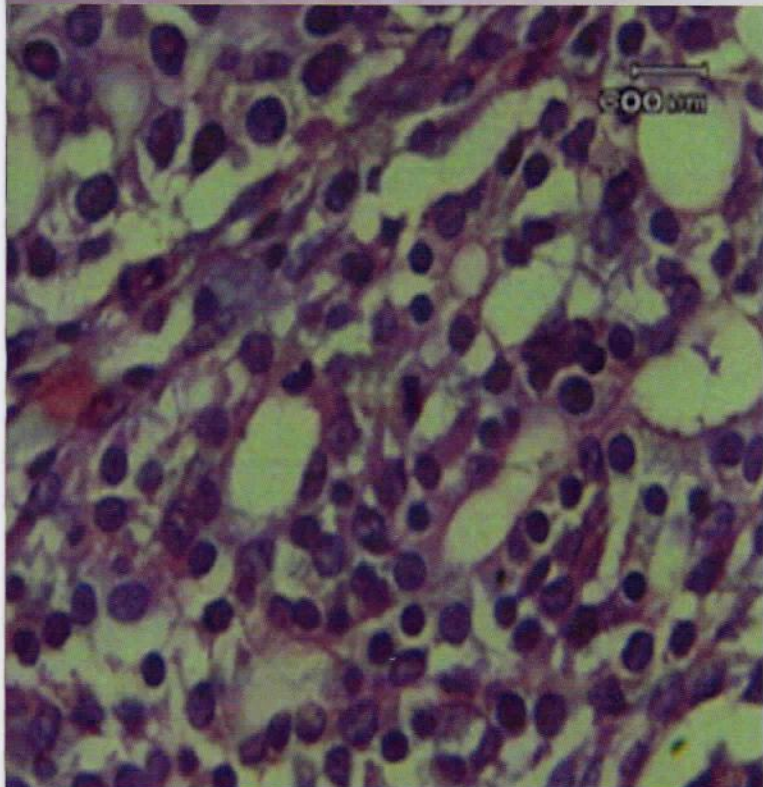


ISSN 1979-1305

VETERINARIA

Medika



Vet Med | Vol. 8 | No. 3 | Hal.227-348 | Surabaya, Nopember 2015

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Veterinaria Medika

Vol 8 , No. 3, Nopember 2015

Veterinaria Medika memuat tulisan ilmiah dalam bidang Kedokteran Hewan dan Peternakan.

Terbit pertama kali tahun 2008 dengan frekuensi terbit tiga kali setahun pada bulan Pebruari, Juli dan Nopember.

Susunan Dewan Redaksi

Ketua Penyunting :

Widjiati

Sekretaris :

Lucia Tri Suwanti

Bendahara :

Hani Plumeriastuti

Iklan dan Langganan :

Budi Setiawan

Penyunting Pelaksana :

Imam Mustofa

Mustofa Helmi Effendi

Sri Hidanah

Suherni Susilowati

Gracia Angelina Hendarti

Penyunting Teknis :

Djoko Legowo

Alamat Redaksi : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus C Unair Jl. Mulyorejo Tel. (031) 5992785 – 5993016 Surabaya 60115
Fax (031) 5993015 E-mail : vetmed_ua@yahoo.com

Rekening : BNI Cabang Unair No Rek. 0112443027 (Hani Plumeriastuti)
Veterinaria Medika diterbitkan oleh Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Ketentuan Umum Penulisan Naskah

1. Ketentuan Umum
 - a. Veterinaria Medika memuat tulisan ilmiah dalam bidang Kedokteran Hewan dan Peternakan, berupa hasil penelitian, artikel ulasan balik (review/mini review) dan laporan kasus baik dalam Bahasa Indonesia maupun Bahasa Inggris.
 - b. Naskah/makalah harus orisinal dan belum pernah diterbitkan. Apabila diterima untuk dimuat dalam Veterinaria Medika, maka tidak boleh diterbitkan dalam majalah atau media yang lain.
2. Standar Penulisan
 - a. Makalah diketik dengan jarak 2 spasi, kecuali Judul, Abstrak, Judul tabel dan tabel, Judul gambar, Daftar Pustaka, dan Lampiran diketik menurut ketentuan tersendiri.
 - b. Alinea baru dimulai 3 (tiga) ketukan ke dalam atau (*First line 0.3"*).
 - c. Huruf standar untuk penulisan adalah Times New Roman 12.
 - d. Memakai kertas HVS ukuran A4 (21,0 x 29,7 cm).
 - e. Menggunakan bahasa Indonesia.
 - f. Tabel/Illustrasi/Gambar harus hitam putih, amat kontras atau *file scanning* (apabila sudah disetujui untuk dimuat).
3. Tata cara penulisan naskah/makalah ilmiah
 - a. Tebal seluruh makalah sejak awal sampai akhir maksimal 12 (dua belas) halaman.
 - b. Penulisan topik (Judul, Nama Penulis, Abstrak, Pendahuluan, Metode dst.) tidak menggunakan huruf kapital (*setence*) tetapi menggunakan *Title Case* dan diletakkan di pinggir (sebelah kiri).
 - c. Sistematika penulisan makalah adalah Judul, Nama Penulis dan Identitas, Abstrak dengan Key words, Pendahuluan, Materi dan Metode, Hasil dan Pembahasan, Kesimpulan, Ucapan Terima Kasih (bila ada), Daftar Pustaka dan Lampiran.
 - d. Judul harus pendek, spesifik, tidak boleh disingkat dan informatif, yang ditulis dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris.
 - e. Nama penulis di bawah judul, identitas dan instansi penulis harus jelas, tidak boleh disingkat dan ditulis di bawah nama penulis.
 - f. Abstrak maksimal terdiri dari 200 (dua ratus) kata, diketik 1 (satu) spasi dalam bahasa Indonesia dan Inggris.
 - g. Kata kunci (*key words*) maksimum 5 (lima) kata setelah abstrak.
 - h. Materi dan Metode memuat peralatan/bahan yang digunakan terutama yang spesifik.
 - i. Daftar Pustaka disusun secara alfabetik tanpa nomor urut. Singkatan majalah/jurnal berdasarkan tata cara yang dipakai oleh masing-masing jurnal. Diketik 1 (satu) spasi dengan paragraf *hanging 0.3"* dan before 3.6 pt. Proporsi daftar pustaka, Jurnal/Majalah Ilmiah (60%), dan *Text Book* (40%). Berikut contoh penulisan daftar pustaka berturut-turut untuk *Text Book* dan Jurnal.
Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 1996. *Immunology*. 4th Ed. Black Well Scientific Pub. Oxford.
Staropoli, I., J.M. Clement, M.P. Frenkiel, M. Hofnung and V. Deuble. 1996. Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus neutralization antibody in mice and protects them from virus challenge. *Am.J. Trop. Med. Hygi*; 45: 159-167.
 - j. Tabel, Keterangan Gambar atau Penjelasan lain dalam Lampiran diketik 1 (satu) spasi, dengan huruf Times New Roman 12.
4. Pengiriman makalah dapat dilakukan setiap saat dalam bentuk cetakan (*print out*) sebanyak 3 (tiga) eksemplar. Setelah ditelaah oleh Tim Editor Veterinaria Medika, makalah yang telah direvisi penulis segera dikembalikan ke redaksi dalam bentuk cetakan 1 (satu) eksemplar dengan menyertakan makalah yang telah direvisi dan 1 (satu) disket 3.5" (Progam MS Word / IBM Compatible) dikirim ke alamat redaksi: Veterinaria Medika, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo, Surabaya 60115, Telepon 031-599.2785; 599.3016; Fax. 031-599.3015; e-mail : vetmed_ua@yahoo.com
5. Ketentuan akhir
Terhadap naskah/makalah yang dikirim, redaksi berhak untuk:
 - a. memuat naskah/makalah tanpa perubahan
 - b. memuat naskah/makalah dengan perubahan
 - c. menolak naskah/makalah
6. Redaksi tidak bertanggung jawab atas isi naskah/makalah.
7. Makalah yang telah dimuat dikenai biaya penerbitan dan biaya pengiriman.
8. Penulis/pelanggan dapat mengirimkan biaya pemuatan makalah/langganan lewat transfer bank BNI Cabang Unair No Rek. 0112443027 (Hani Plumeriastuti) harga langganan Rp 100.000,- (Seratus ribu rupiah) pertahun sudah termasuk biaya pengiriman.
9. Semua keputusan redaksi tidak dapat diganggu gugat dan tidak diadakan surat menyurat untuk keperluan itu.

DAFTAR ISI

- 1 Genotyping *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada Ikan Kerapu di Wilayah Jawa Timur dan Nusa Tenggara Barat 227-244
Devy Rahmawati Putri, Suwarno, Gunanti Mahasri
- 2 Pengaruh Suplementasi Insulin Transferrin Selenium (ITS) pada Media Maturasi TCM-199 terhadap Diameter Oosit Sapi 245-250
Reza Mahendra Yudha Permana, Widjiati, Budi Utomo, Tjuk Imam Restiadi
- 3 Pengaruh Pemberian Lactoferrin terhadap Pembentukan Biofilm *Klebsiella pneumoniae* yang Diisolasi dari Kasus Mastitis pada Sapi Perah 251-262
Ratna Sari Yudaningrum, Anwar Ma'ruf, Nenny Harijani
- 4 Suplementasi Insulin Transferrin Selenium pada Maturasi *In Vitro* *Cumulus Oocyte Complex* (COC) terhadap Ekspresi *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) dan Ekspansi Kumulus 263-270
Galuh Chandra Agustina, Widjiati, Pudji Srianto, Hani Plumeriastuti
- 5 Kemampuan Adaptasi dan Stabilitas Antigen Virus Newcastle Disease Isolat Lokal pada Kultur Sel HELA 271-278
Margaretha Prayudhi Novantiana, Rahaju Ernawati, Kusnoto, Fedik Abdul Rantam
- 6 Perbandingan Titer Antibodi Anti *Brucella abortus* dengan CFT dan iELISA pada Sapi dengan RBT Positif 279-284
Eni Rohyati, Suwarno, At. Soelih Estoepangestie
- 7 Potensi Cuka Apel sebagai Pengobatan Alternatif terhadap Lama Waktu Kesembuhan Luka Infeksi *Staphylococcus aureus* pada Mencit 285-288
Erni Rosilawati Sabar Iman
- 8 Suplementasi Protein Spesifik Membran Spermatozoa dalam Media Diluter Semen Beku sebagai Upaya Peningkatan Kualitas Semen Beku Sapi *Post Thawing* 289-300
Tatik Hernawati, Sri Mulyati

- 9 Potensi Alkaloid Sambiloto (*Andrographis paniculata L*) terhadap Total Leukosit dan Hitung Jenis Leukosit pada Tikus setelah Diinfeksi *Salmonella typhimurium* 301-312
 Imam Mustofa, Wurlina, Dewa Ketut Meles
- 10 Potensi Outer Membrane Protein *Brucella abortus* Isolat Lokal untuk Pengembangan Vaksin Brucellosis Di Indonesia 313-320
 Didik Handijatno, Hani Plumeriastuti, Wiwiek Tyasningsih
- 11 Pemanfaatan Whole Serum PMSG (*Pregnat Mare Serum Gonadotropin*) dengan Sepadex untuk Meningkatkan Kejadian Birahi pada Kambing Peranakan Ettawa 321-328
 Heri Agoes Hermadi
- 12 Uji Toksisitas Ekstrak Daun Singawalang (*Petiveria alliaceae*) terhadap Hipertrofi Otot Jantung Mencit Jantan Putih (*Mus musculus*) 329-334
 Nurmawati Fatimah, Setiawan Koesdarto
- 13 Pengaruh Benzo(A)Pyrene terhadap Terjadinya Kanker Mama pada Mencit 335-340
 Ernisa Chumaidah, Dewa Ketut Meles, Wurlina Anwar Ma'ruf

Suplementasi Protein Spesifik Membran Spermatozoa dalam Media Diluter Semen Beku Sebagai Upaya Peningkatan Kualitas Semen Beku Sapi *Post Thawing*

Supplementation of Specific Protein Membrane Spermatozoa in Freezing Medium to Improvement Efforts a Succes Cattle Frozen Semen Quality *Post Thawing*

Tatik Hernawati, Sri Mulyati

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair jl. Mulyorejo Surabaya-60115

Telp 031-5992785, Fax.031-5993015

Email : hernawati_tatik@yahoo.com

Abstract

This research aims to improve the quality of post-thawing of frozen semen, with the addition of specific protein osteopontin spermatozoa membrane into a freezing medium. This research was conducted in the laboratory and in the field that includes the stages following methods frozen semen quality test supplemented osteopontin spermatozoa membranes isolated cow. The test includes: measuring the levels of osteopontin using the standard osteopontin ELISA, determination of the optimum dosage of the addition of osteopontin in freezing media on the quality of spermatozoa post thawing, which include : the percentage of motility, viability, plasma membrane intact and acrosome intact hood. Results showed that the addition of specific protein osteopontin membrane of the spermatozoa in the semen freezing diluter media there are significant differences ($p < 0.05$) compared with no addition of osteopontin this means that the addition of specific protein osteopontin membrane can increase the number of spermatozoa motility, viability, plasma membrane intact (MPU). The conclusion from this study is the addition of a specific protein osteopontin spermatozoa membrane can improve the quality of frozen semen and improvement of in vitro fertilization.

Keywords: specific proteins, membrane spermatozoon, Diluter, Semen Quality

Pendahuluan

Pemeriksaan air mani pada pejantan sebagai tolak ukur tingkat kesuburan selama ini hanya dilakukan melalui pemeriksaan makros dan mikroskopis saja. Selain pemeriksaan tersebut bisa juga dilihat dari silsilahnya (*pedigree*), yaitu

seleksi yang didasarkan pada reputasi yang ditunjukkan oleh nenek moyang sapi yang bersangkutan tetapi uji ini kurang akurat, karena suatu *bloodline* atau keturunan dari individu yang baik tidak selalu berarti bahwa ciri yang baik itu akan diwariskan melalui seleksi dan perkawinan (Blakely

dan Bade, 1994; Copeland, 1994). Uji kesuburan pejantan yang lain adalah didasarkan pada uji *progeny* yaitu suatu uji untuk melihat sifat heritabilitasnya tetapi uji ini memakan waktu lama kurang lebih 4-6 tahun sehingga tidak efisien (Tomaszewska dkk., 1991; Akiko, 1998).

Untuk melengkapi pemeriksaan air mani tersebut perlu juga dilakukan pemeriksaan molekuler, mengingat bahwa dalam seminal plasma ada kumpulan antigen yang dapat dipakai untuk menunjukkan kesuburan air mani, spermatozoa sebelum mampu melakukan fertilisasi dengan sel telur akan mengalami kapasitas di dalam saluran reproduksi sapi betina. Kapasitas sel spermatozoa dapat dirangsang oleh protein spesifik osteopontin (OPN). OPN adalah protein dengan berat molekul 55 kilodalton yang disekresikan oleh kelenjar ampula dan tuba falopii sehingga keberadaan OPN dalam membran spermatozoa berkaitan erat dengan kualitas dan fertilitas hewan jantan (Cancel *et al.*, 1997, Rodriguez *et al.*, 2000). Penelitian Maura (2006), pejantan dengan semen yang mengandung OPN (semen yang di membran plasmanya mengandung protein dengan BM 55 kDa) mempunyai tingkat kesuburan yang lebih tinggi antara 20 sampai 25 % bila dibanding dengan semen pejantan tanpa OPN. Pada tahun 2007 Erikson *et al.*, mengatakan bahwa dari 8 sapi perah jantan yang diperiksa air mani mengandung OPN mempunyai potensi yang besar dalam keberhasilan pembuahan dibandingkan yang tidak mengandung OPN. Killian *et al.*, (1993) menyatakan bahwa di dalam membran spermatozoa terdapat empat protein spesifik yang sangat berhubungan dengan fertilitas, dua diantaranya *prostaglandin-D*

syntase (Moura, 2005) dan osteopontin (OPN) (Cancel *et al.*, 1997). Pada Membran spermatozoa sapi yang mempunyai fertilitas tinggi ternyata memiliki kadar OPN 2,6 lebih tinggi dibandingkan sapi perah yang mempunyai fertilitas rendah (Killian *et al.*, 1993). Menurut Erikson (2006) dan Erikson *et al.*, (2007) OPN ditemukan seminal plasma dan membran sperma sapi perah yang telah diejakulasikan, dimana lokasi OPN ditemukan pada bagian post-akrosomal kepala dan bagian leher spermatozoa melalui pemeriksaan menggunakan metode imunositokimia. Untuk itu perlu diupayakan peningkatan kesuburan air mani beku dengan penambahan OPN dalam media pembekuan.

Materi dan Metode Penelitian

Pada penelitian tahap I diperlukan semen sapi yang dipisahkan antara spermatozoa dengan plasma semen untuk mendapatkan protein spesifik osteopontin dari membran spermatozoa yang akan ditambahkan dalam bahan pengencer semen beku sapi

Bahan dan reagen yang dipakai dalam penelitian tahap I adalah phosphate buffer saline (PBS) pH 7, tween 20 (polyoxyethylen sorbitan monolaurat, Art, 822184, Merck-Schuchardt, Munchen), phenyl methene sulfonil fluorid (PMSF, Biorad), etanol absolut, buffer Tris-HCl, NaN₃ (Sodium Azide), mAb-Osteopontin (ABGENT), Osteopontin standar (SIGNALCHEM), substrat Western Blue (Western Blue Stabilized. Substrate for alkaline phosphatase cat # S 3841, Promega Co., USA), Anti IgG Rabbit AP (Anti Rabbit IgG C (Fc), AP Conjugate, Catalog # S 3731, Promega Co.USA), Anti IgG Rabbit SA-HRP (Catalog # S 3731, Promega Co.USA),

nitroselulosa (Hybond-C pure, nitrocellulose membrane, Amersham Life Science-England), kertas tissue, Adenosin triphosphate (ATP) BM 551,2 g/mol, histon (sigma, H 5505), TCA (*Tri Chlor acetic Acid*) 8%, BO caffeine (*Brickett and Olliphants Caffein*), Tris Cl, KCl, NaCl, KH_2PO_4 , Tween-20, Magnesium Klorida (MgCl_2), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , etanol absolut ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), aqua DM (*deionized water*) steril, bis-akrilamida, sodium dodecyl sulphate (SDS), Ammonium per sulfate (APS), *N,N,N',N'* tetramethyl etylene diamina (TEMED), dan *bromophenol blue*, Sedangkan peralatan yang digunakan adalah Blotter (Bio-Dot Apparatus, BIORAD-USA), microplate, vacuum pump, vortex, gunting, pipet eppendorf, pipet Pasteur, millipore, plastik tip, gunting, kantong selofan, sentrifus, tabung reaksi, *refrigerated centrifuge*, freezer, autoclaf, labu takar 10 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL, pipet volume 10 mL, gelas ukur 100 mL, beaker gelas 10 mL, 250 mL, 1000 mL, pipet tetes, pengaduk gelas, gelas arloji, pengaduk magnetic, digital pH meter, neraca analitik (sartorius basic P-160), tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), incubator (memmert), vortex (Guo-Huq), sonikasi (Branson 200), spektrofotometer UV, mini 2D elektroforesis protein II (Biorad), *autoclave*, stirer, corong gelas, bola hisap, botol semprot, eppendof dan lemari pendingin.

Bahan dan reagen yang digunakan pada penelitian tahap II adalah TCM-199, Bovine Serum Albumin (BSA), Phosphate Buffer Saline (PBS), NaCl fisiologis, gliserol, susu skim, kuning telur, eosin-negrosin, nitrogen cair, gentamycin, kertas tissue. Peralatan yang digunakan adalah *cool top*, *water bath*, vagina buatan sapi,

laminar flow, straw, *filling-sealing*, goblet, canister, container, cawan petri, pipet Pasteur, tabung reaksi, mikroskop *dissecting*, mikroskop inverted, mikroskop optik, obyek glass, *cover glass*, *insemination gun*.

Prosedur Penelitian

Penentuan Kadar Osteopontin dengan Metode ELISA

Dilakukan *coating* dengan antigen (Osteopontin 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-Osteopontin (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).

Penampungan semen dan pemeriksaan kualitas spermatozoa

Semen sapi jantan ditampung menggunakan vagina buatan yang dilengkapi dengan tabung penampung berskala, pemeriksaan makroskopis spermatozoa meliputi : volume, warna, bau, pH dan kekentalan dan pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi spermatozoa dengan spektrofotometer.

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 akuades 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 mengaliri 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.

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 Osteopontin, Perlakuan 1 (P1) : Osteopontin 5 $\mu\text{g/ml}$, Perlakuan 2 (P2): Osteopontin 10 $\mu\text{g/ml}$ dan Perlakuan 3 (P3) : Osteopontin 20 $\mu\text{g/ml}$. 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 .

Perhitungan volume pengencer berdasarkan dosis Inseminasi Buatan yaitu konsentrasi spermatozoa per straw (0,25 ml). Total spermatozoa yang motil per ejakulat yang dapat diperhitungkan menjadi jumlah straw semen. Dosis IB

$$\text{volume pengencer} = \frac{8 \times 850.10^6 \times 70\% \times 0,25 \text{ ml}}{25.1010^6} = 95,2 \text{ ml}$$

Melakukan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa *post thawing*

Pemeriksaan motilitas spermatozoa terdiri dari pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif. Sepuluh mikroliter suspensi semen pada tiap kelompok perlakuan ditetaskan 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. Persentase pergerakan spermatozoa dihitung berdasarkan rataan persentase motilitas untuk semua lapangan pandang yang dihitung (Tuty, 2004).

Melakukan pemeriksaan persentase spermatozoa yang hidup *post thawing*

Pemeriksaan spermatozoa yang hidup dengan cara membuat preparat ulas. 10 µl suspensi semen ditetaskan pada bagian ujung gelas obyek, kemudian tetaskan 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

pada sapi sebesar 25–30 juta spermatozoa/ straw dengan volume 0,25 ml. Misalnya : volume semen 8 ml, konsentrasi spermatozoa 850.10^6 sp/ml, motilitas 70% maka,

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)

Pemeriksaan membran plasma utuh spermatozoa *post thawing*

Pemeriksaan membran plasma dan tudung akrosom utuh spermatozoa dilakukan dengan metode *hypoosmotic swelling test* (HOST) yang dikembangkan oleh Jayendra *et al.* (1984). Suspensi spermatozoa yang berasal dari semen beku sapi yang telah di suplementasi dengan Osteopontin 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 $2H_2O$, 13,52 g fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter aquades). Selanjutnya diinkubasikan selama 1 jam dalam inkubator CO_2 pada suhu $37^\circ C$. 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 pembengkakan bagian ekor yang diikuti ekor berputar dengan pancaran warna terang, sedang spermatozoa dengan membran plasma yang sudah rusak ditandai dengan tidak adanya pembengkakan kepala dengan ekor lurus.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini ditabulasikan secara diskriptif. Persentase spermatozoa yang hidup, motilitas dianalisis dengan uji Univariat. Bila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan uji Tukey (Santoso, 2005)

Hasil dan Pembahasan

Data penelitian dan analisis hasil penelitian yang sesuai dengan tujuan penelitian. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel, foto atau gambar yang disusun sesuai dengan tahapan penelitian yaitu :

Tabel 1. Nilai rata-rata dan simpangan baku motilitas spermatozoa *post thawing* keempat perlakuan.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata motilitas (%) ± Simpangan baku
P0	40.3000 ^a ± 1.98281
P1	43.3087 ^a ± 2.13648
P2	50.8950 ^b ± 1.75890
P3	54.3037 ^c ± 3.34867

Superskrip yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada keempat perlakuan (p<0,05)

Keterangan :

- P₀ = Semen segar + OPN 0µg/50juta spermatozoa+PBS
- P₁ = Semen segar + OPN 5µg/50 juta spermatozoa+PBS
- P₂ = Semen segar + OPN 10µg/50 juta spermatozoa+PBS
- P₃ = Semen segar + OPN 20µg/50 juta spermatozoa+PBS

Berikut merupakan hasil analisa data viabilitas spermatozoa pasca *thawing* dengan menggunakan *Analysis of variance* (Anova) yang dilanjutkan dengan Uji BNT 5%

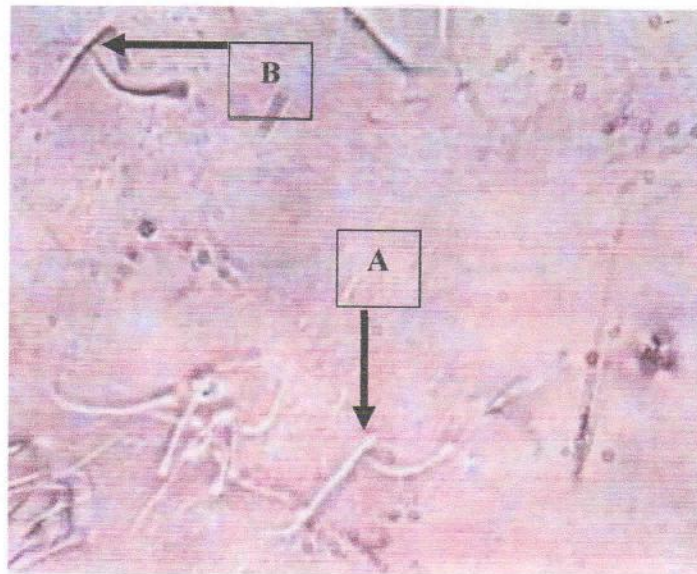
Tabel 2. Nilai rata-rata dan simpangan baku viabilitas spermatozoa *post thawing* dari keempat perlakuan.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata viabilitas (%) ± Simpangan baku
P0	49.7750 ^a ± 1.42264
P1	53.5375 ^b ± 3.25974
P2	61.6950 ^c ± 1.80176
P3	65.5325 ^d ± 1.26104

Superskrip yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada keempat perlakuan (p<0,05).

Keterangan :

- P₀ = Semen segar + OPN 0µg/50juta spermatozoa+PBS
- P₁ = Semen segar + OPN 5µg/50 juta spermatozoa+PBS
- P₂ = Semen segar + OPN 10µg/50 juta spermatozoa+PBS
- P₃ = Semen segar + OPN 20µg/50 juta spermatozoa+PBS



Gambar 1. Hasil pewarnaan spermatozoa dengan zat warna eosin-negrosin. Spermatozoa hidup dan mati yang tampak di bawah mikroskop cahaya dengan pewarnaan eosin negrosin (pembesaran 400X).
 A. Spermatozoa yang hidup tampak tidak terwarnai (panah hitam)
 B. Spermatozoa yang mati tampak berwarna biru keunguan (panah merah)

Berikut merupakan hasil analisa data MPU spermatozoa pasca *thawing* dengan menggunakan *Analysis of variance* (Anova) yang dilanjutkan dengan Uji BNT 5%:

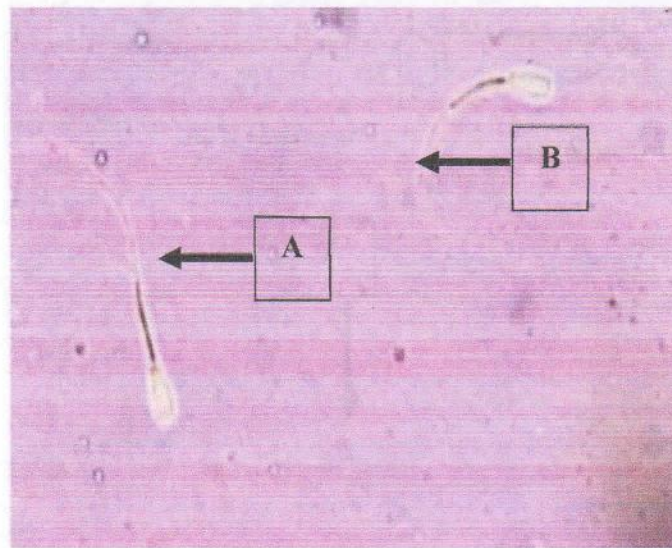
Tabel 3. Nilai rata-rata dan simpangan baku membran plasma utuh (MPU) spermatozoa *post thawing* dari keempat perlakuan.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata MPU (%) ± Simpangan baku
P0	41.5938 ^a ± 1.41768
P1	43.1775 ^a ± 1.72216
P2	46.0500 ^b ± 2.33971
P3	51.2488 ^c ± 1.62553

Superskrip yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada keempat perlakuan ($p < 0,05$).

Keterangan:

- P0: Kontrol (tanpa ditambah osteopontin)
- P1: Ditambah OPN 5 µg/ 50 juta spermatozoa dalam media pembekuan
- P2: Ditambah OPN 10 µg/ 50 juta spermatozoa dalam media pembekuan
- P3: Ditambah OPN 20 µg/50 juta spermatozoa dalam media pembekuan



Gambar 2. Hasil pemeriksaan MPU spermatozoa dengan zat warna eosin-negrosin. MPU spermatozoa sapi perah *post thawing* yang tampak di bawah mikroskop cahaya (pembesaran 400X).

- A. Spermatozoa yang mengalami kerusakan membran plasma (ekor lurus). panah merah:
- B. Spermatozoa dengan membran plasma baik (ekor bengkok).

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

Analisis data persentase motilitas spermatozoa yang ditunjukkan pada tabel 5.1 tampak bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol P₀ dengan kelompok perlakuan P₁ akan tetapi ada perbedaan yang signifikan P₂, P₃. Kemudian, analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan

antara kelompok perlakuan ($p < 0,05$) ini menunjukkan bahwa suplementasi protein spesifik osteopontin dapat meningkatkan motilitas spermatozoa pada dosis 10 µg/ 50 dan 20 µg/ 50, dan pada dosis 5 µg/ 50 masih belum cukup kuat untuk meningkatkan motilitas spermatozoa setelah thawing, Erikson (2007) membuktikan bahwa penambahan OPN pada spermatozoa mampu meningkatkan aktivitas mitokondria yang diketahui melalui pewarnaan dengan *MitoTracker Red*. Terjadinya peningkatan aktivitas mitokondria diharapkan mampu menghasilkan energi yang cukup untuk motilitas spermatozoa. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini, dimana penambahan OPN pada diluter semen beku mampu meningkatkan motilitas spermatozoa *post thawing*.

Penambahan osteopontin dalam media pembekuan akan memicu peningkatan reseptor osteopontin pada

membran 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 meningkat akan menyebabkan kapasitas dan hiperaktivasi motilitas spermatozoa. Terjadinya kapasitas spermatozoa akan memungkinkan terjadinya pengikatan membran spermatozoa dengan zona pelusida sel ovum, selanjutnya akan menstimulasi spermatozoa untuk mengalami reaksi akrosom

Menurut Holt (2000) proses pembekuan secara biologis, sel membutuhkan adaptasi yang tinggi terhadap tekanan osmotik dan *shock* termik yang terjadi selama *freezing* dan *thawing*. Kerusakan seluler yang terjadi terutama pada membran seluler yakni plasma dan mitokondria, hingga lebih parah lagi terjadi pada inti. Kerusakan membran berdampak pada viabilitas dan faktor-faktor metabolik, termasuk *adenosine triphosphat* (ATP), lebih jauh keadaan ini akan mempengaruhi fertilitas spermatozoa.

Analisis data menunjukkan bahwa kelompok perlakuan P0 tidak berbeda nyata dengan kelompok P1 ($P > 0,05$), namun berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P2, P3 ($P < 0,05$). Masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan bahwa antara kelompok P1, P2 berbeda nyata dengan kelompok P3 ($P > 0,05$). Urutan persentase viabilitas dari yang terendah hingga tertinggi berturut-turut yaitu P0, P1, P2, P3. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa setelah *post thawing* dengan penambahan osteopontin dapat meningkatkan

angka viabilitas *post thawing*. Studi sebelumnya (Erikson, 2006) turut mendukung pernyataan ini, dimana spermatozoa yang telah diinkubasi dengan osteopontin menghasilkan viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak ditambah dengan osteopontin. Osteopontin merupakan salah satu protein yang berperan dalam ketahanan sel (Scatena *et al.*, 1998; Sodek *et al.*, 2000). Diketahui bahwa, semen babi dengan *freezability* yang baik mengandung protein osteopontin lebih tinggi. Pengaruh konsentrasi penambahan osteopontin ke dalam bahan pengencer semen beku terhadap persentase viabilitas sapi perah FH sebanyak $10\mu\text{g}/50$ juta dan $20\mu\text{g}/50$.

Menurut Anzar *et al* (2002) terdapat beberapa faktor yang menyebabkan kematian spermatozoa karena kerusakan permeabilitas membrane, yaitu kerja ion Ca^{2+} yang menginisiasi melalui aktivasi enzim endonuclease (yang akan menghancurkan DNA dalam inti spermatozoa) dan transglutaminase yang berikatan kovalen dengan protein membrane melalui pembentukan ikatan isopeptida yang menyebabkan kematian sel, selain itu adanya perubahan susunan membrane terutama susunan fosfolipid penyusun membrane karena terjadi translokasi fosfatidil serin dari lapisan dalam membrane menuju ke lapisan luar membrane, hal ini terjadi karena paparan suhu beku, juga akan menyebabkan kematian spermatozoa.

Osteopontin yang ditambahkan dalam media pembekuan diduga berfungsi menstabilkan membrane melalui ikatan hydrogen antara asam amino penyusun protein membrane, interaksi ini akan mencegah denaturasi protein membrane.

Apabila terjadi akumulasi denaturasi protein membran akan menyebabkan kematian spermatozoa. 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 (Esteves, *et al.*, 2005).

Baik membran plasma maupun membran mitokondria spermatozoa sapi rentan terhadap pengaruh kriopreservasi. Pengaruh utama kriopreservasi terhadap sel spermatozoa ialah penurunan motilitas dan daya hidup, perubahan permiabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran. Timbulnya peroksidasi lipid selama proses pembekuan semen mempengaruhi kerusakan membran pada sel spermatozoa. Kerusakan fisik salah satunya dapat berupa kerusakan plasma dan membran akrosom (Ismaya, 2009).

Analisis data persentase MPU spermatozoa yang ditunjukkan oleh tabel 5.3 tampak bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol P₀ dengan kelompok perlakuan dengan kelompok P₁, namun terdapat perbedaan yang signifikan yang nyata antara kelompok kontrol dengan kelompok P₂ dan P₃ ($p > 0,05$). Secara berurutan, nilai persentase MPU dari kelompok seluruh perlakuan mulai dari yang terendah sampai tertinggi adalah P₀, P₁, P₂, P₃.

Osteopontin merupakan ekstraselular matriks glikoprotein yang disekresikan ke dalam seminal plasma dan cairan kelenjar asesoris (Moura *et al.*, 2006; Moura *et al.*, 2007). Susunan glikoprotein osteopontin diduga berkaitan dengan pengaruhnya terhadap stabilisasi membran spermatozoa. Hal ini juga berkaitan dengan interaksi

dengan lemak dalam membentuk lipoprotein sehingga menyebabkan membran lebih lentur tidak mudah rapuh. Adanya ikatan antara osteopontin, glukosa dan lemak dapat menyebabkan partikel-partikel antar membran terkumpul, dengan demikian terjadi kerapatan dari komponen membran sehingga semakin stabil dalam proses pendinginan, pembekuan maupun pencairan kembali setelah pembekuan, semakin stabilnya membran spermatozoa maka metabolisme berjalan normal, fungsi spermatozoa menjadi lebih baik.

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah penambahan protein spesifik osteopontin membran spermatozoa dapat meningkatkan kualitas semen beku meliputi peningkatan motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh (MPU) spermatozoa *post thawing*.

Daftar Pustaka

- Anzar, M., L. Hei, M. M. Buhr, T. G. Kroetsch and K. P. Pauls. 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flo Cytometry and Its Relationship with Fertility. *Biol of Reprod.* 66 :354-360
- Aulanni'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Cetakan pertama. Penerbit Citra Mentari Group. Malang. 19-27
- Blakely, J. dan D.H. Bade. 1994. Ilmu Peternakan. Cetakan keempat. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. 156-164.
- Caballero, J., G. Frenette and R. Sullivan. 2010. Post Testicular Sperm Maturational changes an Protosome. *Vet Medicine International.* Cambridge. 1 – 25.

- Cancel, A.M., A. C. David and G.J. Killian. 1997. Osteopontin is the Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. Department of Dairy and Animal Sci and The Department of Biology. University park. Pennsylvania. 1293-1301.
- Copeland, L. 1994. Pedigree Analysis as a Basis of Selecting Bull Calves. *Journal of Dairy Science*. 17 (2) 93-102.
- Erikson D.W., A.L. Way, R.P. Bertolla, D.A. Chapman and G.J. Killian. 2007. Influence of osteopontin, casein and oviductal fluid on bovine sperm capacitation. *Anim.Reprod* 4:103-112
- 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.
- Hafez, E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th.Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Holt.W.V. 2000. Basic Aspect of Frozen Storage of Semen. *Animal Reprod Sci* 62: 47-48
- Ismaya. 2009. Konservasi Spermatozoa Perkembangan, Hasil dan Potensi di Masa Datang. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Peternakan. Universitas Gadjah Mada.
- Kim, S and T. Shin. 2007. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis. *J. Vet. Sci.* 8: 107-110.
- Lemma, A. 2011. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, Artificial Insemination in Farm Animals, Dr Milad Manafi (ed) ISBN. 978-933-307-312-5, in Tech
- Martin, G., O. Sabido, P. Durand and R. Levy. 2004. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. *Biology of Reproduction* 71:28-37.
- Moura, A.A., H. Koc, D.A. Chapman and G.J. Killian, G.J. 2007. A comprehensen proteomic analysis of the accessory sex gland fluid of mature Holstein bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 98: 169-188.
- Moura, A.A., H. Koc, D.A. Chapman and G.J. Killian. 2006. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J. Androl.* 27: 201-211.
- Naz, R.K. and Rajesh P.B. 2004. Role of Thyrosine Phosphorilation in Sperm capacitation/Acrosome Reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2 : 75-86
- 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. 522 - 556.
- Rodriguez, C.M., R.D. Jonathan and G.J. Killian. 2000. Osteopontin Gene Expression in The Holstein Bull Reproductive Tract. Department of Dairy and Animal Sci and The Department of Biology. University park. Pennsylvania. 414-419.

- Santoso, G. 2005. Metodologi Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif. Cetakan pertama. Prestasi Pustaka Publisher. 27-44.
- Scatena, M., M. Almeida, M. L. Chaisson, N. Fausto, R. F. Nicossia and C. M. Giachelli. 1998. NF κ B Mediates $\alpha_v\beta_3$ Integrin-Induced Endothelial Cell Survival. *J. Cell Biol.* 141-1083-93.
- Sodek JB., B. Ganss and M. D. McKee. 2000. Osteopontin Critical Reviews in Oral Biology and Medicine <http://crowsagepub.com/content/11/3/279>
- Susilawati, T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Tomaszwaska, M.W., I. K. Utama, I. G. Putu dan T.D. Chaniago. 1991. Reproduksi, Tingkah laku, dan Produksi Ternak Indonesia. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 88.