

- PROTEIN-TYROSINE KINASE

- RATTLE - SPERMATOZOA

ADN Perpustakaan Universitas Airlangga

DISERTASI

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



SRI PANTJA MADYAWATI

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008

**SUPLEMENTASI TIROSIN KINASE SPERMATOZOA
SAPI FRIESIAN HOLSTEIN (FH) TERHADAP
KUALITAS SEMEN BEKU**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka**

Pada hari : Selasa

Tanggal : 29 Januari 2008

Pukul 10.⁰⁰ WIB

Oleh :

SRI PANTJA MADYAWATI

NIM : 090415493 D

LEMBAR PERSETUJUAN

**Naskah Disertasi ini telah disetujui
Tanggal, 18 Februari 2008**

Oleh
Promotor



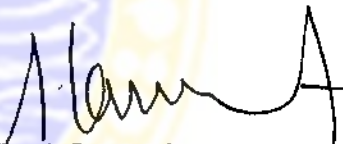
**Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS.
NIP. 130 687 297**

Ko Promotor I



**Prof. Win Darmanto, drs., M.Si., Ph.D.
NIP. 131 653 741**

Ko Promotor II



**Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh.
NIP. 131 653 434**

**Mengetahui
Ketua Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Prof. Dr. Suharingsih, Ir.
NIP. 130 701 435**

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal 19 Desember 2007

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Mas'ud Hariadi, drh., M.Phil., Ph.D.

Anggota : Prof. Dr. Ismudiono, drh.,MS.

Prof. Win Darmanto, drs., M.Si.,Ph.D.

Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh.

Dr. Hudi Winarso, dr., Sp. And., M.Kes.

Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes.

Dr. Widjiati, drh.,M.Si.

Dr. Nuryadi, Ir., MS.



**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 304/J03/PP/2008
Tanggal : 8 Januari 2008**

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya yang dilimpahkan kepada saya, sehingga penulisan hasil penelitian untuk ujian kelayakan disertasi ini dapat terselesaikan.

Terima kasih yang tak terhingga saya haturkan kepada Prof.Dr. Ismudiono, drh., MS. Sebagai promotor beliau tanpa henti memberikan dorongan semangat untuk segera menyelesaikan jenjang pendidikan tertinggi. Kesabaran, perhatian dan senantiasa menyediakan waktu merupakan kekaguman saya kepada beliau. Beliau telah membimbing saya sejak pendidikan magister sampai dengan penyelesaian naskah ujian kelayakan disertasi ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat, hidayah dan barokahNya kepada beliau

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Ko-Promotor I, Prof. Win Darmanto, drs., M.Si., Ph.D. yang selalu menyediakan waktu untuk membimbing saya. Beliau telah banyak membangun kerangka berpikir saya serta memberikan pengarahan yang sangat bermanfaat dalam membantu penulisan disertasi ini.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Ko-Promotor II, Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh. yang tidak pernah bosan meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan pengarahan serta memberi dorongan semangat dan mengoreksi disertasi ini dengan penuh kesabaran.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Pemerintah Republik Indonesia melalui menteri Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberi kesempatan dan bantuan dana BPPS (Beasiswa Program Pascasarjana), sehingga saya dapat mengikuti pendidikan pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt. dan mantan Rektor Prof.Dr.Med. Puruhito, dr.,SpB.TKV. yang telah memberikan ijin dan berkenan menerima saya sebagai mahasiswa Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr.Hj. Sri Hajati, SH., MS. dan Asisten Direktur Bidang Akademik Prof. Dr. H.R. Eddy Rahardjo, dr.,Sp.An(K). I.C. serta mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof.Dr. Muh. Amin, dr., SpP(K) dan Asisten Direktur Bidang Akademik,

Prof.Dr.DNK. Laba Mahaputra, drh., M.Sc. yang telah memberikan fasilitas kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof.Dr. Suhariningsih, Ir., Ketua Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga, atas nasehat, dorongan semangat serta perhatian yang telah diberikan kepada saya.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof.Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D. dan mantan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof.Dr. Ismudiono, drh., MS. yang telah memberikan ijin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada Hibah Penelitian Program DUE-Like Batch III Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bantuan dana penelitian untuk penelitian pendahuluan saya.

Ungkapan terima kasih saya sampaikan kepada para penguji pada ujian kualifikasi, proposal, kelayakan serta ujian tahap I yakni : Prof.Dr. Laba Mahaputra, drh., M.Sc., Prof. Mas'ud Hariadi, drh.,M.Phil.,Ph.D., Dr. Hudi Winarso, dr.,Sp.And., M.kes., Dr. Nuryadi, Ir.,MS., Dr. Hari Basuki, dr.,M.Kes., Dr. Pudji Sianto, drh.,M.Kes., Dr. CA. Nidom,drh., MS. dan Dr. Widjiati, drh.,M.Si. atas masukan pemikiran dan penyempurnaan alur ilmiah kerangka penelitian dan disertasi ini.

Ungkapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. Aulanni'am. drh.,DES., sebagai konsultan pelaksanaan pemeriksaan laboratorium dalam penelitian disertasi saya serta yang terus menerus memberi motivasi kepada saya untuk segera menyelesaikan studi. Terimakasih saya sampaikan kepada Wibi Riawan, S.Si. staf laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah banyak memberikan bantuan pemeriksaan imunositokimia. Serta Dr. Dasrul, drh.,M.Si. yang telah banyak memberikan masukan demi kesempurnaan disertasi saya. Terima kasih kepada Tina, Inna, Novi, Herna, Arum dan Ha'nun yang telah banyak membantu saya di laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada Husni Anwar, drh., Dr. Pudji Sianto, drh.,M.Kes., Abdul Samik, drh.,M.Si., dan Erma Safitri, drh.,M.Si. juga semua staf di Bagian Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah banyak membantu dalam penelitian saya. Kepada Trilas Sardjito, drh.,M.Si. dan Tri Wahyu Suprayogi, drh.,M.Si. Saya mengucapkan terima kasih atas bantuan pengumpulan sampel penelitian dan telah membimbing saya dalam kegiatan di Laboratorium semen beku. Terima kasih pula saya ucapkan

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 ug/ml dan perlu dilakukan analisis genomik dan proteomik tirosin kinase spermatozoa pada berbagai spesies sehingga temuan in dapat diaplikasikan lebih luas.



SUMMARY

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

In producing frozen bovine semen, the proportion of motile spermatozoa after freezing (post-thawing motility) is 40%. This proportion remains adequate to use in artificial insemination program. The proportion is also applied in the standard procedure of semen freezing at Artificial Insemination Center (Balai Besar Inseminasi Buatan) Singosari. During the process of semen freezing, the percentage of motile spermatozoa becomes 34-50%, and membrane integrity becomes 45%. The reduced percentage of post-thawing motility and viable spermatozoa is commonly found in freezing process, since drastic temperature reduction may result in 20% of the total spermatozoa. Different temperature between freezing process and post-thawing period may increase spermatozoa membrane permeability that results in cell death. The damage of spermatozoa plasma membrane occurs during the process of freezing and thawing.

Tyrosine kinase (TK) is one of spermatozoa plasma membrane protein whose function is as the primary mediator of fusion between spermatozoa and zona pellucida 3 (ZP3). The increase of tyrosine kinase phosphorylation is related with spermatozoa capacitation through the increase of calcium influx, which activates adenilate cyclase, and, subsequently, affects the increase of cyclic adenosin monophosphate (cAMP).

To date, several studies on tyrosine kinase in various species have not been able to describe the characteristics of tyrosine kinase and how the mechanism would be if it is supplemented within dilution medium of FH frozen semen.

Problems addressed in this study are: 1) What are the biochemical of tyrosine kinase and its optimum activity?, 2) Would the supplementation of tyrosine kinase into frozen semen thawing medium increase the post-thawing spermatozoa quality of FH?, 3) Would the tyrosine kinase-supplemented FH frozen semen increase the in vitro fertilization rate?, and 4) Would the artificial insemination in FH using tyrosine kinase-supplemented FH frozen semen increase the pregnancy rate?

The general objectives of this study were to investigate the role of tyrosine kinase supplemented into frozen semen thawing medium to increase the quality of post-thawing spermatozoa and to disclose tyrosine kinase mechanism in recognizing process with the ovum either in vitro or in vivo fertilization. The particular objectives were 1) Identification and characterization of tyrosine kinase of FH spermatozoa based on tyrosine kinase expression in spermatozoa, molecular weight, specificity and optimum activity, 2) analyzing optimum dose of supplemented tyrosine kinase within frozen semen thawing medium on post-thawing spermatozoa quality, which included: the percentage of viable spermatozoa, spermatozoa motility, and spermatozoa membrane integrity, 3) to prove that tyrosine kinase-supplemented FH frozen semen can increase in vitro fertilization rate, and 4) to prove that tyrosine kinase-supplemented FH frozen semen can increase the pregnancy rate of dairy cow.

The scientific benefits of this study were 1) to explain the mechanism of tyrosine kinase that has been supplemented within frozen semen thawing medium in increasing post-thawing spermatozoa quality, and 2) to explain the mechanism of

tyrosine kinase in inducing spermatozoa recognition of the ovum, resulting in the increase of *in vitro* fertilization rate and pregnancy rate. The practical benefit of this study was that the supplementation of tyrosine kinase into frozen semen thawing media, particularly in FH, can be developed as the basis for producing frozen semen with better spermatozoa quality, which can be expected to raise the pregnancy rate of cow.

The hypotheses of this study were 1) tyrosine kinase supplementation in various doses into frozen semen medium can increase the quality of post-thawing FH spermatozoa quality, which includes the percentage of motility, viable spermatozoa, and spermatozoa membrane integrity, 2) tyrosine kinase-supplemented FH frozen semen can increase *in vitro* fertilization rate, and 3) artificial insemination in cow using tyrosine kinase-supplemented frozen semen can increase the pregnancy rate.

This was a laboratory study that consisted of four stages. Firstly, characterization of tyrosine kinase resulting from the isolation of FH spermatozoa isolation, which including: the expression of tyrosine kinase in FH spermatozoa; the determination of tyrosine kinase molecular weight using SDS-PAGE method and confirmed with dot blot method and followed with Western Blot using tyrosine kinase monoclonal antibody, and the activity test of tyrosine kinase from the isolation of FH spermatozoa by determining its optimum condition. Secondly, testing the quality of tyrosine kinase-supplemented frozen semen resulting from the isolation of FH spermatozoa, which including the determination of tyrosine kinase level using tyrosin kinase standard with ELISA method, the examination of spermatozoa motility percentage, the percentage of viable spermatozoa and spermatozoa plasma membrane integrity, as well as the immunocytochemical expression of tyrosine kinase. Thirdly, fertility test of tyrosine kinase-supplemented frozen semen isolated *in vitro* from FH spermatozoa. Fourthly, fertility test of tyrosine kinase-supplemented frozen semen isolated from FH spermatozoa by insemination into female FH. The first stage of the study was explorative, while the second to the fourth stage was experimental, so that this study employed the complete randomized design.

The result of the first stage of this study revealed that tyrosine kinase in spermatozoa showed brownish color at the sperm's head, which resulted from the reaction between tyrosine kinase in the spermatozoa and MAb tyrosine kinase, SA-HRP-labeled secondary antibody, and DAB substrate. The confirmation of tyrosine kinase molecular weight using Western blot method by means of MAb-Tyrosin Kinase, which was preceded with SDS-PAGE method, revealed eleven protein bands of 160.39, 114.20, 95.00, 76.45, 59.70, 46.64, 37.58, 31.18, 21.55, 17.91 and 14.42 kDa. The confirmation of tyrosine kinase isolate from FH spermatozoa was done using Dot Blot technique with MAb-tyrosin kinase. Specific reaction between antigen (tyrosine kinase) and antibody (MAb-tyrosin kinase) was visualized as purplish blue patch. The confirmation of tyrosine kinase molecular weight isolated from FH was undertaken using Western blot technique. Tyrosine kinase isolate from FH spermatozoa was used as antigen and MAb-tyrosine kinase was used as primary antibody from protein series contained in FH spermatozoa. One protein band appeared in nitrocellulose membrane with molecular weight of 95 kDa was tyrosine kinase. Optimum condition of tyrosine kinase activity (pH 7.0, temperature 35°C and incubation time 30 minutes) revealed average tyrosine kinase activity of 0.02188 unit.

The result of the second stage of this study revealed that tyrosine kinase level resulting from electroelution was 20.030 µg/ml isolate. The data were used as the

basis for determining tyrosine kinase supplementation dose into frozen semen thawing medium, i.e. 100 µg/ml (P1), 200 µg/ml (P2) and 300 µg/ml (P3). Tyrosine kinase supplementation into frozen semen thawing medium could increase the percentage of viable spermatozoa pre- and post-thawing of $77.5 \pm 2.6352\%$ and $53.0 \pm 2.5819\%$, respectively; increase the percentage of spermatozoa motility pre- and post-thawing of $72.5 \pm 2.6352\%$ and $47.0 \pm 2.5819\%$, respectively; and increase the percentage of spermatozoa membrane integrity pre- and post-thawing of $68.0 \pm 0.600\%$ and $51.33 \pm 0.462\%$, respectively, each in optimum dose of 200 µg/ml

The result of the third stage of this study was that in in vitro fertilization test various doses of tyrosine kinase-supplemented FH frozen semen could increase fertilization rate. In 24-hour observation, 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 the highest fertilization rate (4-cell embryo) was 54.54%. The result of the fourth stage was that in field test various doses of tyrosine kinase-supplemented FH frozen semen could increase the pregnancy rate in female cow as much as 100% at the optimum dose of 200 µg/ml

In conclusion, the characteristics of tyrosine kinase isolated from FH spermatozoa expresses tyrosine kinase at the sperm's head. It has 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 of 30 minutes). Tyrosine kinase supplementation into frozen semen thawing medium can increase the percentage of viable spermatozoa pre- and post-thawing of $77.5 \pm 2.6352\%$ and $53.0 \pm 2.5819\%$, respectively; increase the percentage of spermatozoa motility pre- and post-thawing of $72.5 \pm 2.6352\%$ and $47.0 \pm 2.5819\%$, respectively; and increase the percentage of spermatozoa membrane integrity pre- and post-thawing of $68.0 \pm 0.600\%$ and $51.33 \pm 0.462\%$, respectively, each in optimum dose of 200 µg/ml. In in vitro fertilization test various doses of tyrosine kinase-supplemented FH frozen semen could increase fertilization rate. In 24-hour observation, the highest fertilization rate (zygote) in the dose of 200 µg/ml is 77.27%, in 48-hour observation, the highest fertilization rate (2-cell embryo) is 63.63%, and in 72-hour the highest fertilization rate (4-cell embryo) is 54.54%. In field test various doses of tyrosine kinase-supplemented FH frozen semen could increase the pregnancy rate in female cow as much as 100% at the optimum dose of 200 µg/ml.

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

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DEPAN.....	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
HALAMAN PRASYARAT GELAR.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	viii
RINGKASAN.....	xii
SUMMARY.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
DAFTAR ISI	xix
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR GAMBAR	xxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
DAFTAR SINGKATAN	1
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	5
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Fisiologi Semen	9
2.2 Karakteristik dan Sifat Kimiawi Spermatozoa	12
2.3 Membran Plasma Spermatozoa	15
2.4 Enzim	16
2.4.1. Enzim tyrosin kinase	19
2.5 Beberapa Faktor Yang Berpengaruh Terhadap Aktivitas Enzim	19
2.5.1 Pengaruh temperatur	20
2.5.2 Pengaruh pH	21
2.5.3 Pengaruh konsentrasi enzim dengansubstrat.....	22
2.6 Tinjauan Tentang Zona Pelusida	23
2.7 Semen Beku	23
2.7.1 Mekanisme pembekuan	26
2.7.2 Metode pembekuan	28
2.7.3 Pengaruh pembekuan terhadap kualitas semen	30
2.8 Media Krioprotektan	31
2.9 Fertilisasi In Vitro	32
2.10 Penentuan Kualitas Oosit.....	34
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	34
3.1 Kerangka Konseptual	39
3.2 Hipotesis Penelitian	40
BAB 4 METODE PENELITIAN	40
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	41
4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel	41
4.2.1 Populasi penelitian	41
4.2.2 Sampel penelitian	42
4.3 Variabel Penelitian	42

4.4 Definisi Operasional Variabel	43
4.5 Bahan dan Peralatan Penelitian	44
4.6 Prosedur Penelitian	45
4.6.1 Tahap Penelitian I	45
4.6.1.1 Konfirmasi adanya TK pada spermatozoa sapi FH	46
4.6.1.2 Pemisahan protein spermatozoa sapi FH	47
4.6.1.3 Karakterisasi dan Identifikasi TK dengan SDS-PAGE	48
4.6.1.4 Isolasi TK dengan elektroelusi	49
4.6.1.5 Konfirmasi isolat TK dengan imunoblotting	49
4.6.1.6 Uji Aktivitas TK berdasarkan kondisi optimum	51
4.6.2 Tahap Penelitian II	55
4.6.2.1 Penentuan kadar TK dengan ELISA	55
4.6.2.2 Penampungan semen dan pemeriksaan kualitas sperma.....	56
4.6.2.3 Pembuatan bahan pengencer	56
4.6.2.4 Pencampuran semen dengan bahan pengencer	57
4.6.2.5 Pemeriksaan persentase sperma hidup sebelum dan sesudah pembekuan	58
4.6.2.6 Pemeriksaan persentase motilitas sperma sebelum dan sesudah pembekuan	59
4.6.2.7 Pemeriksaan persentase integritas membran sperma sebelum dan sesudah pembekuan	60
4.6.2.8 Pemeriksaan ekspresi TK pada spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan.....	60
4.6.3 Tahap Penelitian III	61
4.6.3.1 Koleksi oosit	61
4.6.3.2 Pematangan oosit	62
4.6.3.3 Preparasi fertilisasi in vitro	62
4.6.4 Tahap Penelitian IV.....	63
4.7 Analisis Data	63
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	67
5.1 Hasil Penelitian dan Analisis Hasil.....	67
5.1.1 Karakter biokimiawi TK spermatozoa sapi FH	68
5.1.1.1 Ekspresi TK spermatozoa dengan teknik imunositokimia.....	68
5.1.1.2 Konfirmasi pita protein sperma sapi FH dengan SDS-PAGE....	69
5.1.1.3 Konfirmasi TK sperma sapi FH dengan teknik imunoblotting....	70
5.1.1.4 Uji aktivitas TK sperma sapi FH pada kondisi optimum.....	71
5.1.2 Uji kualitas semen beku yang di suplementasi dengan tyrosin kinase hasil isolasi spermatozoa Sapi FH.....	76
5.1.2.1 Penentuan kadar TK dengan teknik ELISA	76
5.1.2.2 Persentase sperma hidup sebelum dan sesudah pembekuan.	77
5.1.2.3 Persentase motilitas sperma sebelum & sesudah pembekuan	81
5.1.2.4 Persentase integritas membran sperma sebelum dan sesudah pembekuan	85
5.1.2.5 Ekspresi TK pada sperma sebelum dan sesudah pembekuan.	89
5.1.3 Uji fertilitas semen beku yang disuplementasi TK secara in vitro.....	94
5.1.4 Uji fertilitas semen beku yang disuplementasi TK melalui IB pada sapi betina.....	99
BAB 6 PEMBAHASAN	101
6.1 Karakterisasi TK Spermatozoa Sapi FH.....	101

6.1.1. Ekspresi TK pada sperma sapi FH dengan teknik imunositokimia	101
6.1.2. Penentuan berat molekul TK dengan teknik SDS-PAGE.....	102
6.1.3. Konfirmasi TK sperma sapi FH dengan teknik Dot blot	104
6.1.4. Konfirmasi TK sperma sapi FH dengan teknik Western blot.....	105
6.1.5. Penentuan Aktivitas TK Hasil Isolasi Sperma Sapi FH	106
6.1.5.1 Pengaruh pH	106
6.1.5.2 Pengaruh temperatur	107
6.1.5.3 Pengaruh waktu inkubasi	108
6.1.6. Peran TK endogen terhadap kualitas spermatozoa	109
6.2. Uji Kualitas semen beku yang disuplementasi TK sperma	111
6.2.1. Penentuan kadar TK dengan ELISA.....	111
6.2.2. Persentase spermatozoa hidup.....	112
6.2.3. Persentase motilitas spermatozoa.....	114
6.2.4. Integritas membran spermatozoa	117
6.2.5. Ekspresi TK pada spermatozoa	120
6.3. Uji Fertilitas Semen Beku yang Disuplementasi TK Secara In Vitro dan In Vivo.....	121
6.3.1. Uji laboratoris semen beku sapi FH yang disuplementasi TK secara FIV	121
6.3.2. Aplikasi lapangan semen beku sapi FH yang disuplementasi TK secara IB pada sapi betina	124
6.4. Temuan Baru	127
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	130
7.1 Kesimpulan	130
7.2 Saran	131
DAFTAR PUSTAKA	132
LAMPIRAN	140

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 2.1. Data Karakter Semen yang Diejakulasikan Oleh Hewan Jantan Normal	9
Tabel 2.2. Tahapan Proses Pembekuan Semen Sapi	25
Tabel 5.1. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas TK.....	71
Tabel 5.2. Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas TK.....	72
Tabel 5.3. Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas TK	73
Tabel 5.4. Aktivitas Isolat TK Pada Kondisi Optimumnya	75
Tabel 5.5. Rerata \pm SB Persentase Spermatozoa Hidup Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan.....	77
Tabel 5.6. Uji F Spermatozoa Hidup Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan	78
Tabel 5.7. Uji Univariat analisis varian persentase sperma hidup pada berbagai Perlakuan sebelum dan sesudah pembekuan.....	79
Tabel 6.8. Uji Univariat Analisis Varian Persentase Sperma Hidup pada Berbagai Perlakuan Selama Pembekuan	79
Tabel 6.9. Uji Tukey HSD Interaksi Pembekuan Dengan Dosis Perlakuan Terhadap Persentase Sperma Hidup.....	80
Tabel 5.10 Rataan \pm SB Persentase Motilitas Spermatozoa Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan.....	81
Tabel 5.11 Uji F Motilitas Spermatozoa Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan	82
Tabel 5.12 Uji Univariat Analisis Varian Persentase Motilitas Sperma Pada Berbagai Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan.....	82
Tabel 5.13 Uji Univariat Analisis Varian Persentase Motilitas Sperma Pada Berbagai Perlakuan Selama Pembekuan	83
Tabel 5.14 Rataan \pm SB Persentase Integritas Membran Spermatozoa Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan.....	85
Tabel 5.15 Uji F Integritas Membran Spermatozoa Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan	87
Tabel 5.16 Uji Univariat Analisis Varian Persentase Integritas Membran Sperma Pada Berbagai Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan.....	87
Tabel 5.17 Uji Univariat Analisis Varian Persentase Integritas Membran Sperma Pada Berbagai Perlakuan Selama Pembekuan	88
Tabel 5.18 Rataan \pm SB Ekspresi TK Pada Spermatozoa Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan.....	91
Tabel 5.19 Perkembangan Embrio Pada Proses FIV menggunakan Semen Beku yang Disuplementasi TK.....	94
Tabel 5.20 Uji F Jumlah Sigot yang Diperoleh dari Hasil FIV Waktu Pengamatan 24 jam	95
Tabel 5.21 Uji Analisis Varian Satu Arah Jumlah Sigot yang Diperoleh Dari Hasil FIV Waktu Pengamatan 24 jam	95
Tabel 5.22 Uji F Jumlah Embrio 2 sel yang Diperoleh Dari Hasil FIV Waktu Pengamatan 48 jam	96

Tabel 5.23 Uji Analisis Varian Satu Arah Jumlah Embrio 2 sel yang Diperoleh dari Hasil FIV Waktu Pengamatan 48 jam	96
Tabel 5.24 Uji F Jumlah Embrio 4 sel yang Diperoleh Dari Hasil FIV Waktu Pengamatan 72 jam	97
Tabel 5.25 Uji Analisis Varian Satu Arah Jumlah Embrio 4 sel yang Diperoleh Dari Hasil FIV Waktu Pengamatan 72 jam	97
Tabel 5.26 Persentase Kebuntingan Sapi FH yang di IB Dengan Semen Beku Yang Disuplementasi TK	98



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1. Morfologi Spermatozoa	12
Gambar 2.3. Reaksi Enzimatik Aktivitas Tyrosin Kinase	17
Gambar 2.4. Mekanisme Fusi Spermatozoa-ZP Sel Telur Mamalia	19
Gambar 2.5. Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim	20
Gambar 2.6. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim	21
Gambar 4.1. Kerangka Operasional Penelitian I	52
Gambar 4.2. Kerangka Operasional Penelitian II dan IV	62
Gambar 5.1. Ekspresi TK Sperma Sapi FH Dengan Teknik Imunositokimia.....	67
Gambar 5.2. Hasil SDS-PAGE Protein Membran Sperma Sapi FH	68
Gambar 5.3. Konfirmasi TK Sperma Sapi FH Dengan Teknik Dot blot	69
Gambar 5.4. Konfirmasi Berat Molekul TK Dengan Teknik Western blot	70
Gambar 5.5. Kurva Hubungan pH Dengan Aktivitas TK	71
Gambar 5.6. Kurva Hubungan Temperatur Dengan Aktivitas TK.....	73
Gambar 5.7. Kurva Hubungan Waktu Inkubasi Dengan Aktivitas TK	74
Gambar 5.8. Kurva TK Standar	76
Gambar 5.9. Histogram Persentase Spermatozoa yang Hidup Sebelum dan Setelah Pembekuan Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan.....	77
Gambar 5.10. Histogram Persentase Motilitas Spermatozoa Sebelum dan Setelah Pembekuan Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan.....	81
Gambar 5.11. Integritas Membran Plasma Spermatozoa Sapi FH yang Diamati Dengan HOST.....	84
Gambar 5.12. Histogram Persentase Integritas Membran Spermatozoa Sebelum dan Sesudah Pembekuan Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan.....	86
Gambar 5.13. Ekspresi TK Spermatozoa Sapi FH Pada Kondisi Sebelum Perlakuan	89
Gambar 5.14. Ekspresi TK spermatozoa Sapi FH Pada Kondisi dan Sebelum Setelah Perlakuan	90
Gambar 5.15. Ekspresi TK spermatozoa Sapi FH Pada Kondisi Sesudah Perlakuan	92
Gambar 5.16. Embrio Sapi Hasil FIV	93
Gambar 5.17. Histogram Persentase Fertilisasi Pada FIV	94
Gambar 5.18. Histogram Persentase Kebuntingan Pada Sapi FH yang Di IB dengan Semen Beku	99
Gambar 6.1. Mekanisme Tيروسin Kinase Eksogen dalam Meningkatkan Fosfori- lasi Tيروسin Kinase sampai Terjadi Fusi Sperma-ZP3 Sel Telur	129

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Pembuatan Reagensia	140
Lampiran 2. Diagram Alur Percobaan	147
Lampiran 2.1. Isolasi Protein Spermatozoa Sapi FH	147
Lampiran 2.2. Pembuatan Preparat Histologis	148
Lampiran 2.3. Imunositokimia	149
Lampiran 2.4. Diagram Alir Metode SDS-PAGE	150
Lampiran 2.5. Diagram Alir Metode Dot Blot	153
Lampiran 2.6. Diagram Alir Metode Western Blot	154
Lampiran 2.7. Pengukuran Kadar Tyrosin Kinase Dengan Metode ELISA	155
Lampiran 2.8. Diagram Alir Penentuan Kondisi Optimum TK	157
Lampiran 2.9. Penghitungan Kadar TK	161
Lampiran 3. Pengujian Statistik	163
Lampiran 3.1. Data Motilitas Spermatozoa dan Spermatozoa yang Hidup	163
Lampiran 3.2. Uji Univariat Analisis Varian Motilitas Sebelum dan Sesudah Pembekuan	165
Lampiran 3.3. Uji Univariat Analisis Varian Sebelum dan Sesudah Pembekuan	168
Lampiran 3.4. Interaksi Pembekuan * Perlakuan Spermatozoa	171
Lampiran 3.5. Data Integritas Membran Sperma Sapi FH Sebelum dan Sesudah Pembekuan	172
Lampiran 3.6. Uji Univariat Analysis of Varian Integritas membran Sperma.....	173
Lampiran 3.7. Uji Univariat Analysis of Varian Integritas membran Sperma.....	174
Lampiran 3.8. Data Jumlah Ekspresi TK Pada Sperma	176
Lampiran 3.9. Uji Anava Satu Arah Ekspresi Tk Pada Sperma	177
Lampiran 3.10. Data Persentase Fertilisasi FIV	180
Lampiran 3.11. Uji Anava Satu Arah Jumlah Sigot Hasil FIV	181
Lampiran 3.12. Uji Anava Satu Arah Jumlah Embrio 2 sel Hasil FIV	183
Lampiran 3.13. Uji Anava Satu Arah Jumlah Embrio 4 sel Hasil FIV	185
Lampiran 3.14. Data Persentase kebuntingan Pada Sapi Betina	187
Lampiran 3.15. Deskriptif Dan Uji Khi-Kuadrat Angka kebuntingan	189

DAFTAR SINGKATAN

AC	: Adenylate Cyclase
AP	: Alkaline Phosphatase
APS	: Ammonium per Sulphat
ATP	: Adenosine Triphosphat
BBIB	: Balai Besar Inseminasi Buatan
BSA	: Bovine Serum Albumin
BM	: Berat Molekul
BO	: Brickett Oliphant
cAMP	: Cyclic Adenosin Monophosphat
CFA	: Complete Freund's Adjuvant
CPE	: Coronary penetrating enzyme
DAB	: 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DNA	: Deoksiribonucleic Acid
DAG	: Diacylglycerol
DW	: Deionized Water
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EGF	: Epidermal Growth Factor
FH	: Friesian Holstein
FIV	: Fertilisasi In Vitro
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
HOST	: Hypoosmotic Swelling Test
H ₂ O ₂	: Hydrogen Peroksida
IB	: Inseminasi Buatan
IFA	: Incomplete Freund's Adjuvant
IgG	: Immunoglobulin G
IP3	: Inositol Triphosphate
IP4	: Inositol Tetrphosphate
kDa	: Kilo Dalton
LH	: Luteinizing Hormone
MPU	: Membran Plasma Utuh
NADPH	: Nicotinamid adenine dinukleotida phosphate
OD	: Optical Density
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PKA	: Protein Kinase A
PKC	: Protein Kinase C
PC	: Phosphatidil Choline
PLC	: Phospholipase C
PIP2	: Phosphatidil inositol Diphosphate
pNPP	: Para Nitro Phenol Phosphate
PMSF	: Phenyl Methene Sulfonyl Fluoride
Ppm	: Part Per Million
PTM	: Post Thawing Motility
PVP	: Polyvinil Pyrolidon
Rf	: Retardation Factor
ROS	: Reactive Oxygen Species

rEGF	: Receptor Epidermal Growth Factor
Rpm	: Rotation per minute
RPH	: Rumah Potong Hewan
SAS	: Saturated Ammonium Sulphate
SDS PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphonat – Polyacrylamid Gel Electroforesis
SA-HRP	: Strepavidin-Horseradish Peroxidase
TBS	: Tris Buffer Saline
TCA	: Trichloro Acetic Acid
TK	: Tyrosin Kinase
TE	: Transfer Embrio
TCM-199	: Tissue Culture medium -199
TEMED	: N,N,N,N Tetramethyl Etylene Diamina
TRIS-Cl	: Tris- hydroxyl-aminomethane-chloride
UV-Vis	: Ultra Violet Visible
ZP3	: Zona Pelusida 3



BAB 1

PENDAHULUAN

1 Latar Belakang

Salah satu upaya pemerintah dalam meningkatkan populasi ternak untuk keperluan penyediaan protein hewani utamanya yang berasal dari susu, dilakukan melalui penyediaan bibit ternak, khususnya ternak sapi perah, dan penerapan bioteknologi reproduksi (Direktorat Jenderal Peternakan, 2005). Salah satu bioteknologi reproduksi yang telah diterima oleh masyarakat peternak dalam meningkatkan produksi ternak adalah teknologi inseminasi buatan (IB). Melalui penggunaan teknologi IB akan dapat memperbaiki mutu genetik ternak sapi Friesian Holstein (FH) dengan cara membuat semen beku yang berasal dari pejantan unggul, ini merupakan salah satu cara meningkatkan efisiensi reproduksi (Hafez, 2000).

Dalam menunjang program IB dibutuhkan penyediaan semen yang cukup secara kualitas dan kuantitas, dalam bentuk semen segar atau semen beku. Kualitas semen segar lebih cepat menurun dibandingkan semen beku meskipun di simpan dalam medium pengencer maupun tanpa medium pengencer. Cara penyimpanan semen dapat dalam kondisi dingin (dalam refrigerator) atau dalam kondisi beku (dalam nitrogen cair). Semen hasil pendinginan mempunyai daya tahan relatif pendek, sedang bila disimpan dalam kondisi beku memungkinkan penggunaan semen dalam jangka waktu lama (Suyadi, 2003).

Pembekuan merupakan proses penghentian sementara metabolisme sel tanpa mematikan fungsi sel dan proses metabolisme dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan (Susilawati, 2000). Secara prinsip pembekuan semen adalah mempertahankan viabilitas dan fertilitas spermatozoa (Partodihardjo, 1992).

Pada teknik pembekuan semen sapi, jumlah spermatozoa yang motil setelah pembekuan (*post thawing motility*) sebesar 40% (Tanaka, *et al.*, 2000). 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 (BBIB). Dikatakan pula bahwa pada proses pembekuan semen, persentase motilitas spermatozoa menjadi 34 – 50% dan integritas membran menjadi 45% (Anonymous, 2005). 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 (Suprayogi, 1996). Hal ini sesuai dengan pernyataan Park and Graham (1992) bahwa kerusakan membran plasma spermatozoa terjadi selama proses pembekuan dan *thawing*.

Pommer *et al.* (2003) mengatakan bahwa spermatozoa yang dibekukan akan menyebabkan perubahan beberapa karakteristik pada membran plasma, antara lain terjadi reorganisasi membran, kadar kalsium meningkat, *reactive oxygen species* (ROS) meningkat dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi menurun. Kerusakan integritas membran sel akan mempengaruhi fungsi komponen membran sel spermatozoa seperti lipid, protein dan karbohidrat (Park and Graham, 1992). Menurut Pablo, *et al.* (1990), protein membran plasma spermatozoa berfungsi sebagai reseptor, enzim dan antigen yang terlibat dalam pengenalan membran kepala spermatozoa seperti adhesi zona pelusida dengan spermatozoa, induksi reaksi akrosom dan fusi spermatozoa – sel telur (Herrero *et al.*, 1999).

Tirosin kinase (TK) adalah salah satu protein membran plasma spermatozoa yang berfungsi sebagai mediator utama terjadinya fusi spermatozoa dengan zona pelusida 3 (ZP3) (Leyton and Saling, 1989), selanjutnya akan terjadi beberapa perubahan seluler yaitu terjadinya influks kalsium ekstraseluler dan efluks proton secara tiba-tiba, yang mengakibatkan induksi eksositosis akrosom dan merangsang membran plasma fusogenik sehingga mampu mengenali membran vitelin oosit untuk berfusi (Bunch *et al.*, 1994; Leyton *et al.*, 1992). Morales and Llanos (1996) menyatakan bahwa tirosin kinase merupakan salah satu molekul protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa dan berfungsi untuk pengenalan dengan ZP3 serta berperan dalam signal transduksi yang akan menghasilkan autofosforilasi dari residu tirosin. Hasil penelitian Naz and Ahmed (1994) melaporkan beberapa protein membran spermatozoa pada tikus yang mempunyai kemampuan mengikat protein zona pelusida (ZP) sel telur mempunyai berat molekul 95, 63, 51 dan 14-18 kDa. Namun yang mempunyai aktivitas autofosforilasi paling potensial adalah protein dengan berat molekul 95 kDa. Protein dengan berat molekul 95 kDa ini digolongkan kedalam protein tirosin kinase.

Hasil penelitian Pommer *et al.*,(2003) menggunakan spermatozoa kuda yang dikapasitasi secara *in vitro*, terjadi peningkatan fosforilasi tirosin kinase yang dideteksi dengan metode imunofluoresen. Adanya peningkatan fosforilasi tirosin kinase ini berhubungan dengan motilitas dan hiperaktivitas spermatozoa . Penelitian serupa juga dilakukan oleh Visconti and Kopf (1998) pada spermatozoa tikus, sapi dan manusia bahwa fosforilasi tirosin kinase berhubungan dengan terjadinya kapasitasi spermatozoa melalui mekanisme peningkatan influks kalsium yang akan mengaktifkan adenilat siklase, selanjutnya akan berpengaruh pada peningkatan cyclic adenosin monophosphat (cAMP). Selanjutnya hasil penelitian pendahuluan

Madyawati, dkk. (2004) menunjukkan bahwa penambahan *crude* tirosin kinase sebesar 7% dalam *Tissue Culture Medium* (TCM) -199 dapat meningkatkan fusi spermatozoa-sel telur dan dispersi dari sel-sel granulosa secara *in vitro*.

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 medium pengencer semen beku sapi FH.

Fungsi protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa antara lain adalah sebagai reseptor, antigen, signal transduksi dan stabilisasi ikatan kovalen penyusun protein membran plasma. Pada proses pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen penyusun protein membran plasma, membran mitokondria maupun komponen penyusun yang lain. Melemahnya ikatan kovalen yang terjadi akan diikuti dengan putusanya ikatan tersebut jika sel spermatozoa terpapar suhu yang rendah dalam waktu yang lama. Hal ini akan menyebabkan perubahan komposisi penyusun membran spermatozoa dan akan mengakibatkan penurunan fungsi dan destabilisasi membran (Rubinsky, 2000). Tirosin kinase termasuk dalam kelompok protein yang salah satu fungsinya adalah stabilisasi ikatan kovalen penyusun protein membran, sehingga bila ditambahkan dalam medium pengencer semen beku diharapkan dapat mencegah putusanya ikatan kovalen membran spermatozoa.

Berdasarkan uraian diatas menjadi sangat penting dilakukan pengkajian tentang karakter tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH serta peran tirosin kinase dalam medium pengencer semen beku yang nantinya diharapkan dapat sebagai alternatif dalam memperbaiki kualitas semen beku yang selanjutnya dapat meningkatkan reproduktivitas dan produktivitas ternak khususnya sapi perah.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, maka permasalahan yang timbul adalah sebagai berikut :

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*?
4. Apakah inseminasi buatan pada sapi perah betina menggunakan semen beku yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dapat meningkatkan angka kebuntingan?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari 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*.

1.3.2 Tujuan Khusus

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*
4. Membuktikan bahwa semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dapat meningkatkan angka kebuntingan pada sapi perah.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuan

- Menjelaskan mekanisme tirosin kinase yang telah disuplementasi ke dalam medium pengencer semen beku dalam meningkatkan kualitas spermatozoa *pasca thawing*
- Menjelaskan mekanisme tirosin kinase dalam menginduksi pengenalan spermatozoa dengan sel telur sehingga dapat meningkatkan angka fertilisasi pada fertilisasi *in vitro* serta meningkatkan angka kebuntingan

1.4.2 Manfaat Praktis

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.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fisiologi Semen

Semen adalah sekresi alat kelamin jantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran kelamin betina pada waktu kopulasi (Toelihere, 1985). Semen terdiri dari dua bagian yaitu bagian yang padat adalah sel spermatozoa yang dihasilkan oleh tubulus seminiferus dalam testes dan bagian yang cair merupakan plasma semen yang dihasilkan oleh kelenjar aksesoris (Hafez, 2000, Partodihardjo, 1992). Produksi spermatozoa oleh testes maupun plasma semen oleh kelenjar aksesoris keduanya dikontrol oleh hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) yang dihasilkan oleh hipofisis anterior serta hormon testoteron yang dihasilkan oleh sel Leydig dalam testes (Toelihere, 1985).

Menurut Hafez (2000) volume semen sapi yang diejakulasikan secara normal berkisar antara 5 – 8 ml, sedangkan menurut Partodihardjo (1992) volume semen sapi dalam satu kali ejakulasi hanya berkisar 4 – 5 ml, konsentrasi spermatozoa yang tinggi akan memberikan warna putih kekuningan. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap volume semen sapi per- ejakulasi antara lain adalah bangsa, umur, ukuran, berat badan, tingkat nutrisi, frekuensi penampungan dan besar testis (Bearden and Fuquay, 1992). Selanjutnya adanya perbedaan anatomi kelenjar kelamin pada berbagai jenis hewan juga menyebabkan perbedaan volume dan komposisi (Toelihere, 1985).

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

Tabel 2.1. Data Karakter Semen yang Diejakulasikan Oleh Hewan Jantan Normal

Spesies	Volume ejakulat (ml)	Konsentrasi Sperma($\times 10^6$ /ml)	Jumlah total sperma per-ejakulasi ($\times 10^9$)
Sapi	4 - 8	1200 - 1800	4 - 14
Domba	0,8 - 1,2	2000 - 3000	2 - 4
Babi	150 - 500	200 - 300	40 - 50
Kuda	30 - >150	100 - 250	3 - 15

Sumber : Hunter, 1995

2.2 Karakteristik dan Sifat Kimiawi Spermatozoa

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

Secara normal spermatozoa terdiri dari bagian kepala, leher, bagian tengah dan ekor. Komponen bagian kepala sel spermatozoa adalah nukleus sebagai pembawa materi genetik. *Post nuclear cap*, sebagai penutup bagian posterior dari nukleus. Akrosom sebagai penutup bagian nukleus (tudung protoplasmik) (Hafez, 1993).

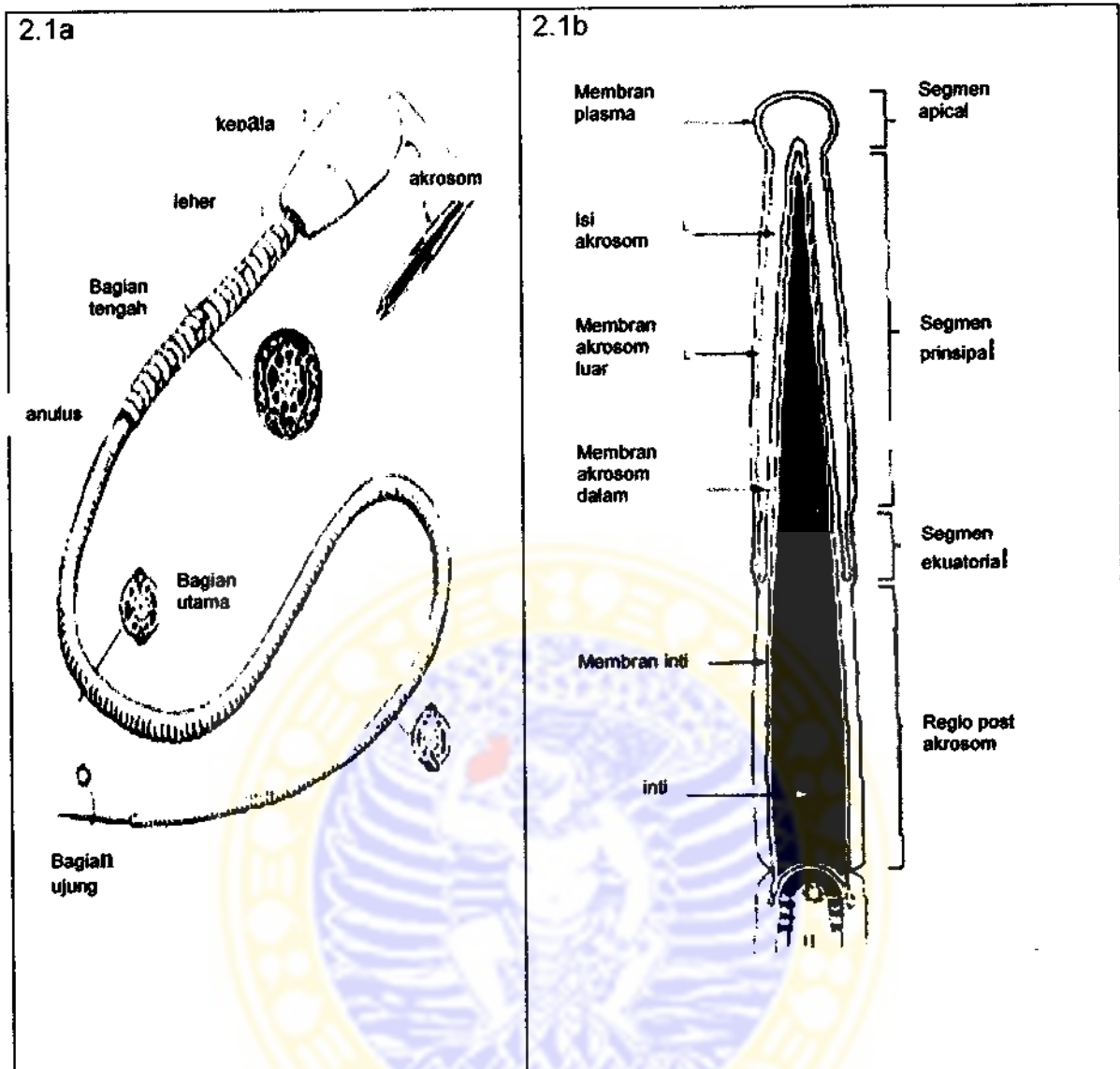
Menurut Partodihardjo (1992) morfologi normal spermatozoa sapi mempunyai ciri kepala lonjong dengan batas teratur dan bagian tepi akrosom yang menutup lebih dari sepertiga permukaan kepala. Panjang kepala 8 – 9 mikron dan lebarnya 2 – 3 mikron. Ukuran lebar harus antara setengah dari dua pertiga ukuran panjang. Bagian tengah berukuran kurang dari sepertiga lebar kepala dengan batas yang teratur. Bagian tengah terletak pada satu sumbu dengan poros panjang kepala dengan ukuran 11- 12 mikron. Ekor spermatozoa berbentuk ramping, tidak tergulung, batasnya teratur serta mempunyai ukuran panjang 45 – 50 mikron.

Setiap bagian sel spermatozoa mempunyai perbedaan susunan kimiawi. Kepala spermatozoa terdiri dari *deoxyribo nucleic acid* (DNA) yang terdapat di bagian nukleus spermatozoa. Bagian akrosom mengandung beberapa enzim proteolitik yaitu hyaluronidase, akrosin dan *coronary penetrating enzyme* (CPE) yang penting untuk penembusan sel telur saat proses fertilisasi (Hafez, 2000).

Pada bagian leher spermatozoa mempunyai panjang 5-7 μm dipisahkan dari ekor oleh cincin yang disebut annulus. Dalam sitoplasma spermatozoa banyak mengandung lipid juga terdapat mitokondria dan dikelilingi oleh suatu filamen yang berbentuk heliks. Bagian leher berhubungan dengan kebutuhan energi untuk motilitas serta berperan dalam metabolisme oksidatif. Beberapa zat yang dihasilkan di bagian leher spermatozoa antara lain enzim glikolitik, asam amino, sulfhidril, kholesterol, sitokrom oksida, lipoprotein dan sitokrom yang penting dalam reaksi

respirasi spermatozoa. Plasmalogen merupakan senyawa lemak terbanyak di dalam spermatozoa didapatkan di bagian ekor terutama pada mitokondria yang merupakan sumber energi endogen untuk aktivitas spermatozoa. Beberapa enzim yang mengatur metabolisme aerob maupun anaerob pada sel spermatozoa banyak ditemukan pada bagian leher dan ekor, kecuali enzim hyaluronidase yang hanya ditemukan di bagian kepala dan akrosom (Hardjopranto, 1995, Toelihere, 1985).





Gambar 2.1a. Morfologi spermatozoa Utuh
 2.1b. Potongan sagital kepala spermatozoa sapi
 (Sumber : Hafez, 1993)

2.3 Membran Plasma Spermatozoa

Spermatozoa ditutup oleh membran sel dari kepala sampai ekor, mempunyai struktur sangat kompleks dalam susunan mozaik yang teratur dan mempunyai peran biologik spesifik pada permukaannya (Jones, 1989). Membran sel spermatozoa mempunyai fungsi sebagai pembatas sel, mempertahankan integritas sel dan membentuk interfase dinamis antara sel dengan lingkungan sekitarnya. Pada

umumnya membran sel mengandung enzim dan sistem transpor yang membantu mempertahankan keseimbangan intraseluler. Bagian luar membran sel banyak mengandung reseptor spesifik untuk mengenali isyarat molekuler tertentu dengan sel yang lain, sehingga memungkinkan komunikasi antar sel selama perkembangan (Aulanni'am, 2004).

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

Komposisi membran spermatozoa terdiri dari lipid, protein, karbohidrat atau molekul lain yang bergabung bersama-sama dengan ikatan non kovalen yang sangat sensitif terhadap faktor luar, seperti temperatur, kekuatan ionik dan polaritas pelarut. Lipid merupakan komponen struktur membran spermatozoa yang berperan penting dalam mempertahankan stabilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa secara keseluruhan, termasuk kemampuan kapasitas dan membuahi sel telur, serta ketidak stabilan spermatozoa dalam proses pendinginan dan pembekuan (Park and Graham , 1992).

Komposisi lipid membran yang bertanggungjawab terhadap fungsi spermatozoa adalah fosfolipid dan kholesterol. Fosfolipid memiliki molekul amfipatik

dengan satu kelompok kepala hidrofilik dan beberapa rantai asil lemak hidrofobik. Sifat amfipatik dari molekul ini memungkinkan pembentukan membran lapis ganda (*bilayer*) pada spermatozoa (Darnell *et al.*, 1990).

Di antara dua lapisan fosfolipid hidrofobik dan hidrofilik terdapat protein globular dan fibrous dengan distribusi yang bervariasi. Protein ini bersifat dinamis dan dapat bergerak bebas di antara kedua lapisan fosfolipid. Protein pada membran ada yang terletak secara vertikal sehingga sebagian masuk dan menembus ke dalam dua lapisan fosfolipid serta berinteraksi dengan bagian hidrofilik, protein ini disebut protein integral. Sedangkan protein yang terletak dipermukaan luar dari membran sebagai pemegang kedua lapisan fosfolipid disebut protein perifer. Protein ini mempunyai fungsi sebagai reseptor terhadap rangsangan eksternal, sebagai sinyal terhadap cahaya, hormon, obat-obatan, faktor penumbuh, enzim dan antigen yang terlibat dalam pengenalan kepala spermatozoa, misalnya adhesi spermatozoa-zona pelusida, induksi reaksi akrosom dan fusi spermatozoa sel telur (Herrero *et al.*, 1999).

Pablo *et al.* (1995) mengatakan bahwa membran plasma spermatozoa mengandung beberapa molekul yang berperan dalam proses fertilisasi. Molekul tersebut adalah lipid dan protein. Protein yang terkandung dalam membran plasma spermatozoa mempunyai peran utama dalam fusi spermatozoa dengan ZP3 adalah tirosin kinase (Leyton and Saling, 1989, Bunch *et al.*, 1992, Leyton *et al.*, 1992).

2.4 Enzim

Enzim adalah biokatalisator yang mampu meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik tanpa ikut bereaksi dan tidak menghasilkan produk samping, bersifat jauh lebih efisien dibandingkan dengan katalisator yang lain, hal ini disebabkan

karena molekul enzim memiliki spesifisitas yang amat tinggi terhadap substrat (Lehninger, 1995). Sedangkan menurut Aulanni'am (2005), enzim merupakan kelompok protein yang berperan sangat penting dalam proses aktivitas biologis dan berfungsi sebagai biokatalisator yang mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi. Cara penurunan energi yakni dengan pembentukan kompleks enzim substrat, substrat akan terikat pada lokasi aktif (*active site*).

Kerja enzim pada umumnya mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi pada temperatur dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan keseimbangan dan dapat mengendalikan reaksi (Martoharsono, 1988).

Mekanisme reaksi yang dikatalisis oleh enzim memungkinkan diadakan klasifikasi enzim. Menurut *International Union of Biochemistry* (IUB) berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisisnya, enzim dapat diklasifikasikan dalam enam kelompok yaitu : 1. *Oksidoreduktase*, yaitu kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi, 2. *Transferase*, yaitu kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi pemindahan gugus fosfat dari ATP ke serin atau threonin, 3. *Hidrolase*, yaitu kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis, 4. *Liase*, yaitu kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi pelepasan gugus, 5. *Isomerase*, yaitu kelompok enzim yang mengkatalisis interkonversi isomer-isomer optik, geometrik atau posisi, 6. *Ligase*, yaitu kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi penggabungan dua senyawa disertai peruraian molekul ATP.

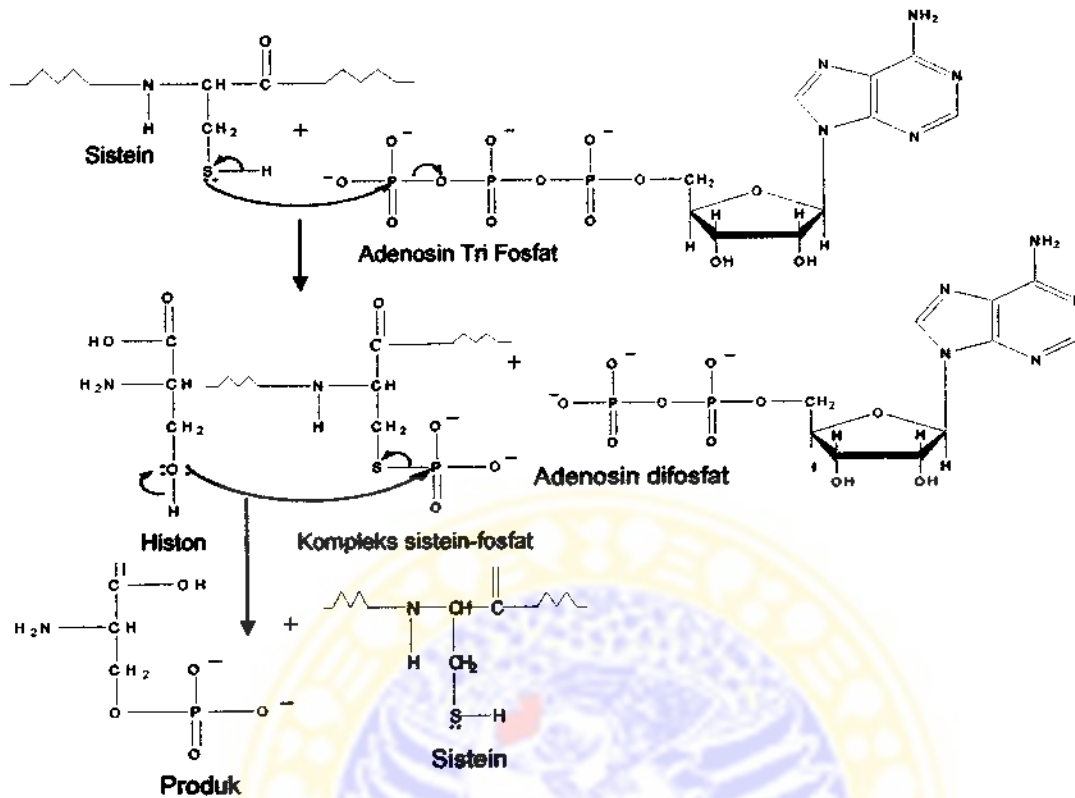
2.4.1 Enzim Tirosin Kinase

Tirosin kinase termasuk dalam keluarga besar enzim yang memediasi respon inti sel terhadap rangsangan eksternal dengan fosforilasi *hydroxyamino acids*. Enzim

ini terdiri dari dua golongan berdasarkan hubungan enzim dengan substrat yang spesifik yaitu serine atau threonin dan tirosin spesifik (Anonimous,1999).

Pada bagian ekstraselular, tirosin kinase bertindak sebagai *ligand*. Mekanisme yang sama dapat mengikat dua reseptor bersama-sama untuk membentuk homo atau heterodimer. Di tempat intraseluler atau sitoplasma respon aktivitas kinase bertahan lama. Pengikatan tirosin kinase dengan *ligand* menyebabkan dua reaksi yaitu ; (1) dimerisasi dari dua reseptor kinase monomerik atau stabilisasi dari dimer bebas. (2) Trans – auto fosforilasi dari kinase (fosforilasi dari kinase lain dalam dimer) (Anonimous,2004). Selanjutnya menurut Yatim (1992), tirosin kinase adalah enzim yang bekerja sebagai reseptor *Growth factor* (EGF, TGF, PDGF, IGF), berada di membran plasma dan berfungsi mengkatalisis fosforilasi residu tirosin pada reseptor, terbentuk cAMP (M2), meningkatkan aktivitas PK-A.

Autofosforilasi menyebabkan dua subdomain dari kinase intrinsik berubah posisi , membuka domain kinase untuk pengikatan ATP. Dalam bentuk in aktif , subdomain kinase bekerja sama dengan ATP tidak dapat mencapai pusat katalitik dari kinase. Ketika beberapa asam amino sesuai untuk fosforilasi berada dalam domain kinase (misalnya : *insulin like growth factor receptor*), maka aktivitas dari kinase akan meningkat dengan adanya sejumlah asam amino yang terfosforilasi (Anonimous,2004).



Gambar 2.2. Reaksi enzimatik Aktivitas Tirosin Kinase
(Sumber : Gilbert, 1997)

Secara prinsip tirosin kinase mengatur regulasi aspek multisel organisme serta memediasi hubungan antar sel, diferensiasi, adhesi, pergerakan sel dan kematian sel (Robinson, 2000). Menurut Aitken *et al.* (1995) isolasi tirosin kinase dapat diperoleh melalui ekstrak protein sperma menggunakan SDS PAGE setelah proses kapasitasi. Aktivitas tirosin kinase terlihat melalui fosforilasi tirosin pada gel dan aktivitas tirosin kinase sangat penting untuk mengontrol fungsi spermatozoa dan reaksi redoks yang mengatur fosforilasi tirosin kinase. Kapasitasi spermatozoa dapat ditingkatkan dengan adanya pengaturan fosforilasi tirosin kinase oleh regulasi redoks dan *CAMP-mediated* (Aitken *et al.*, 1998), sedang menurut Herrero *et al.*

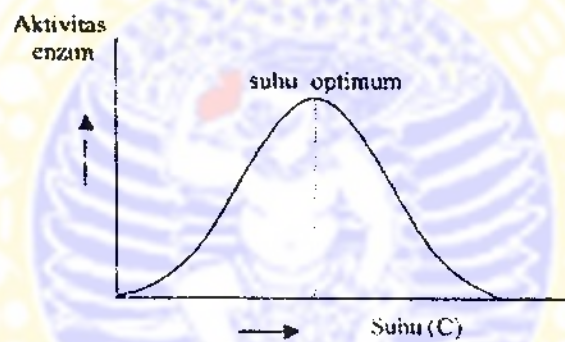
(1999) proses kapasitasi akan menyebabkan perubahan pada membran plasma, peningkatan konsentrasi ion intraseluler serta peningkatan proses metabolisme. Thaler and Cardullo (1995) menyatakan bahwa reaksi akrosom terjadi akibat interaksi sperma-zona pelusida yang memicu jalur transduksi sinyal, sehingga menimbulkan penetrasi dan fusi membran plasma spermatozoa. Proses ini menyebabkan membran akrosom luar terbuka dan secara berurutan akan mengeluarkan isi akrosom di tempat pengikatan sperma-zona pelusida.

Dalam penelitian menggunakan tikus sebagai model, Naz *et al.* (1991) mengatakan bahwa mediator utama pengenalan gamet adalah tirosin kinase dengan berat molekul 95 kDa yang mengalami autofosforilasi pada saat *cross linked* dengan ZP3. Selanjutnya akan terjadi beberapa perubahan seluler yaitu terjadinya influks kalsium ekstraseluler dan efluks proton secara tiba-tiba yang akhirnya mengakibatkan induksi eksositosis akrosom dan merangsang membran plasma fusogenik sehingga mampu mengenali membran vitelin oosit dan terjadi fusi.

Autofosforilasi tirosin kinase serupa dengan BM 94 kDa juga dibuktikan dalam ekstrak spermatozoa manusia yang diinkubasi dengan ZP3 babi. Pemberian progesteron juga dapat mengaktifkan spermatozoa manusia melalui mekanisme peningkatan fosforilasi tirosin, sedang pemberian genestein dalam spermatozoa manusia akan menyebabkan supresi fosforilasi tirosin (Tesarik *et al.*, 1993).

dan pH normal, dan enzim akan kehilangan aktivitasnya akibat panas, asam, basa atau keadaan lain yang menyebabkan denaturasi protein (Aulanni'am,2005)

Enzim memerlukan temperatur optimum untuk mencapai aktivitas yang maksimum. Enzim mempunyai temperatur optimum antara 30 – 35°C. Pada suhu diatas 35°C fungsi katalitik beberapa enzim akan menurun, hal ini disebabkan pada suhu di atas suhu optimum, energi kinetik molekul sangat besar sehingga melampaui energi aktivasi untuk memecah ikatan sekunder dan tersier yang mempertahankan keadaan katalitik aktif enzim sehingga mengakibatkan hilangnya aktivitas katalitik (Montgomery *et al.*,1993). Hubungan antara temperatur terhadap aktivitas enzim dapat dinyatakan sebagai berikut :



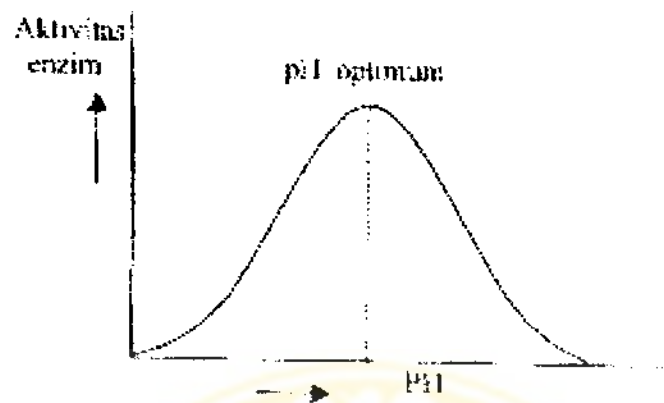
Gambar 2.4. Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim

2.5.2 Pengaruh pH

Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada pH optimum yaitu pada kisaran 4.5 – 8.0. Pada pH rendah ataupun tinggi dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim (Martin *et al.*,1983).

Enzim mempunyai pH optimum yang khas yakni pH yang dapat menyebabkan aktivitas enzim maksimum. Profil aktivitas enzim maksimum pada pH optimum digambarkan saat gugus pemberi atau penerima proton pada sisi katalitik

enzim berada pada tingkat ionisasi yang diharapkan (Lehninger, 1995). Hubungan antara pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 2.5. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim

2.5.3. Pengaruh Konsentrasi Enzim dan Substrat

Pada reaksi enzimatik, kecepatan reaksi sebanding dengan konsentrasi enzim. Hubungan ini dapat dinyatakan dengan :

Kecepatan reaksi = $k \cdot [E] \cdot [S]$ dimana.

k = konstanta kecepatan reaksi

$[E]$ = konsentrasi enzim

$[S]$ = konsentrasi substrat

Kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim berbanding lurus dengan konsentrasi enzim. Oleh karena itu pada permulaan reaksi, kecepatan reaksi akan berbanding lurus dengan konsentrasi enzim (Martin *et al.*, 1983).

Kecepatan reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Semakin tinggi konsentrasi substrat kecepatan reaksi enzimatik meningkat sampai mencapai kecepatan yang tetap. Kecepatan reaksi enzimatik naik bila konsentrasi

substrat dinaikkan sampai pada titik dimana enzim telah jenuh oleh substrat (Lehninger, 1995).

2.6 Tinjauan tentang Zona Pelusida (ZP)

Sel telur mamalia dilindungi oleh selaput yang disebut zona Pelusida (ZP) yang tersusun atas beberapa jenis glikoprotein. Awal interaksi antara sel telur dengan spermatozoa pada proses fertilisasi difasilitasi oleh ZP (Burkin and Miller, 2000). Dalam proses fertilisasi, spermatozoa berfungsi sebagai antigen sedang ZP mempunyai reseptor yang mengenali spermatozoa sehingga terjadi ikatan antara spermatozoa dengan sel telur yang memungkinkan terjadinya fertilisasi (Topfer Peterson *et al.*, 2000).

Hasil penelitian Aulanni'am dkk. (2001) pada oosit sapi telah berhasil dipisahkan empat molekul zona pelusida yaitu bovine ZP1, bovine ZP2, bovine ZP3 dan bovine ZP4.

Peran utama ZP adalah dalam proses pengenalan gamet (*gamete recognition*), aktivasi spermatozoa dan pencegahan terhadap polispermi. Pengenalan gamet ini dapat menginduksi signal transduksi yang menghasilkan suatu reaksi akrosom, eksositosis dan terjadi penetrasi spermatozoa ke dalam zona pelusida, selanjutnya terjadi fusi spermatozoa dengan membran vitelin dari oosit (Kerr *et al.*, 1998, Haila and Tulsiani, 2000).

Menurut Morales and Llanos (1996) protein zona pelusida yang mempunyai fungsi fisiologis hanya ZP2 dan ZP3, hal ini sesuai dengan pernyataan Bauskin *et al.* (1999), bahwa hanya ada dua jenis glikoprotein yang berperan dalam proses fertilisasi yaitu ZP2 dan ZP3. ZP3 berperan sebagai reseptor primer spermatozoa,

sedangkan ZP2 berperan sebagai reseptor sekunder spermatozoa untuk menjaga terikatnya spermatozoa pada sel telur.

Interaksi spermatozoa pada ZP sangat spesifik dan merupakan kunci pengatur proses fertilisasi. Membran plasma spermatozoa mengandung molekul protein yang diperlukan untuk berinteraksi dengan ZP. Molekul ZP3 digambarkan sebagai reseptor untuk terjadinya reaksi akrosom (Hinsch *et al.*, 1999).

2.7. Semen Beku

2.7.1. Mekanisme Pembekuan

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

Jika suatu sel dibekukan, membran secara terbatas dapat menghalangi terbentuknya kristal es di bagian dalam membran dan mempertahankan keadaannya tetap terjaga sangat dingin tanpa disertai terbentuknya kristal es. Keadaan ini menimbulkan perbedaan tekanan osmotik di bagian luar dan bagian dalam membran sel. Sel berusaha membuat keadaan potensial kimia air intra dan ekstra seluler menjadi seimbang dengan mengeluarkan air melalui membran sel,

akibatnya sel mengalami dehidrasi dan konsentrasi zat dalam sel akan meningkat (Toelihere, 1985).

Mekanisme pembekuan merupakan perubahan bentuk fisik timbal balik dari fase cair ke fase padat atau fase beku dan kembali ke fase cair. Perubahan fisika dari proses pembekuan meliputi penurunan suhu dalam keadaan tekanan normal disertai dehidrasi sampai ke tingkat tertentu dan mencapai temperatur di bawah 0°C (*deepfreezing*), sampai -196°C. Tujuan dari proses pembekuan adalah mempertahankan sesempurna mungkin beberapa sifat dari materi biologis terutama sifat viabilitas (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Kendala utama dari proses pembekuan ini adalah terjadinya kerusakan sel. Penyebabnya antara lain karena proses dehidrasi tidak terjadi sehingga terbentuk kristal-kristal es besar intraseluler yang dapat merusak sel. Selain itu juga bisa karena peningkatan osmolaritas medium pembekuan sehingga krioprotektan menjadi bersifat racun, selanjutnya terjadi kerusakan fisik yaitu terbentuknya kristal es ekstraseluler, toksisitas dari elektrolit yang pekat atau terjadinya *osmotic swelling* (Kasai, 1996).

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

bahwa proses pembekuan semen dapat menurunkan motilitas sebesar 34 – 50% dan menurunkan integritas membran sebesar 45% (Anonymous, 2005).

Beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam proses pembekuan antara lain adalah; (1) medium pengencer dan konsentrasi sel, (2) krioprotektan yang sesuai dan konsentrasi yang digunakan harus diperhatikan, (3) waktu dan temperatur penyeimbangan, (5) Pola laju pendinginan (bentuk dan lajunya), (6) sifat kurva pencairan kembali, (7) penggunaan medium pencairan kembali (*thawing*) (Hunter, 1995).

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

Tabel 2.2. Tahapan Proses Pembekuan Semen Sapi

Tahapan Pembekuan	Keterangan
Cooling	proses pendinginan semen setelah pengenceran, dengan memasukkan gelas ukur bertutup yang telah berisi semen ke dalam gelas beker yang berisi air dengan suhu 37°C selanjutnya diletakkan di dalam alat pendingin selama 75 – 120 menit untuk menurunkan suhu semen dari 37°C menjadi 5°C. Perendaman setengah bagian gelas ukur yang berisi semen ke dalam gelas beker berisi air dengan suhu 37°C untuk mencegah <i>cold shock</i>
Gliserolisasi	penambahan gliserol secara bertahap ke dalam gelas ukur yang berisi semen setelah proses <i>cooling</i> . Waktu ekuilibrisasi adalah waktu yang dibutuhkan spermatozoa untuk menyesuaikan diri dengan bahan pengencer. Lama waktu yang dibutuhkan adalah dua jam dengan

	menempatkan gelas ukur yang berisi semen di dalam alat pendingin bersuhu 3 - 5 °C menuju -140 °C yang merupakan titik kritis terhadap kerusakan dan kematian sel
<i>Prefreezing</i>	setelah semen dikemas dalam bentuk ministraw dengan volume 0,25 ml, selanjutnya straw yang diletakkan ke dalam canister dimasukkan ke uap nitrogen ± 1 – 2 cm di atas permukaan nitrogen cair. Proses ini berlangsung kurang lebih 10 menit kemudian dimasukkan ke dalam nitrogen cair
<i>Freezing</i>	proses penghentian sementara kegiatan hidup sel spermatozoa tanpa mematikan fungsi sel
<i>Storage</i>	Semen beku yang telah dikemas dalam bentuk ministraw, disimpan dalam kontainer yang berisi nitrogen cair bersuhu -196 °C
<i>Thawing</i>	proses pencairan kembali semen beku pada suhu optimum 37 °C. kondisi spermatozoa setelah pencairan kembali tidak mempunyai daya tahan hidup seperti semen segar dan mempunyai persentase motilitas sekitar 40%

Sumber : Hafez, 2000

secara bertahap. Sampel dari *ambient temperature* langsung ditempatkan pada *plunging temperature* selama 10 menit dan baru dimasukkan ke dalam nitrogen cair (Supriatna, 1993).

2. Metode Vitrifikasi

Metode vitrifikasi merupakan metode dengan proses pemadatan larutan yang terjadi karena meningkatnya viskositas selama pembekuan, sehingga larutan tersebut seolah-olah menjadi kaca. Pada metode vitrifikasi, waktu ekuilibrase dilakukan sangat singkat atau tidak sama sekali dan penurunan temperatur dilakukan sangat cepat, sangat drastis sehingga sel yang dibekukan mengalami masa kritis yang sangat singkat (Kasai, 1996). Mekanisme ini memerlukan krioprotektan berkonsentrasi tinggi, *cooling* dan *warming* sangat cepat dan dapat menimbulkan vitrifikasi baik pada kompartemen intraseluler maupun ekstraseluler.

2.7.3. Pengaruh Pembekuan Terhadap Kualitas Semen

Proses pembekuan berpengaruh negatif terhadap kualitas semen akibat paparan suhu rendah pada spermatozoa. Akibat terpenting dari paparan suhu rendah adalah destabilisasi membran spermatozoa, terjadinya stres oksidatif karena penurunan kandungan anti oksidan pada spermatozoa (Garcia-Vazquez and Matas, 2004).

Kondisi spermatozoa akibat pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen penyusun protein membran plasma, membran mitokondria serta komponen penyusun bagian yang lain (misalnya sitoskeleton sebagai sarana gerak spermatozoa). Lemahnya ikatan kovalen akan diikuti dengan putusannya ikatan

tersebut, apabila paparan suhu rendah terus berlanjut. Hal ini akan menyebabkan perubahan struktur komponen penyusun membran spermatozoa, sehingga akan menyebabkan kemunduran fungsi dari masing-masing komponen tersebut (Rubinsky, 2000).

Terjadinya destabilisasi membran plasma spermatozoa secara fisik maupun kimiawi akan menyebabkan peningkatan permeabilitas sel terhadap ion ekstraseluler, termasuk ion Ca^{2+} . Meningkatnya kadar ion Ca^{2+} intraseluler akan diikuti dengan peningkatan Ca^{2+} mitokondria yang selanjutnya akan berakibat kematian sel (Widodo, 2003).

Metabolisme pada spermatozoa normal akan menghasilkan radikal bebas 2-5% dalam sehari dari total hasil oksidasi. Paparan suhu rendah akan meningkatkan radikal bebas secara signifikan dan pada kondisi ini anti oksidan alami yang dihasilkan tidak mampu mengimbangi jumlah radikal bebas yang terbentuk sehingga terjadi penumpukan radikal bebas atau radikal oksigen yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Radikal bebas merupakan suatu molekul atau atom yang amat tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan yang sangat reaktif mencari pasangan elektron. Jika radikal bebas berikatan dengan protein atau lipid membran maka akan terjadi reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas baru yang akhirnya jumlahnya akan terus bertambah dan jumlah komponen penyusun yang mengalami perubahan atau penurunan fungsi juga bertambah sehingga akan merusak membran plasma spermatozoa (Benaroudj *et al.*, 2001).

Stres oksidatif dan destabilisasi membran spermatozoa akan menimbulkan beberapa kejadian yaitu: 1. Menurunnya motilitas individu spermatozoa karena sintesa ATP dalam mitokondria menurun, 2. Kematian sel akibat fragmentasi DNA

dan 3. Meningkatnya jumlah spermatozoa yang terkapasitasi serta yang mengalami reaksi akrosom (Baldi *et al.*,2000)

2.8 Media Krioprotektan

Krioprotektan merupakan zat kimia non elektrolit yang berfungsi mencegah pembentukan kristal es ekstraseluler atau intraseluler sehingga dapat menjaga viabilitas sel setelah pembekuan (Supriatna, 1993).

Berdasarkan perpaduan antara sifat fisika-kimianya, krioprotektan terbagi menjadi dua kelompok yaitu ; (1) krioprotektan intraseluler yang memiliki ukuran molekul kecil dan (2) krioprotektan ekstraseluler yang memiliki ukuran molekul besar. Yang termasuk krioprotektan intraseluler adalah gliserol, dimethylsulfoxide (DMSO), etilene glikol dan 1,2 propanediol, sedangkan yang termasuk krioprotektan ekstraseluler adalah polivinil piroidon (PVP), sukrosa, rafinosa, protein, lipoprotein, kuning telur, serum darah dan susu (Gordon, 1994).

Krioprotektan yang paling banyak digunakan adalah yang memiliki daya penetrasi terhadap membran sel yaitu krioprotektan intraseluler gliserol dan DMSO. Salah satu sifat medium krioprotektan yang dapat digunakan untuk membantu keseimbangan perubahan fisika kimia adalah sifat koligatif yaitu sifat larutan yang tidak tergantung dari sifat solvent tetapi tergantung dari konsentrasi solute.

Selama pembekuan tidak hanya terjadi proses perubahan air menjadi es tetapi krioprotektan akan mempengaruhi berbagai sistem dari proses yang sedang berlangsung. Fungsi krioprotektan dalam mekanisme reaksi pembekuan sel antara lain adalah; (1) penurunan titik beku, (2) proteksi terhadap membran sel, (3) menekan laju pengaruh peningkatan konsentrasi dan (4) merubah bentuk dan ukuran kristal es (Supriatna,1993).

2.9 Fertilisasi *In Vitro*

Proses fertilisasi secara buatan yang dilakukan oleh manusia dengan memanfaatkan sel telur dan sel spermatozoa di luar tubuh hewan atau di dalam suatu bentuk sistem biakan sel disebut dengan fertilisasi *in vitro* (Hunter,1995).

Teknik fertilisasi *in vitro* dapat digunakan sebagai alternatif untuk menghasilkan embrio dari limbah alat kelamin betina yang tidak dimanfaatkan di rumah potong hewan. Selanjutnya menurut Ekayanti dkk.(1995) embrio hasil fertilisasi *in vitro* dapat digunakan untuk aplikasi bioteknologi dalam bidang reproduksi seperti transfer embrio, pengembangan bioteknologi transfer gen, peningkatan jumlah embrio kembar atau digunakan untuk memproduksi substansi biologik seperti protein.

Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan fertilisasi *in vitro* antara lain adalah 1. kualitas oosit dan spermatozoa, 2. proses pematangan oosit, 3. proses kapabilitas spermatozoa, 4. komposisi medium biakan, 5. volume mikrodrip yang digunakan untuk biakan dan konsentrasi spermatozoa, 6. lingkungan yang steril, 7. pemakaian bahan dan alat yang benar-benar steril (Hunter, 1995).

Tahapan pelaksanaan fertilisasi *in vitro* meliputi : 1. pengambilan oosit dari ovarium, 2. pematangan dalam media yang disimpan dalam inkubator CO₂, temperatur 38,5°C, kelembaban 95% selama 20 – 24 jam, 3. spermatozoa yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* harus berasal dari pejantan unggul yang telah mengalami proses kapabilitas *in vitro* menggunakan media yang mengandung cairan folikel, serum atau serum albumin, 4. Pemindahan sel telur yang telah dibuahi pada medium pengembangan yang mengandung *Bovine Serum Albumin* (BSA) untuk perkembangan embrio ke tahap blastosis (Triwulanningsih, 1992)

2.10. Penentuan Kualitas Oosit

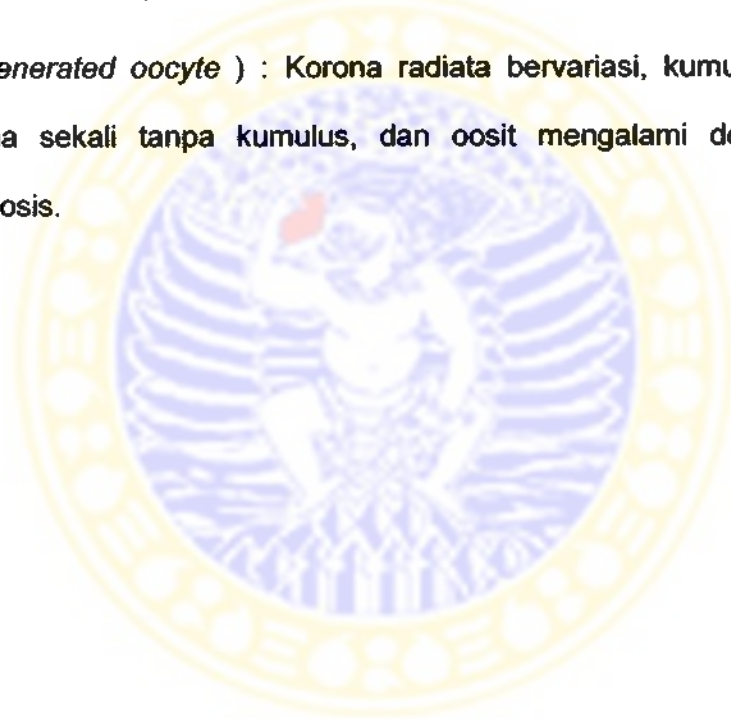
Persiapan maturasi oosit yang diperoleh dari ovarium sapi yang berasal dari rumah potong hewan perlu dilakukan dalam proses fertilisasi *in vitro*. oosit merupakan sel besar dengan inti vesikuler atau vesikula germinalis yang relatif besar pula. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), serta Hafez (1993), oosit praovulasi akan mengalami proses diferensiasi yang ditandai dengan adanya perubahan inti atau pematangan inti disertai dengan perubahan sitoplasma atau pematangan sitoplasma. Oosit akan berkembang menjadi ovum dan dapat dibuahi oleh spermatozoa sehingga memiliki kemampuan perkembangan menjadi embrio. Dengan pemeriksaan mikroskop cahaya, akan terlihat adanya perubahan praovulasi dari oosit – kumulus kompleks. Pawshe *et al.* (1996), seperti yang dikutip oleh Supriatna dan Pasaribu (1992) membagi tingkat kematangan oosit berdasarkan penilaian morfologi kompleks oosit-korona radiata-kumulus ooforus. Oosit yang diisolasi dari folikel antral dapat dibagi menjadi :

Oosit yang belum matang (*immature oocyte*) 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 : kumulus ooforus sedikit sekitar 2 lapis dan korona radiata kompak, oosit tampak samar-samar.
- D : Oosit denute tanpa kumulus ooforus

Oosit matang (*mature oocyte*) terbagi atas 2 fase :

- A : kompleks dengan korona radiata dan kumulus ooforus yang longgar dan meluas, sedikit berlendir (mucinifikasi), 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 (metafase II).
- C : Korona radiata lepas, kumulus ooforus yang tampak berlendir sedikit atau sama sekali tanpa kumulus, oosit memiliki benda kutub I (metafase II).
- D (*Degenerated oocyte*) : Korona radiata bervariasi, kumulus lepas atau sama sekali tanpa kumulus, dan oosit mengalami degenerasi atau piknosis.



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Pembekuan merupakan proses penghentian sementara aktivitas sel tanpa mematikan fungsi sel, proses hidup dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan (Susilawati, 2000). Tujuan dari proses pembekuan adalah mempertahankan sesempurna mungkin sifat sel spermatozoa terutama viabilitas dan motilitas (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Beberapa kendala dalam proses pembekuan yakni terjadinya kerusakan sel akibat proses dehidrasi tidak sempurna sehingga terbentuk kristal es intraseluler yang dapat merusak sel (Kasai, 1996), terjadinya destabilisasi membran spermatozoa serta stres oksidatif akibat penurunan kadar anti oksidan dalam spermatozoa (Garcia-Vazquez and Matas, 2004). Hal tersebut akan menyebabkan kerusakan membran spermatozoa yang menyebabkan perubahan susunan membran spermatozoa yang terdiri dari lipid, karbohidrat dan protein. Salah satu protein yang berperan dalam proses pengenalan spermatozoa dengan sel telur serta autofosforilasi adalah tirosin kinase. Akibat adanya kerusakan membran akan menyebabkan penurunan aktivitas tirosin kinase.

Spermatozoa dilapisi oleh membran sel dari kepala sampai ekor. Fungsi membran spermatozoa adalah sebagai pembatas sel, mempertahankan integritas sel dan bagian luar membran mengandung sisi pengenal spesifik untuk mengenali isyarat molekul tertentu yang memungkinkan komunikasi antar sel (Hendricksen, *et al.*, 1993).

Komposisi membran spermatozoa terdiri dari lipid, protein, karbohidrat. Lipid dalam membran berperan penting dalam mempertahankan stabilitas dan

kelangsungan hidup spermatozoa secara keseluruhan termasuk kemampuan kapasitas dan membuahi sel telur (Park and Graham, 1992).

Fungsi protein pada membran plasma spermatozoa antara lain adalah sebagai reseptor, antigen, signal transduksi dan stabilisasi ikatan kovalen penyusun protein membran plasma. Pada proses pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen penyusun protein membran plasma, membran mitokondria maupun komponen penyusun yang lain. Melemahnya ikatan kovalen yang terjadi akan diikuti dengan putusya ikatan tersebut jika sel spermatozoa terpapar suhu yang rendah dalam waktu yang lama. Hal ini akan menyebabkan perubahan komposisi penyusun membran spermatozoa dan akan mengakibatkan penurunan fungsi dan destabilisasi membran (Rubinsky, 2000).

Tirosin kinase (TK) adalah salah satu protein membran plasma spermatozoa yang berfungsi sebagai mediator utama terjadinya fusi spermatozoa dengan zona pelusida 3 (ZP3) (Leyton and Saling, 1989; Bunch *et al.*, 1994; Leyton *et al.*, 1992). Penelitian pada tikus, berat molekul tirosin kinase diketahui sebesar 95 kDa, sedangkan pada babi sebesar 94 kDa (Aitken *et al.*, 1995). Sedangkan protein permukaan spermatozoa manusia telah diidentifikasi sebagai *Human Spermatozoa Tyrosine Kinase* mempunyai berat molekul 95 kDa dan mempunyai afinitas spesifik terhadap ZP3 (Burks, *et al* dalam Bull *et al.*, 2003).

Aktivitas tirosin kinase sangat penting untuk mengontrol fungsi spermatozoa serta reaksi yang mengatur fosforilasi tirosin kinase. Kapasitas spermatozoa dapat ditingkatkan dengan adanya pengaturan fosforilasi tirosin kinase oleh redoks dan *CAMP-mediated* (Aitken, *et al.*,1998). Fosforilasi tirosin kinase berhubungan dengan terjadinya kapasitas spermatozoa pada tikus, manusia dan sapi melalui mekanisme peningkatan influks kalsium yang akan mengaktifkan enzim adenilat

siklase, selanjutnya akan berpengaruh pada peningkatan cAMP. Cyclic adenosine monophosphate akan mengaktifkan protein kinase A (PKA), yang berpengaruh pada peningkatan tirosin kinase, selanjutnya tirosin kinase akan mengalami fosforilasi. Pada akhirnya fosforilasi tirosin yang meningkat akan menyebabkan kapasitas dan hiperaktivasi motilitas spermatozoa (Visconti and Kopf, 1998).

Interaksi awal spermatozoa dalam menginduksi sel telur dalam proses reaksi akrosom adalah terjadinya ikatan antara zona pelusida dengan dua reseptor di membran plasma spermatozoa. Satu reseptor adalah *Gi-coupled* reseptor yang mengaktifkan enzim phospholipase C (PLC) beta 1 dan reseptor lain adalah reseptor tirosin kinase (TK) yang terikat pada PLC gamma. Pengikatan pada reseptor ini meregulasi adenilat cyclase (AC) untuk meningkatkan cAMP (siklik AMP), dan mengaktifkan protein kinase A (PKA). PKA akan mengaktifkan *channel voltage-dependent Ca²⁺* pada membran bagian luar dengan melepaskan Ca^{2+} dari dalam akrosom menuju ke sitosol yang menyebabkan teraktifkannya PLC.

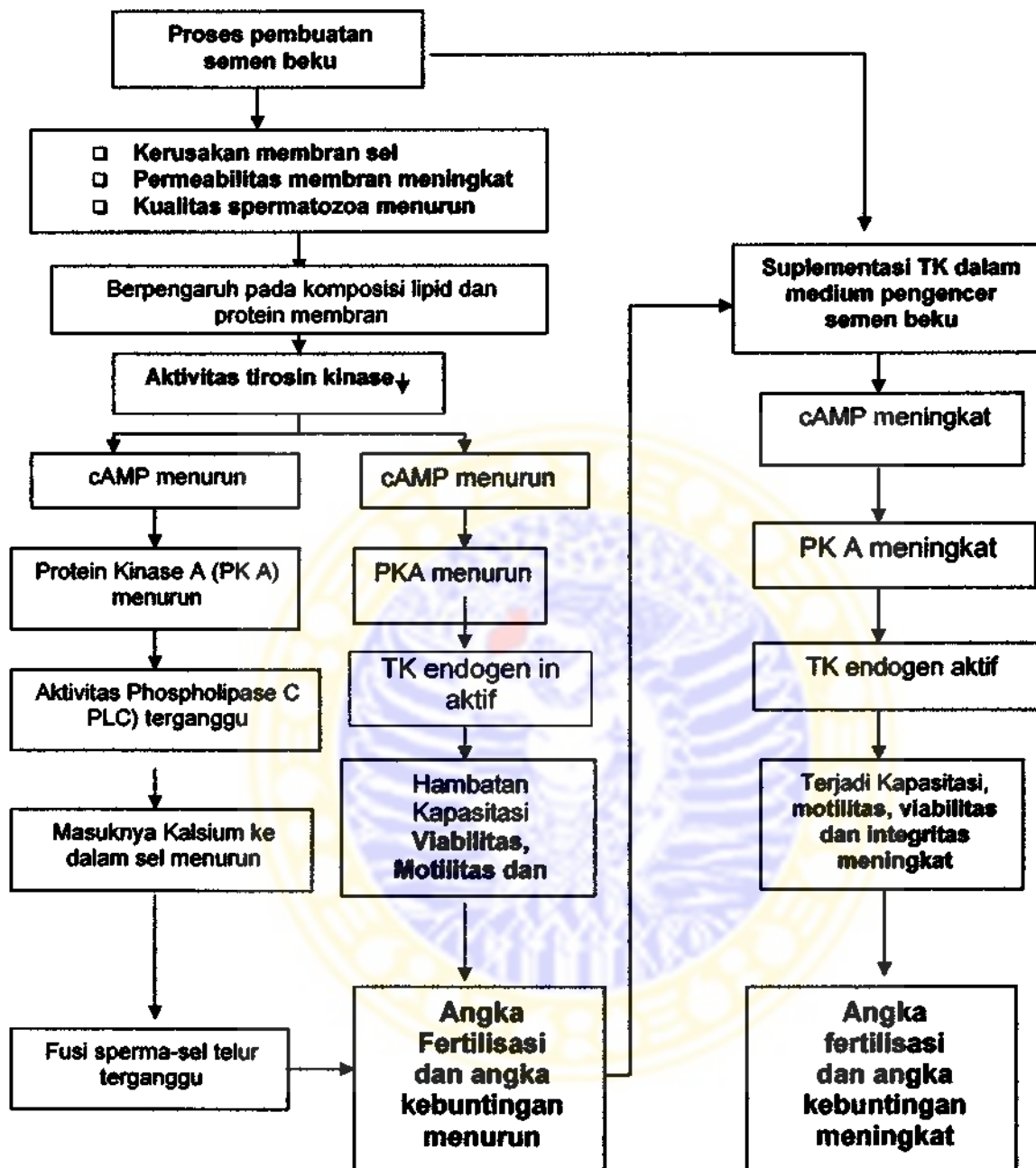
Phospholipase C memecah phosphatidilinositol diphosphate (PIP) menjadi diacylglycerol (DAG) dan inositol triphosphate (IP3). IP3 akan meningkatkan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler melalui pelepasan Ca^{2+} dari gudang Ca^{2+} intraseluler. Selanjutnya DAG yang terbentuk akan mengaktifkan PKC dependent Ca^{2+} (protein kinase) melalui proses fosforilasi. Sebagian IP3 termetilasi menjadi inositol tetraphosphate (IP4) yang berfungsi mengatur pembukaan *channel voltage-dependent* yang menyebabkan pemasukan Ca^{2+} dari ekstraseluler. Sebagian besar Ca^{2+} ini berperan langsung pada fosfolipid membran untuk terjadinya fusi membran (Yanagimachi, 1994).

Tirosin kinase termasuk dalam kelompok protein yang salah satu fungsinya adalah stabilisasi ikatan kovalen penyusun protein membran, sehingga bila

disuplementasikan ke dalam media pengencer semen beku diharapkan dapat mencegah putusya ikatan kovalen membran spermatozoa. Selanjutnya suplementasi tirosin kinase dapat menginduksi aktivitas tirosin kinase endogen melalui pengikatan dengan reseptor tirosin kinase yang berada di membran plasma spermatozoa selanjutnya akan mengaktifkan signal transduksi sampai terjadi proses fosforilasi tirosin kinase yang dapat menyebabkan peningkatan motilitas dan hiperaktivitas spermatozoa.

Suplementasi tirosin kinase ke dalam media pengencer semen beku diharapkan dapat memperbaiki kualitas spermatozoa sapi perah *pasca thawing* yang pada akhirnya dapat meningkatkan angka fertilisasi dan angka kebuntingan pada sapi perah





Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini yang terdiri dari empat tahap penelitian. Penelitian tahap pertama sampai dengan tahap ketiga merupakan penelitian eksperimental laboratoris sedang penelitian tahap keempat merupakan penelitian eksperimental. Tahapan penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut :

Tahap pertama : Karakterisasi terhadap tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH meliputi : ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa Sapi FH menggunakan monoklonal antibodi tirosin kinase (ABGENT, no. Cat. AP7704b); penentuan berat molekul tirosin Kinase (dengan metode SDS-PAGE yang dikonfirmasi dengan metode Dot blot dan dilanjutkan dengan Western blot menggunakan monoklonal antibodi tirosin kinase (ABGENT, no. Cat. AP7704b), 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 standar tirosin kinase (SIGNAL CHEM, dengan 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, penelitian tahap kedua dan ketiga bersifat eksperimental laboratoris sehingga rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap, sedangkan penelitian tahap keempat bersifat eksperimental (Santoso, 2005),

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah sejumlah semen segar sapi FH yang diperoleh dengan cara penampungan menggunakan vagina buatan dari sapi FH jantan yang berumur 3 – 4 tahun yang terdapat di Taman Ternak Pendidikan, Kedamean Gresik

4.2.2 Sampel penelitian

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

4.2.3 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel dalam penelitian ini diperoleh dengan menggunakan rumus Higgins and Klinbaum (1985) sebagai berikut :

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot \sigma^2}{\delta^2}$$

Keterangan :

n = Besar sampel

Z α = Harga standar α 0,05 = 1,96

Z β = Harga standar β 0,10 = 1,28

Pada penelitian eksperimental nilai σ^2 / δ^2 adalah 1

Maka jumlah sampel adalah :

$$n = (1,96 + 1,28)^2$$

$$n = 7,9 \text{ dibulatkan menjadi } 8$$

Jadi besar sampel (n) yang diperoleh menjadi 8 per kelompok perlakuan, dengan total sampel keseluruhan adalah 32 sampel

4.3 Variabel Penelitian

4.3.2 Penelitian II dan IV

Variabel Bebas (*Independent Variable*)

- Dosis suplementasi tirosin kinase dalam medium pengencer semen beku
- Semen beku yang telah disuplementasi dengan isolat tirosin kinase dengan berbagai dosis

Variabel Tergantung (*Dependent Variable*)

- Persentase spermatozoa yang hidup sebelum dan sesudah pembekuan
- Persentase motilitas spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan
- Integritas membran plasma spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan
- Jumlah ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan
- Angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro* menggunakan semen beku yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase setelah diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 22 jam

6. Angka fertilisasi adalah jumlah sel telur yang berhasil dibuahi oleh spermatozoa yang berasal dari semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase, menggunakan medium TCM 199 pada proses fertilisasi *in vitro* setelah 24 jam di inkubasi dalam inkubator CO₂. Indikator terjadinya fertilisasi adalah adanya badan kutub kedua dan bersatunya pronukleus jantan dengan pronukleus betina
7. Angka kebuntingan adalah jumlah sapi FH yang bunting setelah di inseminasi dengan semen beku sapi FH yang telah di suplementasi dengan berbagai dosis TK melalui pemeriksaan rektal pada hari ke-75

4.5 Bahan dan Peralatan Penelitian

Pada penelitian pertama dan kedua diperlukan semen sapi FH yang dipisahkan antara spermatozoa dengan plasma semen untuk mendapatkan protein dari spermatozoa. Penelitian ketiga dan keempat diperlukan semen sapi FH yang ditambah dengan bahan pengencer serta isolat tirosin kinase.

Bahan dan reagen yang dipakai dalam penelitian pertama dan kedua adalah phosphate buffer saline (PBS) pH 7, tween 20 (polyoxyethylen sorbitan monolaurat, Art, 822184, Merck-Schuchardt, Munchen), phenyl methene sulfonil fluorid (PMSF, Biorad), etanol absolut, buffer Tris-HCl, NaN₃ (Sodium Azide), MAb-TK (ABGENT), tirosin kinase standar (SIGNALCHEM), substrat Western Blue (Western Blue Stabilized. Substrate for alkaline phosphatase cat # S 3841, Promega Co., USA), Anti IgG Rabbit AP (Anti Rabbit IgG C (Fc), AP Conjugate, Catalog # S 3731, Promega Co. USA), Anti IgG Rabbit SA-HRP (Catalog # S 3731, Promega Co. USA), nitroselulosa (Hybond-C pure, nitrocellulose membrane, Amersham Life Science-England), kertas tissue, Adenosin triphosphate (ATP) BM 551,2 g/mol,

histon (sigma, H 5505), TCA (*Tri Chlor acetic Acid*) 8%, BO caffeine (*Brickett and Olliphants Caffein*), Tris Cl, KCl, NaCl, KH_2PO_4 , Tween-20, Magnesium Klorida (MgCl_2), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , etanol absolut ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), aqua DM (*deionized water*) steril, bis-akrilamida, sodium dodecyl sulphate (SDS), Ammonium per sulfate (APS), *N,N,N',N'* tetramethyl etylene diamina (TEMED), dan *bromophenol blue*, Sedangkan peralatan yang digunakan adalah Blotter (Bio-Dot Apparatus, BIORAD-USA), microplate, vacuum pump, vortex, gunting, pipet eppendorf, pipet Pasteur, millipore, plastik tip, gunting, kantong selofan, sentrifus, tabung reaksi, *refrigerated centrifuge*, freezer, autoclaf, labu takar 10 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL, pipet volume 10 mL, gelas ukur 100 mL, beaker gelas 10 mL, 250 mL, 1000 mL, pipet tetes, pengaduk gelas, gelas arloji, pengaduk magnetic, digital pH meter, neraca analitik (sartorius basic P-160), tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), inkubator (memmert), vortex (Guo-Huq), sonikasi (Branson 200), spektrofotometer UV, mini 2D elektroforesis protein II (Biorad), *autoclave*, stirer, corong gelas, bola hisap, botol semprot, eppendof dan lemari pendingin.

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

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

2. Imunositokimia

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

4.6.1.2. Pemisahan Protein Spermatozoa Sapi FH

Sampel semen yang ditampung dalam tabung reaksi setelah dilakukan pemeriksaan makroskopis (volume, warna, konsistensi dan pH) dan mikroskopis (motilitas, gerakan massa dan persentase spermatozoa hidup) selanjutnya di sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan pellet (spermatozoa) dengan plasma seminalis.

Kemudian pellet ditambah dengan medium BO-caffein 1 ml, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambah dengan PBS-tween 5 kali volume, ditambah *Phenylmethanesulfonyl fluoride* (PMSF) sebagai inhibitor enzim protease sebanyak 5 kali volume, selanjutnya di-vortex selama 10 menit, dilanjutkan dengan sonikasi selama 20 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Endapan dibuang, supernatan ditambah dengan etanol dingin 1 : 1, disimpan dalam refrigerator selama 1 jam sampai terbentuk bintik-bintik putih, sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, dimasukkan ke refrigerator lagi selama 5 menit, Kemudian etanol dibuang dan dikeringkan menggunakan tissue dan dibiarkan sampai bau etanol hilang. Selanjutnya ditambah dengan Tris-HCl. Hasil akhirnya adalah isolat *crude* protein dari membran plasma spermatozoa (Aulanni'am, 2004).

4.6.1.3. Karakterisasi dan Identifikasi Tirosin Kinase dengan SDS-PAGE

Identifikasi tirosin kinase dengan SDS-PAGE bertujuan untuk mengetahui gambaran beberapa pita protein. Tahapan kerjanya adalah sebagai berikut: masukkan *separating gel* ke dalam alat elektroforesis melalui dinding sampai di bawah batas atas. Selanjutnya tambahkan aquades sampai batas atas supaya *separating gel* rata. Selanjutnya aquades diserap dengan tissue dan tambahkan *stacking gel* melewati dinding sampai penuh, masukkan *comb* (pencetak sumuran dari gel) dan ditunggu sampai terbentuk gel. Selanjutnya *comb* diambil dan dibersihkan dari sisa gel dengan tissue. Cetakan gel yang sudah jadi dipindahkan dan dimasukkan ke dalam *chamber*, kemudian direndam dalam *running buffer*. Selanjutnya diletakkan cetakan penuntun

sampel yang akan di *running*. Sampel penelitian berupa isolat protein membran spermatozoa sapi sebanyak 35 μ l dimasukkan ke dalam lubang cetakan dengan tip 200 μ l. Langkah berikutnya *chamber* dihubungkan dengan alat Biorad, *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 130 V, 30 mA selama 1,5 jam. Jika reaksi *gel* sudah sampai bawah kemudian dimatikan dan *plate* dibuka dan dipisahkan. Selanjutnya hasilnya berupa lembaran berbentuk gel diwarnai dengan *coomasie blue* dan di *sacker* (digoyang) selama 30 menit. Kemudian dikeluarkan dan ditambahkan dengan cairan *destaining* dan di *sacker* lagi selama 30 menit. Jika cairan sudah terlihat biru diganti dengan cairan *destaining* yang baru begitu seterusnya sampai cairan berwarna putih dan hasilnya berupa beberapa pita protein. Berat molekul akan dapat terlihat pada cetakan gel SDS-PAGE (Rantam, 2003).

4.6.1.4. Isolasi Tirosin Kinase dengan Teknik Elektroelusi

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

4.6.1.5. Konfirmasi isolat Tirosin kinase Spermatozoa dengan Teknik Immunoblotting

1. Dot blotting

Konfirmasi isolat TK berdasarkan spesifisitas reaksi dengan antibodi monoklonal TK (MAb-TK, ABGENT). Analisis melalui metode *dot blotting* dilakukan sebagai berikut: : sampel isolat TK sebagai antigen diencerkan 50 kali dengan PBS pH 7,4 . 50 μ L kemudian diteteskan pada membran nitroselulosa yang sudah diletakkan pada alat *dot blotter* untuk dikeringkan. Setelah kering, dilakukan *blocking* dalam PBS-susu skim 5% pada semua tetesan selama 1 jam diatas alat penggoyang (*shaker*). Selanjutnya dicuci dengan PBS-Tween 20 0,05% selama 3 menit sebanyak 3 kali. Membran diinkubasi dengan antibodi primer (MAb-TK, ABGENT) yang telah diencerkan 50 kali dalam PBS-susu skim 1% pada suhu kamar sambil digoyang selama 2 jam. Membran dicuci dengan PBS-Tween 20 0,05% selama 3 menit dan diulang 3 kali. Kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder (*Anti Rabbit IgG AP Conjugate* (Promega Corporation, USA) yang diencerkan dengan TBS 1:2500 selama 1 jam pada suhu kamar dan dicuci lagi dengan PBS-Tween 20 0,05%. Selanjutnya membran direndam dalam substrat *Western Blue* (Promega Corporation,USA) selama 30 menit dan reaksi dihentikan dengan penambahan aquades ketika muncul warna biru/ keunguan dengan intensitas yang jelas.

2. Western Blotting

Metoda *Western Blotting* pada penelitian ini digunakan untuk konfirmasi dalam menentukan apakah protein hasil SDS-PAGE sebelumnya

adalah benar tirosin kinase yang dimaksud. Teknik *Western Blotting* dapat digunakan untuk konfirmasi Berat Molekul (BM) dari protein yang dimaksud. Langkah selanjutnya adalah dengan melakukan konfirmasi dari hasil *Western Blotting*, SDS-PAGE, jika berat molekul yang muncul dari kedua metode itu sama, maka dapat dikatakan bahwa protein tersebut adalah benar tirosin kinase yang dimaksud.

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

4.6.1.6. Uji Aktivitas Tirosin Kinase berdasarkan pH, suhu dan waktu inkubasi

1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Pembuatan Kurva Baku ATP

Dilarutkan 0,0125 g ATP dengan aquades dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Selanjutnya diencerkan dengan aquades sampai tanda batas. Larutan ini merupakan larutan stock ATP dengan konsentrasi 125 ppm. Kemudian diambil dengan pipet mikro 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 ml

konsentrasi ATP awal dengan konsentrasi ATP sisa. Kemudian unit aktivitas tirosin kinase dihitung dengan rumus :

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{[ATP_{awal} - ATP_{sisa}]}{BM \text{ ATP}} \times \frac{v}{p \cdot q} \times fp$$

Dimana : c = konsentrasi ATP yang bereaksi ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
 v = volume total tiap tabung (mL)
 p = jumlah enzim (mL)
 q = waktu reaksi (menit)
 fp = faktor pengenceran
 BM ATP = 551,2 $\mu\text{g} / \mu\text{mol}$

3. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Tirosin Kinase

3.1 Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim tirosin kinase dengan variasi pH yaitu 6,0 , 6,4 , 6,8 , 7,2, 7,4 dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama 30 menit.

Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara tirosin kinase terhadap variasi pH. Aktivitas maksimum menunjukkan harga pH optimum.

3.2 Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim tirosin kinase dengan variasi suhu yaitu 30, 32, 35, 38 dan 40 (°C) dan diinkubasi selama 30 menit.

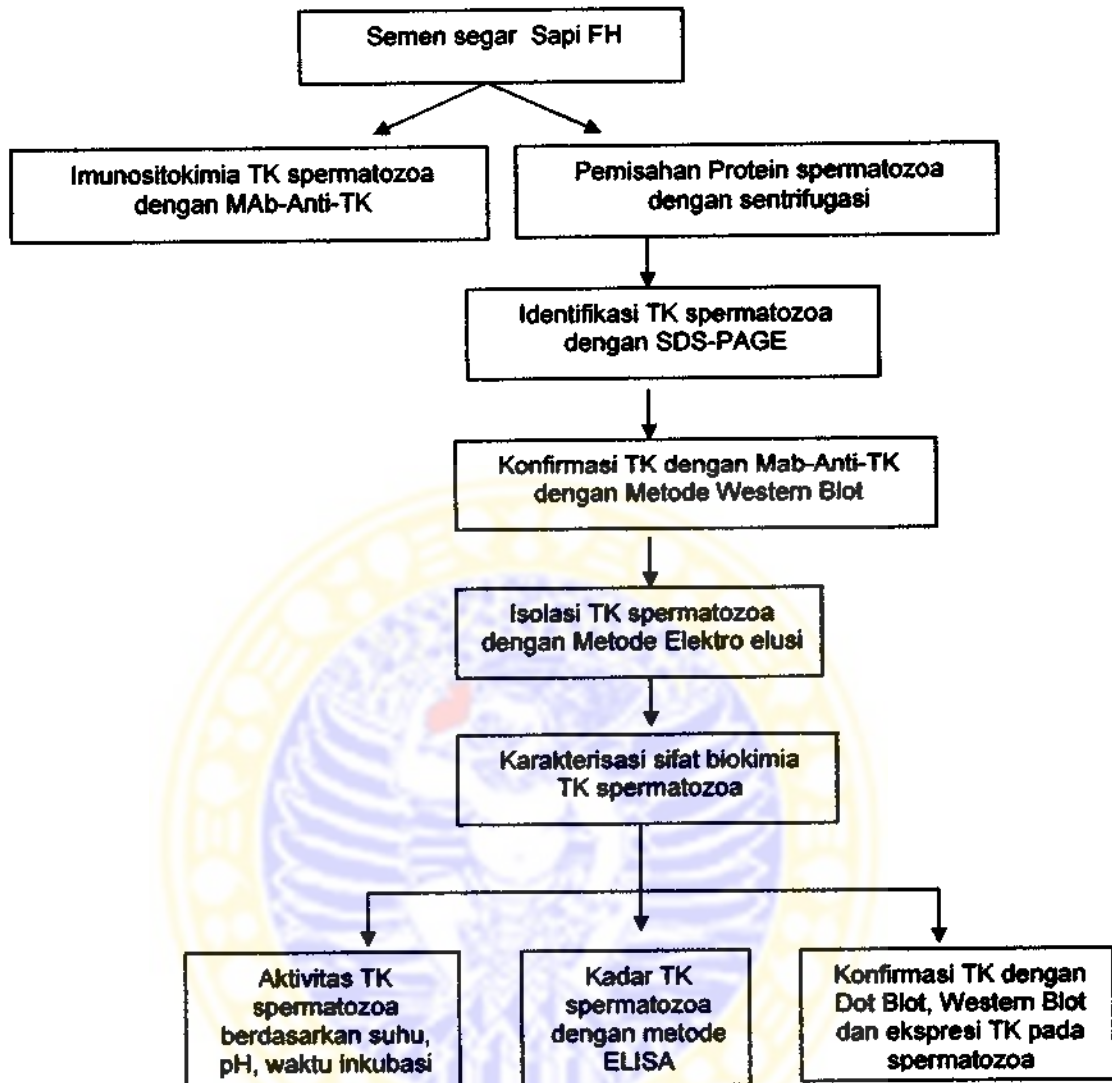
Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara aktivitas tirosin kinase terhadap variasi suhu. Aktivitas maksimum menunjukkan harga suhu optimum.

3.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim tirosin kinase pada pH dan suhu optimum dengan variasi waktu inkubasi yaitu 15, 30, 60, 90 dan 120 menit.

Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara aktivitas tirosin kinase terhadap variasi waktu inkubasi. Aktivitas maksimum menunjukkan harga waktu inkubasi optimum





Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian Tahap I

4.6.2. Tahap Penelitian Kedua

Penelitian tahap kedua ini bertujuan untuk membuktikan dosis optimum suplementasi TK ke dalam medium pengencer semen beku dapat meningkatkan kualitas spermatozoa pasca *thawing*. Penelitian dilakukan melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

1. Melakukan pemeriksaan kadar TK dengan metode ELISA
2. Penampungan semen dan pemeriksaan kualitas spermatozoa
3. Pembuatan bahan pengencer (diluter)
4. Pencampuran semen dengan bahan pengencer
5. Melakukan pemeriksaan persentase spermatozoa yang hidup sebelum dan sesudah pembekuan
6. Melakukan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan
7. Melakukan pemeriksaan integritas membran spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan
8. Melakukan pemeriksaan ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan

4.6.2.1 Penentuan Kadar Tirosin Kinase dengan Metode ELISA

Dilakukan *coating* dengan antigen (Tirosin Kinase standar, SIGNAL CHEM) pada mikroplate sebanyak 50 µl tiap well selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS 0,05%-Tween 20 sebanyak 4 kali, setelah itu dilakukan *blocking* buffer dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 50 µl tiap well, diinkubasi selama 2 jam pada suhu

kamar. Selanjutnya dicuci lagi dengan PBS 0,05%-Tween 20 sebanyak 4 kali, direaksikan dengan MAb-TK (ABGENT) yang dilarutkan dalam *blocking buffer* BSA 1% dengan seri pengenceran 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, dan 1/8000, kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* masing-masing 50 µl tiap well dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. *Microplate* dicuci kembali dengan PBS 0,05%-Tween 20 sebanyak 4 kali, selanjutnya direaksikan dengan antibodi sekunder (anti Rabbit IgG *Biotin Labelled*) yang dilarutkan dengan TBS Tween -20 dengan pengenceran 1/2500, inkubasi pada suhu kamar selama 1 jam, cuci kembali dengan PBS 0,05%-Tween 20 sebanyak 4 kali. Terakhir ditambahkan substrat SA-HRP dimasukkan *microplate* masing-masing sebanyak 50 µl tiap well . diinkubasi dalam suhu kamar selama 30 menit dalam ruang gelap, ditambahkan HCl (sebagai *stop reaction*). Pembacaan dilakukan dengan melihat hasil titer pada *Elisa reader* dengan panjang gelombang 450 nm (Aulanni'am, 2005).

4.6.2.2. Penampungan semen dan pemeriksaan kualitas spermatozoa

1. Semen sapi FH jantan ditampung menggunakan vagina buatan yang dilengkapi dengan tabung penampung berskala
2. Pemeriksaan makroskopis spermatozoa meliputi : volume, warna, bau, pH dan kekentalan
3. Pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi spermatozoa dengan metode Thoma

4.6.2.3. Pembuatan bahan pengencer (diluter)

Bahan pengencer yang digunakan adalah susu skim, tahap pembuatannya sebagai berikut : Susu skim 10% dari total volume, misalnya volume pengencer 500 ml maka kebutuhan susu skim sebesar $10/100 \times 500 \text{ ml} = 50 \text{ ml}$ ditambah aquades ad. 500 ml, kuning telur 5% (larutan skim 95 bagian + kuning telur 5 bagian) dimasukkan dalam tabung erlenmeyer, kemudian dipanaskan dalam penangas air dan di dalam tabung dilengkapi dengan thermometer, pemanasan sampai 92°C . Selanjutnya didinginkan dengan cara mengalir tabung erlenmeyer dengan air dingin sampai suhu turun menjadi 37°C ., bagian lemak susu dibagian atas dibuang. Kemudian diambil 500 ml susu ditempatkan pada tabung steril, ditambah dengan antibiotika (penicillin 1000 IU/ml dan streptomycin 1 mg/ml) diaduk dan disimpan dalam lemari es (susu tanpa gliserol).

Selanjutnya bahan pengencer skim kuning telur yang telah ditambah dengan antibiotika dibagi menjadi dua bagian yaitu pengencer A (250 ml) dan pengencer B (250 ml). Pengencer B ditambah dengan gliserol dengan tahapan sebagai berikut : 250 ml pengencer B ditambah gliserol 16% (16 ml gliserol dalam 250 ml pengencer) kemudian diaduk sampai rata.

4.6.2.4. Pencampuran semen dengan bahan pengencer

Semen segar dalam tabung pengukur dimasukkan dalam gelas beker yang berisi air (sebagai *water jacket*) ditambah dengan pengencer A sebanyak 20 ml, selanjutnya dimasukkan dalam *cool top* dengan suhu 4°C selama 35 menit. Untuk perlakuan suplementasi isolat TK dibuat beberapa perlakuan yaitu, kontrol (P0) : tanpa TK, Perlakuan 1 (P1) : TK 100 $\mu\text{g/ml}$, Perlakuan 2

(P2): TK 200 µg/ml dan Perlakuan 3 (P3) : 300 µg/ml. Kemudian *water jacket* diambil dan ditunggu selama 50 menit baru ditambah dengan sisa pengencer A dibiarkan selama 15 menit.

Selanjutnya pengencer B dimasukkan secara bertahap ke dalam pengencer A sesuai perlakuan (P0,P1,P2,dan P3). Penambahan pengencer B dibagi 4 tahap dengan selang waktu 15 menit. Dibiarkan selama 1 jam untuk memberi kesempatan tercapainya waktu ekuilibrasi. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa sebelum pembekuan dengan hasil minimal 55%. Kemudian dilanjutkan dengan proses *filling* dan *sealing*, dibiarkan selama 1 jam. Proses *prefreezing*, yaitu straw ditempatkan dalam rak dan ditaruh diatas permukaan nitrogen cair (4-5 cm diatas permukaan) selama 10 menit. Selanjutnya dicelupkan dalam nitrogen cair dengan suhu -196 °C. Waktu yang dibutuhkan dalam proses pembekuan adalah 20 jam.

Perhitungan volume pengencer berdasarkan dosis IB yaitu konsentrasi spermatozoa per straw (0,25 ml). Total spermatozoa yang motil per ejakulat yang dapat diperhitungkan menjadi jumlah straw semen. Dosis IB pada sapi sebesar 25 – 30 juta spermatozoa/straw dengan volume 0,25 ml. Misalnya : volume semen 8 ml, konsentrasi spermatozoa $850 \cdot 10^6$ sp/ml, motilitas 70% maka volume pengencer =

$$\frac{8 \times 850 \cdot 10^6 \times 70\% \times 0,25 \text{ ml}}{25 \cdot 10^{10}} = 95,2 \text{ ml}$$

4.6.2.5 Melakukan pemeriksaan persentase spermatozoa yang hidup sebelum dan sesudah pembekuan

Pemeriksaan spermatozoa yang hidup dengan cara membuat preparat ulas. 10 µl suspensi semen diteteskan pada bagian ujung gelas obyek, kemudian teteskan zat warna eosin-negrosin dicampur sampai homogen.

Ambil gelas obyek lain, tempelkan bagian ujung pada campuran semen, kemudian dengan posisi miring bersudut lancip dorong sepanjang gelas obyek yang telah disiapkan untuk mendapatkan selapis semen yang telah diwarnai setipis mungkin. Selanjutnya diangin-anginkan sampai kering. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Spermatozoa dengan bagian kepala tidak berwarna adalah spermatozoa yang hidup, sedang yang berwarna merah muda adalah spermatozoa yang mati (Partodihardjo, 1992).

4.6.2.6 Melakukan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan

Pemeriksaan motilitas spermatozoa terdiri dari pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif. Sepuluh mikroliter suspensi semen pada tiap kelompok perlakuan diteteskan pada obyek glass yang terdapat lekukan di bagian tengah, kemudian ditutup dengan *cover glass* dan diamati motilitas spermatozoa dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Pemeriksaan kuantitatif motilitas spermatozoa ditentukan berdasarkan tingkatan pergerakan progresif kedepan. Motilitas spermatozoa dibagi empat kriteria yaitu : a. pergerakan sangat baik (bergerak cepat ke depan), b. pergerakan yang baik (bergerak maju ke depan), c. pergerakan ditempat atau berputar dan d. spermatozoa tidak bergerak. Motilitas spermatozoa ditentukan dengan menghitung pergerakan spermatozoa motil dan tidak motil pada beberapa lapangan pandang secara acak. Persentase pergerakan spermatozoa dihitung berdasarkan rata-rata persentase motilitas untuk semua lapangan pandang yang dihitung (Tuty, 2004).

4.6.2.7 Pemeriksaan integritas membran plasma spermatozoa sapi FH setelah pembekuan

Pemeriksaan membran plasma utuh spermatozoa dilakukan dengan metode *hypoosmotic swelling test* (HOST) yang dikembangkan oleh Jayendra *et al.* (1984). Suspensi spermatozoa yang berasal dari semen beku sapi FH yang telah di suplementasi dengan tirosin kinase berbagai dosis (P0, P1, P2, P3) diambil sebanyak 0,1 ml kemudian tambahkan 9,9 ml larutan hypoosmotik 0,032 M (yang dibuat dari 7,35 g natrium sitrat 2H₂O, 13,52 g fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter aquades). Selanjutnya diinkubasikan selama 1 jam dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Kemudian dibuat preparat ulas tipis dengan mencampurkan satu tetes larutan diatas dengan satu tetes eosin dan diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Spermatozoa yang mempunyai integritas membran plasma utuh terlihat adanya pembengkaan bagian ekor yang diikuti ekor berputar dengan pancaran warna terang, sedang spermatozoa dengan membran plasma yang sudah rusak ditandai dengan tidak adanya pembengkaan kepala dengan ekor lurus.

4.6.2.8 Pemeriksaan Ekspresi Tirosin Kinase Spermatozoa setelah Perlakuan Suplementasi berbagai dosis tirosin kinase Hasil Isolasi.

Untuk mengetahui ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sapi FH setelah perlakuan suplementasi berbagai dosis tirosin kinase digunakan teknik imunositokimia dengan monoklonal antibodi tirosin kinase (ABGENT, no. Cat. AP7704b). Semen sapi FH yang disuplementasi dengan tirosin kinase pada berbagai dosis perlakuan (P0, P1, P2, P3) dalam medium pengencer pada proses pembekuan semen dilakukan preparasi histologis sebelum dan

sesudah pembekuan. Selanjutnya diwarnai dengan menggunakan teknik imunositokimia (Seperti pada Tahap penelitian I. 4.6.1.1). Pemeriksaan jumlah ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sapi FH dilakukan sebelum dan sesudah pembekuan

4.6.3. Tahap Penelitian Ketiga

Penelitian tahap ini dilakukan melalui uji laboratoris semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dengan berbagai dosis dalam proses fertilisasi *in vitro*.

4.6.3.1. Koleksi Oosit

1. Ovarium sapi diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) dan disimpan dalam NaCl 0,89% yang telah diberi tambahan gentamycin sulfat 50 µg/ml pada suhu 30 – 35°C
2. Ovarium yang berasal dari RPH dicuci dengan NaCl fisiologis yang telah ditambah dengan gentamycin sulfat beberapa kali sampai cairan pencuci menjadi jernih
3. Selanjutnya dilakukan aspirasi oosit menggunakan jarum ukuran G-18 yang dihubungkan dengan spuit 5 ml berisi 1 ml PBS yang telah ditambah 3 % BSA dan 50 µg/ml gentamycin
4. Selanjutnya oosit dicuci secara berturut-turut sebanyak tiga kali di dalam medium PBS dan tiga kali di dalam TCM 199
5. Oosit yang masuk dalam kelompok A dan B saja yang di maturasi secara *in vitro*

4.6.3.2. Maturasi Oosit

Pada proses maturasi oosit digunakan medium TCM -199 yang ditambah dengan 0,01 µg/ml FSH, 0,01 µg/ml LH, 3% BSA dan 50 µg/ml gentamycin sulfat. Selanjutnya dibuat tetes mikro (drop) medium maturasi (TCM-199) 50 µl ke dalam cawan petri dan ditutup dengan mineral *oil*, setiap tetes mikro berisi 10 oosit. Pematangan oosit dilakukan pada suhu 38,5 °C di dalam inkubator CO₂ 5% selama 20 - 22 jam.

4.6.3.3. Preparasi fertilisasi *in vitro*

Untuk persiapan fertilisasi *in vitro* dipergunakan semen beku sapi FH berdasarkan kelompok perlakuan (P0, P1, P2 dan P3), semen dicuci dalam medium Brickket Oliphant (BO) sebanyak 6 ml dan ditambah dengan 20 µg/ml heparin, 3% BSA dan 50 µg/ml gentamycin. Selanjutnya spermatozoadiencerkan dalam medium fertilisasi dan di inkubasi dalam incubator CO₂ 5% selama satu jam untuk optimalisasi motilitas spermatozoa. Spermatozoa yang telah diinkubasi kemudian diinjeksikan ke dalam oosit yang telah dimaturasi dengan dosis 1×10^6 /drop. Oosit yang sudah tercampur dengan spermatozoa kemudian diinkubasi kembali ke dalam inkubator CO₂ 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 sigot (Toelihere, 1985).

4.6.4. Tahap Penelitian Keempat

Penelitian tahap ini dilakukan uji lapang dengan cara inseminasi buatan pada sapi perah betina dengan semen beku yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dengan berbagai dosis. Kriteria sapi perah betina yang digunakan sebagai sampel penelitian ini adalah berumur 3 – 4 tahun, sudah pernah melahirkan dan tidak mengalami gangguan reproduksi.

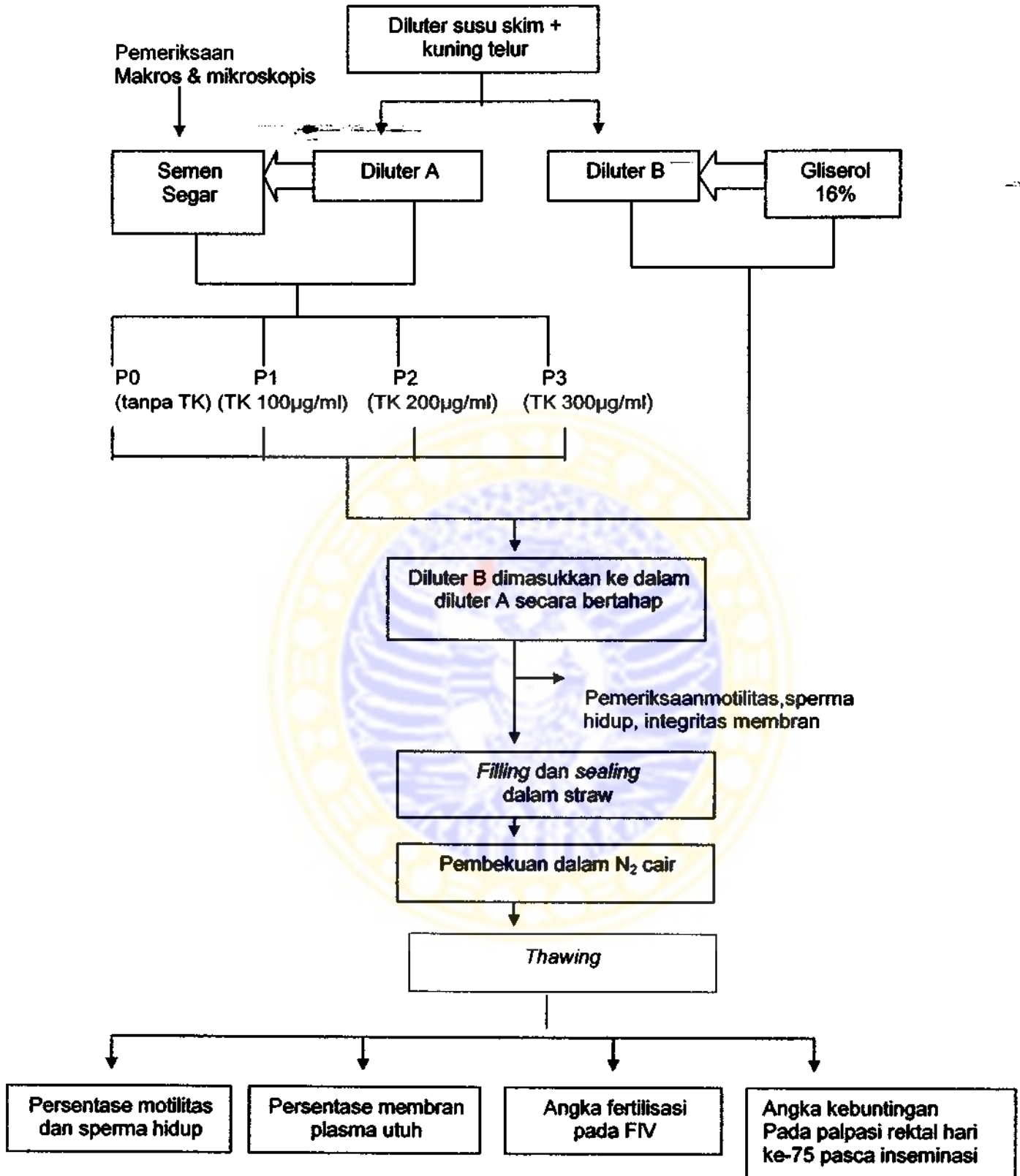
Duapuluh empat ekor sapi perah betina yang digunakan sebagai sampel penelitian digertak birahi menggunakan PGF2 α dengan dosis 5 mg secara submukosa vulva. Birahi akan muncul 48 sampai 72 jam setelah gertak birahi selanjutnya dilakukan inseminasi menggunakan semen beku yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase sesuai perlakuan. Kelompok kontrol sebanyak 6 ekor sapi perah betina di IB dengan semen beku tanpa TK, kelompok P1 sebanyak 6 ekor di IB dengan semen beku P1 (TK 100 μ g/ml), kelompok P2 sebanyak 6 ekor di IB dengan semen beku P2 (TK 200 μ g/ml) dan kelompok P3 sebanyak 6 ekor di IB dengan semen beku P3 (TK 300 μ g/ml). Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kebuntingan dengan cara palpasi rektal pada hari ke-75 setelah inseminasi.

4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari tahapan penelitian ini ditabulasikan secara diskriptif. Ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa, persentase motilitas, spermatozoa yang hidup dan membran plasma utuh dianalisis dengan uji Univariat. Untuk mengetahui pengaruh pH, suhu dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim tirosin kinase dianalisis dengan uji Anova. Persentase fertilisasi pada uji laboratoris secara in vitro dianalisis dengan uji Anova, bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji

Tukey. Angka kebuntingan pada hasil inseminasi buatan sapi FH betina dianalisis dengan uji Khi Kuadrat (Steel and Torrie, 1989).





Gambar 4.2. Kerangka Operasional Penelitian Tahap II, III dan IV

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil Penelitian dan Analisis Hasil Penelitian

Pada bab ini disajikan hasil dan analisis statistik hasil penelitian yang relevan dengan tujuan dan hipotesis penelitian. Penyajian hasil penelitian tersusun dalam bentuk tabel, gambar atau foto. Penelitian ini terdiri dari empat tahap penelitian, yaitu :

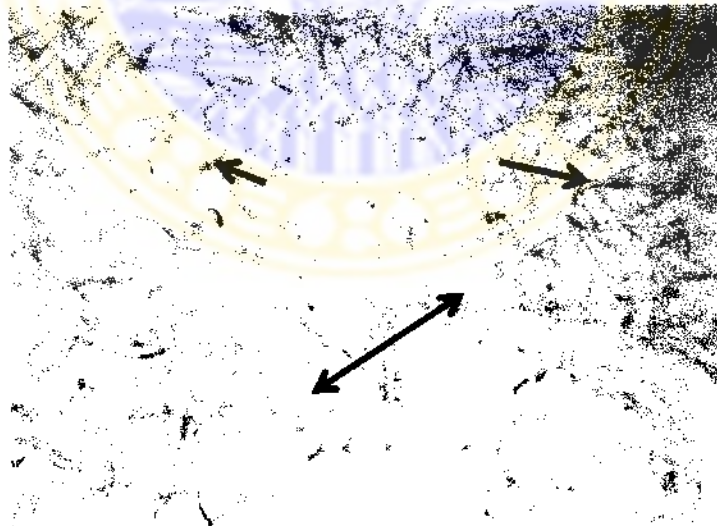
- 5.1.1. Karakter tirosin kinase spermatozoa sapi FH berdasarkan : ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa Sapi FH menggunakan MAb-tirosin Kinase (ABGENT, dengan metoda imunositokimia), penentuan berat molekul protein spermatozoa (dengan metode SDS-PAGE yang dikonfirmasi dengan metode Dot blot dan dilanjutkan dengan Western blot menggunakan MAb-tirosin Kinase (ABGENT), Uji aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH melalui penentuan kondisi optimumnya (pH, suhu dan waktu inkubasi optimum)
- 5.1.2. Uji kualitas semen beku yang disuplementasi tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH meliputi : penentuan kadar tirosin kinase menggunakan bovine tirosin kinase standar (SIGNAL CHEM, dengan metode ELISA), pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa, persentase spermatozoa hidup dan integritas membran plasma spermatozoa serta ekspresi tirosin kinase secara imunositokimia
- 5.1.3. Uji fertilitas semen beku yang disuplementasi tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH secara fertilisasi *in vitro*

5.1.4. Uji fertilitas semen beku yang disuplementasi tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH dengan cara menginseminasikan pada sapi perah betina.

5.1.1. Karakter Tirosin Kinase Spermatozoa sapi FH berdasarkan :

5.1.1.1. Ekspresi Tirosin Kinase pada Spermatozoa Sapi FH menggunakan Metoda Imunositokimia

Untuk mengetahui adanya ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sapi FH yang akan digunakan sebagai sumber tirosin kinase maka dilakukan konfirmasi menggunakan metode imunositokimia dengan monoklonal antibodi tirosin kinase (ABGENT, no. Cat. AP7704b). Ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa tervisualisasi 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 diamin benzidine (DAB). Hasil ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sapi FH dapat dilihat pada Gambar 5.1.

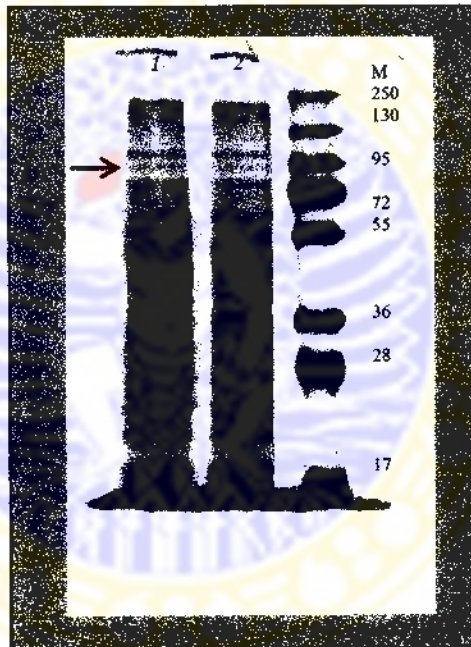


Gambar 5.1. Ekspresi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi FH menggunakan MAb-Tirosin Kinase (400 x)

Tanda panah : menunjuk pada ekspresi tirosin kinase pada kepala spermatozoa

5.1.1.2. Konfirmasi Pita Protein Spermatozoa Sapi FH menggunakan Metode SDS-PAGE

Isolat protein dari sampel spermatozoa sapi FH yang sudah dikonfirmasi mengekspresikan tirosin kinase, selanjutnya dilakukan konfirmasi berat molekul tirosin kinase dengan metode Western Blot menggunakan MAb-tirosin kinase (ABGENT, no. Cat. AP7704b) yang didahului dengan metode SDS-PAGE. Hasil SDS-PAGE dari isolat protein spermatozoa sapi FH ditemukan ada 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. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.2



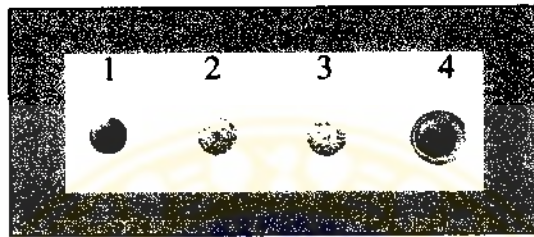
Gambar 5.2. Hasil SDS-PAGE protein membran spermatozoa sapi FH
Panah biru : menunjuk pada pita protein yang diduga tirosin kinase

5.1.1.3. Konfirmasi Tirosin Kinase pada Protein Spermatozoa menggunakan Teknik Immunoblotting

1. Dot Blot

Konfirmasi isolat tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa sapi FH dengan teknik Dot Blot dengan menggunakan MAb-tirosin kinase (ABGENT,

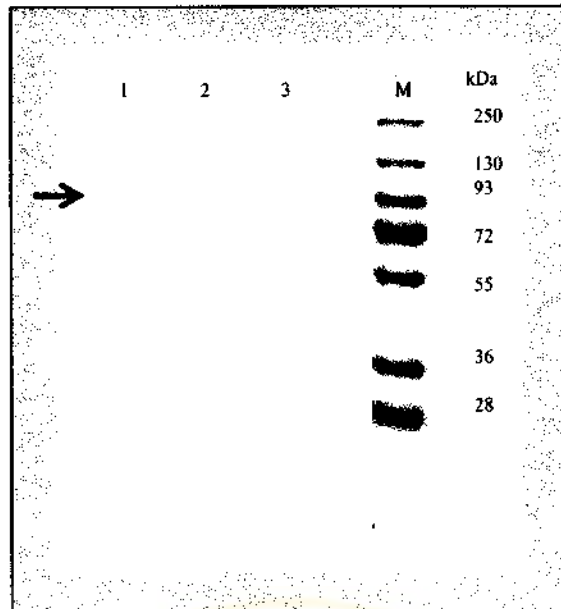
no. Cat. AP7704b). Tirosin kinase sebagai antigen ditetaskan pada membran nitroselulose yang ditempatkan pada alat Dot Blotter (BioRad). Selanjutnya ditetaskan MAb-tirosin kinase. Data yang dihasilkan berupa gambar visualisasi terjadinya reaksi spesifik antara antigen (tirosin kinase) dengan antibodi (MAb-tirosin kinase) yang terlihat sebagai noda biru keunguan seperti yang terlihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3. Konfirmasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi FH dengan MAb - tirosin kinase dengan teknik Dot blot

2. Western Blot

Untuk melakukan konfirmasi lebih lanjut 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. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Konfirmasi Berat Molekul Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Sapi FH dengan Teknik Western Blot (tanda panah menunjuk pada pita protein dengan berat molekul tirosin kinase 95 kDa)

5.1.1.4. Uji Aktifitas Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Sapi FH Melalui Penentuan Kondisi Optimumnya (pH, suhu dan waktu inkubasi optimum)

Pengujian aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH berdasarkan pengaruh pH, temperatur dan waktu inkubasi optimum.

1. Pengaruh pH

Salah satu kondisi optimum yang sangat menentukan karakteristik enzim adalah pH, yang dapat dilihat pada Tabel 5.1.

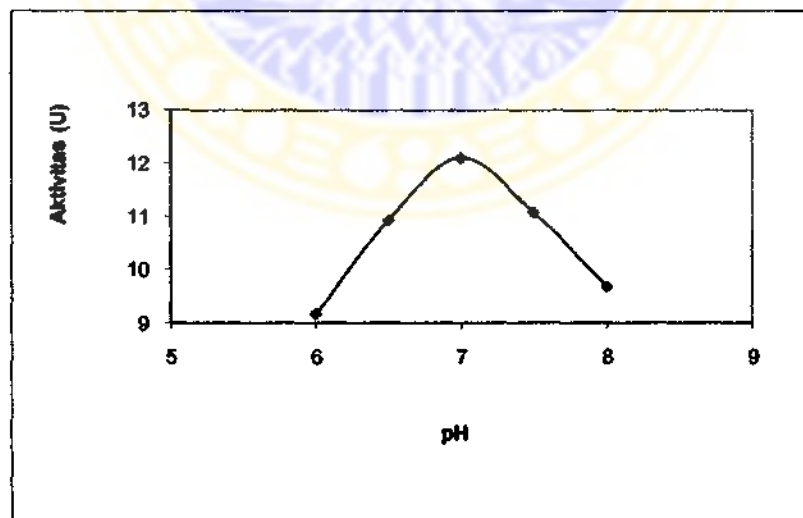
Tabel 5.1. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Tirosin Kinase

pH	Rerata Aktivitas Tirosin Kinase \pm Simpangan Baku (unit)
6,0	0,0162 ^a \pm 0,0007
6,5	0,0169 ^a \pm 0,0008
7,0	0,0208 ^c \pm 0,0004
7,5	0,0194 ^b \pm 0,0005
8,0	0,0164 ^a \pm 0,0001

Keterangan : superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)
 1 unit aktivitas : banyaknya μ mol molekul ATP yang ditransfer oleh TK tiap ml per menit pada kondisi optimum

Tabel 5.1. menunjukkan bahwa pada variasi pH 6, 6,5 dan 8,0 tidak menunjukkan perbedaan nyata ($P > 0,05$), sedangkan pH 7,0 dan 7,5 menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$) dengan pH 6, 6,5 dan 8,0. Aktivitas optimum tirosin kinase terlihat pada pH 7 yaitu sebesar 0,0208 unit.

Untuk mengetahui kurva hubungan pH dengan aktivitas tirosin kinase dapat dilihat pada Gambar 5.5



Gambar 5.5. Kurva Hubungan pH dengan Aktivitas Tirosin Kinase

Gambar 5.5. menunjukkan bahwa variasi pH memberikan nilai aktivitas tirosin kinase yang berbeda-beda. Pada pH optimum 7.0 menunjukkan aktivitas tirosin kinase yang optimum sehingga akan menghasilkan produk yang maksimal.

2. Pengaruh Temperatur

Pengujian pengaruh temperatur terhadap aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH dilakukan pada variasi temperatur 20, 25, 30, 35 dan 40°C. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase

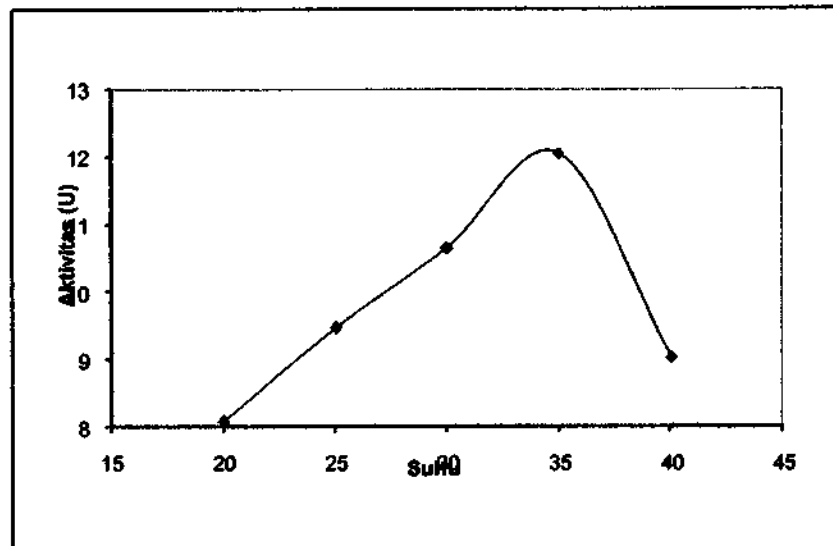
Temperatur (°C)	Rerata Aktivitas Tirosin Kinase ± Simpangan Baku (Unit)
20	0,0146 ^a ± 0,0001
25	0,0171 ^b ± 0,0008
30	0,0193 ^b ± 0,0001
35	0,0218 ^c ± 0,0007
40	0,0163 ^a ± 0,0009

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

1 unit aktivitas : banyaknya μmol molekul ATP yang ditransfer oleh TK tiap ml per menit pada kondisi optimum

Tabel 5.2. menunjukkan bahwa pada temperatur 20 °C dan 40 °C berdasarkan uji statistik menggunakan Analisis Varian tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$), sedangkan pada temperatur 35 °C berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan temperatur 20 °C 40 °C serta 25 °C, 30 °C dengan aktivitas tirosin kinase sebesar 0,0218 unit.

Untuk mengetahui kurva hubungan temperatur dengan aktivitas tirosin kinase dapat dilihat pada Gambar 5.6.



Gambar 5.6. Kurva Hubungan Temperatur dengan Aktivitas Tirosin Kinase

Gambar 5.6. menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas tirosin kinase sampai pada temperatur optimum (35°C) setelah mencapai temperatur optimum, aktivitas tirosin kinase menurun seiring dengan peningkatan temperatur.

3. Pengaruh Waktu Inkubasi

Pengaruh variasi waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH dapat dilihat pada Tabel 5.3

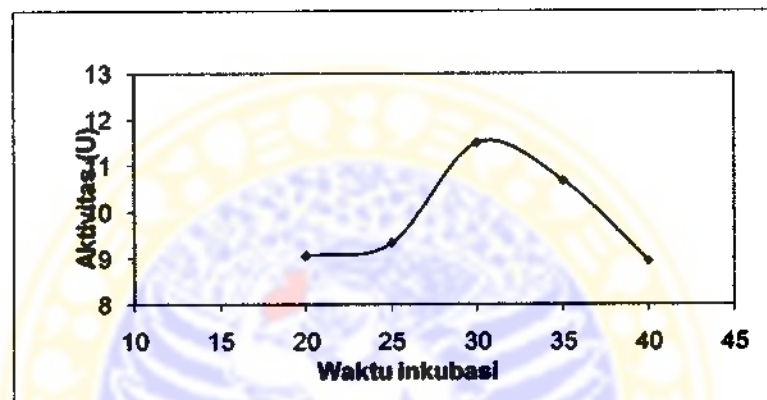
Tabel 5.3 Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Tirosin Kinase

Waktu Inkubasi (menit)	Rerata Aktivitas Tirosin Kinase ± Simpangan Baku (Unit)
20	0,0177 ^a ± 0,001
25	0,0195 ^b ± 0,0004
30	0,0219 ^c ± 0,0002
35	0,0202 ^b ± 0,0008
40	0,0166 ^a ± 0,0001

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

Tabel 5.3. menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 20 dan 40 menit secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$). Waktu inkubasi 30 menit berbeda nyata dengan waktu inkubasi 20 dan 40 menit serta 25 dan 35 menit ($P<0,05$) dengan aktivitas optimum tirosin kinase sebesar 0,0219 unit.

Untuk mengetahui kurva hubungan waktu inkubasi dengan aktivitas tirosin kinase dapat dilihat pada Gambar 5.7



Gambar 5.7 Kurva Hubungan Waktu Inkubasi dengan Aktivitas Tirosin Kinase

Dari data aktivitas tirosin kinase pada kondisi optimum (pH 7,0, temperatur 35°C dan waktu inkubasi 30 menit) diperoleh rerata aktivitas seperti pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Aktivitas isolat TK pada pH 7,0, Temperatur 35°C dan waktu inkubasi 30 menit

Sampel	Rerata Aktivitas Tirosin Kinase (Unit)
1	0,0219
2	0,0218
3	0,0220
4	0,0218
5	0,0219
Rataan	0,02188

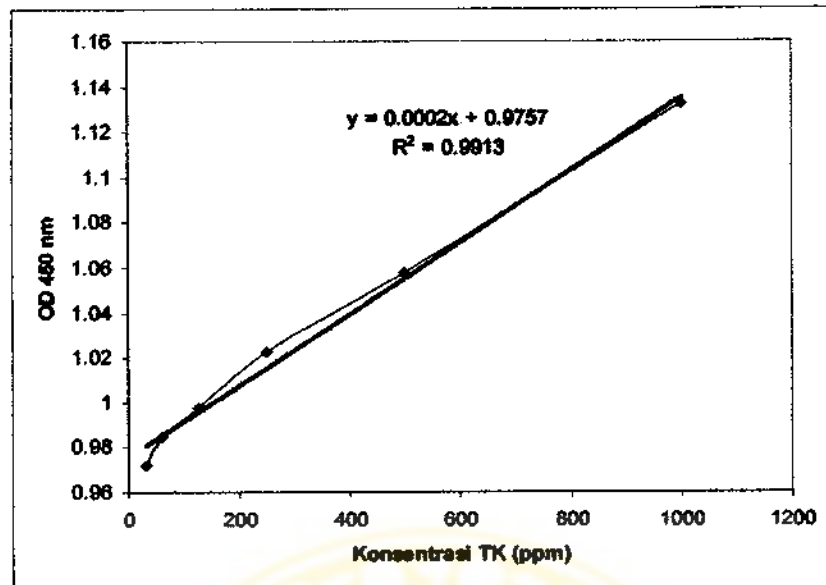
Keterangan : 1 unit aktivitas : banyaknya μmol molekul ATP yang ditransfer oleh TK tiap ml per menit pada kondisi optimum

5.1.2. Uji Kualitas Semen Beku yang Disuplementasi Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Sapi FH

Tirosin kinase hasil penelitian ini ditentukan kadarnya lebih dahulu sebelum digunakan untuk suplementasi dalam medium pengencer semen beku sapi FH yang selanjutnya digunakan untuk uji kualitas spermatozoa dan uji fertilitas secara *in vitro* maupun *in vivo*

5.1.2.1. Penentuan Kadar Tirosin Kinase dengan Metode ELISA

Penentuan kadar tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa sapi FH menggunakan tirosin kinase standar (SIGNAL CHEM) dan MAb- tirosin kinase (ABGENT) dengan metode ELISA, Pengukuran dengan teknik ELISA ini dilakukan dengan menginterpolasikan nilai absorbansi (nilai OD) tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa sapi FH dengan persamaan garis $Y = 0,0002x + 0,9767$. Hasil dapat dilihat pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8. Kurva Tirosin Kinase Standar

Berdasarkan persamaan garis yang terlihat pada Gambar 5.8 diketahui bahwa kadar tirosin kinase hasil elektroelusi adalah 20030 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).

5.1.2.2. Persentase Spermatozoa Hidup Sebelum dan Sesudah Pembekuan

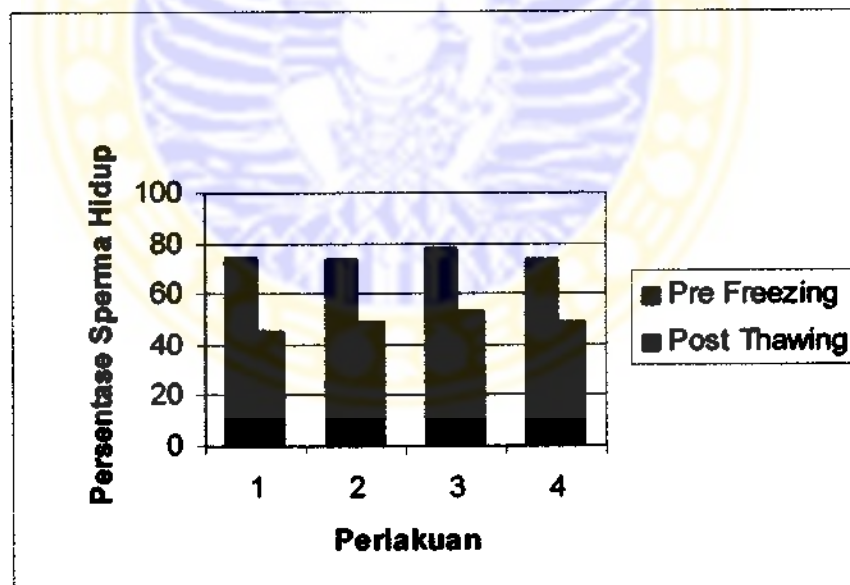
Rerata persentase spermatozoa sapi FH yang hidup sebelum dan sesudah pembekuan pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase dapat dilihat pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5. Rerata (\pm Simpangan Baku) Persentase Spermatozoa Sapi FH yang Hidup pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase Sebelum dan Sesudah Pembekuan

	Perlakuan	N	Rerata \pm Simpangan Baku Spermatozoa yang Hidup (%)
sebelum	P0	10	74.0 \pm 2.1081
	P1	10	73.5 \pm 2.4152
	P2	10	77.5 \pm 2.6352
	P3	10	73.5 \pm 2.4152
sesudah	P0	10	44.7 \pm 0.4830
	P1	10	49.0 \pm 2.1081
	P2	10	53.0 \pm 2.5819
	P3	10	48.5 \pm 2.4152

Keterangan : P0 : Kontrol (tanpa suplementasi TK)
 P1 : Suplementasi TK100 μ g/ml dalam medium semen beku
 P2 : Suplementasi TK 200 μ g/ml dalam medium semen beku
 P3 : Suplementasi TK 300 μ g/ml dalam medium semen beku

Secara histogram rerata persentase spermatozoa sapi FH yang hidup sebelum dan sesudah pembekuan pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase dapat dilihat pada Gambar 5.9.



Gambar 5.9 Histogram Persentase Spermatozoa Sapi FH yang Hidup Sebelum dan Sesudah Pembekuan Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase

Hasil pengujian statistik dengan menggunakan Univariate Analisis Varian, maka hasil uji F dari spermatozoa sapi FH yang hidup sebelum dan sesudah pembekuan pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase dapat dilihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6. Uji F Spermatozoa Sapi FH yang Hidup Pada Kelompok Kontrol Dan Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase Sebelum Dan Sesudah Pembekuan

Sumber keragaman	Jumlah kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat tengah	F	P
Model	318470.900	8	39808.863	7915.598	0.000
Pembekuan (F)	13338.613	1	13338.613	2652.251	0.000
Perlakuan (P)	376.338	3	125.446	24.944	0.000
Interaksi F/P	81.338	3	27.113	5.391	0.002
Galat	362.100	72	5.029		
Total	318833.000	80			

Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh proses pembekuan pada berbagai dosis perlakuan suplementasi tirosin kinase dalam medium pengencer semen beku terhadap persentase spermatozoa yang hidup digunakan uji Univariate analisis varian. Hasil selengkapnya dapat diamati pada Tabel 5.7

Tabel 5.7. Uji Univariat Analisis Varian Persentase Spermatozoa Yang Hidup Pada Berbagai Dosis Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase Sebelum Dan Sesudah Pembekuan

Pembekuan	Rerata ± Simpangan Baku
Sebelum	74,63 ^b ± 2,862
Sesudah	48,80 ^a ± 3,582

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

Tabel 5.7. Menunjukkan bahwa persentase spermatozoa yang hidup setelah disuplementasi dengan tirosin kinase pada berbagai dosis perlakuan sebelum dan sesudah pembekuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Untuk mengetahui pengaruh dosis suplementasi tirosin kinase dalam medium pengencer semen beku terhadap persentase spermatozoa yang hidup selama proses pembekuan digunakan uji Univariat Analisis Varian. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.8.

Tabel 5.8. Uji Univariat Analisis Varian Persentase Spermatozoa Yang Hidup Pada Berbagai Dosis Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase Selama Proses Pembekuan

Perlakuan	Rerata ± Simpangan Baku
P0	59,35 ^a ± 15,104
P1	61,25 ^b ± 12,760
P2	65,25 ^c ± 12,822
P3	61,00 ^{ab} ± 13,038

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

Tabel 5.8 dapat dijelaskan bahwa persentase spermatozoa yang hidup selama proses pembekuan berdasarkan dosis perlakuan yang berbeda

menunjukkan bahwa pada dosis perlakuan 2 (P2) berbeda sangat nyata dengan P0, P1 dan P3 ($P < 0,01$), sedangkan P0 berbeda nyata dengan P1 dan P3 ($P < 0,05$).

Interaksi antara dosis perlakuan dengan proses pembekuan terhadap persentase spermatozoa yang hidup dilakukan dengan uji Tukey HSD. Terdapat interaksi tertinggi antara sebelum pembekuan dengan P2 ($P < 0,05$), begitu pula terjadi interaksi tertinggi antara sesudah pembekuan dengan P2 ($P < 0,05$). Hasil selengkapnya dilihat pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9. Uji Tukey HSD Interaksi Pembekuan Dengan Dosis Perlakuan Terhadap Persentase Spermatozoa Yang Hidup

Interaksi Pembekuan - Perlakuan	Rerata \pm Simpangan Baku
Sebelum-P0	74,00 ^d \pm 2,108
Sebelum-P1	73,50 ^d \pm 2,415
Sebelum-P2	77,50 ^e \pm 2,635
Sebelum-P3	73,50 ^d \pm 2,415
Sesudah-P0	44,70 ^a \pm 0,483
Sesudah-P1	49,00 ^b \pm 2,108
Sesudah-P2	53,00 ^c \pm 2,582
Sesudah-P3	48,50 ^b \pm 2,415

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

5.1.2.3. Persentase Motilitas Spermatozoa Sebelum dan Sesudah Pembekuan

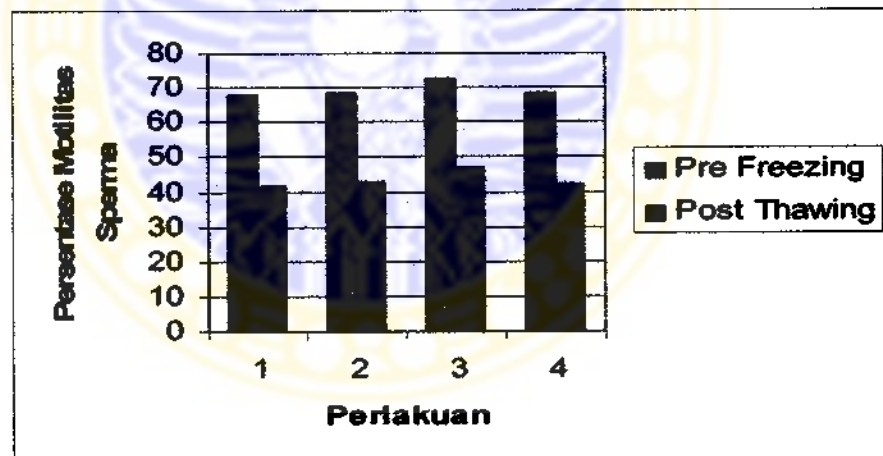
Rerata persentase motilitas spermatozoa sapi FH sebelum dan sesudah pembekuan pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase dapat dilihat pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10. Rerata (\pm Simpangan Baku) Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi FH Kelompok Kontrol dan Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase Sebelum dan Sesudah Pembekuan

	Perlakuan	N	Rerata dan Simpangan Baku Motilitas Spermatozoa (%)
sebelum	P0	10	67.5 \pm 4.2491
	P1	10	68.5 \pm 2.4152
	P2	10	72.5 \pm 2.6352
	P3	10	68.5 \pm 2.4152
sesudah	P0	10	41.5 \pm 2.4152
	P1	10	42.5 \pm 2.6352
	P2	10	47.0 \pm 2.5819
	P3	10	42.0 \pm 2.5819

Keterangan : P0 : Kontrol (tanpa suplementasi TK)
 P1 : Suplementasi TK 100 μ g/ml dalam medium semen beku
 P2 : Suplementasi TK 200 μ g/ml dalam medium semen beku
 P3 : Suplementasi TK 300 μ g/ml dalam medium semen beku

Secara histogram rerata persentase motilitas spermatozoa sapi FH pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase dapat dilihat pada Gambar 5.10.



Gambar 5.10 Histogram Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi FH Sebelum dan Sesudah Pembekuan pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase

Hasil pengujian statistik dengan menggunakan Univariat Analisis Varian, maka hasil uji F dari persentase motilitas spermatozoa sapi FH sebelum dan

Tabel 5.12. menunjukkan persentase motilitas spermatozoa setelah disuplementasi tirosin kinase dengan berbagai dosis perlakuan sebelum dan sesudah pembekuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Untuk mengetahui pengaruh dosis perlakuan suplementasi tirosin kinase dalam medium pengencer semen beku terhadap persentase motilitas spermatozoa selama proses pembekuan digunakan uji Univariat Analisis Varian. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.13

Tabel 5.13. Uji Univariat Analisis Varian Persentase Motilitas Spermatozoa pada Berbagai Dosis Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase Selama Proses Pembekuan

Perlakuan	Rerata \pm Simpangan Baku
P0	54,50 ^a \pm 13,755
P1	55,50 ^a \pm 13,563
P2	59,75 ^b \pm 13,325
P3	55,25 ^a \pm 13,810

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

Pada Tabel 5.13 dapat dijelaskan bahwa persentase motilitas spermatozoa selama proses pembekuan berdasarkan dosis perlakuan yang berbeda menunjukkan bahwa pada dosis perlakuan 2 (P2) berbeda sangat nyata dengan P0, P1 dan P3 ($P < 0,01$), sedangkan P0 tidak berbeda nyata dengan P1 dan P3 ($P > 0,05$).

Rerata persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sapi FH dari semen beku yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dengan berbagai dosis dapat diamati dengan metode *hypoosmotic swelling test* (HOS test). Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.14.

Tabel 5.14. Rerata (\pm Simpangan Baku) Persentase MPU Spermatozoa Sapi Perah Kelompok Kontrol dan Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase sebelum dan sesudah pembekuan

	Perlakuan	N	Rerata \pm Simpangan Baku MPU Spermatozoa (%)
sebelum	P0	5	54,00 \pm 0.872
	P1	5	53,33 \pm 0.115
	P2	5	68,00 \pm 0.600
	P3	5	62,00 \pm 0.200
sesudah	P0	5	30,67 \pm 0.611
	P1	5	31,33 \pm 0.462
	P2	5	51,33 \pm 0.462
	P3	5	50,66 \pm 1.833

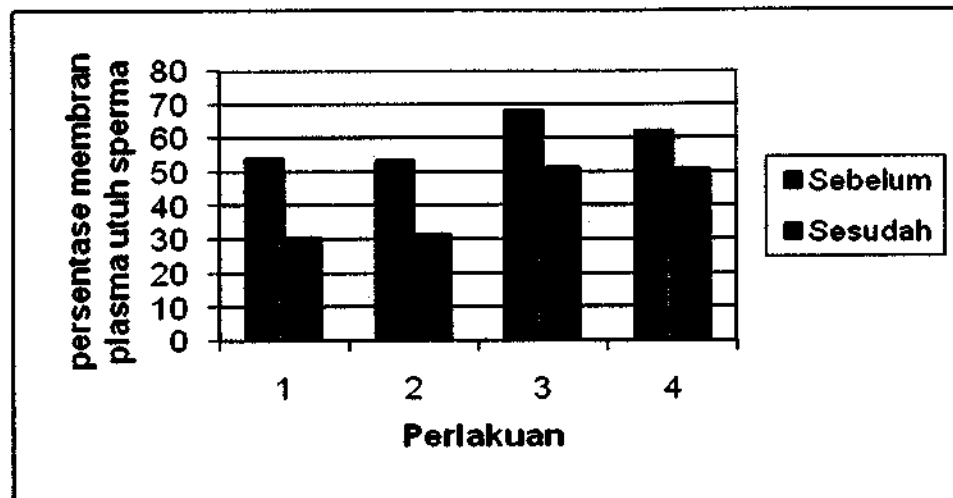
Keterangan : P0 : tanpa suplementasi TK

P1 : Suplementasi TK100 μ g/ml dalam medium semen beku

P2 : Suplementasi TK 200 μ g/ml dalam medium semen beku

P3 : Suplementasi TK 300 μ g/ml dalam medium semen beku

Secara histogram rerata persentase membran plasma utuh spermatozoa sapi FH pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase dapat dilihat pada Gambar 5.12.



Gambar. 5.12. Histogram Persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa Sapi FH Sebelum dan Sesudah Pembekuan pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase

Hasil pengujian statistik dengan menggunakan Univariat Analisis Varian, maka hasil uji F dari persentase membran plasma utuh spermatozoa sapi FH sebelum dan sesudah pembekuan pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase dapat dilihat pada Tabel 5.15.

Tabel 5.15 Uji F Persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa Sapi FH pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase Sebelum dan Sesudah Pembekuan

Sumber keragaman	Jumlah kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat tengah	F	P
Model	1067.805	8	133.476	199.054	0.000
Pembekuan (F)	33.581	1	33.581	50.079	0.000
Perlakuan (P)	25.066	3	8.355	12.460	0.000
Interaksi F/P	2.247	3	0.749	1.117	0.956
Galat	21.458	32	0.671		
Total	1089.263	40			

Tabel 5.17. Uji Univariat Analisis Varian Persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa pada Berbagai Dosis Perlakuan Suplementasi Tirosin Kinase Selama Proses Pembekuan

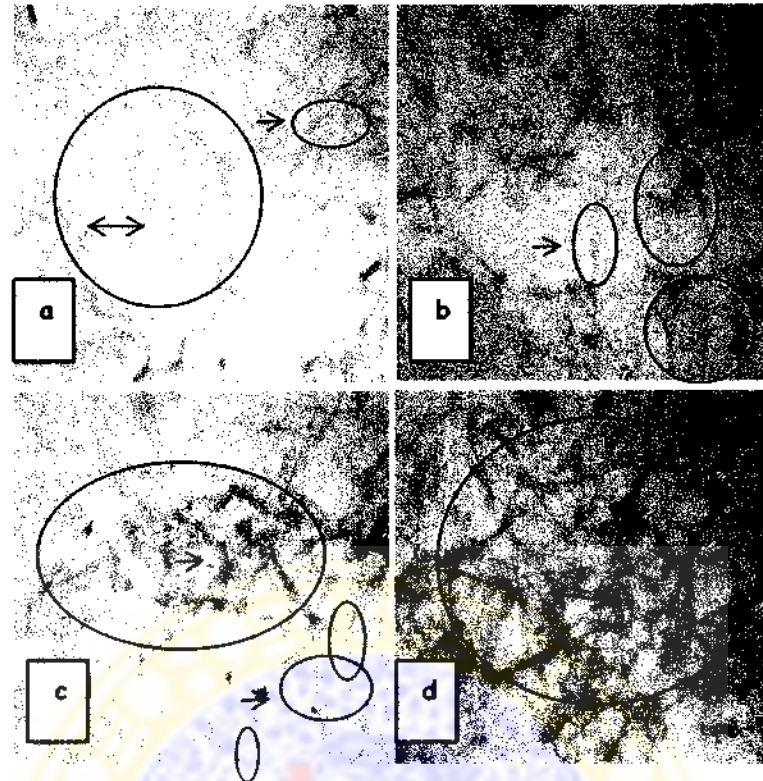
Perlakuan	Rerata \pm Simpangan Baku
P0	4,234 ^a \pm 1,295
P1	4,235 ^a \pm 1,369
P2	5,967 ^b \pm 1,443
P3	5,633 ^b \pm 0,853

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

Pada Tabel 5.17 dapat dijelaskan bahwa persentase membran plasma utuh spermatozoa selama proses pembekuan berdasarkan dosis perlakuan yang berbeda menunjukkan bahwa pada dosis perlakuan 2 (P2) dan P3 berbeda sangat nyata dengan P0 dan P1 ($P < 0,01$), sedangkan antara P0 dengan P1 dan antara P2 dengan P3 tidak berbeda nyata ($P > 0,05$).

5.1.2.5. Ekspresi Tirosin Kinase pada Spermatozoa Sapi FH menggunakan Metoda Imunositokimia

Ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sapi FH yang disuplementasi dengan tirosin kinase pada berbagai dosis perlakuan (100, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$) ke dalam medium pengencer pada proses pembekuan semen dilakukan preparasi histologis sebelum dan sesudah pembekuan, selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan metode imunositokimia menggunakan antibodi primer MAb-tirosin kinase dan antibodi sekunder berlabel SA-HRP dengan substrat Diamino Benzidine (DAB), Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 5.13. dan Gambar 5.14.



Gambar 5.14. Ekspresi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi FH Menggunakan MAb- Tirosin Kinase (400 x) Pada Kondisi Sesudah Pembekuan

**Keterangan : bulatan biru : positif (adanya ekspresi TK pada bagian kepala spermatozoa)
bulatan merah: negatif (tidak ada ekspresi TK)**

Ekspresi tirosin kinase spermatozoa sapi FH dari semen beku yang disuplementasi tirosin kinase dengan dosis (100, 200 dan 300 µg/ml) sebelum dan sesudah pembekuan dapat dilihat pada Tabel 5.18

Tabel 5.18. Rerata Persentase (\pm Simpangan Baku) Ekspresi Tirosin Kinase pada Spermatozoa Sapi FH dari Berbagai Perlakuan Sebelum dan Sesudah Pembekuan menggunakan Metode Imunositokimia

	Perlakuan	N	Rerata \pm Simpangan Baku
sebelum	P0	5	2.20 ^a \pm 0.447
	P1	5	7.40 ^b \pm 1.517
	P2	5	13.20 ^c \pm 0.447
	P3	5	16.80 ^d \pm 0.837
sesudah	P0	5	3.60 ^a \pm 0.894
	P1	5	8.20 ^a \pm 2.167
	P2	5	15.40 ^b \pm 3.266
	P3	5	22.60 ^c \pm 3.847

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

P0 : Kontrol (tanpa suplementasi TK)

P1 : Suplementasi TK 100 µg/ml dalam medium semen beku

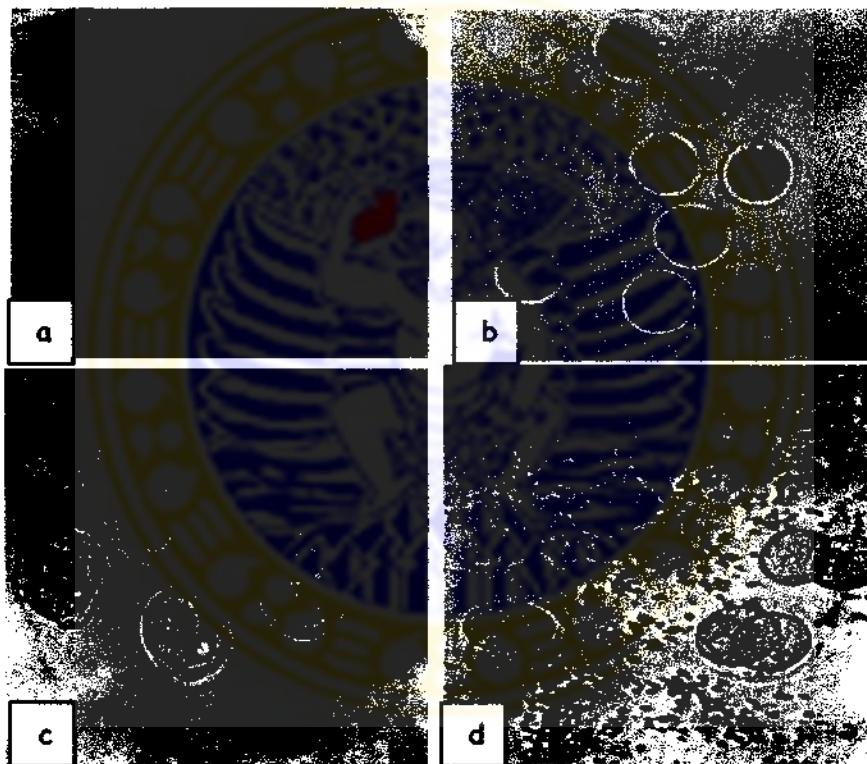
P2 : Suplementasi TK 200 µg/ml dalam medium semen beku

P3 : Suplementasi TK 300 µg/ml dalam medium semen beku

Secara histogram rerata persentase ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sapi FH pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase sebelum dan sesudah pembekuan dapat dilihat pada Gambar 5.15.

5.1.3. Uji Fertilitas Semen Beku yang Telah Disuplementasi Dengan Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Sapi FH secara *In vitro*.

Pengujian semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dengan berbagai dosis secara laboratoris dilakukan dengan cara fertilisasi *in vitro* yang memanfaatkan oosit hasil maturasi dari ovarium sapi yang berasal dari limbah rumah potong hewan (RPH). Embrio yang dihasilkan dari proses fertilisasi *in vitro* dapat dilihat pada Gambar 5.16



Gambar 5.16. Embrio Sapi Hasil Fertilisasi *In Vitro*. (a) Oosit dengan kumulus kompleks, (b) sigot dengan badan kutub dua, (c) embrio dua sel, (d) embrio empat sel

Jumlah embrio dan persentase fertilisasi dari proses fertilisasi *in vitro* menggunakan semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dapat dilihat pada Tabel 5.19

Tabel 5.19. Perkembangan Embrio Pada Proses Fertilisasi *In vitro* Menggunakan Semen Beku yang Telah Disuplementasi Dengan Tirosin Kinase

Perlakuan	N	Jumlah oosit	Pengamatan Hasil Fertilisasi In Vitro		
			24 jam (sigot)	48 jam (embrio 2 sel)	72 jam (embrio 4 sel)
P0	6	19	14 (73.68)	11 (78.57)	9 (64.28)
P1	6	23	17 (73.91)	14 (82.35)	11 (64.70)
P2	6	22	17 (77.27)	14 (82.35)	12 (70.58)
P3	6	20	15 (75.00)	12 (80.00)	10 (66.66)

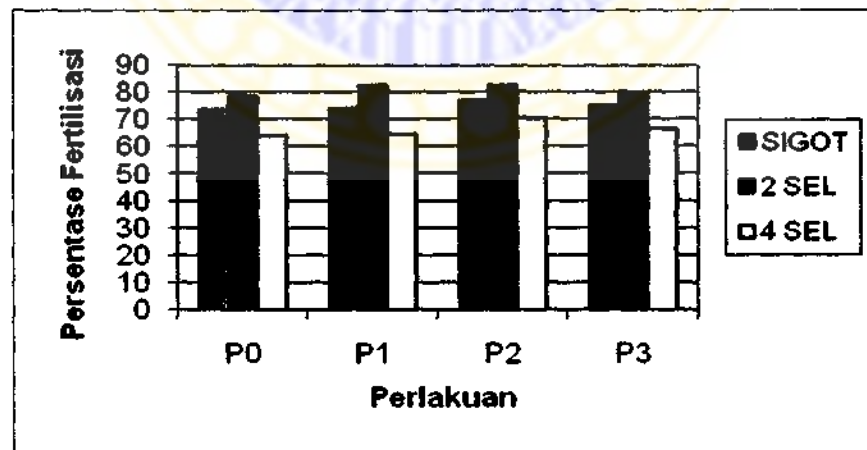
Keterangan : P0 = Semen beku sapi FH tanpa suplementasi TK

P1 = Semen beku sapi FH dengan suplementasi TK 100 µg/ml

P2 = Semen beku sapi FH dengan suplementasi TK 200 µg/ml

P3 = Semen beku sapi FH dengan suplementasi TK 300 µg/ml

Secara histogram rerata persentase fertilisasi yang diperoleh melalui proses fertilisasi *in vitro* dalam waktu (24, 48 dan 72) jam pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase dapat dilihat pada Gambar 5.17



Gambar 5.17 Histogram Persentase Fertilisasi pada Proses Fertilisasi *in vitro* Menggunakan Semen Beku + Tirosin Kinase

Pengujian statistik menggunakan Analisis Varian satu arah untuk mengetahui angka fertilisasi dengan waktu pengamatan 24 jam dapat diketahui jumlah sigot yang didapat, hasilnya dapat diamati pada Tabel 5.20

Tabel 5.20 Uji F Jumlah Sigot yang Diperoleh dari Hasil Fertilisasi *In Vitro* menggunakan Semen Beku Sapi FH + TK pada Waktu Pengamatan 24 jam

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Tengah	F	P
Perlakuan	21.296	3	7.099	7.470	0.002
Galat	19.006	20	.950		
Total	40.303	23			

Hasil Analisis Varian Satu Arah menunjukkan bahwa suplementasi tirosin kinase dalam semen sapi FH dengan dosis 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml dibandingkan dengan kontrol terhadap persentase sigot yang dihasilkan dalam medium kultur *in vitro*, menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0.01$). Kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey, hasil tertinggi ditunjukkan bahwa P2 berbeda nyata dengan P0, P2 dan P3 ($P < 0.05$).

Tabel 5.21 Uji Analisis Varian Satu Arah Persentase Sigot Yang Diperoleh Dari Hasil Fertilisasi *In Vitro* Menggunakan Semen Beku Sapi FH+TK Pada Waktu Pengamatan 24 jam

Perlakuan	N	Rerata ± Simpangan Baku
P0	6	59.15 ^a ± 0.801
P1	6	59.290 ^a ± 1.308
P2	6	61.525 ^c ± 1.138
P3	6	60.012 ^{ab} ± 0.388

Keterangan : superkrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$)

Tabel 5.22. Uji F Jumlah Embrio 2 sel Yang Diperoleh Dari Hasil Fertilisasi *In Vitro* Menggunakan Semen Beku Sapi FH + TK Pada Waktu Pengamatan 48 jam

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Tengah	F	P
Perlakuan	35.695	3	11.898	22.933	<0.0001
Galat	10.376	20	.519		
Total	46.071	23			

Hasil analisis varian menunjukkan bahwa suplementasi tyrosin kinase dalam semen dengan dosis 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml dibandingkan dengan kontrol terhadap persentase embrio dua sel yang dihasilkan dalam medium kultur *in vitro*, menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0.01$). Kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey, hasil tertinggi ditunjukkan oleh P2 berbeda nyata dengan P0, P1 dan P3 ($P < 0.05$), sedangkan hasil terendah ditunjukkan oleh P0 yang berbeda nyata terhadap P1 dan P3 ($P < 0.05$). dan P1 tidak berbeda nyata dengan P3 ($P > 0,05$).

Tabel 5.23 Uji Analisis Varian Satu Arah Persentase Embrio 2 sel Yang Diperoleh Dari Hasil Fertilisasi *In Vitro* Menggunakan Semen Beku Sapi FH+TK Pada Waktu Pengamatan 48 jam

Perlakuan	N	Rerata ± Simpangan Baku
P0	6	49.546 ^a ± 1.083
P1	6	51.286 ^b ± 0.633
P2	6	52.943 ^c ± 0.598
P3	6	50.770 ^b ± 0.378

Keterangan : superkrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$)

Pengujian statistik menggunakan Uji Varian untuk mengetahui persentase fertilisasi dengan waktu pengamatan 72 jam dapat diketahui jumlah embrio 4 sel yang diperoleh, hasilnya dapat diamati pada Tabel 5.24

Tabel 5.24. Uji F Jumlah Embrio 4 Sel Yang Diperoleh Dari Hasil Fertilisasi *In Vitro* Menggunakan Semen Beku Sapi FH + TK Pada Waktu Pengamatan 72 jam

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Tengah	F	P
Perlakuan	60.692	3	20.485	27.485	<0.0001
Galat	14.721	20	.736		
Total	75.413	23			

Hasil analisis Uji Variasi menunjukkan bahwa suplementasi tirosin kinase dalam semen dengan dosis 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml dibandingkan dengan kontrol terhadap persentase embrio empat sel yang dihasilkan dalam medium kultur *in vitro*, menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0.01$). Kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey, hasil tertinggi ditunjukkan oleh P2 yang berbeda nyata dengan P0, P1 dan P3 ($P < 0.05$), sedangkan hasil terendah ditunjukkan oleh P0 yang tidak berbeda nyata terhadap P1 ($P > 0.05$) tetapi berbeda nyata dengan P3 ($P < 0.05$). Hasil selengkapnya dilihat pada Tabel 5.25

Tabel 5.25. Uji Analisis Variasi Satu Arah Persentase Embrio 4 Sel Yang Diperoleh Dari Hasil Fertilisasi *In Vitro* Menggunakan Semen Beku Sapi FH+TK Pada Waktu Pengamatan 72 jam

Perlakuan	N	Rerata ± Simpangan Baku
P0	6	43.693 ^a ± 0.821
P1	6	43.746 ^a ± 1.297
P2	6	47.600 ^c ± 0.279
P3	6	45.335 ^b ± 0.712

Keterangan: superkrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$)

5.1.4. Uji Fertilitas Semen Beku yang Telah Disuplementasi Dengan Tyrosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Sapi FH Dengan Cara Di Inseminasikan pada Sapi FH Betina

Pengujian di lapangan, semen beku sapi FH yang telah disuplementasi dengan tyrosin kinase dengan cara melakukan inseminasi buatan pada sejumlah sapi FH betina yang telah memenuhi kriteria yaitu tidak dalam keadaan bunting, sudah pernah beranak dan tidak mengalami gangguan reproduksi. Persentase kebuntingan pada sapi FH betina dapat dilihat pada Tabel 5.26.

Tabel 5.26 Persentase Kebuntingan pada Sapi FH yang di IB dengan Semen Beku Perlakuan pada Pemeriksaan Kebuntingan Hari ke-75

Perlakuan	Jumlah Sapi FH betina (ekor)	Bunting (%)	Tidak Bunting (%)
P0	6	5 (83,3)	1 (16,6)
P1	6	5 (83,3)	1 (16,6)
P2	6	6 (100)	0 (0)
P3	6	6 (100)	0 (0)

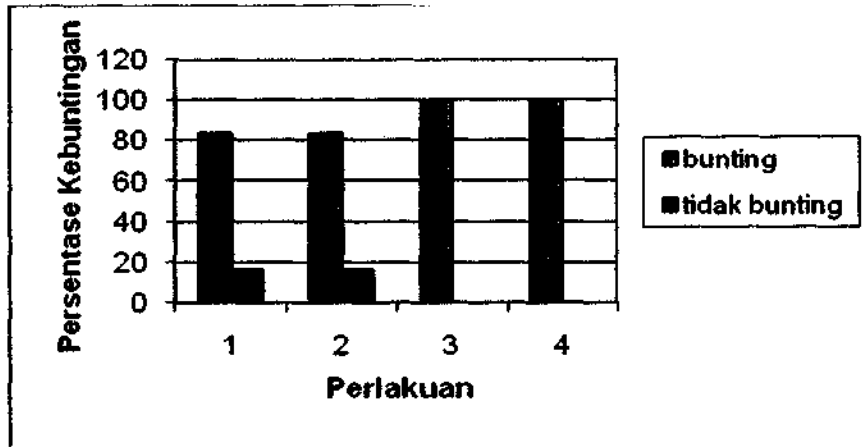
Keterangan : P0 = Semen beku sapi FH tanpa suplementasi TK

P1 = Semen beku sapi FH dengan suplementasi TK 100 µg/ml

P2 = Semen beku sapi FH dengan suplementasi TK 200 µg/ml

P3 = Semen beku sapi FH dengan suplementasi TK 300 µg/ml

Secara histogram rerata persentase kebuntingan yang diperoleh melalui inseminasi buatan pada kelompok kontrol dan perlakuan suplementasi tirosin kinase dapat dilihat pada Gambar 5.19



Gambar 5.19. Histogram persentase kebuntingan pada sapi FH yang di IB dengan semen beku + TK



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Karakterisasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (FH)

Hasil penelitian tahap I ini adalah membuktikan bahwa tirosin kinase yang terdapat pada spermatozoa sapi FH dapat diidentifikasi, diisolasi dan dikarakterisasi melalui serangkaian metode yang nantinya digunakan sebagai bahan suplementasi ke dalam medium pengencer semen beku sapi FH.

6.1.1 Ekspresi TK Pada Spermatozoa Sapi FH Menggunakan MAb-Tirosin Kinase (ABGENT) Dengan Metoda Imunositokimia

Imunositokimia merupakan metode pewarnaan suatu antigen (protein) di dalam jaringan atau sel dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan antigen yang spesifik oleh suatu antibodi. Hasil reaksi antigen-antibodi dapat diidentifikasi karena antigen-antibodi diikat oleh suatu penanda yang dapat divisualisasikan (Nurhidayat, 2002).

Imunositokimia dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan suatu antigen di dalam jaringan atau sel serta dapat mendeteksi letak antigen tersebut diakumulasikan.

Teknik yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode Avidin-Biotin complex. Tirosin kinase sebagai antigen akan terikat oleh antibodi melalui dua tahap. Antibodi primer (monoklonal antibodi tirosin kinase) berikatan langsung dengan tirosin kinase, selanjutnya antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder (anti Rabbit - IgG biotin *labelled*). Pada setiap tangan antibodi sekunder telah terkonjugasi dengan biotin yang dapat berikatan dengan molekul avidin. Antibodi primer berikatan pada tangan-tangan antibodi

sekunder yang terikat biotin. Kompleks ikatan avidin-biotin-antibodi ini dapat mengidentifikasi lokasi tirosin kinase pada spermatozoa (Nurhidayat, 2002).

Hasil konfirmasi adanya ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sapi FH dapat diketahui dengan teknik imunositokimia yang dapat dilihat pada Gambar 5.1. Visualisasi warna kecoklatan pada bagian kepala spermatozoa menunjukkan bahwa terjadi kompleks ikatan antara tirosin kinase - monoklonal antibodi – TK (MAb-TK, ABGENT) - anti Rabbit - IgG berlabel biotin -SA-HRP dengan kromogen 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB).

Menurut Pablo *et al.* (1995), Leyton and Saling (1989) dan Leyton *et al.* (1992) mengatakan bahwa membran plasma spermatozoa mengandung protein tirosin kinase yang berperan utama dalam proses fusi spermatozoa dengan sel telur. Hal ini membuktikan bahwa pada membran kepala spermatozoa sapi FH adalah benar mengandung tirosin kinase yang selanjutnya dapat diisolasi dan dikarakterisasi.

6.1.2 Penentuan Berat Molekul Tirosin Kinase Dengan Metode SDS-PAGE

Setelah dilakukan konfirmasi dengan imunositokimia bahwa pada membran plasma spermatozoa sapi FH adalah benar mengandung tirosin kinase, selanjutnya dilakukan isolasi protein spermatozoa untuk mendapatkan molekul tirosin kinase.

Penentuan berat molekul tirosin kinase spermatozoa sapi FH dilakukan dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. Metode ini berdasarkan pada pergerakan partikel yang bermuatan melalui suatu gel disebabkan oleh pengaruh medan listrik (Anonymous, 2005). 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 mempunyai berat molekul besar.

Hasil isolasi protein spermatozoa sapi FH menggunakan metode SDS-PAGE (Gambar 5.2) 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. Berat molekul isolat protein spermatozoa sapi FH ditentukan dengan mengplotkan harga *Retardation Factor* (Rf) yang diperoleh pada persamaan regresi linier $Y = - 1,314 X + 2,339$. Kurva hubungan antara Rf (sumbu X) dengan logaritma berat molekul protein standar (sumbu Y) (Gambar L 2.4.3). Sebelas pita protein tersebut selanjutnya dicocokkan dengan pita protein standar yang telah diketahui berat molekulnya. Pita protein lain yang diidentifikasi mempunyai berat molekul 76 kDa adalah galactosyltransferase, protein dengan BM 60 kDa adalah lectin dan protein dengan BM 46 kDa adalah D-mannosidase yang mempunyai fungsi dalam pengikatan spermatozoa dengan sel telur (Morales and Llanos, 1995), sedangkan protein dengan BM 32 kDa adalah p32 yang terdapat pada spermatozoa babi dan berperan pada proses kapasitasi (Dube *et al.*, 2005).

Berat molekul tirosin kinase diantara spesies mamalia sangat bervariasi. Leyton and Saling (1989) telah mengidentifikasi tiga pita protein spermatozoa pada tikus berdasarkan berat molekulnya yaitu 52, 75 dan 95 kDa. Yang mempunyai imunoreaktivitas paling tinggi dan yang dapat berinteraksi spesifik dengan zona pelusida sel telur adalah tirosin kinase dengan berat molekul 95 kDa. Selanjutnya diidentifikasi empat pita protein pada spermatozoa manusia yaitu dengan berat molekul 95 ± 3 kDa, 46 ± 3 kDa, 25 ± 7 kDa dan 12 ± 2 kDa, dan yang mempunyai spesifisitas tertinggi dengan

zona pelusida sel telur adalah protein dengan berat molekul 95 kDa yaitu tirosin kinase (Naz and Rajesh, 2004).

Protein yang telah diidentifikasi melalui metode SDS-PAGE masih menunjukkan beberapa pita protein sehingga perlu dilakukan uji yang lebih spesifik untuk mengetahui protein enzim yang dikehendaki. Salah satu uji spesifik yang dapat digunakan adalah uji *Western blotting* (Dube *et al.*,2005).

6.1.3 Konfirmasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi FH Dengan Metode Dot Blot Menggunakan MAb-Tirosin Kinase (ABGENT)

Untuk membuktikan bahwa protein yang diisolasi dari spermatozoa sapi FH adalah benar tirosin kinase dilakukan pengujian spesifisitas secara kualitatif dengan metode Dot blot. Pada metode ini menggunakan alat Dot blotter (BioRad) untuk mendeteksi reaksi antara tirosin kinase dengan MAb-TK (ABGENT) yang diteteskan pada membran nitroselulose selanjutnya ditambahkan Anti Rabbit IgG Alkaline Phosphatase (AP) *Conjugated* serta substrat Western blue. Hasilnya divisualisasikan dengan adanya noda biru keunguan seperti terlihat pada Gambar 5.3. sampel 1 terlihat gradasi warna yang muncul sebagai hasil reaksi tirosin kinase spermatozoa sapi FH dengan MAb-TK (ABGENT) tampak lebih gelap dibandingkan dengan sampel 2, 3 dan 4. Hal ini terbukti bahwa tirosin kinase spermatozoa dapat dikenali oleh MAb-TK dan konsentrasi antigen (tirosin kinase) dan antibodi (MAb-TK) paling tinggi dibanding sampel 2,3 dan 4.

Pengujian spesifisitas tirosin kinase dengan MAb-TK melalui metode Dot blot menunjukkan homologi nukelotida dan asam amino yang tinggi karena terjadi ikatan kovalen antara tirosin kinase dengan MAb-TK, akan tetapi sifat ikatannya kurang spesifik sehingga masih perlu pembuktian lebih

lanjut menggunakan metode yang lebih spesifik yaitu dengan metode Western blot (Laflamme *et al.*, 2005).

6.1.4 Konfirmasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi FH Dengan Metode Western Blot Menggunakan MAb-Tirosin Kinase (ABGENT)

Untuk membuktikan bahwa protein hasil isolasi spermatozoa sapi FH adalah tirosin kinase berdasarkan berat molekulnya, dilakukan pengujian spesifisitas secara kuantitatif dengan teknik Western blot. Beberapa pita protein yang muncul pada gel hasil SDS-PAGE kemudian ditransfer ke membran nitroselulose. Selanjutnya ditambahkan MAb-TK (ABGENT) yang akan mengenali secara spesifik molekul tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH. Hasil Western blot terlihat bahwa pita protein dengan berat molekul 95 kDa adalah tirosin kinase (Gambar 5.4). Antibodi yang spesifik mengenali *respectif peptide* yang bertindak sebagai imunogen dan tidak bereaksi silang dengan peptida kontrol. Pada Gambar 5.4. tampak bahwa monoklonal antibodi tirosin kinase (MAb-TK) mendeteksi tirosin kinase spermatozoa sapi FH sebagai satu pita protein dengan berat molekul 95 kDa.

Proses visualisasi pita protein menggunakan metode Western blot diperoleh satu pita protein saja sedangkan protein lain tidak nampak, hal ini dikarenakan terjadi pengikatan spesifik antara tirosin kinase dengan MAb-TK dan dapat diketahui berat molekulnya yaitu sebesar 95 kDa berdasarkan berat molekul protein standar (Marker) yang digunakan.

6.1.5 Penentuan Aktivitas Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Sapi FH Melalui Penentuan Kondisi Optimumnya (pH, Suhu dan Waktu Inkubasi Optimum)

6.1.5.1 Pengaruh pH

Variasi pH memberikan nilai aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH yang berbeda-beda. Pada penelitian ini nilai optimum dicapai pada pH 7,0 dengan rerata aktivitas tirosin kinase sebesar 0,0208 unit (Tabel 5.1 dan Gambar 5.5)

pH optimum merupakan pH dimana enzim dan substrat berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan yaitu gugus pemberi dan penerima proton yang berada pada sisi aktif enzim dan substrat sesuai. Pada sisi aktif enzim tirosin kinase terjadi pelepasan proton pada gugus tiol (SH) sehingga atom S bersifat nukleofil yang selanjutnya berikatan dengan gugus fosfat pada substrat. Pada pH 7,0 terjadi pelepasan proton lebih banyak untuk menyeimbangkan banyaknya ion OH^- di lingkungannya, sehingga aktivitas enzim tirosin kinase untuk mengikat substrat menjadi optimum. Pada pH 6,0 diperoleh aktivitas enzim tirosin kinase terendah yaitu sebesar 0,0162 unit. Hal ini disebabkan konsentrasi H^+ yang tinggi sehingga sulit terjadi pelepasan proton pada gugus tiol (SH) yang mengakibatkan tidak dapat terbentuk nukleofil yang akan berikatan dengan gugus fosfat dari ATP.

Pada pH antara 6,0 sampai 7,0 terjadi peningkatan aktivitas enzim tirosin kinase walaupun tidak optimum. Diduga hal ini disebabkan oleh semakin tingginya pH pada lingkungan menyebabkan konsentrasi OH^- semakin tinggi sehingga pelepasan proton pada gugus tiol (SH) meningkat. Selanjutnya semakin banyak enzim tirosin kinase yang terikat dengan gugus fosfat dari ATP

yang bertindak sebagai substrat sehingga aktivitasnya akan semakin meningkat.

Pada pH di atas 7,0 diperoleh aktivitas tirosin kinase yang rendah, hal ini dikarenakan terjadi penolakan pada sisi aktif enzim yang bermuatan negatif (COO-) dengan gugus fosfat, sehingga fosfat sulit berikatan dengan atom S yang bersifat nukleofil pada sisi aktif enzim (Dewi, 2000).

6.1.5.2 Pengaruh temperatur

Pengaruh variasi temperatur terhadap aktivitas enzim tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH dapat dilihat pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.6. Pada penelitian ini dicapai aktivitas tirosin kinase optimum pada temperatur 35°C yaitu sebesar 0,0218 unit.

Reaksi yang dikatalisis oleh enzim juga dipengaruhi oleh temperatur. Apabila temperatur meningkat maka laju reaksi juga akan meningkat, akan tetapi peningkatan ini terbatas karena aktivitas enzim akan menurun karena terjadinya denaturasi enzim. Menurut Lehninger (1990), aktivitas enzim pada umumnya berkisar pada temperatur 30 – 35°C, bila di atas temperatur 40°C enzim mulai mengalami denaturasi.

Dalam batas temperatur tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan meningkat jika temperatur dinaikkan. Semakin tinggi temperatur akan memperbesar energi kinetik molekul enzim dan substrat dan akan mempercepat gerakan kedua molekul tersebut. Sehingga frekuensi tumbukan antara molekul enzim dan substrat semakin besar dan akibatnya produk yang dihasilkan akan maksimum. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 5.6 yang

menunjukkan adanya kenaikan aktivitas enzim tirosin kinase pada temperatur 35°C.

Apabila temperatur dinaikkan, energi kinetik molekul enzim menjadi semakin besar sehingga melampaui energi yang dibutuhkan untuk memecah ikatan yang dipertahankan enzim pada struktur alaminya. Akibatnya terjadi kerusakan struktur enzim dimana sebagian ikatan yang menjaga struktur enzim putus sehingga molekul enzim akan terbuka. Terbukanya molekul enzim mengakibatkan kerusakan sisi aktif sehingga enzim menjadi inaktif yang pada akhirnya menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yaitu terjadinya penurunan aktivitas tirosin kinase pada kenaikan temperatur sebesar 40°C.

6.1.5.3 Pengaruh waktu inkubasi

Pada Tabel 5.3 dan Gambar 5.7. terlihat bahwa aktivitas optimum enzim tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH dicapai pada waktu inkubasi 30 menit yaitu sebesar 0,0219 unit.

Waktu inkubasi diperlukan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat. Bila waktu inkubasi pendek, aktivitas enzim juga akan kecil karena waktu yang digunakan untuk interaksi antara enzim dengan substrat yang kecil mengakibatkan interaksi tersebut tidak berlangsung secara keseluruhan, sehingga produk yang dihasilkan akan sedikit. Hal ini terlihat pada hasil penelitian ini yaitu terjadi kenaikan aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH sebesar 0,0177 unit dan 0,0195 unit pada waktu inkubasi 20 menit dan 25 menit

Apabila waktu inkubasi dinaikkan maka semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat sehingga produk yang dihasilkan akan semakin besar. Seperti yang terlihat pada aktivitas optimum enzim tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH sebesar 0,0219 unit pada waktu inkubasi 30 menit. Sedangkan jika waktu inkubasi dinaikkan lagi, enzim akan jenuh oleh substrat maka produk yang dihasilkan tetap.

Setelah diketahui data tentang pH, temperatur dan waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas tirosin kinase selanjutnya dilakukan uji aktivitas tirosin kinase pada kondisi optimum (pH 7,0, temperatur 35°C dan waktu inkubasi 30 menit) dan diperoleh rerata aktivitas tirosin kinase sebesar 0,02188 unit (Tabel 5.4). Hasil yang didapat menunjukkan bahwa aktivitas optimum tirosin kinase pada kondisi optimum adalah 0,02188 unit artinya 0,02188 μmol molekul ATP yang ditransfer oleh setiap milliliter enzim tirosin kinase menitnya pada pH 7,0, Temperatur 35°C dan waktu inkubasi 30 menit.

6.1.6. Peran Tirosin Kinase Endogen Terhadap Kualitas Spermatozoa

Komposisi membran spermatozoa terdiri dari protein, lipid dan karbohidrat. Tirosin kinase merupakan salah satu kelompok protein enzim yang mempunyai peran antara lain dalam proses pengenalan awal membran spermatozoa dengan zona pelusida sel telur, autofosforilasi (Breitbart, 1999; Visconti and Kopf, 1998) dan untuk stabilisasi membran melalui pembentukan ikatan kovalen protein penyusun membran (Rubinsky, 2000).

Mekanisme molekuler terjadinya fusi membran plasma spermatozoa dengan zona pelusida 3 (ZP3) karena teraktivasi protein kinase (PK A) menyebabkan *channel voltage dependent* Ca^{2+} membuka, sehingga ion Ca^{2+}

dalam akrosom keluar ke sitoplasma. Konsentrasi Ca^{2+} yang tinggi dalam sitoplasma menyebabkan Phospholipase C (PLC) aktif dan akan memecah Phosphatidil Inositol Diphosphat (PIP2) menjadi Diacylglycerol (DAG) dan Inositol Triphosphat (IP3). IP3 termetilasi menjadi Inositol Tetrphosphat (IP4) dan menyebabkan *channel* Ca^{2+} membuka. Inositol triphosphat berperan dalam menginduksi masuknya ion Ca^{2+} ekstraseluler dan membran bersifat fusogenik untuk terjadi fusi membran (Breibart *et al.*, 1999).

Proses fosforilasi tirosin kinase terjadi secara fisiologis dalam sel spermatozoa melalui serangkaian signal transduksi yang diawali dengan aktifnya enzim adenilat siklase membran spermatozoa untuk mengubah adenosin triphosphat (ATP) menjadi cyclic adenosin monophosphat (cAMP). Meningkatnya cAMP akan menginduksi protein kinase yang semula inaktif menjadi aktif (PK A). Selanjutnya PK A akan mengaktifasi tirosin kinase yang ada dalam bagian ekor spermatozoa (*principal piece*) sebagai biokatalisator dalam proses fosforilasi tirosin kinase. Selain itu PK A akan menstimulasi pembukaan *channel voltage gated dependent* Ca^{2+} sehingga menyebabkan masuknya ion Ca^{2+} ke dalam sel. Produk fosforilasi tirosin kinase akan menyebabkan hiperaktivasi dan motilitas spermatozoa dan diikuti dengan terjadinya kapasitasasi (Naz and Rajesh, 2004)

Parameter dari kualitas spermatozoa meliputi spermatozoa yang hidup, motilitas dan integritas membran spermatozoa. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan kondisi membran plasma spermatozoa yang intak sehingga fungsi membran sebagai pengatur transportasi zat-zat serta ion dari luar ke dalam sel atau sebaliknya masih berjalan normal, maka proses signal

transduksi dan metabolisme sel juga normal dan sel spermatozoa dapat bergerak progresif (motil) (Hafez,2000).

6.2. Uji Kualitas Semen Beku Yang Telah Disuplementasi Dengan Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Sapi FH

Pada penelitian tahap II ini untuk membuktikan bahwa tirosin kinase endogen yang telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari spermatozoa sapi FH dapat digunakan sebagai tirosin kinase eksogen yaitu disuplementasikan ke dalam medium pengencer semen beku

6.2.1. Penentuan kadar tirosin kinase spermatozoa sapi FH dengan standar bovine tirosin kinase (SIGNAL CHEM) menggunakan metode ELISA

Penentuan kadar tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi perah dengan kurva standar menggunakan tirosin kinase standar (SIGNAL CHEM) yang dapat diukur dengan teknik ELISA. Prinsip ELISA adalah reaksi antara antigen dengan antibodi spesifik. Tirosin kinase yang bertindak sebagai antigen merupakan substansi yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistem imun dalam hal ini adalah monoklonal antibodi tirosin kinase (MAB-TK, ABGENT) (Aulanni'am, 2005).

Pengukuran dengan teknik ELISA ini dilakukan dengan menginterpolasikan nilai absorbansi (nilai OD) tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa sapi FH dengan persamaan garis $Y = 0,0002x + 0,9767$. Berdasarkan persamaan garis yang terlihat pada Gambar 5.8 diketahui bahwa kadar tirosin kinase hasil elektro elusi adalah 20030 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 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).

Dari hasil pengujian dapat diketahui kadar tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH yang dapat digunakan dalam menentukan dosis suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku.

6.2.2. Persentasi spermatozoa hidup

Persentase spermatozoa yang hidup merupakan indikator kualitas semen yang penting untuk meningkatkan fertilisasi. Untuk mengetahui spermatozoa dalam keadaan hidup atau mati, digunakan pewarnaan eosin negrosin. Prinsip pewarnaan spermatozoa adalah perbedaan afinitas menyerap warna antara sel spermatozoa yang hidup dan yang mati. Pada spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna atau pada bagian kepala spermatozoa akan berwarna jernih, hal ini dikarenakan permeabilitas membran spermatozoa masih normal, sedangkan sel spermatozoa yang mati akan menyerap warna dengan bagian kepala berwarna merah sebab kondisi membran telah rusak sehingga tidak mampu mencegah masuknya zat warna (Partodihardjo, 1992)

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase tertinggi spermatozoa yang hidup setelah suplementasi tirosin kinase dengan berbagai dosis sebelum pembekuan adalah pada P2 yaitu sebesar 77.5 ± 2.6352 dibandingkan dengan P0, P1 dan P3. Begitu pula persentase tertinggi spermatozoa hidup setelah pembekuan adalah pada P2 sebesar 53.0 ± 2.5819 dibandingkan dengan P0, P1 dan P3. Hal ini membuktikan bahwa suplementasi tirosin kinase dengan dosis 200 ug/ml dalam medium pengencer semen beku merupakan dosis optimal yang dapat menginduksi reseptor tirosin kinase pada membran spermatozoa, sehingga

signal transduksi dapat berlangsung didalam sel yang pada akhirnya dapat menyebabkan hiperaktivasi dan kapasitas. Sedangkan suplementasi tirosin kinase pada dosis 300 µg/ml menunjukkan penurunan persentase spermatozoa yang hidup yaitu sebesar 73.5 ± 2.4152 sebelum pembekuan dan 48.5 ± 2.4152 sesudah pembekuan (Tabel 5.5. dan Gambar 5.9.)

Tirosin kinase berpengaruh terhadap persentase spermatozoa yang hidup sebelum pembekuan maupun setelah pembekuan. Suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku yang paling baik sebelum dan sesudah pembekuan adalah dengan dosis 200 µg/ml (P2). Tirosin kinase merupakan kelompok protein enzim yang diperlukan untuk mendukung stabilisasi membran melalui ikatan penyusun protein membran. Pada peningkatan dosis 300 µg/ml (P3) terjadi penurunan persentase spermatozoa yang hidup. Dosis TK yang ditambahkan dalam medium pengencer telah melebihi dosis optimal sehingga reseptor tirosin kinase telah jenuh oleh tirosin kinase eksogen akibatnya akan terjadi penurunan aktivitas tirosin kinase.

Menurut Anzar (2002) terdapat beberapa faktor yang menyebabkan kematian sel spermatozoa karena permeabilitas membran yang meningkat, yaitu :

- 1). Kerja ion Ca^{2+} yang menginisiasi melalui aktivasi enzim endonuclease (yang akan menghancurkan DNA dalam inti spermatozoa) dan transglutaminase yang berikatan kovalen dengan protein membran melalui pembentukan ikatan isopeptida yang menyebabkan kematian sel, 2). Adanya perubahan susunan membran terutama susunan fosfolipid penyusun membran karena terjadi translokasi fosfatidil serin dari lapisan dalam membran menuju ke lapisan luar membran, hal ini terjadi karena paparan suhu beku, juga akan menyebabkan kematian sel spermatozoa. Selama pembekuan terjadi depolarisasi atom atau

molekul penyusun membran yang mengakibatkan destabilisasi membran sehingga dapat menurunkan fungsi fisiologis membran (Fuller and Shields, 1998). Dikatakan pula oleh Rubinsky (2000) bahwa pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen asam amino penyusun protein membran sehingga akan menyebabkan destabilisasi membran yang berpengaruh terhadap proses metabolisme sel spermatozoa.

Tirosin kinase yang disuplementasikan dalam medium pengencer semen sapi FH diduga berfungsi menstabilkan membran melalui ikatan hidrogen antara asam amino penyusun protein membran. Adanya interaksi ini akan mencegah denaturasi protein membran yang menurunkan fungsi protein. Apabila terjadi akumulasi denaturasi protein membran akan menyebabkan kematian sel. Fungsi fisiologis protein membran yaitu sebagai enzim, reseptor, komunikasi sel maupun sebagai *channel* membran bila terjadi denaturasi akan mengakibatkan kehilangan fungsi sehingga fungsi fisiologis tidak bisa berjalan normal (Chen, *et al.*, 2003).

6.2.3. Persentase motilitas spermatozoa

Salah satu indikator dalam menentukan kualitas spermatozoa adalah motilitas. Pengertian motilitas adalah kemampuan gerak maju (progresif) dari spermatozoa. Daya gerak progresif ini sangat dibutuhkan oleh spermatozoa pada saat berada dalam saluran reproduksi betina untuk mencapai tempat fertilisasi, terutama pada saat spermatozoa menembus lapisan zona pelusida sel telur. Pada kondisi *in vitro*, kemampuan spermatozoa bergerak progresif dipengaruhi oleh faktor internal dan eksternal. Faktor internal meliputi integritas membran spermatozoa, morfologi normal dan adanya flagela pada spermatozoa.

Sedangkan faktor eksternal meliputi kondisi medium seperti pH, temperatur dan kandungan ion (Hafez, 1993).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa sapi perah setelah disuplementasi dengan tirosin kinase dengan berbagai dosis sebelum pembekuan terlihat rerata persentase motilitas tertinggi pada kelompok P2 yaitu sebesar 72.5 ± 2.6352 , sedangkan sesudah pembekuan, rerata persentase motilitas tertinggi juga pada kelompok P2 yaitu sebesar 47.0 ± 2.5819 dibandingkan dengan kelompok P0, P1 dan P3 (Tabel 5.5 dan Gambar 5.10). Hal ini membuktikan bahwa suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku dengan dosis $200 \mu\text{g/ml}$ merupakan dosis optimal bekerjanya tirosin kinase dalam meningkatkan autofosforilasi spermatozoa yang berkaitan dengan peningkatan motilitas. Menurut Sakkas *et al.* (2002) terjadinya fosforilasi tirosin kinase dalam *principal piece* spermatozoa sangat berkaitan dengan hiperaktivasi motilitas dari spermatozoa. Peningkatan fosforilasi tirosin kinase akan meningkatkan hiperaktivasi motilitas spermatozoa yang sangat diperlukan dalam proses penetrasi ke dalam zona pelusida sel telur. Hal ini sesuai dengan penelitian Naz dan Rajesh (2004) yang mengatakan bahwa fosforilasi protein tirosin pada spermatozoa sangat penting untuk terjadinya hiperaktivasi motilitas dan reaksi zona pelusida.

Suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku akan memicu peningkatan reseptor tirosin kinase pada membran plasma spermatozoa, selanjutnya akan menggerakkan sinyal transduksi melalui peningkatan adenilat siklase. Adenilat siklase akan mengaktifkan cAMP dan akan menimbulkan aktivitas protein kinase A (PK A). PK A yang meningkat akan menggerakkan tirosin kinase dan terjadi fosforilasi tirosin. Pada akhirnya fosforilasi

tirosin yang meningkat akan menyebabkan kapasitas dan hiperaktivasi motilitas spermatozoa (Visconti and Kopf, 1998). Menurut Bull *et al.* (2003), tirosin kinase yang ditemukan pada spermatozoa manusia dengan berat molekul 95 kDa berperan dalam fosforilasi tirosin yang berkorelasi dengan terjadinya kapasitas dan hiperaktivasi spermatozoa. Terjadinya kapasitas spermatozoa akan memungkinkan terjadinya pengikatan membran sperma dengan zona pelusida sel telur selanjutnya akan menstimulasi sperma untuk mengalami reaksi akrosom (Breitbart and Naor, 1999).

Analisis statistik dengan uji Univariat terlihat bahwa persentase motilitas spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata ($P < 0.01$) (Tabel 5.12). Proses pembekuan dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa. Hal ini sesuai dengan pendapat Pommer *et al.* (2003) bahwa spermatozoa yang dibekukan akan mengalami perubahan karakteristik dari membran plasma spermatozoa antara lain terjadi reorganisasi dari membran, peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler, serta kemampuan spermatozoa untuk membuahi akan menurun. Dikatakan pula bahwa pada pembekuan spermatozoa, proses fosforilasi tirosin akan terhambat akibatnya hiperaktivasi dan motilitas spermatozoa akan menurun.

Peningkatan dosis tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku ternyata tidak menyebabkan peningkatan motilitas spermatozoa. Hal ini diduga karena reseptor tirosin kinase pada membran spermatozoa telah jenuh dengan tirosin kinase eksogen sehingga jalur signal transduksi untuk memicu terjadinya peningkatan fosforilasi tyrosin tidak terjadi dan fosforilasi tirosin cenderung tetap. Hal ini membuktikan bahwa dengan peningkatan dosis tirosin kinase tidak menyebabkan peningkatan persentase motilitas spermatozoa.

Sesuai dengan pendapat Lehninger (1990) bahwa dengan peningkatan dosis tirosin kinase akan memicu jalur signal transduksi yang berpengaruh pada tirosin kinase endogen untuk mengikat substrat (ATP) dalam sel spermatozoa yang mengakibatkan produk fosforilasi tirosin akan meningkat, tetapi bila dosis ditingkatkan lagi tirosin kinase endogen telah jenuh mengikat substrat sehingga produk fosforilasi tirosin yang dihasilkan tetap. Produk fosforilasi tirosin akan menyebabkan hiperaktivasi dan motilitas spermatozoa.

6.2.4. Integritas membran

Membran plasma adalah selaput dinding sel yang berfungsi mengatur keluar masuknya beberapa zat yang diperlukan dalam proses metabolisme dan aktivitas hidup sel. Selain itu membran plasma yang dibentuk oleh protein, karbohidrat maupun lemak, dapat bertindak sebagai reseptor untuk beberapa zat tertentu. Sinyal kimia ekstraseluler dapat diterima oleh reseptor pada membran plasma dan dapat diteruskan ke dalam sel melalui beberapa cara, baik melalui difusi pasif atau aktif dari ion-ion *ligand* kimiawi ataupun melalui perubahan konformasi oleh sistem enzim dalam membran plasma (Yatim, 1992). Jika terjadi kerusakan pada membran plasma spermatozoa maka proses metabolisme akan terganggu yang akan mengakibatkan penurunan motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semen beku sapi FH yang telah disuplementasi tirosin kinase dengan dosis 100 µg/ml, 200 µg/ml dan 300 µg/ml sebelum pembekuan menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0.01$) dengan kontrol (Tabel 5.6 dan Gambar 5.12). Peningkatan persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sapi FH setelah disuplementasi dengan tirosin kinase

dengan dosis 200 µg/ml (P2) ternyata lebih tinggi dibandingkan P0 (kontrol), P1 dan P3. Rerata persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sapi FH selama proses pembekuan dengan berbagai dosis perlakuan pada kelompok P2 sebesar $59,67 \pm 1,443$ lebih tinggi dibandingkan P0, P1 dan P3 masing-masing sebesar $42,34 \pm 1,295$, $42,35 \pm 1,369$ dan $56,33 \pm 0,853$ dan pada uji Univariat terdapat perbedaan nyata antara P2 dengan P0, P1 dan P3 ($p < 0,05$). Hal ini sesuai dengan standar membran plasma utuh pada sel spermatozoa yang memenuhi syarat untuk digunakan dalam fertilisasi *in vitro* adalah sebesar 50% (WHO, 2005).

Menurut Hafez (2000), membran plasma spermatozoa akan menjadi lebih stabil apabila masih mengandung plasma seminalis karena plasma seminalis diketahui banyak mengandung bahan nutrisi bagi spermatozoa serta mengandung bahan elektrolit dan non elektrolit seperti ion natrium, kalium, protein dan asam askorbat yang penting untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan. Kandungan ion natrium dan kalium dalam plasma seminalis sangat penting untuk menjaga integritas membran plasma, protein berperan dalam melindungi membran plasma agar tetap lentur dan merupakan pelindung spermatozoa dari kerusakan yang bersifat irreversibel (Nainar *et al.*, 1991). Asam askorbat merupakan zat antioksidan yang penting untuk melindungi spermatozoa dari senyawa oksigen reaktif (Aurich *et al.*, 1997).

Semen beku masih mengandung komposisi yang lengkap yaitu spermatozoa dan plasma seminalis serta adanya penambahan bahan pengencer yang terdiri dari susu skim, kuning telur dan gliserol sebagai krioprotektan intraseluler. Susu skim dan kuning telur mengandung lemak (lecithin) yang berperan untuk mengurangi pergerakan, melindungi spermatozoa terhadap suhu

6.2.5. Ekspresi Tirosin Kinase Pada Spermatozoa Sapi FH

Jumlah ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sapi FH sebelum dan sesudah pembekuan dapat diketahui dengan teknik imunositokimia yang dapat dilihat pada Gambar 5.13 dan 5.14. Visualisasi warna kecoklatan pada bagian kepala spermatozoa menunjukkan bahwa terjadi kompleks ikatan antara tirosin kinase - monoklonal antibodi – TK (MAb-TK, ABGENT) - anti Rat - IgG berlabel biotin -SA-HRP dengan kromogen 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah ekspresi tirosin kinase secara signifikan pada spermatozoa sapi FH sebelum pembekuan ($p < 0,05$) dan rata-rata jumlah ekspresi tirosin kinase tertinggi pada P3 yaitu sebesar $16,80 \pm 0,447$, begitu pula ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa sapi FH setelah pembekuan mengalami peningkatan secara signifikan ($p < 0,05$) dan rata-rata jumlah ekspresi tirosin kinase spermatozoa tertinggi pada P3 yakni sebesar $22,60 \pm 3,847$.

Menurut Breibart (1997), membran plasma spermatozoa mempunyai dua reseptor yaitu reseptor protein G1 yang terikat pada fosfolipase $\beta 1$ (PLC $\beta 1$) dan reseptor tirosin kinase (rTK) disebut juga reseptor *epidermal growth factor* (rEGF) yang terikat pada fosfolipase gamma (PLCgamma). Suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen akan menyebabkan terjadinya ikatan spesifik antara tirosin kinase eksogen dengan rTK yang terdapat pada membran spermatozoa. Semakin besar dosis suplementasi tirosin kinase sebelum maupun sesudah pembekuan menunjukkan semakin banyak jumlah ekspresi tirosin kinase pada spermatozoa. Hal ini diduga rTK membran spermatozoa akan mengikat secara spesifik tirosin kinase eksogen, jika masih ada tirosin kinase eksogen yang belum terikat dengan rTK maka akan terjadi pengikatan non spesifik dengan

terjadinya kapasitas adalah peningkatan fosforilasi tirosin yang dapat menginduksi hiperaktivasi spermatozoa dan reaksi akrosom (Breitbart and Naor, 1999).

Proses fertilisasi diawali dengan penetrasi sel spermatozoa pada massa kumulus oophorus yang mengelilingi sel telur. Interaksi ini melibatkan reseptor yang ada pada spermatozoa dan sel telur. Sel telur mempunyai lapisan ekstraseluler yang disebut zona pelusida yang mengandung glikoprotein (Hafez, 2000), yang terdiri dari zona pelusida 1, 2 dan 3 (ZP1, ZP2 dan ZP3), ZP2 dan ZP3 yang secara umum bertanggungjawab untuk interaksi awal dan interaksi sekunder pada membran sel spermatozoa (Brewis and Wong, 1999). ZP3 merupakan reseptor pertama yang berperan untuk mengikat spermatozoa, sedangkan ZP2 adalah reseptor kedua untuk menjaga terikatnya spermatozoa selama proses fertilisasi berlangsung (Hafez, 2000).

Aplikasi laboratoris sampel semen beku sapi FH yang disuplementasi dengan tirosin kinase dengan dosis 100 µg/ml (P1), 200 µg/ml (P2) dan 300 µg/ml (P3) yang digunakan dalam proses fertilisasi *in vitro* (FIV) setelah diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 22 jam diperoleh hasil rerata persentase jumlah sigot tertinggi pada hasil fertilisasi *in vitro* menggunakan semen beku pada P2 yaitu sebesar 77,27%. Inkubasi selama 48 jam diperoleh hasil rerata persentase jumlah embrio dua sel tertinggi adalah hasil fertilisasi *in vitro* menggunakan semen beku P2 sebesar 63,63% dan pada inkubasi 72 jam diperoleh hasil rerata persentase jumlah embrio empat sel tertinggi adalah hasil fertilisasi *in vitro* menggunakan semen beku P2 sebesar 54,54% dibandingkan P0, P1 dan P3 (Tabel 5.10).

Berdasarkan pengujian statistik menggunakan Analisis Varian Satu Arah, persentase jumlah sigot, embrio dua sel dan empat sel antara kelompok kontrol

dengan perlakuan menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$), selanjutnya dilakukan uji Tukey terlihat hasil tertinggi pada P2 (200 $\mu\text{g/ml}$) yang berbeda nyata dengan P0, P1 dan P3 ($p < 0,05$).

Penurunan jumlah embrio yang berkembang mencapai tahap empat sel disebabkan karena perkembangan embrio sapi dua sel menjadi empat sel ditemukan adanya fenomena *cell block* atau terjadinya hambatan perkembangan sel (Miyoshi, 1994). Embrio sapi tahap dua sel untuk berkembang menjadi empat sel atau untuk melewati *cell block* membutuhkan kadar glukosa dan fruktosa rendah serta kadar fosfat tinggi, sedangkan *chemical defined medium* yang selama ini digunakan seperti *tissue culture medium* (TCM) mengandung komposisi zat kimia tertentu seperti glukosa yang mempunyai efek *crabtree* yaitu efek yang dapat menekan proses fosforilasi oksidasi dan respirasi di mitokondria. Selain mempunyai efek *crabtree*, juga berperan dalam meningkatkan glikolisis dimana produk samping dari proses ini dapat mengganggu respon tumbuh dari embrio sapi pada tahap awal perkembangan (Kim *et al.*, 1993). Oleh karena itu upaya yang perlu dilakukan untuk mengatasi *cell block* adalah dilakukan manipulasi komposisi zat-zat yang ada dalam medium kultur (Widjiati, dkk., 1997)

Faktor lain yang menyebabkan rendahnya perkembangan embrio mencapai tahap empat sel adalah tidak dilakukan penggantian medium setiap 24 jam, sehingga nutrisi yang dibutuhkan oleh embrio untuk tumbuh dan berkembang tidak dapat dipenuhi secara optimum (Widjiati, dkk., 1998)

Hasil fertilisasi *in vitro*, diperoleh persentase jumlah sigot, embrio dua sel dan empat sel tertinggi pada P2 dibandingkan kontrol dan P1 maupun P3. Hal ini disebabkan pada proses fertilisasi *in vitro*, sifat-sifat fisik dan kimiawi dari medium yang digunakan untuk fertilisasi benar-benar telah dikondisikan. Sifat-sifat kimiawi

dari bahan kimia meliputi sifat kelarutan, kemurnian, kestabilan dan kandungan ion, sedang sifat fisik yang perlu diperhatikan adalah pH, osmolaritas, suhu, kekentalan, tegangan permukaan dan buffer (Malole, 1990).

6.3.2 Aplikasi lapangan semen beku sapi FH yang disuplementasi TK dengan cara inseminasi buatan

Beberapa parameter yang digunakan untuk mengukur efisiensi reproduksi pada sapi perah antara lain adalah umur pertama kali beranak (*first calving*) yang kurang dari 24 bulan, hari sejak mulai beranak sampai dengan terjadinya konsepsi (*days open*) kurang dari 100 hari, persentase kebuntingan pada inseminasi pertama (*first service conception rate*) berkisar 70%, jarak antar beranak (*calving interval*) kurang dari 380 hari, jumlah straw yang diperlukan untuk inseminasi sampai menghasilkan kebuntingan (*service per conception*) kurang dari dua, jumlah sapi perah yang bunting dalam satu kelompok ternak (*conception rate* sekitar 95% dan jumlah pedet yang lahir dalam satu kelompok ternak (*calving rate*) sebesar 90% (Hafez, 2000).

Inseminasi buatan yang dilakukan pada sejumlah sapi perah betina yang digunakan sebagai hewan coba menggunakan semen beku yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dengan berbagai dosis yaitu P0 (tanpa TK), P1 (suplementasi TK 100 µg/ml), P2 (suplementasi TK 200 µg/ml) dan P3 (suplementasi TK 300 µg/ml). Angka kebuntingan yang diperoleh dalam penelitian ini, untuk P2 dan P3 sebesar 100%, sedangkan P0 dan P1 sebesar 83,3%. Selanjutnya dilakukan pengujian statistik dengan Khi Kuadrat, hasil persentase kebuntingan pada sapi perah yang di inseminasi dengan semen beku yang telah disuplementasi dengan tirosin kinase dengan berbagai dosis (P1, P2 dan P3) serta

semen beku tanpa suplementasi tirosin kinase (P0) tidak terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p > 0.05$).

Secara deskriptif, kelompok sapi betina yang di inseminasi dengan semen beku yang disuplementasi TK 200 $\mu\text{g/ml}$ (P2) dan 300 $\mu\text{g/ml}$ (P3) semuanya menjadi bunting (100%), tetapi pada kelompok sapi betina yang di inseminasi dengan semen beku kontrol (tanpa TK) dan semen beku yang disuplementasi TK 100 $\mu\text{g/ml}$ (P1), persentase kebuntingan sebesar 83,33%. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa semen beku yang disuplementasi dengan TK dengan dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ dan 300 $\mu\text{g/ml}$ dapat meningkatkan angka kebuntingan pada sapi perah sampel.

Keberhasilan program inseminasi buatan selalu dikaitkan dengan penggunaan teknologi reproduksi yang lain seperti teknologi gertak birahi. Menurut Inskeep *et al.* (1998) penggunaan *progesteron Release Intravaginal Device* (PRID) dikombinasi dengan estradiol benzoate, PRID dikombinasi dengan prostaglandin F2 alfa (PGF2alfa) dan pemberian PGF2alfa sendiri dengan pola satu kali penyuntikan menghasilkan angka kebuntingan masing-masing sebesar 60%, 50% dan 51%. Selanjutnya berdasarkan hasil penelitian Srianto (2004) bahwa gertak birahi pada sapi perah betina menggunakan PGF2alfa secara submukosa vulva dengan dosis 5 dan 7 mg menghasilkan angka kebuntingan masing-masing sebesar 60% dan 70%.

Hasil penelitian ini memberikan angka kebuntingan yang lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Oleh karena beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan beberapa parameter efisiensi reproduksi yang lebih rendah. Faktor-faktor yang sangat mempengaruhi keberhasilan inseminasi buatan antara lain faktor teknis seperti deteksi birahi, dosis inseminasi, deposisi semen dalam alat kelamin betina dan ketrampilan inseminator dan faktor non teknis misalnya kelainan anatomi alat reproduksi betina sapi perah (Salisbury and

VanDemark, 1985). Selain itu komposisi substansi kimiawi dalam saluran reproduksi betina selalu berubah pada fase folikuler karena pengaruh hormonal. Konsentrasi estrogen yang tinggi akan berpengaruh pada myometrium untuk terjadinya kontraksi serta berpengaruh pada massa uterus untuk menghasilkan substansi kimiawi yang akan mempengaruhi viabilitas dan motilitas spermatozoa yang akan menuju ke tempat fertilisasi (Partodihardjo, 1992).

Menurut Laflammae *et al.* (2005), sel-sel endometrial uterus pada golongan mamalia pada fase folikuler akan mensekresikan sitokin dalam hal ini Interleukin 6 (IL-6) yang akan mendorong terjadinya kapasitasi pada spermatozoa melalui reseptor tirosin kinase dan memicu signal transduksi untuk menghasilkan fosforilasi tirosin kinase.

Perubahan yang terjadi selama kapasitasi adalah terjadinya pembuangan kolesterol dari membran yang menyebabkan terbentuknya ruang-ruang bebas kolesterol, hal ini akan mengakibatkan terjadinya gerakan lateral dari protein-protein integral, selanjutnya permeabilitas membran akan meningkat dan ion-ion kalsium ekstraseluler akan masuk ke dalam sel yang akan memicu terjadinya reaksi akrosom. Reaksi akrosom merupakan peristiwa eksositik yang ditandai dengan terjadinya fusi, vesikulasi dan hilangnya membran akrosom luar dan membran plasma yang memungkinkan pelepasan enzim-enzim dalam akrosom (Wasserman, 1990). Mekanisme molekuler yang terjadi pada reaksi akrosom karena teraktivasinya PK A menyebabkan *channel voltage dependent* Ca^{2+} membuka, sehingga Ca^{2+} dalam akrosom keluar ke sitoplasma. Konsentrasi Ca^{2+} yang tinggi dalam sitoplasma menyebabkan PLC aktif dan akan memecah Phosphatidil Inositol Diphosphat (PIP) menjadi Diacylglycerol (DAG) dan Inositol Triphosphat (IP3). IP3 termetilasi menjadi Inositol Tetrphosphat (IP4) dan menyebabkan channel Ca^{2+} membuka. Ca^{2+}

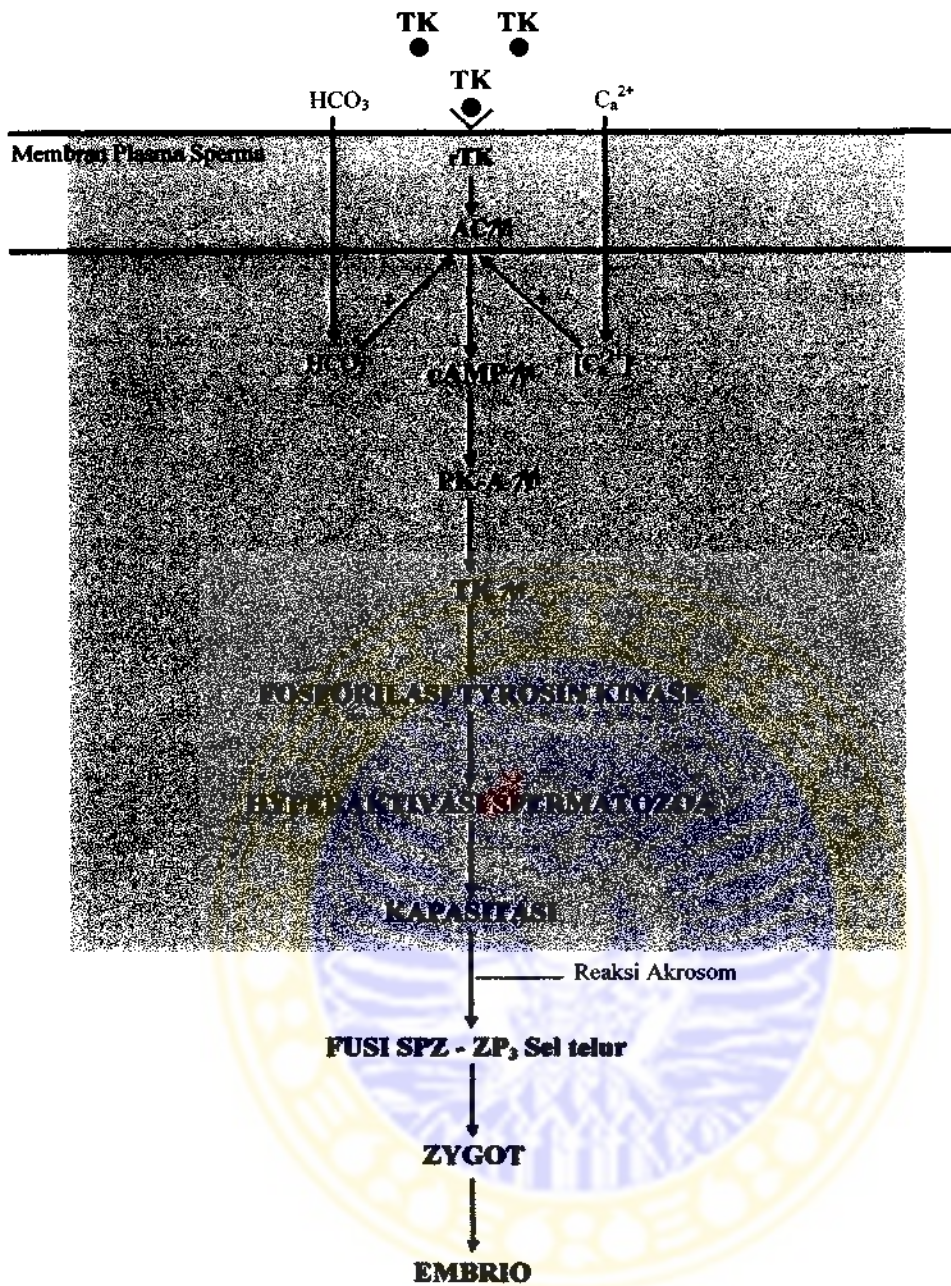
ekstraseluler masuk dan membran bersifat fusogenik untuk terjadi fusi membran (Breitbart *et al.* 1999).

6.4 Temuan Baru

Berdasarkan analisis hasil dan pembahasan penelitian, yang merupakan hal baru dalam penelitian ini adalah mengungkap mekanisme tirosin kinase eksogen yaitu tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi FH yang di suplementasikan ke dalam medium pengencer semen beku yang akan memicu reseptor tirosin kinase (rTK) yang berada di membran spermatozoa. Terjadinya ikatan spesifik antara tirosin kinase eksogen dengan rTK akan menyebabkan terjadinya signal transduksi yang diawali dengan aktifnya enzim adenilat siklase pada membran, hal ini akan mengakibatkan peningkatan cyclic adenosin monophosphate (cAMP). cAMP sebagai *second messenger* berfungsi mengatur proses fosforilasi tirosin kinase melalui aktivasi protein kinase A (PKA), aktifnya PK A akan merangsang aktivitas tirosin kinase endogen untuk proses fosforilasi tirosin kinase. Selain itu ion kalsium maupun bikarbonat ekstraseluler secara sinergis memicu adenilat siklase sehingga hasil akhir dari fosforilasi tirosin kinase adalah terjadi hiperaktivasi spermatozoa untuk mengalami kapasitasasi. Proses kapasitasasi spermatozoa akan diikuti dengan peristiwa eksositosis yaitu membukanya membran plasma spermatozoa dan membran akrosom luar diikuti dengan pengeluaran enzim-enzim akrosom seperti enzim hyaluronidase selanjutnya terjadi fusi dan penetrasi spermatozoa melalui zona pelusida menuju membran vitelin. Peristiwa ini disebut reaksi akrosom. Setelah terjadi reaksi akrosom, spermatozoa akan menembus membran vitelin menuju sitoplasma, didalam sitoplasma pronukleus jantan akan bersingami dengan

pronukleus betina membentuk satu sel yaitu sigot dan terlepasnya badan kutub dua. Gambaran selengkapnya dapat diamati pada Gambar 6.1





Gambar 6.1. Mekanisme Tirosin kinase Eksogen dalam Meningkatkan Fosforilasi Tirosin Kinase sampai Terjadi Fusi Sperma-ZP₃ Sel telur

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari hasil analisis penelitian dan pembahasan dapat dibuat kesimpulan seperti dibawah ini:

1. Karakter tirosin kinase spermatozoa sapi Friesian Holstein (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)
2. Dosis optimum suplementasi tirosin kinase ke dalam medium pengencer semen beku sapi FH yang dapat meningkatkan persentase spermatozoa yang hidup, motilitas spermatozoa dan integritas membran spermatozoa sebelum dan sesudah pembekuan adalah sebesar 200 µg/ml.
3. Angka fertilisasi tertinggi hasil fertilisasi *in vitro* pada pengamatan 24 jam (sigot), 48 jam (embrio dua sel) dan 72 jam (embrio empat sel) menggunakan semen beku sapi FH yang disuplementasi tirosin kinase ditemukan dosis optimum sebesar 200 µg/ml.
4. Angka Kebuntingan tertinggi pada sapi perah betina yang diinseminasi dengan semen beku sapi FH yang di suplementasi tirosin kinase dengan dosis optimum sebesar 200 µg /ml

7.2. Saran

1. Semen beku sapi FH dengan suplementasi tirosin kinase dapat digunakan untuk meningkatkan fertilitas, serta dapat meningkatkan angka kebuntingan pada sapi perah
2. 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 menggunakan dosis 200 µg/ml
3. Diperlukan analisis genomik dan proteomik tirosin kinase spermatozoa pada berbagai spesies sehingga temuan ini dapat diaplikasikan lebih luas



DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous, 1995. Balai Embrio Ternak Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta
- Anonimous, 1998. *Petunjuk Penampungan Semen, Prosesing, Distribusi dan Evaluasi Mani Beku di BIB Singosari, Malang 22-24. 27*
- Anonimous, 1999. *Acrosome Reaction*. [www.acrosome reaction animation.htm](http://www.acrosome-reaction-animation.htm).
- Anonimous, 2004. *Protein Kinase*. Wikipedia, The Free Encyclopedia. [File://A:\ptk.htm](http://A:\ptk.htm).
- Anonimous, 2005. *Semen, Processing, Storage, Thawing and Handling*. [File://F:\chapter 16 htm.download 9/27/2005](http://F:\chapter 16 htm.download 9/27/2005)
- Anzar, M., He, L., M.M. Buhr, T.G. Kroetsch and K.P. Pauls. 2002. *Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility*. J. Biol. Reprod. 66, 354-360
- Aulanni'am, 2004^a. *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul*. Cetakan pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Hal 16 – 22
- Aulanni'am, 2004^b. *Dasar-dasar Biomolekul*. Cetakan Pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang
- Aulanni'am, 2005. *Protein dan Analisisnya*. Cetakan pertama. Penerbit Citra Mentari Group. Malang. Hal. 19-27
- Aulanni'am, S.B. Sumitro, M.S. Djati, Sutiyoso dan G. Ciptadi, 2001. *Karakterisasi Molekul Bovine Zona Pelusida*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing IX/1. FMIPA-Unibraw Malang
- Aitken, R.J., M. Paterson, H. Fisher, D.W. Buckingham and M. Van Duin. 1995. *Redox Regulation of Tyrosine Phosphorylation in Human Spermatozoa and Its Role in The Control of Human Sperm Function*. J. Cell. Science. 108. 2017-2024
- Aitken, R.J., D. Harkiss, W. Knox, M. Paterson and D.S. Irvine, 1998. *A Novel Signal transduction Cascade in Capacitating Human Spermatozoa Characterised by a Redox-regulated, cAMP-mediated Induction of Tyrosin Phosphorylation*. MRC Reprod. Biol. Unit 37 Chalmers street, Edinburgh Scotland, p. 645 – 654
- Arlotto, 1999. *In Vitro Reproduction of Embryos for Improved Production*. Departement of Theriogenology. Faculty of Veterinary Science. University of Pretor. P: 1-6
- Alvarez, J.G. and B.T. Storey. 1995. *Differential Incorporation of Fatty Acids into and Peroxidative Loss Of Fatty Acids From Phospholipids of Human Spermatozoa*. Mol. Reprod. Dev. 42: 334 - 345

- Direktorat Jendral Peternakan, 2005. *Panduan Lomba dan Kontes Ternak Nasional dalam rangka Pekan Peternakan Unggulan Nasional 2005*. Direktorat Jendral Peternakan Departemen Pertanian. Hal.1
- Dube, C., P. Leclerc, T. Baba, C.R. Moreno and J.L. Bailey. 2005. *The Proacrosin Binding Protein, Sp32, Is Tyrosine Phosphorylated During Capacitation of Pig Sperm*. J. And. Vol.26 no.4
- Einarsson, S., 1992. Concluding Remarks. In : *Influence of Thawing Method Motility, Plasma Membrane Integrity and Morphology of Frozen Thawed Stallion Spermatozoa*. Theriogenology, 48 : 531 – 536
- Elbein, A.D., Y.T.Pan, I. Pastuszak and D. Carroll. 2003. *New Insight on Trehalose: a Multifunctional Molecule*. Glycobiology:13(4): 17R-27R
- Ekayanti, M.Kaiin, S. Said dan B. Tappa, 1995. *Maturasi dan Fertilisasi In Vitro Oosit Sapi Perah : Pengaruh Media dan Waktu antara Pematangan dengan Aspirasi Folikel*, Seminar Nasional Sains dan Teknologi Peternakan, Jakarta.
- Esteves, S.C., D.M. Spaine, A.P. Cedenho, and M. Srough., 2005. *Effects of The Technique of Cryopreservation and Dilution/Centrifugation After Thawing on The Motility and Vitality of Spermatozoa of Oligoasthenozoospermic Men*. International Braz.J.Urol. 29 : 133-40
- Freshney, R.I. 1988. *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique*, 2nd .ed. Alan R. Liss Inc. New York.
- Fuller, G.M. and D. Shields. 1998. *Molecular Basis of Medical Cell Biology*. Prentice Hall International, Inc. USA.
- Garcia-Vazquez, F and C. Matas. 2004. *Changes in Membrane Sulfhydryl Status of Boar Spermatozoa by Freezing*.
- Gilbert, S.F. 1997. *Developmental Biology*. Fifth Edition. Sinaur Associat Inc. Publisher. Sunderland, Massachusetts. p. 148
- Gordon, I., 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. The UK. University Press. Cambridge
- Hafez, E.S.E., 1993. *Reproduction in Farm Animals*. 5th edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hafez, E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th.Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Haila, A. and D.R. Tulsiani, 2000. *Mammalian Sperm Acrosome : Formation, Contents and Function*. Arch Biochem Biophys, Jul 15 : 392 (2) : 173 – 182.
- Hardjopranto, S., 1995. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Cetakan I. Airlangga University Press.

- Herrero, MB., E. de Lamirande and C.Gagnon, 1999. *Nitrit Oxide Regulates Human Sperm Capacitation and Protein Tyrosine*. Biol. of Reprod.61:575-581
- Hinsch E, S. Oehringer, W.B. Schill and K.D.Hinsch, 1999. *Specificity of Human and Murin anti-ZP3 Synthetic peptide Antisera and Use of Antibodies for Localization and Identification of ZP3 or ZPC domain if Functional significance*. Hum Reprod. Feb; 14(2):419-428
- Hunter, RHF., 1995. *Fisiologi dan Teknologi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB Bandung.
- Inskeep, E.K., R.A. Dailey and P.E. Lewis. 1998. *Association of Fertility with Temporal Changes in Ovarian Function of Domestic Ruminants*.<http://www.ccochrane/revabstr/ab002864.htm>.
- Jones, R.T. Mann and R.J. Sherins, 1989. *Peroxidative Breakdown of Phospholipids by Human Spermatozoa, Spermocidal Properties of Fatty Acids Peroxides and Protective of Seminal Plasma*. Fertil Steril. 31:531-537
- Kasai, M., 1996. *Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos*. Animal Reproduction Sciences.
- Kerr L.E., M.R. Paterson and R.J. Aitken, 1998. *Molecular Basis of Sperm Egg Interaction and The Prospect for Contraception*. J. Reprod. Immun. 40:103-118
- Kim, J.H., H. Funahashi, K. Niwa and K. Okuda. 1993. *Glucosa Requirement of Different Developmental Stages of In Vitro Maturated, In Vitro Fertilized Bovine Oocytes in Medium*. J. Theriogenology. 39: 875-886
- Laflammae, J., A. Akaum and P. Lecter, 2005. *Induction of Human Sperm Capacitation and Protein Tyrosine Phosphorylation by Endometrial Cells and IL6*. Molecular Human Reprod. Vol 11 (2): 141-150
- Lehninger, A.L., 1990. *Dasar-dasar Biokimia* jilid I, Alih Bahasa : Maggy Thenawijaya, Erlangga, Jakarta. Hal. 9,235,237,241,255
- Leyton L. and P.M. Saling, 1989. *Evidence that Aggregation of Mouse Sperm Receptors by ZP3 Triggers The Acrosome Reaction*. J.Cell.Biol. 108.2163 – 2168.
- Leyton, L., P. Leguen, D. Bunch and P.M. Saling., 1992. *Regulation of Mouse Gamete Interaction by a Sperm Tyrosin Kinase*. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 89. 11692 – 11695
- Madyawati, SP., H.A.Hermadi dan T.Sardjito, 2004. *Produksi Protein Tyrosin Kinase hasil Isolasi Spermatozoa Sapi Potong; Alternatif Meningkatkan Produksi Semen Beku*. Penelitian proyek Due-Like Batch III. Fakultas Kedokteran Hewan . Universitas Airlangga, Surabaya.

- Malole, M.B.M., 1990. *Kultur Sel dan Jaringan Hewan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Teknologi Bogor.*
- Martin, D.W., R.A. Mayes and V.W. Rodwell, 1983. *Biokimia, Rev. of Biochemist*, Edisi ke-19, Alih Bahasa : A. Dharma dan S. Kumiawan, CV EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta, hal. 62-67. 87-90, 96
- Miyoshi K., L.R. Abeydeera, K. Okuda and K. Niwa. 1994. Effect of Osmolarity and Amino Acids in a Chemically Defined Medium on Development of Rat one Cell Embryos. *J. of Reprod. and Fert.* 103:27-32
- Montgomery, R., R.L. Dryer, T.W. Connay and A.A. Spector, 1983. *Biochemistry, A Case-Oriented Approach*, Fourth edition, CV. Mosby Company, London p.97
- Morales P. and M. Llanos, 1996. *Interaction of Human Spermatozoa with The Zona Pellucida of Oocyte: Development of The Acrosome Reaction.* *Frontiers in Bioscience* 1:August 1:d149-160
- Nagy, R.K., K. Ahmed and R. Kumar., 2000. *Role of Membrane Tyrosine Kinase Proteins in Human Spermatozoa Function.* *J. Cell. Sci.* 99:157-165.
- Nainar, M.A., B.M. Easwaran and V. Ulgathan. 1991. *Studi on non-motile Spermatozoa (Static Semen) in Buffalo Bull Semen.* *Indian Vet. J.* 67:133-125
- Naz, R.K., K. Ahmed and R. Kumar, 1991. *Role of Membrane Tyrosin Protein in Human Spermatozoal Function.* *J. Cell. Sci.* 99:157 – 165.
- Naz, R.K. and K. Ahmed, 1994. *Molecular Identities of Human Sperm Proteins That Bind Human Zona Pellucida : Nature of Sperm –Zona Interaction, Tyrosine Kinase Activity and Involvement of FA-1.* *Mol. Reprod. Dev.* 39, 397 – 408.
- Nurhidayat, 2002. *Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Imunohistokimia dalam Modul Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan terapan Bidang Biologi dan Biomedis.* Kerjasama Proyek Peningkatan Kualitas Sumber daya Manusia Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi departemen Pendidikan Nasional dengan Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Pablo, E.V., J.L. Bailey, G.D. Moore, Dieyun Pan, P.O. Clarke and G.S. Kopf. 1995. *Capacitation of Mouse Spermatozoa : Correlation Between The Capacitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation Development* 121. 1129-1137.
- Park, J.E. and J.K. Graham, 1992. *Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes.* *J. Theriogenology* 38 : 2009-222
- Partodihardjo, S., 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan.* Cetakan ketiga. Mutiara Sumber Widya. Jakarta. Hal. 522 – 556.

- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika : Suatu Pendekatan Biometrik*. Edisi II. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Tanaka H., Herliantien, E. Herwiyanti, O.P. Lubis, Buwono dan J. Pujianto.,2002. *Reproduksi Klinik. The Aftercare Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project*. Japan International Cooperation Agency. Hal. 2.
- Thaler ,C.D. and R.A. Cardullo. 1995. *The Mammalian Sperm Surface: Molecular and Cellular Aspects in Gametes The Spermatozoon*, Ed.J.G.Grudzinskas and J.L. Yovich. Cambridge
- Topfer-Peterson TE, S.M. Petrounina and E.M. Hundrieser ,2000. *Oocyte – sperm Interaction*. *Anim Reprod Sci.*, Ju 2;60-61; 653-662.
- Trywulanningsih, 1992. *Materi Kursus Bioteknologi Embrio Transfer pada Ternak Ruminansia Besar*. Balai Penelitian Ternak Ciawi, Bogor.
- Tulsiani, D.R.,2000. *Structural Analysis of Asparagine-linked Glycan Units of ZP2 and ZP3 glycoproteins from Mouse Zona Pellucida*. *Arch Biochm Biophys* Oct 15; 382(2):275-283.
- Tappa,B. 1996. *Peranan dan Perkembangan Embrio transfer pada Ternak Sapi di Indonesia dalam Seminar Bioteknologi dan Teknologi Inovatif Bidang Peternakan*. Malang.
- Tesarik,J.,J.Moon and C.Mendoza, 1993. *Stimulation of Protein Tyrosin Phosphorylation by a Progesterone Receptor on Surface of Human Sperm*. *Endocrinology*. 133. 328 – 335.
- Toelihere,M.R., 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. 6th.Ed. Penerbit Angkasa Bandung.
- Tuty, L.Y., 2004. *Pengembangan Laboratorium Inseminasi Buatan Melalui Semen Cair dan Semen Beku. Pelatihan Laboran , Puspitnak, Ditjenak, Lembang*.
- Visconti, P.E. and G.S. Kopf, 1998. *Regulation of Protein Phosphorylation During Sperm Capacitation*. *Biol. of Reprod*. 59, 1 – 6
- Wassarman,PM., 1990. *Profile of Mammalian Sperm Receptor Development*, 108. 1-17
- Wetzels,AMM., 1996. *Cryopreservation/Theory in : M. Bras et al. (editor) IVF Laboratory Aspectes of invitro fertilization*. NV.Organon Netherlands.
- WHO,2005. *WHO Laboratory Manual for The Examination of HumanSemen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Ed 5th, United Kingdom : Cambridge University Press.

LAMPIRAN 1. Pembuatan Reagensia

1. Pembuatan Larutan

Larutan K_2HPO_4 0,1 M sebanyak 500 mL, diperlukan padatan K_2HPO_4 sebanyak :

$$\text{Massa} = C \times V \times \text{BM}$$

$$\text{Massa} = 0,1 \text{ mol/L} \times 0,5 \text{ L} \times 174,3 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa} = 8,715 \text{ gram}$$

Padatan K_2HPO_4 sebanyak 8,715 gram, dilarutkan dengan aqua DM steril dalam beaker glass 100 mL, dituang dalam labu ukur 500 mL dan diencerkan dengan aqua DM steril hingga tanda batas.

2. Pembuatan Larutan KH_2PO_4

Larutan KH_2PO_4 0,1 M sebanyak 250 mL, padatan KH_2PO_4 yang diperlukan sebanyak :

$$\text{Massa} = C \times V \times \text{BM}$$

$$\text{Massa} = 0,1 \text{ mol/L} \times 0,25 \text{ L} \times 163,03 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa} = 3,4001 \text{ gram}$$

Padatan K_2HPO_4 sebanyak 3,4001 gram, dilarutkan dengan aqua DM steril dalam beaker glass 100 mL, dituang dalam labu ukur 500 mL dan diencerkan dengan aqua DM steril hingga tanda batas.

3. Pembuatan Larutan Buffer fosfat pH 7

Larutan buffer fosfat pH 7 sebanyak 500 mL diperoleh dengan mencampurkan 331 mL K_2HPO_4 0,1 M dan 169 mL larutan K_2HPO_4 0,1 M sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan mengaduk magnetik dan diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter sampai pH 7.

4. Pembuatan Tris Cl 0,02 M

Tris cl ditimbang sebanyak 0,63024 g dilarutkan dalam beaker gelas 100 mL lalu diencerkan dalam labu ukur 200 mL dengan aquades demineral steril sampai tanda batas.

$$\text{BM Tris Cl} = 157,56 \text{ g/mol} \times 0,02 \text{ mol/L}$$

$$= 3,1512 \text{ g/L}$$

$$\text{Untuk 200 mL} = 0,2 \times 3,1512 \text{ g/L}$$

5. Pembuatan Larutan TCA 8%

Ditimbang TCA 0,8 g, kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7 dalam gelas kimia dan diencerkan dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas.

6. Pembuatan Larutan Histon 74 ppm

Ditimbang 0,00074 g histon, kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7 dalam gelas kimia dan diencerkan dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas.

7. Pembuatan Larutan ATP 125 ppm

Ditimbang 0,00125 g ATP, kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7 dan diencerkan dalam labu takar 10 mL.

8. Pembuatan larutan PBS T₂₀

Ditimbang NaCl 8 g, KCL 0,2 g, Na₂HPO₄.7H₂O 2,1 g, KH₂PO₄ lalu dilarutkan dalam aqua demineral steril dan diencerkan dalam labu ukur 1000 mL, didapatkan larutan PBS dari larutan tersebut diambil 99 mL dan ditambahkan 1mL Tween 20 dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL.

9. Larutan Poliakrilamida (T-Akriil)

Ditimbang 2,92 gram akrilamida dan 0,08 gram bisakrilamida, lalu dilarutkan dalam 7 ml aquades dengan menggunakan pengaduk magnetik, lalu diencerkan dalam 10 ml aquades steril.

10. Larutan Upper Gel Buffer (pH 7)

Ditimbang 0,75 gram tris dan 0,04 gram SDS, kemudian dilarutkan dengan 5 ml aquades steril, lalu ditambahkan HCl sampai pH7. setelah itu diencerkan dalam 10 ml aquades steril.

11. Running Buffer

Ditimbang 3,03 gram tris, 14,4 gram glisin dan 1 gram SDS, lalu dilarutkan dalam 1 L aquades steril.

12. Larutan Reducing Sampel Buffer (RSB)

Diambil Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 sebanyak 1 ml, 1,6 ml gliserol 10% ($\frac{1}{10}$), SDS 10% ($\frac{1}{10}$) sebanyak 1,6 ml, 0,4 ml 2-merkaptotanol 5% dan 0,2 ml Bromofenol blue 1,2% ($\frac{1}{10}$). kemudian diencerkan dalam 8 ml aquades steril.

13. Larutan Staining Comassie blue

Ditimbang 0,25 gram Coomassie brilliant Blue R-250 kemudian ditambah dengan metanol absolute sebanyak 45,4 ml dan asam glacial sebanyak 9,2 ml. setelah itu ditambah aquades steril sampai volume sebanyak 100 ml.

14. Larutan Destaining

Diambil 7 ml asam asetat glacial, 7 ml methanol absolute dan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml kemudian diencerkan dengan aquades steril sampai tanda batas.

Destaining	Metanol absolut Asam asetat glasial ddH ₂ O	70 ml 70 ml hingga 1 L
------------	--	------------------------------

Tabel 1.2. Komposisi Larutan pada Dot Blotting

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
PBS 500 ml	KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (berurutan sambil distirer) dH ₂ O	0,1 g 0,1 g 4 g 1,08 g hingga 500 ml
PBS-azida	PBS Natrium azida 1%	10 ml 5 µl
PBS skim 5%	PBS Non fat milk	100 ml 5 g
PBS-T 0,05 %	PBS Tween-20	100 ml 50 µl
TBS	NaCl Tris ddH ₂ O HCl pekat	8,7 g 1,21 g 1 L sampai pH 7,4
Antigen (1:50)	Antigen PBS azida	50 µl 2500 µl
Antibodi Primer (1:100)	Antibodi primer PBS-T skim	10 µl 990 µl
Antibodi Sekunder (1:2500)	Antibodi sekunder <i>AP Conjugated</i> TBS	0,4 µl 999,6 µl
Substrat Western Blue	<i>Western Blue Substrat Solution</i>	3 ml

Tabel 1.3. Komposisi Larutan pada Imunositokimia

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
PBS 500 ml	KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (berurutan sambil distirer) dH ₂ O	0,1 g 0,1 g 4 g 1,08 g hingga 500 ml
DAB (fresh)	DAB TBS pH 7,6	2,5 g 100 ml
AEC (fresh)	AEC N,N-dimetil formamide 0,1 M Buffer Asetat pH 5,2 3 % H ₂ O ₂	4 mg 1 ml 14 ml 0,15 ml

Tabel 1.4. Komposisi Larutan pada ELISA

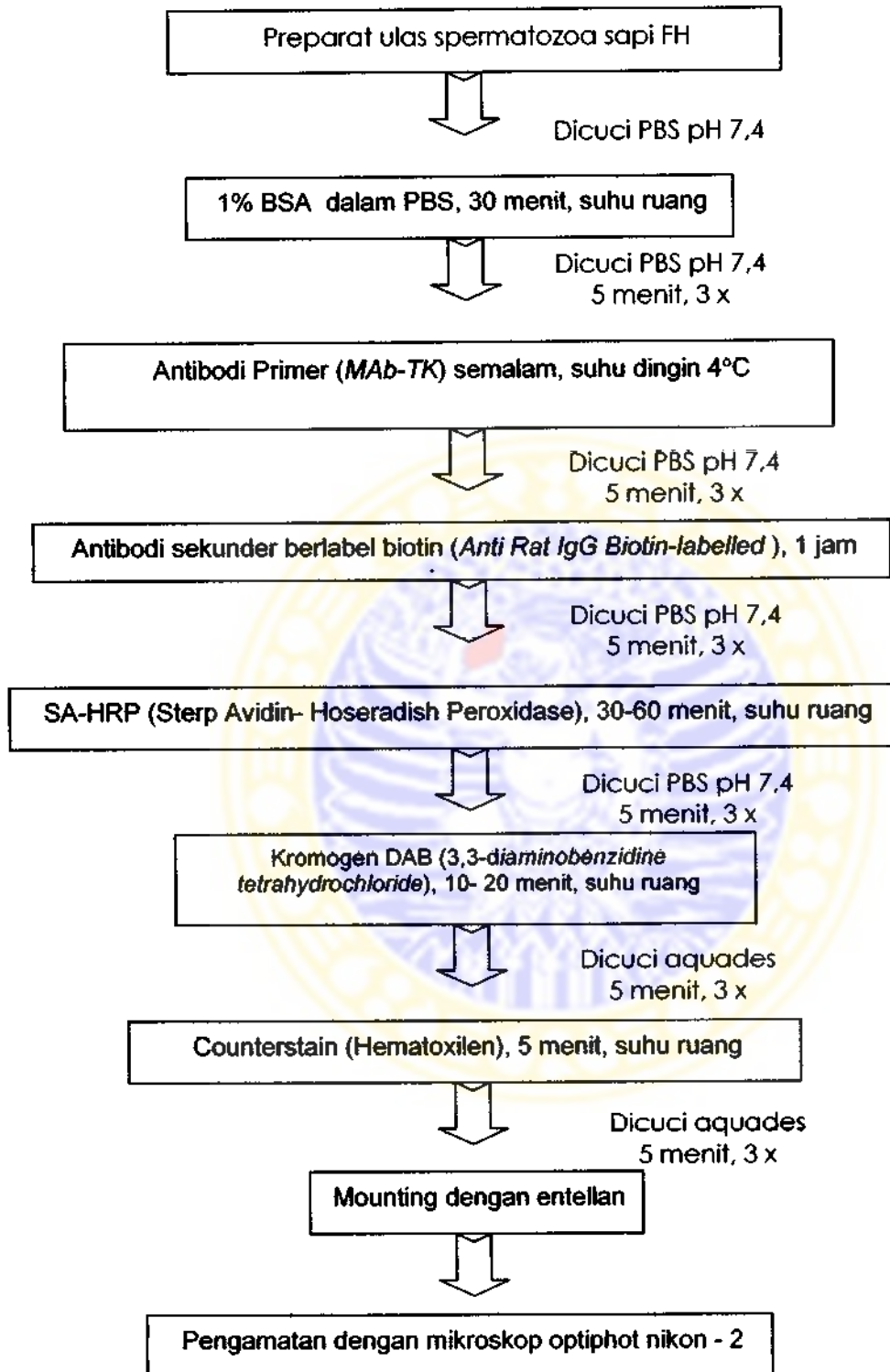
Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
Coating buffer	Na ₂ CO ₃ NaHCO ₃ NaN ₃ dd H ₂ O (cek pH 9,6!)	0,159 g 0,293 g 0,02 g sampai 100 ml
PBS-T	PBS Tween-20	100 ml 50 µl
Blocking Buffer (BSA 1% dalam PBS)	BSA PBS	0,1 g 10 ml
Diethanolamin 10% pH 9,8	Diethanolamin dd H ₂ O NaN ₃ MgCl ₂ . 6 H ₂ O (cek pH 9,8!)	2,425 ml 20 ml 0,005 g 0,0025 g
pNPP dalam Diethanolamin	pNPP Diethanolamin	1 tablet 5 ml

Tabel 1.6. Rataan dan Simpangan Baku Kualitas Semen Segar Sapi Perah FH yang Digunakan Dalam Penelitian

Parameter	Ukuran
Volume (ml)	6.75 ± 1.4953
Warna	Putih kekuningan
Konsistensi	Agak kental sampai kental
Derajat keasaman (pH)	6.76 ± 0.1646
Gerakan Massa	++ sampai +++
Konsentrasi ($10^6/ml$)	1189 ± 114.15
Persentase Motilitas (%)	74 ± 6,9920
Persentase Spermatozoa Hidup (%)	84 ± 5,1639
Persentase Abnormalitas (%)	6,9 ± 0,8756

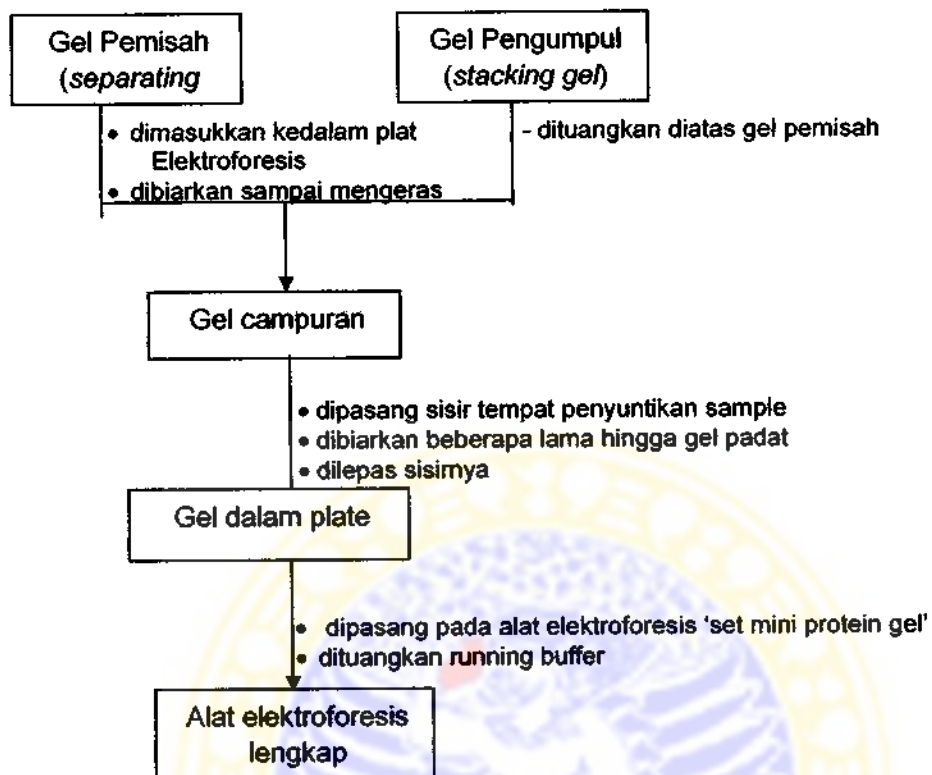
Lampiran 2.2. Pembuatan Preparat Histologis Spermatozoa

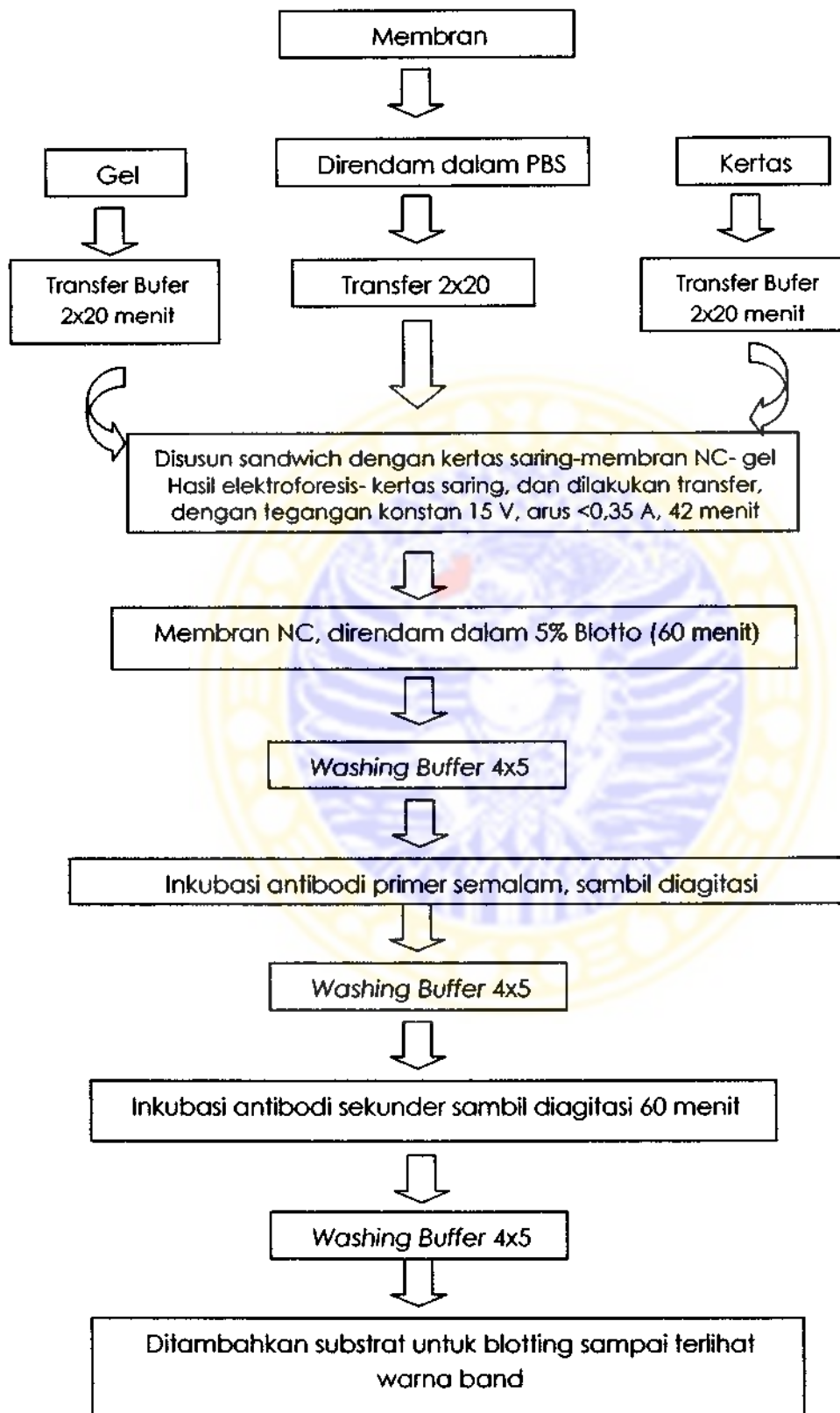
Lampiran 2.3. Imunositokimia



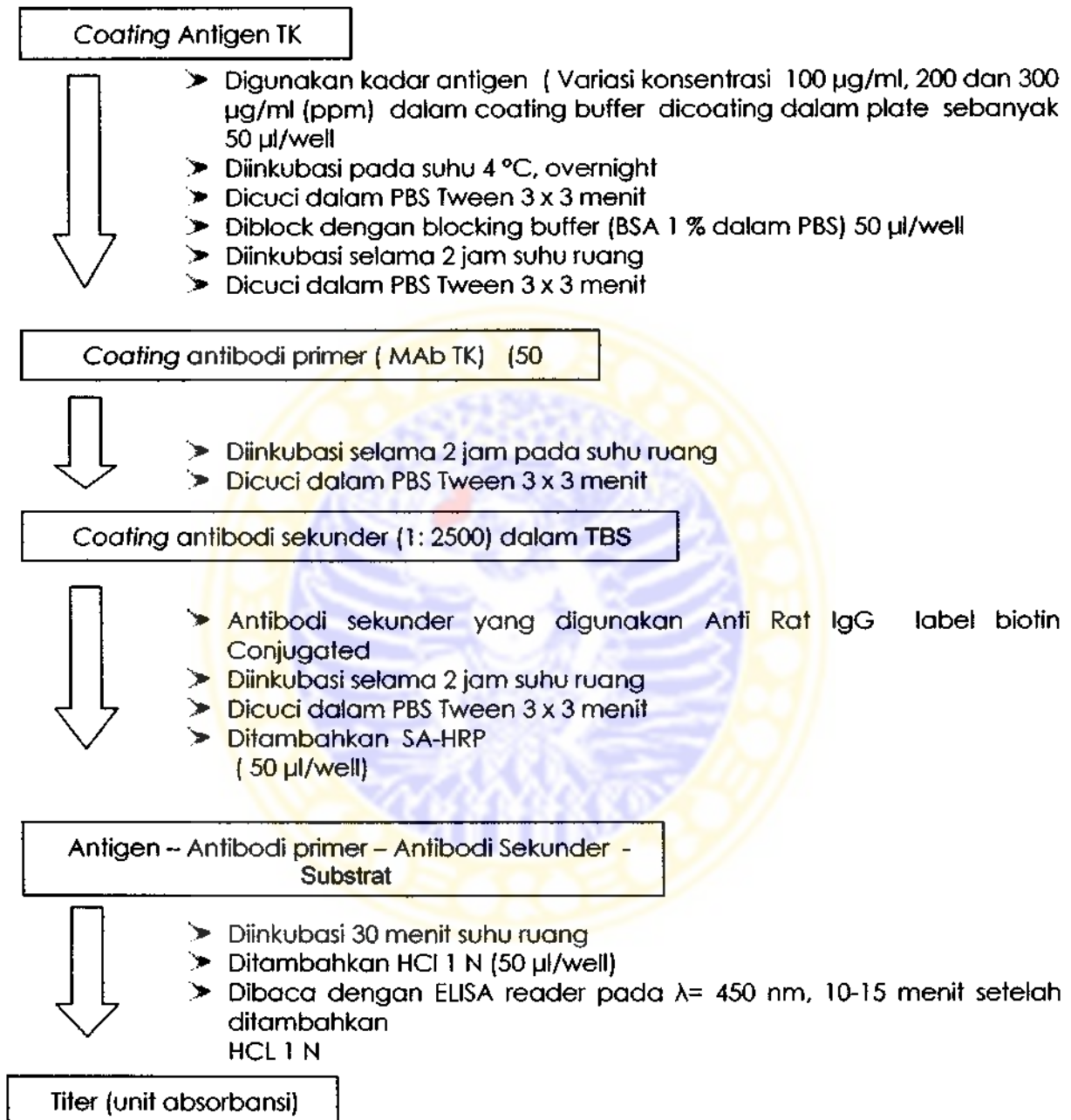
Lampiran 2.4. Diagram Alir Metode Elektroforesis SDS-PAGE

2.4.1. Persiapan Gel



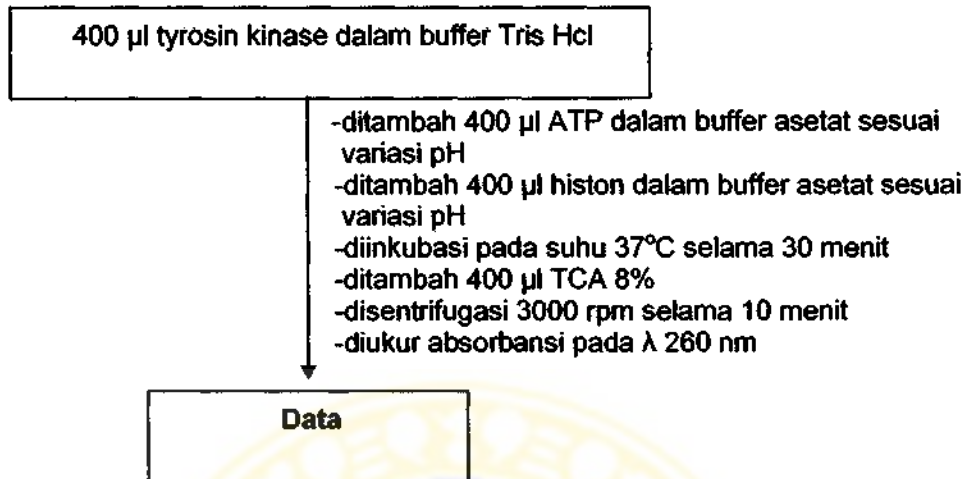
Lampiran 2.6. Diagram Alir Metode WESTERN BLOT

Lampiran 2.7. Uji Pengukuran Kadar TK dengan ELISA Menggunakan Standar TK (SIGNAL CHEM) dan MAb TK (ABGENT)

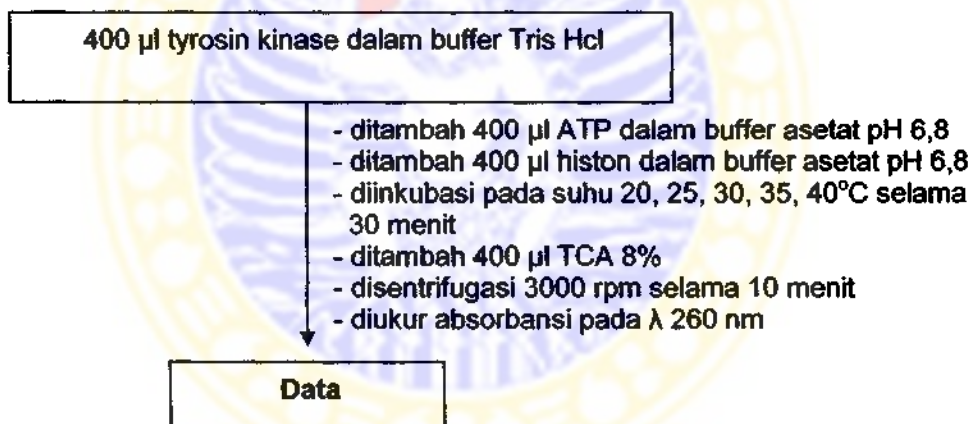


Lampiran 2.8. Diagram Alir Penentuan Kondisi Optimum TK dan Aktivitas TK

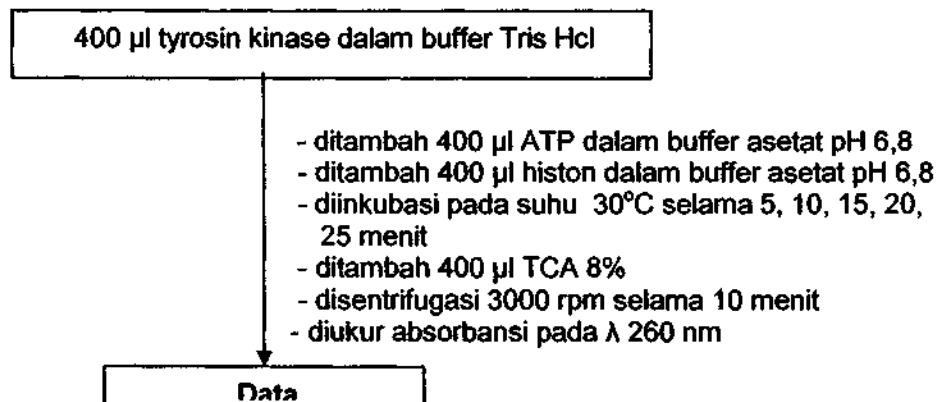
2.7.1 Penentuan pH Optimum



2.7.2. Penentuan Temperatur Optimum

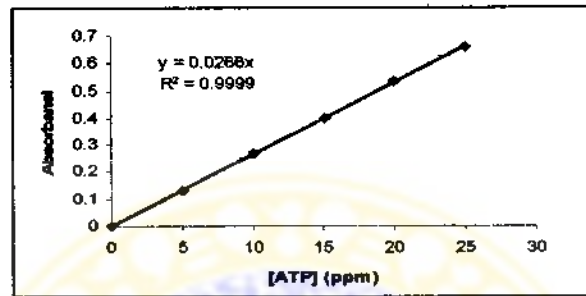


2.7.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum



Tabel L.2.7.5. Nilai Absorbansi Kurva Baku ATP

Konsentrasi (ppm)	A ₁	A ₂	A ₃	Absorbansi Rata-Rata
0	0	0	0	0
5	0.138	0.125	0.131	0.132
10	0.268	0.256	0.286	0.270
15	0.390	0.398	0.410	0.399
20	0.498	0.520	0.584	0.534
25	0.634	0.658	0.688	0.660



Gambar L.2.7.5. Kurva Baku ATP

2.7.6. Penentuan Aktivitas Tyrosin Kinase

Aktivitas tyrosin kinase dihitung dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva baku ATP, $y = 0.0266x$. Dengan menggunakan persamaan tersebut dapat ditentukan konsentrasi ATP yang diperoleh dari serapan yang terukur pada penelitian. Aktivitas tyrosin kinase ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[ATP_{awal} - ATP_{sisu}]}{Mr \text{ ATP}} \times \frac{v \times fp}{p \times q}$$

Dimana : v = volume total sampel (ml)
 p = volume enzim (ml)
 q = waktu inkubasi
 f_p = faktor pengenceran

Misalkan absorbansi = 0.210

Persamaan kurva baku $Y = 0,0266 x$

$$0,210 = 0,0266 x$$

$$X = 7,8947$$

$$\text{Aktivitas} = \frac{(31,25 - 7,8947) \mu\text{mol}}{551,2 \mu\text{mol/ml menit}} \times \frac{1,6 \mu\text{l} \times 4}{0,4 \mu\text{l} \times 30 \text{ menit}}$$

= 0,0226 $\mu\text{mol/ml}$ menit

Tabel L.2.7.6. Aktivitas Tyrosin Kinase pada Berbagai pH (suhu 35°C, waktu inkubasi 30 menit)

pH	Absorbansi			Aktivitas			Aktivitas rata-rata (U)	SD
	I	II	III	I	II	III		
6,0	0,399	0,381	0,358	0,0157	0,0164	0,0172	0,0166	$7,7782 \cdot 10^{-4}$
6,5	0,392	0,358	0,347	0,0159	0,0172	0,0176	0,0169	$8,8882 \cdot 10^{-4}$
7,0	0,258	0,269	0,246	0,0208	0,0204	0,0213	0,0208	$4,5277 \cdot 10^{-4}$
7,5	0,314	0,291	0,291	0,0188	0,0197	0,0197	0,0194	$5,1962 \cdot 10^{-4}$
8,0	0,347	0,426	0,381	0,0176	0,0147	0,0164	0,0162	$1,0470 \cdot 10^{-4}$

Tabel L.2.7.7. Aktivitas Tyrosin Kinase pada Berbagai Suhu (pH 7,0, waktu inkubasi 30 menit)

Suhu (°C)	Absorbansi			Aktivitas			Aktivitas rata-rata (U)	SD
	I	II	III	I	II	III		
20	0,462	0,418	0,407	0,0134	0,0150	0,0154	0,0146	$1,0583 \cdot 10^{-4}$
25	0,352	0,341	0,385	0,0174	0,0178	0,0162	0,0171	$8,3367 \cdot 10^{-4}$
30	0,308	0,253	0,341	0,0190	0,0210	0,0178	0,0193	$1,6171 \cdot 10^{-4}$
35	0,231	0,209	0,252	0,0218	0,0226	0,0211	0,0218	$7,5166 \cdot 10^{-4}$
40	0,396	0,352	0,396	0,0158	0,0174	0,0158	0,0163	$9,2466 \cdot 10^{-4}$

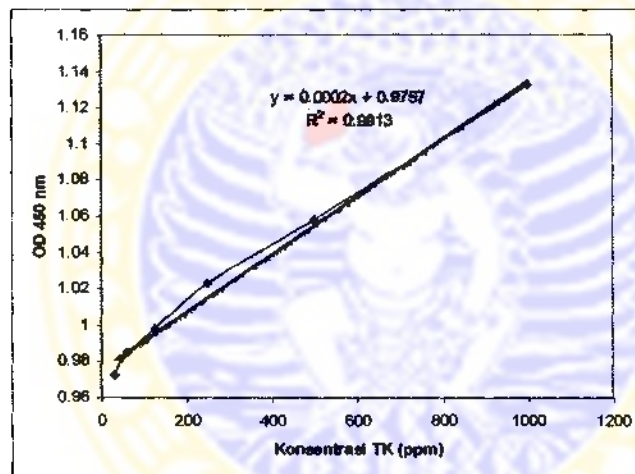
Tabel L.2.7.8. Aktivitas Tyrosin Kinase pada Berbagai Waktu Inkubasi (pH 7,0, suhu 35°C)

Waktu (menit)	Absorbansi			Aktivitas			Aktivitas rata-rata (U)	SD
	I	II	III	I	II	III		
20	0,385	0,396	0,341	0,0162	0,0158	0,0178	0,0166	$1,0583 \cdot 10^{-3}$
25	0,286	0,264	0,264	0,0198	0,0190	0,0198	0,0195	$4,636 \cdot 10^{-4}$
30	0,220	0,231	0,231	0,0222	0,0218	0,0219	0,0219	$2,2361 \cdot 10^{-4}$
35	0,297	0,253	0,286	0,0194	0,0210	0,0201	0,0202	$8,0312 \cdot 10^{-4}$
40	0,341	0,341	0,363	0,0178	0,0178	0,0176	0,0177	$1,2247 \cdot 10^{-4}$

Lampiran 2.9. Penghitungan Kadar Tyrosin Kinase Hasil Elektroelusi

1. Pembuatan kurva Baku menggunakan TK Standar (SIGNAL CHEM) dan MAb- TK (ABGENT)

No.	Konsentrasi Standar TK (ppm)	OD 450
1	31.25	0.972
2	62.5	0.985
3	125	0.998
4	250	1.023
5	500	1.058
6	1000	1.132



Sampel	OD 450 (y)	Konsentrasi TK ($\mu\text{g/ml}$)
1	1.173	19730
2	1.173	19730
3	1.182	20630
rataan kadar		20030

Lampiran 3.2.Uji Univariate Analysis of Variance Motilitas Spermatozoa Sapi FH sebelum dan Sesudah Pembekuan

NPar Test

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		P0 Motilitas sebelum pembekuan	P1 Motilitas sebelum pembekuan	P2 Motilitas sebelum pembekuan	P3 Motilitas sebelum pembekuan
N		10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	67.50	68.50	72.50	68.50
	Std. Deviation	4.249	2.415	2.635	2.415
Most Extreme Differences	Absolute	.422	.433	.329	.433
	Positive	.278	.267	.329	.267
	Negative	-.422	-.433	-.329	-.433
Kolmogorov-Smirnov Z		1.334	1.368	1.039	1.368
Asymp. Sig. (2-tailed)		.057	.047	.230	.047

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		P0 Motilitas sesudah pembekuan	P1 Motilitas sesudah pembekuan	P2 Motilitas sesudah pembekuan	P3 Motilitas sesudah pembekuan
N		10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	41.50	42.50	47.00	42.00
	Std. Deviation	2.415	2.635	2.582	2.582
Most Extreme Differences	Absolute	.433	.329	.381	.381
	Positive	.433	.329	.381	.381
	Negative	-.267	-.329	-.277	-.277
Kolmogorov-Smirnov Z		1.368	1.039	1.204	1.204
Asymp. Sig. (2-tailed)		.047	.230	.110	.110

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Pembekuan	1	Sebelum	40
	2	Sesudah	40
Trial	1	P0	20
	2	P1	20
	3	P2	20
	4	P3	20

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Motilitas (%)

Pembekuan	Trial	Mean	Std. Deviation	N
Sebelum	P0	67.50	4.249	10
	P1	68.50	2.415	10
	P2	72.50	2.635	10
	P3	68.50	2.415	10
	Total	69.25	3.499	40
Sesudah	P0	41.50	2.415	10
	P1	42.50	2.635	10
	P2	47.00	2.582	10
	P3	42.00	2.582	10
	Total	43.25	3.311	40
Total	P0	54.50	13.755	20
	P1	55.50	13.563	20
	P2	59.75	13.325	20
	P3	55.25	13.810	20
	Total	56.25	13.513	80

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Motilitas (%)

F	df1	df2	Sig.
2.175	7	72	.046

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Pembekuan+Trial+Pembekuan * Trial

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Motilitas (%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	266985.000 ^a	8	33373.125	4252.858	.000
Pembekuan	13520.000	1	13520.000	1722.903	.000
Trial	337.500	3	112.500	14.336	.000
Pembekuan * Trial	2.500	3	.833	.106	.956
Error	565.000	72	7.847		
Total	267550.000	80			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .998)

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Pembekuan	1	Sebelum	40
	2	Sesudah	40
Trial	1	P0	20
	2	P1	20
	3	P2	20
	4	P3	20

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Hidup Mati (%)

Pembekuan	Trial	Mean	Std. Deviation	N
Sebelum	P0	74.00	2.108	10
	P1	73.50	2.415	10
	P2	77.50	2.635	10
	P3	73.50	2.415	10
	Total	74.63	2.862	40
Sesudah	P0	44.70	.483	10
	P1	49.00	2.108	10
	P2	53.00	2.582	10
	P3	48.50	2.415	10
	Total	48.80	3.582	40
Total	P0	59.35	15.104	20
	P1	61.25	12.760	20
	P2	65.25	12.822	20
	P3	61.00	13.038	20
	Total	61.71	13.387	80

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Hidup Mati (%)

F	df1	df2	Sig.
5.588	7	72	.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Pembekuan+Trial+Pembekuan * Trial

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Hidup Mati (%)

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	318470.900 ^a	8	39808.863	7915.598	.000
Pembekuan	13338.613	1	13338.613	2652.251	.000
Trial	376.338	3	125.446	24.944	.000
Pembekuan * Trial	81.338	3	27.113	5.391	.002
Error	362.100	72	5.029		
Total	318833.000	80			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .999)

Post Hoc Tests

Trial

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hidup_Mati (%)

Tukey HSD

(I) Trial	(J) Trial	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	-1.90*	.709	.044	-3.77	-.03
	P2	-5.90*	.709	.000	-7.77	-4.03
	P3	-1.65	.709	.101	-3.52	.22
P1	P0	1.90*	.709	.044	.03	3.77
	P2	-4.00*	.709	.000	-5.87	-2.13
	P3	.25	.709	.985	-1.62	2.12
P2	P0	5.90*	.709	.000	4.03	7.77
	P1	4.00*	.709	.000	2.13	5.87
	P3	4.25*	.709	.000	2.38	6.12
P3	P0	1.65	.709	.101	-.22	3.52
	P1	-.25	.709	.985	-2.12	1.62
	P2	-4.25*	.709	.000	-6.12	-2.38

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Hidup_Mati (%)

Tukey HSD^{a,b}

Trial	N	Subset		
		1	2	3
P0	20	59.35		
P3	20	61.00	61.00	
P1	20		61.25	
P2	20			65.25
Sig.		.101	.985	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type II Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5.029.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

b. Alpha = .05.

Lampiran 3.4. Interaksi Pembekuan*^aTrial (dosis suplementasi TK) terhadap Spermatozoa yang Hidup

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hidup_Mati (%)
Tukey HSD

(i) Perlakuan Kombinasi	(j) Perlakuan Kombinasi	Mean Difference (i-j)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Sebelum*P0	Sebelum*P1	-.500*	1.000	1.000	-2.53	1.43
	Sebelum*P2	-3.500*	1.000	.018	-4.63	-.37
	Sebelum*P3	.500	1.000	1.000	-2.63	3.63
	Sesudah*P0	29.300*	1.000	.000	26.17	32.43
	Sesudah*P1	25.000*	1.000	.000	21.87	28.13
Sebelum*P1	Sebelum*P2	-3.500*	1.000	.000	-4.63	-.37
	Sebelum*P3	-1.000*	1.000	.004	-2.13	-.87
	Sesudah*P0	28.800*	1.000	.000	25.67	31.93
Sebelum*P2	Sebelum*P3	.000	1.000	1.000	-3.13	3.13
	Sesudah*P0	24.500*	1.000	.000	21.37	27.63
	Sesudah*P1	20.500*	1.000	.000	17.27	23.63
Sebelum*P3	Sebelum*P0	3.500*	1.000	.018	.37	6.63
	Sebelum*P1	4.000*	1.000	.004	.87	7.13
	Sebelum*P2	4.000*	1.000	.004	.87	7.13
	Sesudah*P0	32.800*	1.000	.000	29.67	35.93
	Sesudah*P1	28.500*	1.000	.000	25.37	31.63
Sesudah*P0	Sebelum*P1	-.500	1.000	1.000	-3.63	2.63
	Sebelum*P2	-.000	1.000	1.000	-3.13	3.13
	Sebelum*P3	-4.000*	1.000	.004	-5.13	-.87
	Sesudah*P1	28.800*	1.000	.000	25.67	31.93
	Sesudah*P2	24.500*	1.000	.000	21.37	27.63
Sesudah*P1	Sebelum*P2	-3.500*	1.000	.000	-4.63	-.37
	Sebelum*P3	-3.000*	1.000	.007	-4.13	-.87
	Sesudah*P2	25.000*	1.000	.000	21.87	28.13
	Sesudah*P3	21.000*	1.000	.000	17.87	24.13
	Sesudah*P0	-29.300*	1.000	.000	-32.43	-26.17
Sesudah*P2	Sebelum*P3	-28.800*	1.000	.000	-31.93	-25.67
	Sesudah*P3	-32.800*	1.000	.000	-35.93	-29.67
	Sesudah*P0	-28.800*	1.000	.000	-31.93	-25.67
	Sesudah*P1	-4.300*	1.000	.001	-5.43	-1.17
	Sesudah*P3	-3.800*	1.000	.002	-4.93	-.67
Sesudah*P3	Sebelum*P0	-25.000*	1.000	.000	-28.13	-21.87
	Sebelum*P1	-24.500*	1.000	.000	-27.63	-21.37
	Sebelum*P2	-28.500*	1.000	.000	-31.63	-25.37
	Sesudah*P0	4.300*	1.000	.001	3.17	7.43
	Sesudah*P1	4.000*	1.000	.004	2.87	7.13
Sesudah*P0	Sebelum*P2	-21.000*	1.000	.000	-24.13	-17.87
	Sebelum*P3	-20.500*	1.000	.000	-23.63	-17.37
	Sesudah*P1	-24.500*	1.000	.000	-27.63	-21.37
	Sesudah*P2	-20.500*	1.000	.000	-23.63	-17.37
	Sesudah*P3	8.300*	1.000	.000	5.17	11.43
Sesudah*P1	Sebelum*P0	4.800*	1.000	.004	3.67	7.93
	Sebelum*P2	4.000*	1.000	.004	2.87	7.13
	Sebelum*P3	4.500*	1.000	.001	3.37	7.63
	Sesudah*P2	-25.500*	1.000	.000	-28.63	-22.37
	Sesudah*P3	-25.000*	1.000	.000	-28.13	-21.87
Sesudah*P2	Sebelum*P0	-29.000*	1.000	.000	-32.13	-25.87
	Sebelum*P1	-25.000*	1.000	.000	-28.13	-21.87
	Sebelum*P2	-25.000*	1.000	.000	-28.13	-21.87
	Sebelum*P3	3.800*	1.000	.007	.67	6.93
	Sesudah*P0	-.500	1.000	1.000	-3.63	2.63
Sesudah*P3	Sebelum*P1	-4.500*	1.000	.001	-5.63	-.93
	Sebelum*P2					

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Hidup_Mati (%)

Tukey HSD^a

Perlakuan Kombinasi	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
Sesudah*P0	10	44.70				
Sesudah*P3	10		48.50			
Sesudah*P1	10		49.00			
Sesudah*P2	10			53.00		
Sebelum*P1	10				73.50	
Sebelum*P3	10				73.50	
Sebelum*P0	10				74.00	
Sebelum*P2	10					77.50
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Lampiran 3.5. Data Integritas Membran Spermatozoa Sapi FH Sebelum dan Sesudah Pembekuan

Sesudah

MPU	P0			P1			P2			P3		
50	40	60		40	40	30	60	50	70	60	40	50
30	20	40		20	20	40	40	20	50	50	40	70
30	30	20		50	20	30	70	70	60	60	60	80
40	20	40		50	10	50	60	60	70	30	40	70
10	10	20		10	40	20	40	30	20	40	40	30
Rerata	30.2	20.4	30.6	30.4	20.6	30.4	50.4	40.6	50.4	40.8	40.4	60
rerata	30.067			30.1333			50.1333			50.0667		
SD	0.611			0.4619			0.4619			0.8327		

Sebelum

MPU	P0			P1			P2			P3		
60	60	50		60	70	50	60	80	90	60	50	60
70	50	50		70	60	40	40	70	80	50	70	70
60	50	50		50	50	70	70	70	60	70	60	80
70	50	40		40	50	50	60	60	70	60	80	70
60	40	50		50	40	50	80	60	70	60	50	40
Rerata	60.4	50	40.8	50.4	50.4	50.2	60.2	60.8	70.4	60	60.2	60.4
rerata	50.4			50.3333			60.8			60.2		
SD	0.872			0.1155			0.6			0.2		

Lampiran 3.6. Uji Univariate Analysis of Variance Integritas Membran Spermatozoa Sapi FH**NPar Tests****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		P0 Integritas sebelum pembekuan	P1 Integritas sebelum pembekuan	P2 Integritas sebelum pembekuan	P3 Integritas sebelum pembekuan
N		5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	5.4000	5.3340	6.8000	6.2000
	Std. Deviation	.28089	.97069	.37934	.76776
Most Extreme Differences	Absolute	.232	.298	.234	.197
	Positive	.198	.246	.234	.149
	Negative	-.232	-.298	-.166	-.197
Kolmogorov-Smirnov Z		.518	.667	.523	.441
Asymp. Sig. (2-tailed)		.951	.765	.947	.990

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		P0 Integritas sesudah pembekuan	P1 Integritas sesudah pembekuan	P2 Integritas sesudah pembekuan	P3 Integritas sesudah pembekuan
N		5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3.0680	3.1360	5.1340	5.0660
	Std. Deviation	.54651	.50575	1.67608	.49622
Most Extreme Differences	Absolute	.350	.254	.297	.247
	Positive	.350	.222	.209	.153
	Negative	-.233	-.254	-.297	-.247
Kolmogorov-Smirnov Z		.782	.569	.665	.553
Asymp. Sig. (2-tailed)		.574	.902	.769	.920

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 3.7. Uji Univariate Analysis of Variance Integritas Membran Spermatozoa Sapi FH**Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
Pembekuan	1	Sebelum	20
	2	Sesudah	20
Perlakuan	1	P0	10
	2	P1	10
	3	P2	10
	4	P3	10

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Integritas membran

Pembekuan	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Sebelum	P0	5.4000	.28089	5
	P1	5.3340	.97069	5
	P2	6.8000	.37934	5
	P3	6.2000	.76776	5
	Total	5.9335	.86898	20
Sesudah	P0	3.0680	.54651	5
	P1	3.1360	.50575	5
	P2	5.1340	1.67608	5
	P3	5.0660	.49622	5
	Total	4.1010	1.34600	20
Total	P0	4.2340	1.29554	10
	P1	4.2350	1.36911	10
	P2	5.9670	1.44343	10
	P3	5.6330	.85359	10
	Total	5.0173	1.45312	40

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Integritas membran

F	df1	df2	Sig.
5.509	7	32	.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Pembekuan+Perlakuan+Pembekuan * Perlakuan

Lampiran 3.8. Data Jumlah Ekspresi TK pada Spermatozoa Sapi FH Sebelum dan Sesudah Pembekuan

Sebelum

Sesudah

P0	3	1	1	3	2	P0	2	4	5	2	2
	2	4	3	2	2		3	2	1	6	1
	3	1	1	2	2		7	3	4	8	6
rerata	3	2	2	2	2	rerata	4	3	3	5	3
P1	6	7	4	6	3	P1	8	8	3	11	8
	5	8	4	6	9		8	11	5	9	11
	10	11	8	12	12		10	12	8	2	12
rerata	7	9	5	8	8	rerata	9	10	5	7	10
P2	14	8	8	13	9	P2	21	11	23	21	12
	12	18	17	15	12		12	10	20	11	11
	14	14	13	12	20		24	14	12	15	14
rerata	13	13	13	13	14	rerata	19	12	18	16	12
P3	13	17	20	18	18	P3	21	27	14	21	21
	18	17	20	13	14		25	31	19	26	20
	21	20	11	17	17		23	26	21	24	19
rerata	17	18	17	16	16	rerata	23	28	18	24	20



Lampiran 3.9. Uji Anava Satu Arah Ekspresi TK pada Spermatozoa Sapi FH Sebelum dan Sesudah Pembekuan

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance	
					Lower Bound	Upper Bound				
TK POST	P0	5	3.6000	.89443	.40000	2.4884	4.7106	3.00	5.00	
	P1	5	8.2000	2.16795	.96954	5.5061	10.8919	5.00	10.00	
	P2	5	15.4000	3.29634	1.40969	11.3195	19.4805	12.00	19.00	
	P3	5	22.6000	3.84708	1.72047	17.8232	27.3768	18.00	28.00	
	Total	20	12.4500	7.83027	1.75090	8.7853	16.1147	3.00	28.00	
	Model			Fixed Effects	2.76837	.62350	11.1282	13.7718		
			Random Effects	4.16443		-.6031	25.7031			
TIROSIN KINASE	P0	5	2.20	.447	.200	1.64	2.78	2	3	
	P1	5	7.40	1.517	.678	5.52	9.28	5	9	
	P2	5	13.20	.447	.200	12.64	13.78	13	14	
	P3	5	16.80	.837	.374	15.78	17.84	16	18	
	Total	20	9.90	5.778	1.281	7.20	12.60	2	18	
	Model			Fixed Effects	.922	.206	9.46	10.34		
			Random Effects	3.215		-.33	20.13			

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TK POST	Between Groups	1040.550	3	346.850	44.611	.000
	Within Groups	124.400	16	7.775		
	Total	1164.950	19			
TIROSIN KINASE	Between Groups	620.200	3	206.733	243.216	.000
	Within Groups	13.600	16	.850		
	Total	633.800	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
TK POST	P0	P1	-4.60000	1.76352	.080	-9.6455	.4455
		P2	-11.80000*	1.76352	.000	-16.8455	-6.7545
		P3	-19.00000*	1.76352	.000	-24.0455	-13.9545
	P1	P0	4.60000	1.76352	.080	-.4455	9.6455
		P2	-7.20000*	1.76352	.004	-12.2455	-2.1545
		P3	-14.40000*	1.76352	.000	-19.4455	-9.3545
	P2	P0	11.80000*	1.76352	.000	6.7545	16.8455
		P1	7.20000*	1.76352	.004	2.1545	12.2455
		P3	-7.20000*	1.76352	.004	-12.2455	-2.1545
	P3	P0	19.00000*	1.76352	.000	13.9545	24.0455
		P1	14.40000*	1.76352	.000	9.3545	19.4455
		P2	7.20000*	1.76352	.004	2.1545	12.2455
TIROSIN KINASE	P0	P1	-5.200*	.583	.000	-6.87	-3.53
		P2	-11.000*	.583	.000	-12.67	-9.33
		P3	-14.600*	.583	.000	-16.27	-12.93
	P1	P0	5.200*	.583	.000	3.53	6.87
		P2	-5.800*	.583	.000	-7.47	-4.13
		P3	-9.400*	.583	.000	-11.07	-7.73
	P2	P0	11.000*	.583	.000	9.33	12.67
		P1	5.800*	.583	.000	4.13	7.47
		P3	-3.600*	.583	.000	-5.27	-1.93
	P3	P0	14.600*	.583	.000	12.93	16.27
		P1	9.400*	.583	.000	7.73	11.07
		P2	3.600*	.583	.000	1.93	5.27

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

TK POST

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
P0	5	3.6000		
P1	5	8.2000		
P2	5		15.4000	
P3	5			22.6000
Sig.		.080	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 3.10. Data Persentase fertilisasi dari hasil Fertilisasi In Vitro pada inkubasi 24, 48 dan 72 jam

Summarize

Case Summaries*

			Sigot	2 sel	4 sel	
Perlakuan	P0	1	72,17	60,35	47,89	
		2	74,41	56,45	50,32	
		3	72,57	59,54	47,44	
		4	75,35	55,80	46,39	
		5	74,36	56,56	47,95	
		6	73,22	58,64	46,39	
		Total	N	6	6	6
			Sum	442,08	347,34	286,38
			Mean	73,6800	57,8900	47,7300
			Std. Deviation	1,22540	1,87335	1,44620
P1	P1	1	73,21	60,74	45,87	
		2	72,89	61,81	47,82	
		3	70,94	60,96	50,03	
		4	74,51	60,85	48,50	
		5	76,61	61,92	50,19	
		6	75,30	58,88	44,51	
		Total	N	6	6	6
			Sum	443,46	365,16	286,92
			Mean	73,9100	60,8600	47,8200
			Std. Deviation	1,99667	1,09279	2,26813
P2	P2	1	76,76	62,95	54,69	
		2	77,62	63,67	54,24	
		3	78,43	63,71	55,23	
		4	74,95	64,40	54,52	
		5	79,62	65,09	53,78	
		6	76,24	62,35	54,78	
		Total	N	6	6	6
			Sum	463,62	382,17	327,24
			Mean	77,2700	63,6950	54,5400
			Std. Deviation	1,65493	,98061	,49481
P3	P3	1	75,01	61,23	50,78	
		2	74,97	60,06	49,41	
		3	73,96	59,40	49,80	
		4	75,34	59,51	49,45	
		5	75,76	59,85	50,02	
		6	74,98	60,01	50,65	
		Total	N	6	6	6
			Sum	450,02	360,06	300,11
			Mean	75,0033	60,0100	50,0183
			Std. Deviation	,59601	,65400	,58650
Total	Total	N	24	24	24	
		Sum	1799,18	1454,73	1200,65	
		Mean	74,9658	60,6138	50,0271	
		Std. Deviation	1,99329	2,41817	3,10826	

a. Limited to first 100 cases.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sigot

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	-,23000	,84569	,993	-3,2307	2,7707
	P2	-3,59000*	,84569	,002	-6,5907	-,5893
	P3	-1,32333	,84569	,420	-4,3241	1,6774
P1	P0	,23000	,84569	,993	-2,7707	3,2307
	P2	-3,36000*	,84569	,004	-6,3607	-,3593
	P3	-1,09333	,84569	,578	-4,0941	1,9074
P2	P0	3,59000*	,84569	,002	,5893	6,5907
	P1	3,36000*	,84569	,004	,3593	6,3607
	P3	2,26667	,84569	,064	-,7341	5,2674
P3	P0	1,32333	,84569	,420	-1,6774	4,3241
	P1	1,09333	,84569	,578	-1,9074	4,0941
	P2	-2,26667	,84569	,064	-5,2674	,7341

*. The mean difference is significant at the .01 level.

Homogeneous Subsets

Sigot

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .01	
		1	2
P0	6	73,6800	
P1	6	73,9100	
P3	6	75,0033	75,0033
P2	6		77,2700
Sig.		,420	,064

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Lampiran 3.12. Uji Anava Satu Arah Jumlah Embrio 2 sel hasil Fertilisasi In Vitro

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		P0 2 sel	P1 2 sel	P2 2 sel	P3 2 sel
N		6	6	6	6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	57,8900	60,8600	63,6950	60,0100
	Std. Deviation	1,87335	1,09279	,98061	,65400
Most Extreme Differences	Absolute	,261	,290	,161	,303
	Positive	,261	,166	,161	,303
	Negative	-,156	-,290	-,156	-,175
Kolmogorov-Smirnov Z		,640	,709	,393	,742
Asymp. Sig. (2-tailed)		,808	,696	,998	,641

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

2 sel

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	6	57,890	1,87335	,7648	55,9240	59,8560	55,80	60,35
P1	6	60,860	1,09279	,4461	59,7132	62,0068	58,88	61,92
P2	6	63,695	,98061	,4003	62,6659	64,7241	62,35	65,09
P3	6	60,010	,65400	,2670	59,3237	60,6963	59,40	61,23
Total	24	60,614	2,41817	,4936	59,5926	61,6349	55,80	65,09

Test of Homogeneity of Variances

2 sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,247	3	20	,018

ANOVA

2 sel

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	104,028	3	34,676	22,765	,000
Within Groups	30,465	20	1,523		
Total	134,493	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: 2 sel

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	-2,97000*	,71256	,002	-4,9644	-,9756
	P2	-5,80500*	,71256	,000	-7,7994	-3,8106
	P3	-2,12000*	,71256	,035	-4,1144	-,1256
P1	P0	2,97000*	,71256	,002	,9756	4,9644
	P2	-2,83500*	,71256	,004	-4,8294	-,8406
	P3	,85000	,71256	,638	-1,1444	2,8444
P2	P0	5,80500*	,71256	,000	3,8106	7,7994
	P1	2,83500*	,71256	,004	,8406	4,8294
	P3	3,68500*	,71256	,000	1,6906	5,6794
P3	P0	2,12000*	,71256	,035	,1256	4,1144
	P1	-,85000	,71256	,638	-2,8444	1,1444
	P2	-3,68500*	,71256	,000	-5,6794	-1,6906

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

2 sel

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
P0	6	57,8900		
P3	6		60,0100	
P1	6		60,8600	
P2	6			63,6950
Sig.		1,000	,638	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Lampiran 3.13. Uji Anava Satu Arah Jumlah Embrio 4 sel hasil Fertilisasi In Vitro

NPc Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		P0 4 sel	P1 4 sel	P2 4 sel	P3 4 sel
N		6	6	6	6
Normal Parameters ^a	Mean	47,7300	47,8200	54,5400	50,0183
	Std. Deviation	1,44620	2,26813	,49481	,58650
Most Extreme Differences	Absolute	,273	,168	,151	,193
	Positive	,273	,148	,147	,167
	Negative	-,177	-,168	-,151	-,193
Kolmogorov-Smirnov Z		,668	,412	,369	,472
Asymp. Sig. (2-tailed)		,763	,996	,999	,979

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

4 sel

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
P0	6	47,73	1,44620	,59041	46,2123	49,2477	46,39	50,32
P1	6	47,82	2,26813	,92596	45,4397	50,2003	44,51	50,19
P2	6	54,54	,49481	,20201	54,0207	55,0593	53,78	55,23
P3	6	50,02	,58650	,23944	49,4028	50,6338	49,41	50,78
Total	24	50,03	3,10826	,63447	48,7146	51,3396	44,51	55,23

Test of Homogeneity of Variances

4 sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,826	3	20	,026

ANOVA

4 sel

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	183,086	3	61,029	31,198	,000
Within Groups	39,123	20	1,956		
Total	222,209	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: 4 sel

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
	P3	-2,28833*	,80750	,047	-4,5485	,0282
P1	P0	,09000	,80750	,999	-2,1701	2,3501
	P2	-6,72000*	,80750	,000	-8,9801	-4,4599
	P3	-2,19833	,80750	,058	-4,4585	,0618
P2	P0	6,81000*	,80750	,000	4,5499	9,0701
	P1	6,72000*	,80750	,000	4,4599	8,9801
	P3	4,52167*	,80750	,000	2,2615	6,7818
P3	P0	2,28833*	,80750	,047	,0282	4,5485
	P1	2,19833	,80750	,058	-,0618	4,4585
	P2	-4,52167*	,80750	,000	-6,7818	-2,2615

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

4 sel

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
P0	6	47,7300		
P1	6	47,8200	47,8200	
P3	6		50,0183	
P2	6			54,5400
Sig.		,999	,058	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Lampiran 3.14. Data Persentase Kebuntingan pada Sapi Perah Betina

			Bunting	Tidak	
Perlakuan	P0	1	100.00	.00	
		2	100.00	.00	
		3	100.00	.00	
		4	100.00	.00	
		5	100.00	.00	
		6	100.00	.00	
		Total	N	6	6
			Median	100.0000	.0000
			Std. Deviation	.00000	.00000
	P1	1		83.30	16.60
		2		83.30	16.60
		3		83.30	16.60
		4		83.30	16.60
		5		83.30	16.60
		6		83.30	16.60
		Total	N	6	6
			Median	83.3000	16.6000
			Std. Deviation	.00000	.00000
	P2	1		100.00	16.60
		2		100.00	.00
		3		100.00	.00
4			100.00	.00	
5			100.00	.00	
6			100.00	.00	
	Total	N	6	6	
		Median	100.0000	.0000	
		Std. Deviation	.00000	6.77692	
P3	1		66.60	.00	
	2		66.60	33.30	
	3		66.60	33.30	
	4		66.60	33.30	
	5		66.60	33.30	
	6		66.60	33.30	
	Total	N	6	6	
		Median	66.6000	33.3000	
		Std. Deviation	.00000	13.59467	
	Tot al	N	24	24	
		Median	91.6500	8.3000	
		Std. Deviation	14.14473	13.42192	

a Limited to first 100 cases.

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Bunting	Tidak
Normal	Mean	87.4750	11.1192
Parameters(a,b)	Std. Deviation	14.14473	13.42192
Most Extreme Differences	Absolute	.312	.310
	Positive	.188	.310
	Negative	-.312	-.190
Kolmogorov-Smirnov Z		1.529	1.518
Asymp. Sig. (2-tailed)		.019	.020

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test 2

		Bunting	Tidak
N		24	24
Uniform Parameters(a,b)	Minimum	66.60	.00
	Maximum	100.00	33.30
Most Extreme Differences	Absolute	.500	.500
	Positive	.250	.500
	Negative	-.500	-.208
Kolmogorov-Smirnov Z		2.449	2.449
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000	.000

a Test distribution is Uniform.

b Calculated from data.

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Bunting

F	df1	df2	Sig.
1.175	2	21	.328

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Tidak

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

Dependent Variable: Tidak

F	df1	df2	Sig.
5.067	2	21	.016

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a Design: Intercept+Bunting

Lampiran 3.15. Deskriptif dan Uji Khi Kuadrat Persentase Kebuntingan Pada Sapi Perah Betina

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Bunting	24	5.00	6.00	5.5000	.51075
Tidakbunting	24	.00	1.00	.5000	.51075
Valid N (listwise)	24				

Summarize

Case Summaries(a)

			tidakbunting	bunting
perakuan	P0	1	1.00	5.00
		2	1.00	5.00
		3	1.00	5.00
		4	1.00	5.00
		5	1.00	5.00
		6	1.00	5.00
	Total	N	6	6
		Mean	1.0000	5.0000
		Std. Deviation	.00000	.00000
		P1	1	1.00
2			1.00	5.00
3			1.00	5.00
4			1.00	5.00
5			1.00	5.00
6			1.00	5.00
Total		N	6	6
		Mean	1.0000	5.0000
		Std. Deviation	.00000	.00000
		P2	1	.00

	2		.00	6.00
	4		.00	6.00
	5		.00	6.00
	6		.00	6.00
	Total	N	6	6
		Mean	.0000	6.0000
		Std. Deviation	.00000	.00000
P3	1		.00	6.00
	2		.00	6.00
	3		.00	6.00
	4		.00	6.00
	5		.00	6.00
	6		.00	6.00
	Total	N	6	6
		Mean	.0000	6.0000
		Std. Deviation	.00000	.00000
Total		N	24	24
		Mean	.5000	5.5000
		Std. Deviation	.51075	.51075

a Limited to first 100 cases.

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		bunting	tidakbunting
N		24	24
Normal Parameters(a,b)	Mean	5.5000	.5000
	Std. Deviation	.51075	.51075
Most Extreme Differences	Absolute	.336	.336
	Positive	.336	.336
	Negative	-.336	-.336
Kolmogorov-Smirnov Z		1.647	1.647
Asymp. Sig. (2-tailed)		.009	.009

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Chi-Square Test

Frequencies

bunting

	Observed N	Expected N	Residual
5.00	12	12.0	.0
6.00	12	12.0	.0
Total	24		

tidakbunting

	Observed N	Expected N	Residual
.00	12	12.0	.0
1.00	12	12.0	.0
Total	24		

Test Statistics

	bunting	tidakbunting
Chi-Square(a)	.000	.000
df	1	1
Asymp. Sig.	1.000	1.000

a. 0 cells (.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 12.0.