

DISERTASI

**STUDI PROTEIN PLASMA SEMEN SEBAGAI BIOMARKER
FERTILITAS PADA SAPI BALI**

*STUDY OF SEMINAL PLASMA PROTEIN AS BIOMARKERS FERTILITY IN
BALI CATTLE*

HIKMAYANI ISKANDAR

P013191033



**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**STUDI PROTEIN PLASMA SEMEN SEBAGAI BIOMARKER
FERTILITAS PADA SAPI BALI**

*STUDY OF SEMINAL PLASMA PROTEIN AS BIOMARKERS FERTILITY IN
BALI CATTLE*

Disertasi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor

Program Studi Ilmu Pertanian

Disusun dan diajukan oleh

HIKMAYANI ISKANDAR

P013191033

Kepada

PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2022

DISERTASI
STUDI PROTEIN PLASMA SEMEN SEBAGAI BIOMARKER FERTILITAS
PADA SAPI BALI

Disusun dan diajukan oleh

HIKMAYANI ISKANDAR
NIM P013191033

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Doktor Program Studi Ilmu Pertanian
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
pada tanggal 7 Desember 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Promotor



Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DES., DEA.
Nip 19570129 198003 1 001

Ko-promotor



Prof. Dr. Dra. R. Iis Arifiantini, M.Si.
Nip 19600804 198103 2 001

Ko-promotor



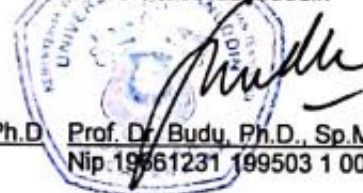
Dr. Hasbi, S.Pt., M.Si.
Nip 1977100 20050 1 001

Plt. Ketua Program Studi
Doktor Ilmu Pertanian



Prof. Dr. Baharuddin, S.T., M.Arch., Ph.D.
Nip 19690308 199512 1 001

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed.
Nip 1961231 199503 1 009

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, disertasi berjudul “Studi Protein Plasma Semen sebagai Biomarker Fertilitas pada Sapi Bali” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DES., DEA., Prof. Dr. Dra. Iis Arifiantini, M.Si., dan Dr. Hasbi, S.Pt., M.Si. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 7 Desember 2022



Hikmayani Iskandar
P013191033

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas karunia-Nya sehingga disertasi ini akhirnya dapat terselesaikan dengan baik. Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan disertasi ini dapat terampungkan. Penyusunan disertasi sebagai syarat kelulusan doktoral ini tidak akan selesai dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Penulis menyampaikan terima kasih kepada pihak yang membantu baik langsung maupun tidak langsung. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi atas beasiswa yang telah diberikan kepada penulis melalui beasiswa Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) *batch* IV periode 2018-2022.
2. JASSO *scholarship* melalui program *Six University Initiative Japan-Indonesia* (SUIJI) untuk *join degree program* di Universitas Kagawa, Jepang tahun 2019-2020.
3. Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi atas beasiswa yang telah diberikan melalui program Peningkatan Kualitas Publikasi Internasional (PKPI) PMDSU tahun 2021.
4. Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DES. DEA sebagai promotor, Prof. Dr. Dra. R. lis Arifiantini, M.Si sebagai ko-promotor-1, dan Dr. Hasbi, S.Pt., M.Si sebagai ko-promotor-2 yang telah memberikan arahan, saran, masukan, kritikan, dan dorongan semangat sejak penulisan proposal, penelitian, penulisan jurnal hingga disertasi.
5. Prof. Dr. Ir. Lellah Rahim, M.Sc., IPU., ASEAN Eng., Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco, M.Sc., Prof. Ir. Muhammad Yusuf, S.Pt., Ph.D., IPU., dan Dr. Muhammad Ihsan A. Dagong, S.Pt., M.Si. selaku penguji proposal, seminar kemajuan penelitian, ujian hasil, ujian tutup, dan ujian terbuka. Saran dan kritikan yang diberikan sangat membantu dalam perbaikan tulisan ini.
6. Prof. Dr. Ir. Syahrudin Said, M.Agr.Sc (Animal Repronomics Research Group, Research Center for Applied Zoology, National Research and Innovation Agency, Bogor) atas kesediaannya sebagai penguji luar komisi pada ujian tertutup dan ujian terbuka.
7. Dr. Syahdar Baba, S.Pt., M.Si., selaku Dekan Fakultas Peternakan, Prof. Dr. Budu, Ph.D.,Sp.M(K),M.Med.Ed., selaku Dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin, Prof. Dr. Ir. Darmawan Salman, M.S., selaku Ketua Program Studi Doktor Ilmu Pertanian Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin, serta seluruh staf dan pegawai pascasarjana yang telah membantu dalam pengurusan administrasi.

8. Sugiyama Yasunori sensei, Yuuki Uezato, Nakane Tatsuto, Iida Satoshi, Tomohiro Iguchi, Kaede Inoue, Misato Yamada, Yuri Kohara, Takara Yamasaki, Taishiro Inoue, Suzuka Matsumoto, dan Yuki Nakagawa di Laboratorium *Animal Cell Biology, Kagawa University, Japan* atas ilmu, kebersamaan, dan bimbingannya dalam mengajari metode *TA Cloning, Plasmid Extraction, SDS-PAGE, PCR, Cell Culture, Protein Purification, dan Antibodies*. たのしかったです
9. Prof. Noël Homlgren dan Ibu Titi Homlgren atas bantuannya selama studi di Swedia.
10. Prof. Göran Andersson yang telah bersedia menjadi supervisor serta berbagi ilmu, membimbing, dan berbagi pengalaman berharga selama *join research* dan *manuscript collaboration* di *Department Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU)* tahun 2021-2022. Tack så mycket
11. Tytti Vanhala di *Department Animal Breeding and Genetics, SLU* yang telah mengajarkan metode *sequencing, RT-PCR, dan DNA preparation*; Bodil Ström Holst, Ph.D. atas kesediannya melibatkan dalam *research project (Anti-Mullerian Hormone)*; teman-teman *Ph.D students councils* SLU atas kebersamaan dan diskusi selama di SLU; serta seluruh dosen, peneliti, dan staf di *Department Animal Breeding and Genetics, SLU*.
12. Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Pucak, Maros, Sulawesi Selatan terkhusus kepada Ibu Sitti Farida, S.Pt., Majdah Pratiwi, S.Pt., dan Pak Usman, serta petugas penampung semen.
13. Kelompok Riset Repronmik Hewan, Pusat Penelitian Zoologi Terapan, Badan Riset, dan Inovasi Nasional (BRIN), Bogor, Indonesia, terkhusus kepada Prof. Dr. Ir. Syahrudin Said, M.Agr.Sc. atas izin untuk melakukan penelitian dan kepada Tulus Maulana, Spt, M.Si. untuk bantuan dalam mendampingi menganalisis kualitas semen menggunakan *Computer-assisted sperm analysis (CASA)*.
14. Ibu Dewi Asnita dari lab Bioteknologi Hewan, PAU IPB, Ibu Wiwit Ridhani, M.Si dari *Dermama Proteomics Laboratory*, dan Ibu Dewi dari Lab. *Proteomik-Advanced Lab*, IPB yang telah membantu proses analisis proteomik; serta Dr. Abdullah Baharun dari Universitas Djuanda Bogor atas bantuan dan diskusi dalam analisis proteomik.
15. Prof. Dr. Ir. Dorothea Agnes Rampisela, M.Sc. dan teman-teman SUIJI UNHAS atas motivasi dan semangatnya selama menyelesaikan studi.
16. Teman seperjuangan PMDSU Batch IV khususnya Erni Damayanti, S.Pt atas kebersamaan, diskusi, dukungan, dan semangatnya selama menyelesaikan studi Magister dan Doktor.

17. Mama dan Bapak tercinta, Ibu Ramliah dan Bapak Iskandar Karang, S.Ag., M.M, kakak-kakak, dan adik-adik tersayang serta keluarga besar tercinta untuk segalanya yang tak pernah henti memberikan kasih sayang, doa, dan dukungan.
18. Keluarga besar ibu Iis Arifiantini khususnya bapak, Mas Randi, teh Listi, dan dek Puspa atas kebaikannya selama penelitian di Bogor.
19. Teman-teman PPI Kagawa Jepang, khususnya kak Aisyah Haderus, Supriadi, Ph.D., Arum Tyas Suminar, M.Sc., Isty Putri Utami, S.KM., Adriyanus Ivan Pratama, M.Si, Sonia Dora Esa, M.Sc., Rahmaniar, M.Si; dan terkhusus untuk sahabat terbaik saya Shutaro Fujita, Saranta Sawettanun, P.hD., Alexa Obenewaa Quache, M.Sc., Chong Jia Wen, dan Akira Koda atas bantuan dan kebersamaannya selama di Jepang.
20. Teman-teman PPI Uppsala Swedia, khususnya Rano Kristofel, Desis Natalia Liu, Daniel Sethio, Ph.D., li Ratna Kosasih, M.Sc., Reza Fachrizal, Ph.D., Raden Annisa Dhini, M.Sc., Faikha Fairuz Firdausi, Mumtaz Naga Asrul Haqiqy, Lukas Bonar Nainggolan, M.Sc., Tri Ariyani, M.Sc., Jerry Faisal, Ratna Aini Hadi, Erina Prastyani, M.Sc., Gabriel Salim, M.Sc., dan Linda Juniar, Ph.D. atas kebersamaan dan bantuannya yang diberikan selama menjalani studi di Swedia.
21. Dr. Magfira, M.Si., Dr. drh. Vincentia Trisna Yoelinda, M.Si., Dr. Zulfi Amrina Rosyada, dan Dr. drh. Faisal Amri Satrio, Riskawati, M.Si atas bantuan, diskusi, dan kebersamaan selama penelitian di Bogor.
22. Sahabat-sahabat terbaik Isna Arliana Goccing, S.Ag., Nur Asiyah, S.Pd., Indah Nurul Washilah, S.T., Aisyah Aminny, S.Pd., drh. Nurul Fajriani, dan Nurbaity, S.Sos atas dukungan dan kebersamaannya.
23. Teman-teman di Lab Embrio In Vitro Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, khususnya Fara Fathiani, S.Pt dan Eka Hardiyani, S.Pt.
24. *Indonesia Bioinformatics and Biomolecular (INBIO)* sebagai wadah belajar dan *sharing* ilmu bioinformatika dan analisis molekuler.
25. Semua pihak yang telah mendukung dan membantu setiap proses sehingga penelitian dan penulisan karya ilmiah ini dapat diselesaikan.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Makassar, 7 Desember 2022

Hikmayani Iskandar

P013191033

v

ABSTRAK

HIKMAYANI ISKANDAR. *Studi Protein Plasma Semen sebagai Biomarker Fertilitas pada Sapi Bali* (dibimbing oleh **HERRY SONJAYA, RADEN IIS ARIFANTINI, dan HASBI**).

Penilaian untuk menyeleksi pejantan dilakukan dengan metode *Breeding Soundness Examination* (BSE) dan evaluasi rutin kualitas semen sebagai dasar penentu fertilitas. Namun, penilaian fertilitas pejantan berdasarkan BSE dan kualitas semen belum cukup untuk memprediksi fertilitas pejantan. Penelitian ini bertujuan untuk 1) mengevaluasi kualitas semen segar, semen beku, libido, dan konsentrasi testosteron sapi Bali; 2) menganalisis korelasi kualitas semen dengan berat molekul (BM) protein plasma semen; dan 3) mengidentifikasi protein plasma semen sebagai biomarker fertilitas sapi Bali. Penelitian ini menggunakan 10 ekor sapi Bali, karakteristik semen segar dan semen beku yang dievaluasi meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan membran plasma utuh (MPU). Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford, dan protein dikarakterisasi menggunakan gel elektroforesis poliakrilamida natrium SDS-PAGE. Pewarnaan gel menggunakan CBB dan marker PM2700. Identifikasi protein menggunakan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*. Hasil penelitian menunjukkan 1) karakteristik semen segar pada semua parameter kualitas berbeda nyata ($P < 0,05$), kecuali MPU ($P > 0,05$). Semen beku pada semua parameter kualitas berbeda nyata ($P < 0,05$), kecuali motilitas spermatozoa ($P > 0,05$). Libido pejantan sapi Bali di BIBD Pucak 60% tinggi dan 40% rendah serta konsentrasi testosteron bervariasi antar individu. Semua pejantan sapi Bali secara umum memiliki produktivitas semen beku yang baik. 2) Jumlah pita protein dengan berat molekul yang sama memiliki perbedaan ketebalan pita pada rentang 15 – 245 kDa. Korelasi antara kualitas semen dengan BM protein plasma semen menunjukkan korelasi positif ($P < 0,05$). Profil protein berdasarkan BM menggunakan SDS-PAGE dapat digunakan sebagai indikator tambahan selain BSE dalam seleksi calon pejantan. 3) Pola ekspresi protein plasma semen konsisten dengan kapasitas reproduksi fungsional yaitu protein spermadhesin 1 (SPADH1), C-type natriuretic peptide (NPPC), clusterin (CLU), apolipoprotein A-II (APOA2), inositol-3-phosphate synthase 1 (ISYNA1), dan sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1). Protein tersebut berperan dalam fungsi reproduksi spermatozoa seperti motilitas spermatozoa, kapasitas, dan reaksi akrosom. Pendekatan proteomik berbasis LC-MS/MS dalam penelitian ini dapat digunakan sebagai metode untuk mendeteksi biomarker fertilitas pejantan.

Kata kunci: plasma semen, protein, biomarker, fertilitas, kualitas semen, sapi Bali

ABSTRACT

HIKMAYANI ISKANDAR. *Study of Seminal Plasma Protein as Fertility Biomarkers in Bali Cattle* (supervised by **HERRY SONJAYA, RADEN IIS ARIFANTINI, and HASBI**).

Evaluation for selection of the best bull is conducted using the breeding soundness examination (BSE) method and routinely evaluates semen quality as the basis for determining the fertility. However, the assessment of bull fertility based on BSE and semen quality is not sufficient to predict its fertility. The study was aimed to 1) evaluate the quality of fresh semen, frozen semen, libido, and testosterone concentrations in Bali cattle; 2) evaluate the correlation between semen quality and seminal plasma protein molecular weight (MW); 3) identify seminal plasma protein as a fertility biomarker in Bali cattle. This study used 10 Bali cattle, fresh and frozen semen characteristics evaluated were motility, viability, abnormalities, and integrity of plasma membrane (IPM) of spermatozoa. Protein concentration in seminal plasma was determined by the Bradford method and were characterized using one-dimensional polyacrylamide sodium dodecylphosphate (1D-SDS-PAGE) gel electrophoresis. The Coomassie Brilliant Blue (CBB) was used to stain the gel, and the molecular weight of the protein was used as a PM2700 marker. Protein identification were analyzed using Liquid Chromatograph Mass Spectrometry (LC-MS/MS). The results shows 1) fresh semen characteristics differed significantly ($P < 0.05$) for all quality parameters, except plasma membrane integrity ($P > 0.05$). Frozen semen differed significantly ($P < 0.05$) in all quality parameters, except motility ($P > 0.05$). The libido of Bali cattle in the research site (BIBD Pucak) was 60% high and 40% low with varied testosterone concentration between individuals. All Bali cattle in general have good frozen semen productivity. 2) The number of protein bands with the same molecular weight and the differences in the thicknesses of protein bands in the range of 15–245 kDa. The correlation between semen quality and seminal plasma protein weight showed a positive correlation ($P < 0.05$). Based on the result SDS-PAGE, it can be used as an additional indicator in the selection of prospective bulls besides *breeding soundness examination* (BSE). 3) The expression pattern of seminal plasma protein was consistent with functional reproductive ability, such as spermadhesin 1 (SPADH1) protein, C-type natriuretic peptide (NPPC), clusterin (CLU), apolipoprotein A-II (APOA2), inositol-3-phosphate synthase 1 (ISYNA1), and sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1). These proteins play a role in spermatozoa reproductive functions such as spermatozoa motility, capacitation, and acrosome reactions. The LC-MS/MS-based proteomic approach in this study can be used as a method for detecting bull fertility biomarkers.

Keywords: *seminal plasma, protein, biomarkers, fertility, semen quality, Bali cattle*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN DISERTASI	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN UMUM	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Kegunaan Penelitian	5
1.5 Ruang Lingkup Penelitian	5
1.6 Kebaruan Penelitian	5
BAB II KUALITAS SEMEN SEGAR, SEMEN BEKU, LIBIDO, DAN KONSENTRASI HORMON TESTOSTERON PEJANTAN SAPI BALI	6
2.1 Abstrak.....	6
2.2 Pendahuluan	8
2.3 Metode Penelitian.....	11
2.4 Analisis Data.....	12
2.5 Hasil dan Pembahasan	12
2.6 Simpulan.....	19
BAB III KORELASI ANTARA KUALITAS SEMEN DENGAN BERAT MOLEKUL PROTEIN PLASMA SEMEN PEJANTAN SAPI BALI	20
3.1 Abstrak.....	20
3.2 Pendahuluan	20
3.3 Metode Penelitian.....	21
3.4 Analisis Data.....	23
3.5 Hasil dan Pembahasan	23
3.6 Simpulan.....	26

BAB IV IDENTIFIKASI PROTEIN PLASMA SEMEN SEBAGAI BIOMARKER PEJANTAN SAPI BALI	27
4.1 Abstrak.....	27
4.2 Pendahuluan	27
4.3 Metode Penelitian.....	29
4.4 Analisis Bioinformatika	31
4.5 Hasil dan Pembahasan	31
4.6 Simpulan.....	43
BAB V PEMBAHASAN UMUM.....	44
Daftar Pustaka	50
BAB VI SIMPULAN, SARAN, DAN LIMITASI	64
6.1 Simpulan.....	64
6.2 Saran	64
6.3 Limitasi.....	64
CURRICULUM VITAE	65

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Penilaian libido pejantan sapi Bali.....	10
Tabel 2. Kualitas semen segar pejantan sapi Bali	13
Tabel 3. Kualitas semen beku pejantan sapi Bali	14
Tabel 4. Produktivitas semen beku pejantan sapi Bali.....	18
Tabel 5. Protein plasma semen pejantan sapi Bali.....	32

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Rumusan masalah penelitian	4
Gambar 2. Konsentrasi hormon testosteron pejantan sapi Bali	17
Gambar 3. <i>One-dimensional sodium dodecyl phosphate polyacrylamide electrophoresis gel</i> (1D-SDS-PAGE) plasma semen pejantan sapi Bali	24
Gambar 4. Korelasi antara kualitas semen dengan berat molekul protein plasma semen pejantan sapi Bali	26
Gambar 5. <i>Gene ontology</i> protein pada plasma semen sapi Bali	38
Gambar 6. Interaksi protein plasma semen yang berhubungan dengan fertilitas spermatozoa	41
Gambar 7. Jalur pensinyalan cGMP-PKG: aktivitas CGMP-PKC yang diaktifkan melalui pengikatan antara ligan CNP (2',3'-siklik-nukleotida 3'-phospodiesterase) dan reseptor NPR-B (guanilat siklase)	43
Gambar 8. Diagram hasil penelitian dan implikasinya sebagai biomarker fertilitas pejantan sapi Bali	45

DAFTAR SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan penjelasan
IB	Inseminasi Buatan
AI	Artificial Insemination
BSE	Breeding Soundness Examination
BBIB	Balai Besar Inseminasi Buatan
BIB	Balai Inseminasi Buatan
BIBD	Balai Inseminasi Buatan Daerah
ID	Identitas
MPU	Membran Plasma Utuh
HOS	Hypoosmotic Swelling Test
CBB	Coommassie Brilliant Blue
1D-SDS-PAGE	One Dimensional-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
2D-SDS-PAGE	Two Dimensional-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SNI	Standar Nasional Indonesia
DNA	Deoxyribonucleic Acid
MW	Molecular Weight
kDa	Kilo Dalton
BM	Berat Molekul
Rf	Retention factors
LH	Luteinizing Hormone
g	gram
μ	mikro
μ L	mikroliter
μ m	mikrometer
ng	nanogram
mL	mililiter
bp	base pairs
cm	centimetre
kg	kilo gram
b/b	berat per berat
SOP	Standar Operasional Prosedur
PO	Peranakan Ongole
NaCL	Natrium Chloride
α	alpha
β	beta
γ	gamma
rpm	rotation per minute
LC-MS/MS	Liquid Chromatograph Mass Spectrometry

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Upaya peningkatan populasi ternak sapi di Indonesia saat ini dilakukan dengan inseminasi buatan (IB). Teknologi IB sebagian besar menggunakan semen beku yang diproduksi oleh Balai Besar Inseminasi buatan (BBIB) Singosari, Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang, dan Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) yang tersebar di beberapa provinsi di Indonesia (Jakaria *et al.*, 2018). Produksi semen beku di BBIB, BIB, dan BIBD mengacu kepada Permentan 10 tahun 2016 mengenai Penyediaan dan Peredaran semen beku ternak ruminansia dan Standar Nasional Indonesia (SNI) semen beku nomor 4869.1:2021. Sapi jantan yang digunakan sebagai sumber semen dalam memproduksi semen beku di BBIB, BIB, dan BIBD adalah sapi pejantan unggul.

Pejantan unggul adalah pejantan normal yang sudah diseleksi berdasarkan garis keturunannya, mempunyai kemampuan produksi, dan reproduksi (SNI Semen Beku-Bagian 1: Sapi 4869-1:2021). Metode penilaian fertilitas pejantan untuk menyeleksi bibit sapi yang sering digunakan adalah *Breeding Soundness Examination* (BSE) (Thundathil *et al.*, 2016). Metode BSE adalah metode sistematis untuk menilai reproduksi potensi sapi jantan (Chenoweth *et al.*, 2010). Penilaian BSE meliputi: pengamatan fisik (meliputi pengamatan genetalia eksternal dan internal melalui eksplorasi rektal), pengukuran lingkaran skrotum, tingkah laku seksual (libido), dan analisis kualitas semen (Hancock *et al.*, 2016).

Fertilitas dipengaruhi oleh sejumlah faktor seperti genetik, epigenetik, lingkungan, dan manajemen (Parisi *et al.*, 2014). Beberapa faktor menentukan kapasitas fertilisasi dari spermatozoa, termasuk faktor intrinsik dari spermatozoa dan komponen plasma semen (Viana *et al.*, 2018). Dogan *et al.* (2015), mengemukakan bahwa fertilitas berasosiasi dengan kualitas semen. Motilitas spermatozoa merupakan salah satu penentu fertilitas pejantan (Mohan *et al.*, 2014). Pejantan meskipun menghasilkan spermatozoa dalam jumlah banyak dengan parameter normal, namun pada beberapa sapi pejantan masih mengalami infertilitas (Ugur *et al.*, 2022). Kastelic dan Thundathil (2008) melaporkan bahwa pengukuran fertilitas pejantan seperti volume semen, konsentrasi, dan kualitas semen seperti motilitas dan persentase abnormalitas spermatozoa tidak cukup

untuk memprediksi fertilitas pejantan. Evaluasi libido dan aspek molekuler sel spermatozoa seperti DNA dan integritas membrannya dapat menjadi tambahan penilaian fertilitas (Ugur *et al.*, 2022). Penggunaan gen dan protein dalam spermatozoa dan plasma semen sebagai biomarker fertilitas telah banyak ditemukan dan dilaporkan melalui berbagai analisis molekuler seperti proteomik (Llavanera *et al.*, 2021; Ugur *et al.*, 2022; Kaya *et al.*, 2022). Proteomik adalah ilmu yang mempelajari keseluruhan protein yang dihasilkan dari ekspresi gen di dalam sel, terutama mengenai struktur dan fungsinya. Eksplorasi potensi fungsi protein yang berkaitan dengan fertilitas sapi jantan dapat dilakukan melalui identifikasi sel spermatozoa dan plasma semen (Menezes *et al.*, 2017; Druart dan de Graaf, 2018).

Plasma semen terdiri atas 80-90% dalam volume semen per ejakulat, mengandung substansi yang disekresikan oleh testis, kelenjar aksesorius, dan saluran genital (Camargo *et al.*, 2018). Lebih dari 2000 protein plasma semen terdeteksi pada manusia (Batruch *et al.*, 2011; Gilany *et al.*, 2015), 1159 pada sapi jantan (Viana *et al.*, 2018), 727 pada domba jantan (Soleilhavoup *et al.*, 2014), dan 607 pada ayam (Labas *et al.*, 2015). Plasma semen berperan penting dalam maturasi dan motilitas spermatozoa, kapasitas serta reaksi akrosom (Rego *et al.*, 2014). Plasma semen mengandung komponen kompleks seperti senyawa organik dan anorganik, termasuk protein, lipid, ion, dan metabolit (Juyena dan Stellette, 2012). Penelitian terdahulu telah melaporkan bahwa protein plasma semen dapat meningkatkan kapasitas pembuahan spermatozoa (Moura, 2006; Kwon, 2015). Laporan terbaru membuktikan bahwa ekspresi microRNAs dalam spermatozoa pejantan juga dikaitkan dengan fertilitas (Govindraju, 2012).

Lima protein dari spermatozoa telah dilaporkan mempunyai hubungan positif dengan fertilitas. Protein-protein tersebut adalah *osteopontin* (Erikson *et al.*, 2007), *phospholipaseA2*, P25b, *acidic seminal fluid proteins* (aSFP), *a-L-fucosidase* (Kumar *et al.*, 2012). Protein yang terdeteksi dalam plasma semen sapi yaitu *Bovine seminal plasma proteins/binder sperm protein* disingkat BSPs (Plante *et al.*, 2015), *osteopontin-K*, *DNase γ precursor* dan *DNASE1L3* (Rego *et al.*, 2016).

Protein spesifik dalam plasma semen telah diidentifikasi sebagai biomarker fertilitas pada sapi Zebu (Chacur, 2012), sapi Hanwoo (Park *et al.*, 2012), sapi Guzarat (Rego *et al.*, 2016), sapi Simental (Baharun *et al.*, 2021), dan sapi Holstein (Kaya *et al.*, 2022). Informasi terkait protein plasma semen sapi Bali belum dilaporkan. Protein berhubungan dengan *binding* spermatozoa dengan sel telur,

fertilisasi serta menginisiasi perkembangan embrio (Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016). Fungsi dan peran dari berbagai protein dalam plasma semen juga dapat memelihara spermatozoa selama dalam saluran reproduksi jantan maupun betina (Samanta *et al.*, 2018).

Studi terkait protein plasma semen pejantan sapi Bali untuk menentukan fertilitas oleh karena itu perlu dikaji lebih mendalam. Protein-protein yang ada dalam plasma semen sangat berpotensi sebagai biomarker molekuler penentu fertilitas yang akan sangat berguna untuk optimalisasi produksi semen beku di BBIB, BIB, dan BIBD. Protein yang teridentifikasi pada plasma semen sapi Bali diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kandidat protein fertilitas sebagai penunjang keberhasilan inseminasi buatan di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

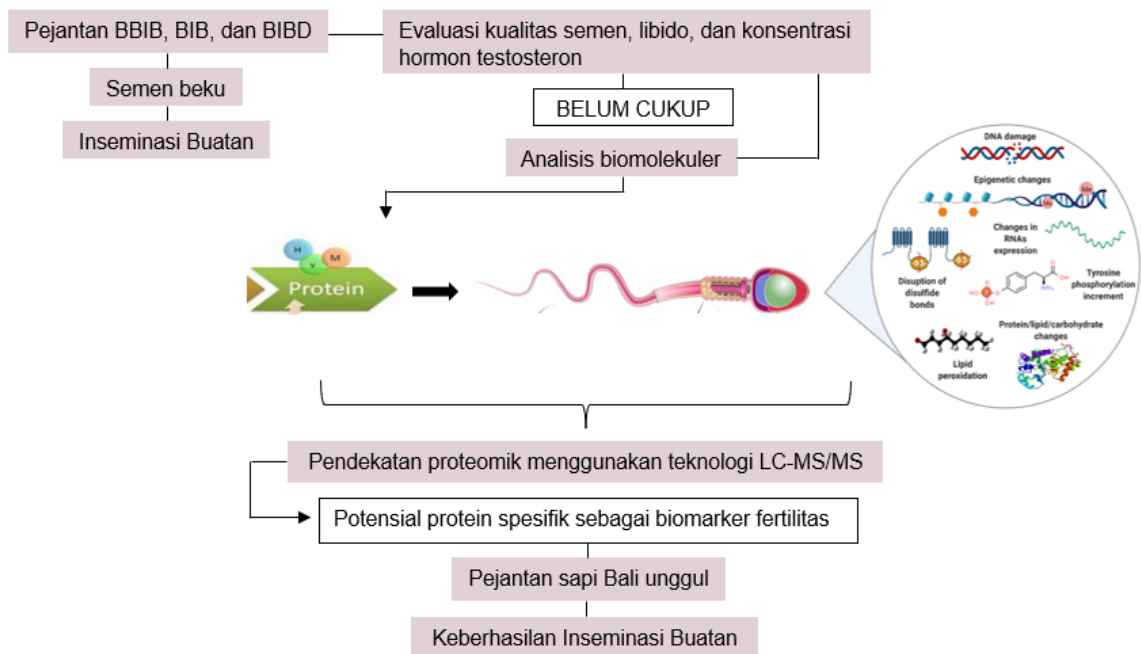
Parameter untuk memprediksi fertilitas pejantan tidak cukup jika dilihat dari motilitas, viabilitas, abnormalitas spermatozoa, dan membran plasma utuh spermatozoa. Plasma semen terdiri atas berbagai komponen (protein, enzim, lipid, asam organik, dan mineral) dan masing-masing komponen memiliki peranan penting dalam fungsi spermatozoa. Eksplorasi potensi protein yang berkaitan dengan fertilitas pejantan dapat dilakukan melalui identifikasi spermatozoa dan plasma semen. Berbagai penelitian mengenai protein spesifik dalam spermatozoa dan plasma semen sapi sebagai penanda fertilitas telah dilaporkan, sapi Zebu, sapi Hanwoo, sapi Guzarat, sapi Simental, dan sapi Holstein. Protein seminal plasma pada sapi Bali di Indonesia belum dilaporkan.

Perkembangan teknologi biologi molekuler memungkinkan diperolehnya suatu marker (penanda gen). Aplikasi biomarker dalam identifikasi penentu fertilitas dan infertilitas semen sapi merupakan hal yang baru dilakukan. Marker ini digunakan untuk menguji ketidaknormalan dalam suatu sistem biologis. Marker ini juga dapat digunakan sebagai penciri yang bersifat aktif. Penciri ini dapat dimasukkan pada suatu metode identifikasi senyawa murni dan juga metode untuk menentukan golongan apa yang terdapat pada plasma semen. Protein biomarker ini diharapkan menjadi parameter untuk menyeleksi pejantan yang lebih akurat, efisien, dan efektif sebagai penunjang keberhasilan inseminasi buatan di Indonesia. Akan tetapi, data dan informasi protein plasma semen sebagai biomarker fertilitas pada sapi Bali masih sangat terbatas dan perlu dilakukan kajian protein tersebut.

Berdasarkan uraian diatas, untuk memperoleh basis data untuk protein plasma semen sapi Bali maka hal yang perlu dikaji adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana kualitas semen segar, semen beku, libido, dan konsentrasi hormon testosteron pejantan sapi Bali?
2. Bagaimana korelasi antara kualitas semen dengan berat molekul protein plasma semen pejantan sapi Bali?
3. Bagaimana protein plasma semen sebagai biomarker fertilitas?

Secara skematik, rumusan masalah yang mendasari penelitian ini disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Rumusan masalah penelitian (Modifikasi gambar dari Peris-Frau *et al.*, 2020)

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini secara umum adalah untuk mengkaji protein pada plasma semen sebagai biomarker fertilitas pada pejantan sapi Bali. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengevaluasi kualitas semen segar, semen beku, libido, konsentrasi hormon testosteron, dan produktivitas pejantan sapi Bali.
2. Menganalisis korelasi antara kualitas semen dengan berat molekul protein plasma semen pejantan sapi Bali.
3. Mengidentifikasi protein plasma semen sebagai biomarker fertilitas pejantan sapi Bali.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini memberikan informasi terkait protein yang berpotensi sebagai biomarker fertilitas pejantan sapi Bali. Hasil akhir dari penelitian dapat menjadi alat bantu yang akurat dalam seleksi pejantan sapi Bali di Balai Inseminasi Buatan Indonesia.

1.5 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian dilakukan dalam tiga tahapan yaitu:

1. Tahap pertama, analisis kualitas semen segar, semen beku, libido, konsentrasi hormon testosteron, dan produktivitas pejantan sapi Bali.
2. Tahap kedua, korelasi kualitas semen dan berat molekul protein plasma semen pejantan sapi Bali.
3. Tahap ketiga, identifikasi protein plasma semen sebagai biomarker fertilitas pejantan sapi Bali.

1.6 Kebaruan Penelitian (*Novelty*)

1. Kajian proteomik pada pejantan sapi Bali.
2. Menemukan potensi protein spermadhesin 1 (SPADH1), C-type natriuretic peptide (NPPC), clusterin (CLU), apolipoprotein A-II (APOA2), inositol-3-phosphate synthase 1 (ISYNA1), sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) sebagai biomarker fertilitas pejantan sapi Bali.
3. Menemukan protein inositol-3-phosphate synthase 1 (ISYNA1) yang pertama kali pada pejantan sapi Bali.