

RINGKASAN

SUPLEMENTASI TIROSIN KINASE SPERMATOZOA SAPI FRIESIAN HOLSTEIN (FH) UNTUK MENINGKATKAN KUALITAS SEMEN BEKU

Pada teknik pembekuan semen sapi, jumlah spermatozoa yang motil setelah pembekuan (*post thawing motility*) sebesar 40%. Persentase motilitas spermatozoa setelah *thawing* sebesar 40% masih layak digunakan dalam program inseminasi buatan, hal ini sesuai dengan standar prosedur pembekuan semen di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari. Dikatakan pula bahwa selama proses pembekuan semen, persentase motilitas spermatozoa menjadi 34 – 50% dan integritas membran menjadi 45%. Penurunan persentase motilitas dan spermatozoa yang hidup *pasca thawing* biasa terjadi dalam proses pembekuan karena pada saat spermatozoa berada pada kondisi temperatur yang menurun secara drastis dari keadaan semula dapat mengakibatkan kerusakan spermatozoa sebesar 20% dari keseluruhan. Perbedaan kondisi temperatur pada saat pembekuan dan *pasca thawing* akan menyebabkan peningkatan permeabilitas membran spermatozoa sehingga dapat menyebabkan kematian sel. Kerusakan membran plasma spermatozoa terjadi selama proses pembekuan dan *thawing*.

Tirosin kinase (TK) adalah salah satu protein membran plasma spermatozoa yang berfungsi sebagai mediator utama terjadinya fusi spermatozoa dengan zona pelusida 3 (ZP3), terlihat adanya peningkatan fosforilasi tirosin kinase ini berhubungan dengan motilitas dan hiperaktivitas spermatozoa. Fosforilasi tirosin kinase berhubungan dengan terjadinya kapasitas spermatozoa melalui mekanisme peningkatan influks kalsium yang akan mengaktifkan adenilat siklase, selanjutnya akan berpengaruh pada peningkatan *cyclic adenosin monophosphat* (cAMP).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan tentang tirosin kinase pada berbagai spesies sampai saat ini belum ada yang menjelaskan bagaimana karakter biokimiawi tirosin kinase serta bagaimana mekanismenya apabila disuplementasikan dalam media pengencer semen beku sapi FH.

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :1) Bagaimana karakter tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH berdasarkan : ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa, berat molekul, spesifisitas dan aktivitas optimumnya?, 2) Apakah suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku dapat meningkatkan kualitas spermatozoa sapi FH *pasca thawing*?, 3) Apakah semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dapat meningkatkan angka fertilisasi secara *in vitro*? dan 4) Apakah inseminasi buatan pada sapi FH menggunakan semen beku yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dapat meningkatkan angka kebuntingan?.

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengkaji peran tirosin kinase yang disuplementasikan ke dalam medium pengencer semen beku untuk meningkatkan kualitas spermatozoa *pasca thawing* serta mengungkap mekanisme tirosin kinase dalam proses pengenalan dengan sel telur pada fertilisasi *in vitro* maupun *in vivo*. Sedangkan tujuan khusus adalah 1) Identifikasi dan karakterisasi tirosin kinase dari spermatozoa sapi FH berdasarkan ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa, berat molekul, spesifisitas dan aktivitas optimum, 2) Menganalisis dosis optimum suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku terhadap

kualitas spermatozoa *pasca thawing* meliputi : persentase spermatozoa yang hidup, motilitas spermatozoa dan integritas membran spermatozoa, 3) Membuktikan bahwa semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dapat meningkatkan angka fertilisasi secara *in vitro*, dan 4) Membuktikan bahwa semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dapat meningkatkan angka kebuntingan pada sapi perah.

Manfaat Keilmuan penelitian ini adalah 1) Menjelaskan mekanisme tirosin kinase yang telah disuplementasi ke dalam medium pengencer semen beku dalam meningkatkan kualitas spermatozoa *pasca thawing*. 2) Menjelaskan mekanisme tirosin kinase dalam menginduksi pengenalan spermatozoa dengan sel telur sehingga dapat meningkatkan angka fertilisasi pada fertilisasi *in vitro* serta meningkatkan angka kebuntingan. Sedangkan manfaat praktis penelitian ini adalah Suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku khususnya sapi FH dapat dikembangkan sebagai dasar pembuatan semen beku dengan kualitas spermatozoa yang lebih baik serta diharapkan dapat meningkatkan angka kebuntingan pada sapi perah.

Hipotesis penelitian ini adalah 1) Suplementasi tirosin kinase dengan berbagai variasi dosis ke dalam medium semen beku dapat meningkatkan kualitas spermatozoa sapi FH *pasca thawing* meliputi persentase motilitas, spermatozoa yang hidup dan integritas membran spermatozoa. 2) Semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dapat meningkatkan angka fertilisasi secara *in vitro*. 3) Inseminasi buatan pada sapi perah menggunakan semen beku yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dapat meningkatkan angka kebuntingan.

Penelitian ini merupakan penelitian laboratoris yang terdiri dari empat tahap penelitian, yaitu : Tahap pertama : Karakterisasi terhadap tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH meliputi : ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa Sapi FH; penentuan berat molekul tirosin kinase (dengan metode SDS-PAGE yang dikonfirmasi dengan metode Dot Blot dan dilanjutkan dengan Western Blot), serta uji aktifitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH melalui penentuan kondisi optimumnya.

Tahap kedua : Uji kualitas semen beku yang disuplementasi tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH meliputi : penentuan kadar tirosin kinase menggunakan tirosin kinase standar (metode ELISA), pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa, persentase spermatozoa hidup dan integritas membran plasma spermatozoa serta ekspresi tirosin kinase secara imunositokimia. Tahap ketiga : Uji fertilitas semen beku yang disuplementasi tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH secara *in vitro*. Tahap keempat : Uji fertilitas semen beku yang disuplementasi tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH dengan cara diinseminasikan pada sapi FH betina. Penelitian tahap pertama bersifat eksploratif, sedangkan pada tahap kedua dan ketiga bersifat eksperimental laboratoris sehingga rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak lengkap.

Hasil Penelitian Tahap pertama adalah ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa dikenali dengan warna kecoklatan pada bagian kepala spermatozoa yang merupakan hasil reaksi antara tirosin kinase pada spermatozoa yang berikatan dengan MAb-tirosin kinase dan antibodi sekunder berlabel SA-HRP serta substrat DAB. Konfirmasi berat molekul tirosin kinase dengan metode Western Blot menggunakan MAb-Tirosin Kinase yang didahului dengan metode SDS-PAGE ditemukan sebelas pita protein yaitu 160,39, 114,20, 95,00, 76,45, 59,70, 46,64, 37,58, 31,18, 21,55, 17,91 dan 14,42 kDa.

Konfirmasi isolat tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa sapi FH dengan teknik Dot Blot dengan menggunakan MAb-tirosin kinase. Gambar visualisasi terjadinya reaksi spesifik antara antigen (tirosin kinase) dengan antibodi (MAb-tirosin kinase) yang terlihat sebagai noda biru keunguan. Konfirmasi berat molekul tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa sapi FH digunakan teknik Western Blot. Isolat tirosin kinase hasil dari spermatozoa sapi FH dipakai sebagai antigen dan MAb-tirosin kinase sebagai antibodi primer dari rangkaian teknik ini. MAb-tirosin kinase ini hanya akan mengenali tirosin kinase dari pita protein yang dikandung oleh spermatozoa sapi FH. Satu pita protein yang muncul pada membran nitroselulose dengan berat molekul 95 kDa adalah tirosin kinase. Aktivitas tirosin kinase pada kondisi optimum (pH 7,0, temperatur 35°C dan waktu inkubasi 30 menit) diperoleh rerata aktivitas tirosin kinase sebesar 0,02188 unit.

Hasil Penelitian Tahap kedua adalah kadar tirosin kinase hasil elektroelusi adalah 20.030 µg /ml isolat. Data ini dipakai sebagai dasar untuk penentuan dosis suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku yaitu sebesar 100 µg /ml (P1), 200 µg /ml (P2) dan 300 µg /ml (P3), Suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku dapat meningkatkan persentase spermatozoa yang hidup tertinggi sebelum dan sesudah pembekuan pada dosis perlakuan P2 (200 µg /ml), berturut-turut sebesar 77.5 ± 2.6352% dan 53.0 ± 2.5819% (P<0,05), meningkatkan persentase motilitas spermatozoa tertinggi sebelum dan sesudah pembekuan pada dosis perlakuan P2 (200 µg /ml), berturut-turut sebesar 72.5 ± 2.6352% dan 47.0 ± 2.5819% (P<0,05) dan meningkatkan persentase integritas membran spermatozoa tertinggi sebelum dan sesudah pembekuan pada dosis perlakuan P2 (200 µg /ml), berturut-turut sebesar 68.0 ± 0.600% dan 51.33 ± 0.462% (P<0,05).

Hasil Penelitian Tahap ketiga adalah semen beku sapi FH yang telah di suplementasi tirosin kinase dengan perlakuan P0 (tanpa TK), P1 (TK 100 µg /ml), P2 (TK 200 µg /ml) dan P3 (300 µg /ml) pada uji fertilisasi *in vitro* dapat meningkatkan angka fertilisasi Pada pengamatan 24 jam, angka fertilisasi (sigot) tertinggi pada dosis 200 µg /ml sebesar 77.27 %, pengamatan 48 jam angka fertilisasi tertinggi (embrio 2 sel) sebesar 63.63% dan pengamatan 72 jam angka fertilisasi (embrio 4 sel) sebesar 54.54% (P<0,05).

Hasil Penelitian Tahap keempat adalah semen beku sapi FH yang telah di suplementasi tirosin kinase dengan perlakuan P0 (tanpa TK), P1 (TK 100 µg /ml), P2 (TK 200 µg /ml) dan P3 (300 µg /ml) pada uji lapangan dapat meningkatkan angka kebuntingan pada sapi perah betina sebesar 100% pada dosis optimum TK sebesar 200 µg /ml akan tetapi pada uji statistik menggunakan Khi Kuadrat tidak ada perbedaan yang signifikan (P>0,05) angka kebuntingan antara sapi perah yang diinseminasi dengan semen beku P0, P1, P2 dan P3.

Kesimpulan hasil penelitian adalah Karakter tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH mengekspresikan tirosin kinase pada bagian kepala spermatozoa, mempunyai berat molekul 95 kDa dan aktivitas enzimatis sebesar 0,02188 unit pada kondisi optimumnya (pH 7,0, temperatur 35°C dan waktu inkubasi 30 menit). Suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku dapat meningkatkan persentase spermatozoa yang hidup tertinggi sebelum dan sesudah pembekuan, berturut-turut sebesar 77.5 ± 2.6352% dan 53.0 ± 2.5819%, meningkatkan persentase motilitas spermatozoa tertinggi sebelum dan sesudah pembekuan berturut-turut sebesar 72.5 ± 2.6352% dan 47.0 ± 2.5819% dan meningkatkan persentase integritas membran spermatozoa tertinggi sebelum dan sesudah pembekuan berturut-turut sebesar 68.0 ± 0.600% dan 51.33 ± 0.462%

masing-masing pada dosis optimum sebesar 200 µg/ml ($P < 0,05$). Semen beku sapi FH yang telah di suplementasi tirosin kinase dengan perlakuan P0 (tanpa TK), P1 (TK 100 µg /ml), P2 (TK 200 µg /ml) dan P3 (300 µg /ml) pada uji fertilisasi *in vitro* dapat meningkatkan angka fertilisasi pada pengamatan 24 jam, angka fertilisasi (sigot) tertinggi pada dosis 200 µg /ml sebesar 77.27 %, pengamatan 48 jam angka fertilisasi tertinggi (embrio 2 sel) sebesar 63.63% dan pengamatan 72 jam angka fertilisasi (embrio 4 sel) sebesar 54.54% ($P < 0,05$). Semen beku sapi FH yang telah di suplementasi tirosin kinase dengan perlakuan P0 (tanpa TK), P1 (TK 100 µg /ml), P2 (TK 200 µg /ml) dan P3 (300 µg /ml) pada uji lapangan dapat meningkatkan angka kebuntingan pada sapi perah betina sebesar 100% pada dosis optimum TK sebesar 200 µg /ml tetapi pada uji statistik menggunakan Khi Kuadrat tidak ada perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) angka kebuntingan antara sapi perah yang diinseminasi dengan semen beku P0, P1, P2 dan P3.

Saran dalam penelitian ini adalah semen beku sapi FH dengan suplementasi tirosin kinase dapat digunakan dalam program inseminasi buatan yang mempunyai kecenderungan meningkatkan angka kebuntingan pada sapi perah, suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku sapi FH dapat meningkatkan angka fertilisasi secara *in vitro* maupun *in vivo*, untuk itu dapat dilakukan suplementasi tirosin kinase pada medium pengencer lain dengan dosis optimum 200 µg/ml dan perlu dilakukan analisis genomik dan proteomik tirosin kinase spermatozoa pada berbagai spesies sehingga temuan ini dapat diaplikasikan lebih luas.



ABSTRACT

TYROSINE KINASE SUPPLEMENTATION TO FRIESIAN HOLSTEIN (FH) SPERMATOZOA ON THE QUALITY OF FROZEN SEMEN

This research a laboratory study that consisted of four stages. Firstly, characterization of tyrosine kinase resulting from the isolation of Friesian Holstein (FH) spermatozoa, which including: the expression of tyrosine kinase in FH spermatozoa; the determination of tyrosine kinase molecular weight, and the activity test of tyrosine kinase from the isolation of FH spermatozoa by determining its optimum condition. Secondly, testing the quality of frozen semen supplemented with tyrosine kinase resulting from the isolation of FH spermatozoa, including the determination of tyrosine kinase level using tyrosine kinase standard with ELISA method, the examination of spermatozoa motility percentage, the percentage of living spermatozoa and spermatozoa plasma membrane integrity, as well as the immunocytochemical expression of tyrosine kinase. Thirdly, fertility test of frozen semen supplemented with tyrosine kinase isolated in vitro from FH spermatozoa. Fourthly, fertility test of frozen semen supplemented with tyrosine kinase isolated in vitro from FH spermatozoa by insemination to female cow.

The result of the first stage of the study revealed that characters of tyrosine kinase resulting from the isolation of FH spermatozoa expressed tyrosine kinase at the sperms' head, with molecular weight of 95 kDa, and enzymatic activity of 0.02188 units in its optimum condition (pH 7.0, temperature 35°C and incubation time 30 minutes). At the second stage, the level of tyrosine kinase resulting from electroelution was 20.030 µg/ml isolate. This data was used as a basic data for determine tyrosine kinase supplementation dose into frozen semen solvent medium as much as 100 µg/ml (P1), 200 µg/ml (P2) and 300 µg/ml (P3). Tyrosine kinase supplementation to frozen semen solvent medium could increase the percentage of living spermatozoa before and after freezing as much as $77.5 \pm 2.6352\%$ and $53.0 \pm 2.5819\%$, respectively, increase the percentage of spermatozoa motility before and after freezing as much as $72.5 \pm 2.6352\%$ and $47.0 \pm 2.5819\%$, respectively, and increase the percentage of spermatozoa membrane integrity before and after freezing of $68.0 \pm 0.600\%$ and $51.33 \pm 0.462\%$, each in optimum dose of 200 µg/ml.

The result of the third stage revealed that in vitro fertilization test, the frozen semen of FH supplemented with tyrosine kinase in various doses could increase fertilization rate. In observation for 24 hours, the highest fertilization rate (zygote) in the dose of 200 µg/ml was 77.27%, in 48 hour observation the highest fertilization rate (2 cell embryo) was 63.63%, and in 72 hour observation the fertilization rate (4 cell embryo) was 54.54%. The result of the fourth stage revealed that in field test, the frozen semen of FH bull supplemented with tyrosine kinase in various doses could increase pregnancy rate in female cow as much as 100% in optimum dose of 200 µg/ml.

Keywords: tyrosine kinase, FH spermatozoa membrane, frozen semen expander, fertilization rate, pregnancy rate