6,00	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90

Log BM					BM				
S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5
2,11	2,11	2,11	2,11	2,11	129,60	129,60	129,60	129,60	129,60
2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	111,71	111,71	111,71	111,71	111,71
1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	91,63	91,63	91,63	91,63	91,63
1,88	1,88	1,88	1,88	1,88	75,17	75,17	75,17	75,17	75,17
			1,83	1,83				68,08	68,08
1,79	1,79	1,79	1,79	1,79	61,66	61,66	61,66	61,66	61,66
1,75	1,75	1,75			55,84	55,84	55,84		
1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	48,13	48,13	48,13	48,13	48,13
1,57	1,57	1,57	1,57	1,57	37,58	37,58	37,58	37,58	37,58
1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	30,82	30,82	30,82	30,82	30,82
			1,36	1,36				22,90	22,90
1,30	1,30	1,30			19,74	19,74	19,74		
1,19	1,19	1,19	1,19	1,19	15,41	15,41	15,41	15,41	15,41

**Konfirmasi BM Protein**

Sampel ke-	BM (kDa)																									
	15,4		19,74		22,9		30,82		37,58		48,13		55,84		61,66		68,08		75,17		91,63		111,71		129,6	
	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1	P0	P1
S-1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
S-2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
S-3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
S-4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
S-5	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Lampiran 4. Komposisi media HTF (*Human Tubal Fluid*) (Widjiati,2012) :

- ❖ NaCl
- ❖ KCl
- ❖  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ❖  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ❖  $\text{NaHCO}_3$
- ❖ HEPES
- ❖ Na Laktat
- ❖ Na Piruvat
- ❖ Glukosa
- ❖ Gentamicin
- ❖ Fenol Red

Lampiran 5. Data Persentase Fertilisasi dari hasil Fertilisasi *In Vitro*

**Case Processing Summary(a)**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Oosit terfertil * Perlakuan	30	100.0%	0	.0%	30	100.0%

**Case Summaries(a)**

			oositterfertil
Perlakuan P0(-OSTEOPONTIN)	1		50.00
	2		40.00
	3		33.40
	4		37.00
	5		50.00
	6		40.00
	7		40.00
	8		25.00
	9		37.50
	10		40.00
	11		40.00
	12		37.50
	13		30.00
	14		42.00
	15		25.00
	Total	N	15
		Mean	37.8267
		Std. Deviation	7.31051
P1=(15OSTEOPONTIN)	1		60.00
	2		33.40
	3		33.40
	4		50.00
	5		62.50
	6		50.00
	7		40.00
	8		75.00
	9		87.50
	10		35.00
	11		40.00
	12		50.00
	13		65.00
	14		75.00

	15		50.00
	Total	N	15
		Mean	53.7867
		Std. Deviation	16.68733
Total	N		30
	Mean		45.8067
	Std. Deviation		15.03692

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		oositterfertil
N		30
Normal Parameters(a,b)	Mean	45.8067
	Std. Deviation	15.03692
Most Extreme Differences	Absolute	.217
	Positive	.217
	Negative	-.105
Kolmogorov-Smirnov Z		1.188
Asymp. Sig. (2-tailed)		.119

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

### Group Statistics

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
oositterfertil P0(-OSTEOPONTIN)	15	37.8267	7.31051	1.88756
P1=(OSTEOPONTIN)	15	53.7867	16.68733	4.30865

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Oosit terfertil	Equal variances assumed	10.231	.003	-3.393	28	.002	-15.96000	4.70397	-25.59565	6.32435
	Equal variances not assumed			-3.393	19.183	.003	-15.96000	4.70397	-25.79918	6.12082

**Descriptive Statistics**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
tr_oositfertil	30	1.40	1.94	1.6405	.13307
Valid N (listwise)	30				



**Case Summaries(a)**

			tr oositterfertil
Perlakuan P0(-OSTEOPONTIN)	1		1.70
	2		1.60
	3		1.52
	4		1.57
	5		1.70
	6		1.60
	7		1.60
	8		1.40
	9		1.57
	10		1.60
	11		1.60
	12		1.57
	13		1.48
	14		1.62
	15		1.40
	<b>Total</b>	<b>N</b>	15
		<b>Mean</b>	1.5696
		<b>Std. Deviation</b>	.08914
P1=(15OSTEOPONTIN)	1		1.78
	2		1.52
	3		1.52
	4		1.70
	5		1.80
	6		1.70
	7		1.60
	8		1.88
	9		1.94
	10		1.54
	11		1.60
	12		1.70
	13		1.81
	14		1.88
	15		1.70
	<b>Total</b>	<b>N</b>	15
		<b>Mean</b>	1.7114
		<b>Std. Deviation</b>	.13406
<b>Total</b>	<b>N</b>		30
	<b>Mean</b>		1.6405
	<b>Std. Deviation</b>		.13307

a Limited to first 100 cases.

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		tr_ooositterfertil
N		30
Normal Parameters(a,b)	Mean	1.6405
	Std. Deviation	.13307
Most Extreme Differences	Absolute	.180
	Positive	.180
	Negative	-.090
Kolmogorov-Smirnov Z		.988
Asymp. Sig. (2-tailed)		.283

a Test distribution is Normal.

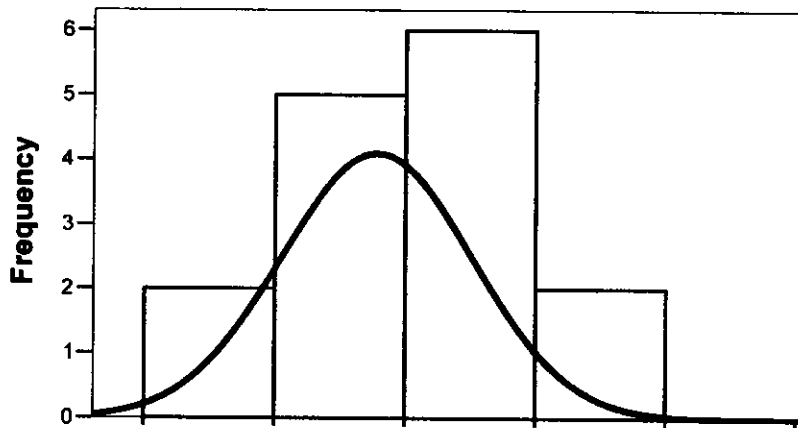
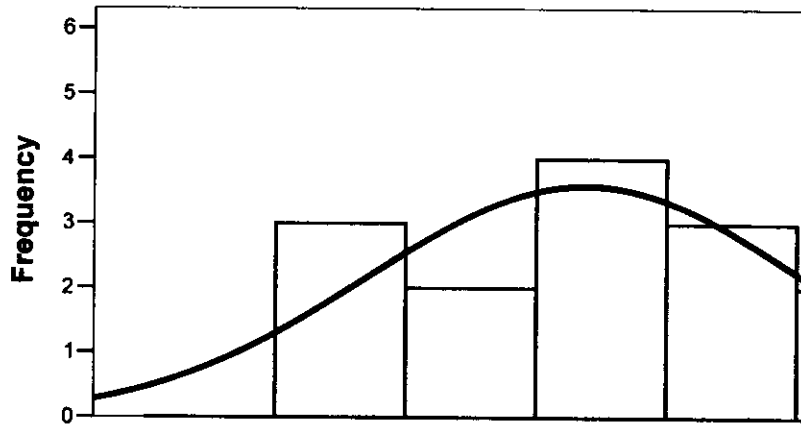
b Calculated from data.

**Group Statistics**

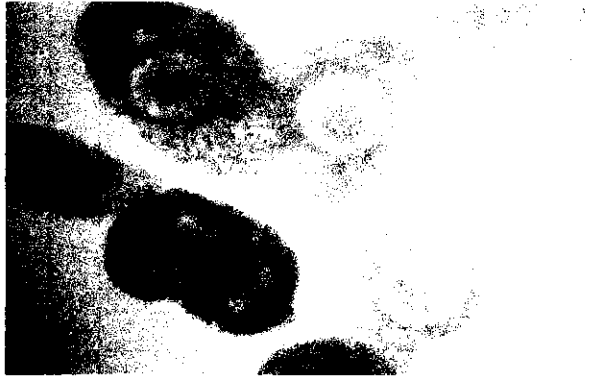
Perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
tr_ooositterfertil	P0(-OSTEOPONTIN)	15	1.5696	.08914	.02302
	P1=(15OSTEOPONTIN)	15	1.7114	.13406	.03461

**Independent Samples Test**

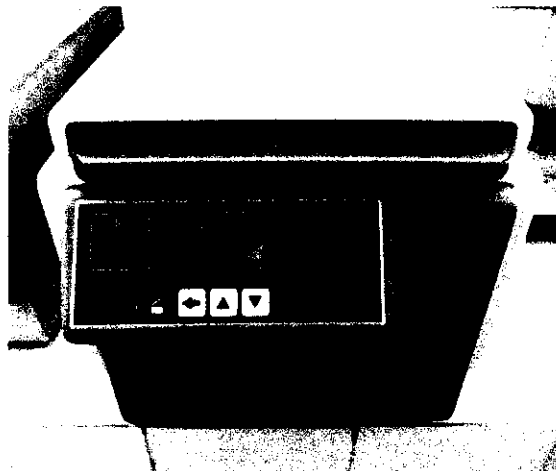
Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
tr_oositterfertil	Equal variances assumed	3.198	.085	-3.410	28	.002	-.14174	.04157	-.22689	-.05659
	Equal variances not assumed			-3.410	24.356	.002	-.14174	.04157	-.22747	-.05602



## Lampiran 6. Dokumentasi penelitian



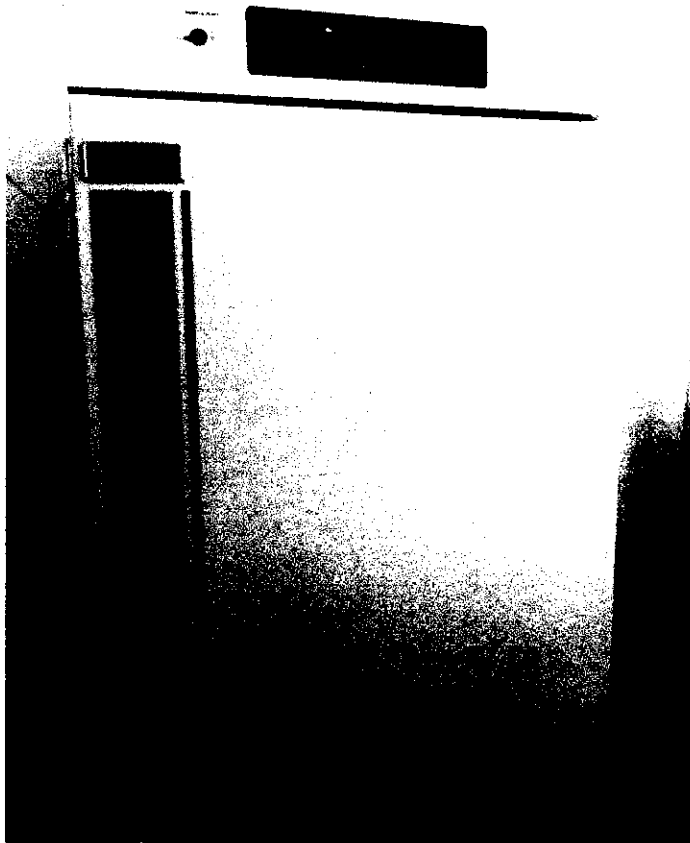
**Maturasi oosit**



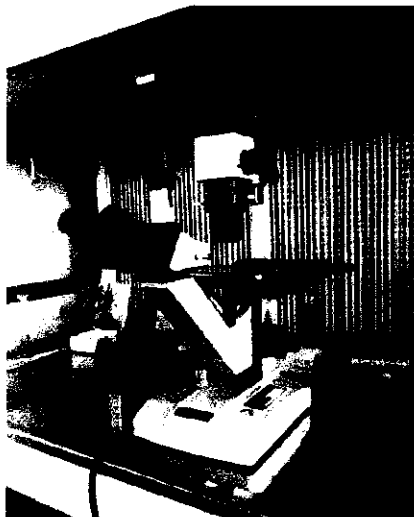
**Centrifuge untuk *swim up***



**Ovarium sapi *Friesian Holstein* (FH)  
RPH Bajangan Gondang wetan, pasuruan**



**Inkubator CO<sub>2</sub>**



**Mikroskop inverted**

## Lampiran 7. Data Penelitian

Ulangan	Jumlah Oosit		Pengamatan				Persentase Oosit terfertilisasi (%)	
	P0	P1	Terfertilisasi		Tidak terfertilisasi			
I	4	5	2	3	2	2	50	60
II	5	6	2	2	3	4	40	33,4
III	6	6	2	2	4	4	33,4	33,4
IV	8	8	3	4	5	4	37	50
V	8	8	4	5	4	3	50	62,5
VI	5	6	2	3	3	3	40	50
VII	5	5	2	2	3	3	40	40
VIII	8	9	2	6	6	2	25	75
IX	8	8	3	7	5	1	37,5	87,5
X	5	7	2	3	3	4	40	35
XI	5	5	2	2	3	3	40	40
XII	8	8	3	4	5	4	37,5	50
XIII	8	8	2	5	6	3	30	65
XIV	7	7	3	6	4	1	42	75
XV	8	8	2	5	6	3	25	50