

KUALITAS DAN UJI VALIDITAS SPERMATOZOA SAPI BALI *POLLED* HASIL SEXING BERBASIS VERIFIKASI MOLEKULER

QUALITY AND VALIDITY TEST OF BALI COW SPERMATOZOA *POLLED* RESULTS OF SEXING BASED ON MOLECULAR VERIFICATION



ANDI TIFAL NURGINA
1012212025



Optimized using
trial version
www.balesio.com

ILMU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

**KUALITAS DAN UJI VALIDITAS SPERMATOZOA SAPI BALI *POLLED*
HASIL *SEXING* BERBASIS VERIFIKASI MOLEKULER**

**ANDI TIFAL NURGINA
I012212025**



**MU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

Optimized using
trial version
www.balesio.com

**QUALITY AND VALIDITY TEST OF BALI COW SPERMATOZOA POLLED
RESULTS OF SEXING BASED ON MOLECULAR VERIFICATION**

**ANDI TIFAL NURGINA
I012212025**



**MU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

Optimized using
trial version
www.balesio.com

**KUALITAS DAN UJI VALIDITAS SPERMATOZOA SAPI BALI *POLLED* HASIL
SEXING BERBASIS VERIFIKASI MOLEKULER**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu dan Teknologi Peternakan

Disusun dan diajukan oleh

ANDI TIFAL NURGINA

I012212025

kepada



**ILMU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024

Optimized using
trial version
www.balesio.com

TESIS

KUALITAS DAN UJI VALIDITAS SPERMATOZOA SAPI BALI POLLED HASIL SEXING BERBASIS VERIFIKASI MOLEKULER

ANDI TIFAL NURGINA
I012212025

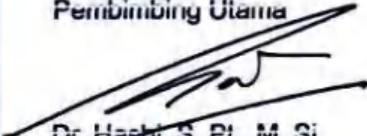
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangkap Penyelesaian Studi Magister Program Studi Ilmu dan Teknologi Peternakan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin

pada 22 Oktober 2024

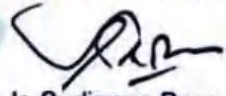
Program Studi Ilmu dan Teknologi Peternakan
Fakultas Peternakan
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

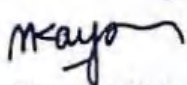
Pembimbing Utama


Dr. Haebi, S. Pt., M. Si
NIP. 197710022005011001

Pembimbing Pendamping I


Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco, M.Sc.
NIP. 196412311989031025

Pembimbing Pendamping II


Dr. Dra. Ekayanti Mulyawati Kaiin, M.Si.
NIP. 196609141992032004

Studi
ologi Peternakan
Dekan Fakultas Peternakan
Universitas Hasanuddin,


Dr. Eko, M.Sc.
NIP. 84031026

Dr. Syahida Baka, S.Pt., M.Si.
NIP. 197312172003121001



Optimized using
trial version
www.balesio.com

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Kualitas dan Uji Validitas Spermatozoa Sapi Bali *Polled* Hasil *Sexing* Berbasis Verifikasi Molekuler adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing Dr. Hasbi, S.Pt., M. Si. sebagai Pembimbing Utama; Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco, M. Sc. dan Dr. Dra. Ekayanti Mulyawati Kaiin, M. Si. sebagai Pembimbing Pendamping. 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 tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di International Journal of Chemical and Biochemical Sciences (IJCBS), 25(19) (2024): 990-995, <https://doi.org/10.62877/119-IJCBS-24-25-19-119> sebagai artikel dengan judul "Quality of Polled Bali Bull Spermatozoa Results from Sexing Using the Bovine Serum Albumin (BSA) Column Method". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Makassar, Oktober 2024



Andi Tifal Nurgina
I012212025



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. Atas rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan makalah proposal rencana penelitian yang berjudul “Kualitas dan Uji Validitas Spermatozoa Sapi Bali *Polled* Hasil *Sexing* Berbasis Verifikasi Molekuler”. Melalui kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan membimbing penulis dalam menyelesaikan tesis ini utamanya kepada:

1. Bapak Dr. Hasbi, S. Pt., M. Si., Bapak Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco, M. Sc. dan Ibu Dr. Dra. Ekayanti Mulyawati Kaiin, M. Si selaku pembimbing yang telah mencurahkan perhatian, ilmu, dan mengarahkan penulis dalam penyusunan makalah ini.
2. Kedua orang tua bapak A. Muh. Jufri dan ibu A. Roswani yang senantiasa mencintai, mendoakan, memberikan dukungan moral serta material dan senantiasa mendidik penulis.
3. Bapak Dr. Syahdar Baba, S. Pt., M. Si selaku Dekan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, beserta jajarannya. Kepada Dosen pengajar Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.
4. Bapak Dr. Muhammad Ihsan A. Dagong, S. Pt., M.Si., Bapak Dr. Muhammad Hatta, S. Pt., M. Si. serta Bapak Dr. Ir. Zulkharnaim, S. Pt., M. Si., IPM selaku penguji yang telah memberikan saran dan masukan dalam proses perbaikan makalah ini.
5. Bapak Tulus Maulana, Bapak Muhammad Gunawan, Bapak Saiful Anwar, Bapak Paskah Partogi Agung, Kakak Hikmayani Iskandar dan Kakak Erni Damayanti Iyang telah memberikan masukan dan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penelitian
6. Program Beasiswa BARISTA yang diselenggarakan oleh Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN).
7. Teman-teman yang telah memberikan masukan dan bantuan hingga terselesaikannya tesis ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan makalah ini masih jauh dari kesempurnaan. Olehnya itu kritikan dan masukan yang bersifat membangun dari pembaca sangat bermanfaat bagi penulisan kedepannya. Semoga makalah ini bermanfaat baik bagi penulis maupun pembaca.

Makassar, Oktober 2024



Andi Tifal Nurgina



ABSTRAK

ANDI TIFAL NURGINA. **Kualitas dan Uji Validitas Spermatozoa Sapi Bali *Polled* Hasil *Sexing* Berbasis Verifikasi Molekuler** (dibimbing oleh Hasbi, Sudirman Baco dan Ekayanti Mulyawati Kaiin).

Latar Belakang. Sapi Bali *polled* merupakan varian sapi Bali yang tanduknya tidak tumbuh secara alami. Sapi Bali *polled* memiliki keunggulan manajemen pemeliharaan yang dapat menghindari kecelakaan bagi peternak maupun antar ternak akibat saling tanduk dengan sifat produktivitas tinggi yang menjadikan jenis sapi Bali ini membutuhkan perhatian lebih. Guna meningkatkan populasinya dapat dilakukan melalui teknologi *sexing* spermatozoa agar kelahiran jenis kelamin ternak dapat dikendalikan. Keberhasilan teknologi *sexing* dapat dipengaruhi oleh kualitas spermatozoa dan validasi hasilnya diamati melalui verifikasi molekuler gen SRY. **Tujuan.** Penelitian ini untuk mengkaji kualitas dan validitas spermatozoa sapi Bali *polled* hasil *sexing* berbasis verifikasi molekuler. **Metode.** Penelitian ini menggunakan spermatozoa dari tiga ekor pejantan sapi Bali *polled* yang dipisahkan dengan metode kolom BSA 5% dan 10%. Data yang diperoleh diolah dengan *Ms. Office Excel* serta dengan analisis deskriptif. **Hasil.** Kualitas spermatozoa tertinggi pada fraksi bawah dengan persentase motilitas 44,82-46,92%, viabilitas 60,50-61,98%, abnormalitas 15,25-16,95%, MPU 57,61-64,18%, status akrosom 83,9-87,45% dan fragmentasi DNA 98,46-99,02%. Sedangkan pada fraksi atas lebih rendah dengan persentase motilitas 31,99-43,59%, viabilitas 50,98-60,80%, abnormalitas 11,81-15,89%, MPU 55,16-57,40%, status akrosom 71,74-74,79% dan fragmentasi DNA 97-98,25%. Berat molekuler protein menunjukkan adanya pita protein yang terbentuk pada kisaran 12-70 kDa pada masing-masing fraksi serta hasil verifikasi molekuler terdapat gen SRY pada fraksi bawah yang dilihat pada pita DNA pada fraksi bawah lebih tebal dibanding pada fraksi atas. **Kesimpulan.** Metode *sexing* spermatozoa sapi Bali *polled* dengan medium BSA 5% dan 10% berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa serta penggunaan metode ini belum optimal dalam memisahkan spermatozoa berkromosom X dan Y.

Kata Kunci: Kualitas Spermatozoa, Sapi Bali *Polled*, *Sexing*, Validitas.



ABSTRACT


ANDI TIFAL NURGINA. **Quality And Validation Test Gene SRY of Sexing Sperm of Bali Polled Bull With Molecular-Based Verification** (supervised by: Hasbi, Sudirman Baco and Ekayanti Mulyawati Kaiin)

Background. Bali cattle Polled are a variant of Bali cattle that are naturally hornless. Bali polled cattle have the advantage of maintenance management which can avoid accidents for breeders and between livestock due to mutual horns with high productivity characteristics which make this type of Bali cattle require more attention. To increase the population, this can be done through spermatozoa sexing technology so that the sex of livestock can be controlled. The success of sexing technology can be influenced by the quality of spermatozoa and validation of the results is observed through molecular verification of the SRY gene. **Aim.** This study aimed to determine the quality and validity of polled Bali cattle spermatozoa from molecular verification-based sexing. This study used spermatozoa from three polled Bali cattle males separated by the 5% and 10% BSA column methods. The data obtained were processed using Ms. Office Excel and descriptive analysis. **Results.** The results of this study showed the highest spermatozoa quality in the lower fraction with a percentage of motility of 44.82-46.92%, viability of 60.50-61.98%, abnormality of 15.25-16.95%, MPU of 57.61-64.18%, acrosome status of 83.9-87.45% and DNA fragmentation of 98.46-99.02%. While in the upper fraction it was lower with a percentage of motility of 31.99-43.59%, viability of 50.98-60.80%, abnormality of 11.81-15.89%, MPU of 55.16-57.40%, acrosome status of 71.74-74.79% and DNA fragmentation of 97-98.25%. The molecular weight of the protein shows the presence of a protein band formed in the range of 12-70 kDa in each fraction and the results of molecular verification show that there is an SRY gene in the lower fraction which is seen in the DNA band in the lower fraction which is thicker than in the upper fraction. **Conclusion.** This study concludes that the method of sexing Balinese polled cattle spermatozoa with 5% and 10% BSA medium affects the quality of spermatozoa and the use of this method is not optimal in separating X and Y chromosome spermatozoa.

Keywords: Sperm Quality, Polled Bali Cattle, Sexing, Validity



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
BAB II	5
2.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	5
2.2 Materi Penelitian	5
2.3 Metode Penelitian	5
2.4 Parameter Penelitian	9
2.5 Analisis Data	11
BAB III	12
3.1 Kualitas Spermatozoa Hasil <i>Sexing</i>	12
3.2 Analisis Kualitas <i>Computer-Assisted Sperm Analyzer</i>	18
3.3 Berat Molekul Protein Spermatozoa	19
3.4 Verifikasi Molekuler Gen SRY	22
	25
.....	25
.....	25
.....	26
.....	37

DAFTAR GAMBAR

No. Urut	Halaman
1. Diagram alir prosedur penelitian	9
2. Berat molekul protein spermatozoa	20
3. Korelasi kualitas dengan berat molekul spermatozoa	21
4. Visualisasi elektroforesis spermatozoa sapi Bali polled hasil sexing	23



DAFTAR TABEL

No. Urut	Halaman
1. Kualitas spermatozoa hasil sexing sapi Bali polled	12
2. Pola pergerakan spermatozoa sapi Bali polled hasil sexing dengan CASA	18
3. Konsentrasi protein spermatozoa hasil sexing sapi Bali polled.....	20
4. Identifikasi protein spermatozoa X dan Y	21



DAFTAR LAMPIRAN

No. Urut	Halaman
1. Dokumentasi kegiatan	20



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Spesies sapi yang banyak dikembangkan di Sulawesi Selatan adalah spesies sapi Bali. Terkait perkembangan sapi Bali, terdapat suatu fenomena ditemukannya spesies sapi Bali yang secara alami tanduknya tidak tumbuh (*polled*). Ternak yang tidak bertanduk dikategorikan dalam dua kondisi yakni kondisi *polled* jika tanduk tidak tumbuh secara alami dan kondisi *scurs* jika tanduk tidak tumbuh secara sempurna (Zulkarnain et al., 2017). Kelahiran sapi Bali *polled* pertama kali ditemukan pada tahun 1990-an di PT. BULI (*Berdikari United Livestock*) Kabupaten Sidrap hingga pada tahun 2000-an yang diisolasi dari populasi awal untuk dikembangkan di Ladang ternak Fakultas Peternakan Kecamatan Pattallasang Kabupaten Gowa. Sapi Bali *polled* secara alami merupakan keturunan tanpa tanduk dari generasi homosigot persilangan antara sapi Bali dan sapi Brahman cross. Sedangkan sapi Brahman cross berasal dari silangan sapi Brahman dengan sapi Hereford. Oleh karena itu, varian tersebut dianggap memiliki keunggulan sifat produktivitas tinggi yang akan menjadi jenis sapi Bali pilihan unggul serta dapat dikembangkan (Baco et al., 2020).

Karakteristik fisik sapi Bali *polled* dan sapi Bali bertanduk tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Zulkarnain et al. (2017) menemukan bahwa dimensi tubuh sapi Bali *polled* dan sapi Bali bertanduk tidak berbeda baik dari segi tinggi gumba, tinggi punggung, panjang badan, dan lingkaran dada. Hal tersebut menjadikan tidak adanya perbedaan performa antara sapi Bali *polled* dan sapi Bali bertanduk. Akan tetapi, sapi Bali *polled* memiliki keunggulan dari segi manajemen pemeliharaan.

Penelitian yang dilakukan oleh Hasbi et al. (2023) evaluasi kualitas semen segar sapi Bali *polled* secara makroskopik dan mikroskopik menunjukkan hasil yang tidak berbeda dengan semen sapi Bali bertanduk. Kualitas semen sapi Bali bertanduk yakni volume semen 6,02 ml, pH 6,4, warna krem, bau khas semen, konsistensi kental, konsentrasi $0,31 \times 10^9$, motilitas 73,33%, viabilitas 92,73%, abnormalitas 4,01% dan integritas membran 76,58%. Sedangkan kualitas semen beku sapi Bali *polled* menunjukkan persentase motilitas 52,79%, viabilitas 56,05%, abnormalitas 8,85%, integritas membran 54,79%, integritas DNA 99,35%, integritas akrosom 92,98%, status protamine 97,92%, dan Recovery Rate (RR) 71,72%.

Kualitas spermatozoa erat kaitannya dengan fertilitas pejantan. Pengamatan kualitas spermatozoa digunakan sebagai penilaian spermatozoa sebelum digunakan maupun *in vivo* sebab kualitas spermatozoa memberikan dampak terhadap keberhasilan proses fertilisasi yang dilihat melalui tingkat motilitas dan morfologi spermatozoa. Kemampuan fertilisasi spermatozoa umumnya dipengaruhi oleh motilitas, morfologi, dan sebagainya. Akan tetapi, hal tersebut belum dapat menjamin fertilitas. Persentase "*healthy (viable) spermatozoa*" yang tinggi akan meningkatkan peluang keberhasilan spermatozoa dalam fertilisasi.



(Purwantara dkk., 2022). Penelitian terbaru oleh Alves, *et al.* (2020) mengungkapkan bahwa spermatozoa dapat memenuhi konsep "*healthy (viable) spermatozoa*" yang dinilai tidak hanya berdasarkan pada hasil evaluasi morfo-fungsional saja, akan tetapi melibatkan beberapa komponen intrinsik yang menunjang fungsi normal spermatozoa dalam proses reproduksi seperti faktor organel (mitokondria dan sentriol) dan molekul (protein dan DNA).

Evaluasi kualitas maupun kuantitas semen penting karena kaitannya dalam menentukan pejantan unggul sebagai produsen semen untuk digunakan dalam program Inseminasi Buatan (IB) (Sumardani dkk., 2019). Teknologi IB dikembangkan tidak hanya terpaku pada peningkatan kelahiran ternak saja tetapi daya gunanya dapat ditingkatkan dengan metode *sexing* untuk menghasilkan spermatozoa dengan kromosom berbeda (X dan Y) guna mengendalikan jenis kelamin pedet yang dilahirkan sesuai keinginan peternak (Luzardin dkk., 2020). *Sexing* spermatozoa merupakan teknologi revolusioner yang telah dilakukan untuk memisahkan spermatozoa berkromosom X dan Y (Yadav *et al.* (2017). Penggunaan semen hasil *sexing* dalam IB dapat memberikan sejumlah manfaat baik pada industri peternakan sapi. Namun, proses *sexing* menjadi salah satu faktor penurunan kualitas spermatozoa (Mahfud dkk., 2019). Perbedaan karakteristik spermatozoa berkromosom X dan Y dalam beberapa laporan menjelaskan bahwa spermatozoa berkromosom Y mengandung DNA yang relative lebih sedikit dan ukurannya yang lebih kecil sehingga mampu bergerak lebih cepat dibandingkan dengan spermatozoa berkromosom X (Yata, 2022). Perbedaan tersebut menyebabkan keduanya memungkinkan untuk dipisahkan. Metode pemisahan spermatozoa sangat beragam dan telah banyak dilakukan yaitu dengan metode sedimentasi, gradien BSA, sentrifugasi gradient densitas, elektroforesis, H-Y antigen, *flow cytometry*, dan filtrasi dengan kolom sephadex (Rosadi dkk., 2018).

Penelitian yang dilakukan oleh Kusumawati dkk. (2017) menemukan bahwa kualitas spermatozoa *sexing* dengan penambahan pengencer Andromed menunjukkan persentase motilitas dan viabilitas pada fraksi bawah 45% dan 53,40% sedangkan fraksi atas 50% dan 60,31%. Purwoistri dkk. (2013) menemukan persentase motilitas semen *sexing* pada fraksi bawah 53,5%, viabilitas 92,12%, abnormalitas 7,94%, konsentrasi $568 \times 10^6/\text{ml}$ dan total spermatozoa motil $151,35 \times 10^6/\text{ml}$ sedangkan persentase motilitas pada fraksi atas 63%, viabilitas 91,91%, abnormalitas 8,16%, konsentrasi $626 \times 10^6/\text{ml}$ dan total spermatozoa motil $197,95 \times 10^6/\text{ml}$. Maulana *et al.* (2022) melakukan evaluasi kualitas spermatozoa terhadap spermatozoa sapi Peranakan Ongole (PO) hasil *sexing* dengan metode BSA yang hasilnya menunjukkan persentase status akrosom dan fragmentasi DNA sebesar 66,51% dan 97,57% sedangkan status akrosom dan a spermatozoa Y sebesar 34,46% dan 97,06%.



asi dan sentrifugasi dalam proses *sexing* spermatozoa dapat spermatozoa, namun metode tersebut masih dapat dilakukan tozoa (Priyanto *et al.*, 2023; Luzardin dkk., 2020) dan masih tuk inseminasi buatan (Teken *et al.*, 2020). BSA dapat

mengurangi kerusakan membran dengan melindungi membran plasma selama proses *sexing* (Akhter *et al.*, 2014).

Komponen molekuler pada spermatozoa memiliki peran penting dalam fertilitas pejantan. Salah satunya berupa protein spermatozoa yang berperan dalam proses fertilisasi, aktivasi sel, dan perkembangan embrio (Moura *and* memili, 2016). Spermatozoa dianggap sebagai kandidat yang baik dalam studi proteomik karena kemurniannya yang mudah dan tidak akan menghasilkan protein jenis baru. Pemahaman terkait proteomik spermatozoa dapat menjelaskan jalur seluler, modifikasi pasca-translasi, interaksi antar protein dan kaitannya dengan gametogenesis normal serta perannya dalam proses fertilisasi. Selain itu, data terkait protein spermatozoa juga mencakup pemahaman terkait biokimia spermatozoa dan kaitannya dalam mengidentifikasi dan meningkatkan fertilitas pejantan. Analisis fungsional tentang protein spermatozoa dapat dilakukan dengan pendekatan bioinformatika sebagai perangkat dalam mengidentifikasi biomarker diagnostik pada pejantan yang infertilitas (Agarwal *et al.*, 2020). Berdasarkan sudut pandang proteomik, identifikasi protein dalam spermatozoa dalam menganalisa protein yang bertanggung jawab untuk mengatur fungsi spermatozoa baik normal maupun cacat, spermatozoa yang viable dalam transkripsi, translasi dan sintesis protein (Rahman *et al.*, 2013).

Protein dalam spermatozoa dikategorikan berdasarkan keterlibatan masing-masing protein dalam jalur fungsional spermatozoa seperti proses metabolisme, apoptosis, siklus sel, *membrane trafficking*, metabolisme RNA serta modifikasi protein pasca-translasi (Amaral *et al.*, 2024). Berat molekul protein (*Protein Molecular-Weight*) merupakan ukuran berat rata-rata molekul protein spermatozoa dengan variasi berat berkisar antara 20-250 kDa (Susan dan Rahayu, 2013). Spermatozoa sapi terdapat berbagai jenis protein dengan fungsi yang berbeda-beda. Salah satu protein yang berperan penting didalamnya adalah *Heat Shock Protein 70* (HSP70) yang didistribusi selama proses kapasitasasi dan reaksi akrosom (Kamaruddin *et al.*, 2004). HSP70 merupakan salah satu protein yang melimpah dalam spermatozoa yang berperan dalam sintesis protein, *de novo folding*, translokasi, penyusunan multiprotein (Rosyada *et al.*, 2022) serta melindungi spermatozoa dari *chemical shock* dan *heat shock* (Kamaruddin *et al.*, 2004) dengan berat molekul 70 kDa (Naaby-Hansen *and* Jerr, 2010). Salah satu protein yang juga berperan penting dalam fertilitas spermatozoa yaitu protein dengan berat molekul 33,71 kDa (Rosyada *et al.*, 2020).

Spermatozoa mengandung setengah jumlah DNA dari sel-sel somatik yang berasal dari spesies yang sama sehingga pada proses spermatogenesis akan terdapat dua macam spermatozoa yang terdiri dari spermatozoa berkromosom XX dan XY. Perbedaan ini didasarkan pada kandungan gen yang ada pada spermatozoa yaitu berupa *Sex determining Region Y gen* (SRY) sebagai penentu seks pada jantan yang tidak terdapat pada spermatozoa betina (Silawati, 2011). Gen *Sex determining-Region Y* (SRY) dalam genom manusia mengkodekan protein sebagai faktor penentu pembentukan testis yang memberikan sinyal untuk perkembangan gonad jantan. Perbedaan



tersebut menjadi salah satu dasar dalam penerapan teknologi *sexing* semen untuk memisahkan spermatozoa berkromosom X dan Y. Ada beberapa metode *sexing* spermatozoa yang dapat dilakukan salah satunya dengan metode kolom *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan tingkat keberhasilan IB dengan spermatozoa berkromosom Y sekitar 89% dan spermatozoa berkromosom X sekitar 87% (Gunawan dkk., 2015). Akan tetapi, data yang menyajikan mengenai kualitas maupun verifikasi molekuler spermatozoa berkromosom X dan spermatozoa berkromosom Y yang diperoleh dari spermatozoa sapi Bali *polled* hasil *sexing* masih terbatas. Hal inilah yang melatar belakangi dilakukannya penelitian mengenai “Kualitas dan Uji Validitas Semen Sapi Bali *Polled* Hasil *Sexing* Berbasis Verifikasi Molekuler”.

1.2 Perumusan Masalah

Sapi Bali *polled* merupakan spesies sapi Bali yang tanduknya tidak tumbuh secara alami. Sapi Bali *polled* memiliki keunggulan manajemen pemeliharaan yang dapat menghindari kecelakaan bagi peternak maupun antar ternak akibat saling tanduk dengan sifat produktivitas tinggi yang menjadi jenis sapi Bali membutuhkan perhatian lebih untuk meningkatkan populasinya melalui teknologi *sexing* spermatozoa agar kelahiran jenis kelamin ternak dapat dikendalikan yang dilakukan diawal program breeding yang ditujukan untuk meningkatkan kualitas genetik ternak dan menekan biaya manajemen produksi. Teknologi ini dilakukan dengan memisahkan spermatozoa berkromosom X dan berkromosom Y sebagai penentu jenis kelamin anak yang telah banyak digunakan yang salah satunya dengan metode kolom BSA. Keberhasilan metode *sexing* pada spermatozoa sapi Bali *polled* dalam memisahkan spermatozoa berkromosom X dan Y dapat dilihat melalui verifikasi secara molekuler. Namun, masih terbatasnya data terkait kualitas dan verifikasi molekuler semen sapi Bali *polled* hasil *sexing* menjadi permasalahan sehingga penelitian ini perlu dilakukan.

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui kualitas spermatozoa sapi Bali *polled* hasil *sexing* dan tingkat validitas metode *sexing* dalam memisahkan dan menghasilkan spermatozoa berkromosom X dan Y pada spermatozoa sapi Bali *polled* melalui verifikasi molekuler gen SRY.

Manfaat pada penelitian ini diharapkan menjadi informasi guna mengetahui kualitas spermatozoa sapi Bali *polled* hasil *sexing* dan tingkat validitas metode *sexing* dalam memisahkan dan menghasilkan spermatozoa berkromosom X dan Y pada spermatozoa sapi Bali *polled* melalui verifikasi molekuler gen SRY.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni 2023-Juli 2024 yang bertempat di UPT-PIBPS Pucak, Maros, Sulawesi Selatan untuk produksi semen *sexing* dan untuk uji laboratorium dilakukan di Gedung Genomik, KST Soekarno, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Jawa Barat, Indonesia.

2.2 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen yang berasal dari 3 ekor pejantan sapi Bali *polled* yang berumur 6-8 tahun. Bahan yang digunakan yaitu *objek glass*, *cover glass*, medium BSA konsentrasi 5% dan 10%, aquadest, andromed, larutan host, PBS, alkohol 70%, AccuPrep® Genomic Extraction Kit (Bioneer K-3032, Korea), master mix, dan lain sebagainya.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vagina buatan untuk penampung semen, mikroskop yang dilengkapi dengan monitor, freezer, alat PCR, elektroforesis, *water bath*, *cool box*, tabung reaksi, gelas ukur, *micropipet*, *thermometer*, ministraw dan lain sebagainya.

2.3 Metode Penelitian

Koleksi dan Evaluasi Semen

Semen dikoleksi dengan menggunakan metode vagina buatan yang kemudian dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi volume semen segar yang diperoleh, pH, konsistensi, warna dan bau, sedangkan uji mikroskopis meliputi gerakan massa dan gerakan individu (Arifiantini, 2012).

Sexing Spermatozoa

Semen yang memenuhi persyaratan secara makroskopis dan mikroskopis selanjutnya dilanjutkan dengan proses *sexing*. Pemisahan semen dilakukan dengan metode kolom *Bovine Serum Albumin* (BSA) berdasarkan prosedur kerja Kaiin dkk. (2017). Medium kolom BSA dibuat dengan 2 fraksi yang konsentrasinya berbeda. Fraksi bawah dibuat dengan konsentrasi 10% dan fraksi atas dengan konsentrasi 5%. Sebanyak 2 ml medium BSA 10% dimasukkan dalam tabung *sexing* dilanjutkan dengan 2 ml medium BSA 5%. Medium diusahakan tidak bercampur. Sebanyak 1 ml semen segar dimasukkan perlahan kedalam tabung yang berisi medium *sexing* lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 28°C. Kemudian memisahkan masing-masing fraksi (fraksi bawah BSA 10%/spermatozoa Y dan fraksi atas BSA 5%/ spermatozoa



; sentrifus yang berbeda yaitu tabung tanpa penambahan A) dan tabung yang berisi tambahan pengencer andromed iugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1800 rpm. Hasil antara plasma dan pellet. Pellet pada sampel A disimpan pada verifikasi molekuler dan sampel B ditambahkan dengan 1000 µl dengan komposisi andromed dan aquadest 1:4 ml. Sampel

dihomogenkan lalu dimasukkan ke dalam mini straw untuk uji kualitasnya secara mikroskopik (Achlis., 2013).

Ekuilibrase, Pra Pembekuan dan Pembekuan Semen

Spermatozoa hasil *sexing* diekuilibrase dalam *refreegerator* selama 2-6 jam pada suhu 5°C (Hanifi dkk., 2016). Setelah ekuilibrase kemudian straw disusun pada rak straw dan dilakukan pra pembekuan dengan uap nitrogen cair dalam sterofom dengan jarak sekitar 4,5 cm di atas permukaan nitrogen selama 9 menit. (Aini dkk., 2014). Selanjutnya dilakukan proses pembekuan dan disimpan dalam kontainer nitrogen cair bersuhu -196°C (Wahjuningsih and Ihsan, 2018).

Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA)

Evaluasi motilitas, moltilitas progresif dan pola pergerakan diamati dengan *Computer-Assisted Sperm Analyzer* (CASA) berdasarkan prosedur kerja Maulana *et al.* (2022). Sampel semen beku di *thawing* dalam *water bath* suhu 37°C selama 30 detik. Sebanyak 3 µl sampel disimpan diatas objek glass dan ditutup dengan cover glass yang sebelumnya telah dipanaskan diatas *heating table* suhu 37°C kemudian diamati dibawah mikroskop.

Viabilitas dan Abnormalitas

Evaluasi viabilitas dilakukan dengan metode pewarnaan Eosin-Nigrosin berdasarkan prosedur kerja Handayani dkk. (2021). Sebanyak 10 µl semen ditetaskan diatas objek glass kemudian ditambahkan dengan 20 µl pewarna Eosin-Nigrosin. Sampel dihomogenkan dan dibuat preparat ulas lalu diiksasi diatas *heating table* selanjutnya diamati dibawah mikroskop.

Membran Plasma Utuh (MPU)

Evaluasi status akrosom dilakukan dengan metode *Hypo-Osmotic Swelling* (HOS) *Test* berdasarkan prosedur Allouche *et al.* (2017). Sebanyak 300 µl larutan HOST dan 30 µl semen dimasukkan kedalam *microtube* lalu di inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Sebanyak 10 µl sampel ditetaskan diatas objek glass dan ditutup dengan cover glass yang sebelumnya telah dipanaskan diatas *heating table* suhu 37°C (Abdollahi *et al.*, 2020) kemudian diamati dibawah mikroskop.

Status Akrosom

Evaluasi status akrosom dilakukan dengan metode *Fluorescens isothiocyanate* (FITC) berdasarkan prosedur kerja Fannessia dkk. (2015). Membuat preparat ulas dengan sampel semen lalu dikeringanginkan dan difiksasi selama 10 menit dalam etanol 96%. Preparat dikeringanginkan dalam kondisi gelap lalu ditetaskan dengan larutan lektin *Peanut agglutinin* (PNA) (Sigma, St. Luis MO) sebanyak 30 µL (100 µg/mL) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selaniutnya preparat ditetaskan dengan *propidium iodine* (PI) (Sigma, St. Luis MO)



(mL) lalu diinkubasi selama 5 menit kemudian preparat dicuci *hate-buffered saline* (PBS) sebanyak 3 kali lalu ditutup dengan ati dibawah mikroskop fluorescence.

mentasi DNA dilakukan dengan pewarnaan *acridine orange* engan menggunakan mikroskop fluorescence berdasarkan

prosedur kerja Handayani dkk. (2021). Sampel semen dibuat preparat ulas lalu dikeringkan dan direndam selama 2 jam dengan larutan carnoy. Preparat kemudian dikeringkan dan dimasukkan kedalam larutan AO 1% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Selanjutnya preparat dicuci menggunakan aquadest dan dikeringkan kemudian diamati dibawah mikroskop fluorescence.

Berat Molekul Protein Spermatozoa

Berat molekul protein dianalisis dengan metode SDS-PAGE berdasarkan prosedur kerja Singh *et al.* (2014) dan Baharun *et al.* (2023).

- Preparasi Sampel

Sampel spermatozoa beku sebanyak 2-3 straw di thawing dalam water bath suhu 37°C selama 30 detik. Sampel dimasukkan ke dalam microtube ukuran 1,5 ml dan dicuci dengan larutan PBS pH 7,4 yang dibuat hingga volume total 1 ml. Homogenkan sampel lalu sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Setelah sentrifugasi, supernatan dibuang dan sampel dicuci kembali dengan larutan PBS (dengan prosedur yang sama). Pellet yang diperoleh ditambahkan dengan 200 µl buffer ekstraksi protein dan dihomogenkan. Inkubasi sampel selama 10-20 menit pada suhu -20°C lalu sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan sampel dibuang lalu pellet yang diperoleh ditambahkan dengan larutan PBS sebanyak 50 µl dan dihomogenkan dengan cara dipipet berulang kali. Sampel yang dipeoleh disimpan pada suhu -20°C untuk analisis selanjutnya.

- Kuantifikasi Protein

Sampel spermatozoa sebanyak 10 µl dimasukkan ke dalam microtube 1,5 ml lalu ditambahkan dengan BCA reagen sebanyak 990 µl kemudian dihomogenkan dengan bantuan vortex. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit hingga berubah warna (semakin tinggi konsentrasi sampel maka warna akan semakin gelap). Konsentrasi protein pada sampel dihitung menggunakan spektrofotometri.

- SDS-PAGE

Preparasi sampel untuk SDS-PAGE dilakukan dengan memasukkan sampel ke dalam microtube 1,5 ml ditambahkan larutan PBS hingga volume total 30 µl. Sampel ditambahkan dengan larutan Loading Dye (4x) sebanyak 10 µl dan dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit. Inkubasi sampel pada suhu 37°C selama 2 menit. Kemudian sampel di inkubasi pada suhu -20°C untuk analisis selanjutnya. Untuk uji SDS-PAGE dimulai dengan menyiapkan alat yang akan digunakan. Procot gel dipasang pada SDS dengan rapat dan lepaskan sisir pada gel. Masukkan running buffer pada bagian tengah SDS hingga penuh dan tidak berbuih. Masukkan marker sebanyak 4 µl dan sampel sebanyak 30 µl pada sumur



urutan kemudian running sampel dengan tegangan 200 volt Setelah itu well diangkat dan perekat gel dilepaskan. Keluarkan endam ke dalam larutan staining commasie blue selama 1 jam arutan staining comassie blue dan rendam gel dengan larutan Gel kemudian di foto untuk analisis berat molekul protein yang

Verifikasi Molekuler Gen SRY

Verifikasi molekuler gen SRY dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berdasarkan prosedur kerja Kaiin dkk. (2017).

- Ekstraksi DNA

Spermatozoa diekstraksi sebanyak 10 juta sel/mL dengan metoda spin column menggunakan AccuPrep® Genomic Extraction Kit (Bioneer K-3032, Korea). Sebanyak 20 μ l proteinase K, 200 μ l sel sperma dan 200 μ l Binding buffer (GC) dimasukkan ke dalam *tube* steril ukuran 1,5 ml kemudian dihomogenkan dengan vortex lalu di inkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Menambahkan 100 μ l isoproponal dan homogenkan dengan cara di pipet lalu lisat pindahkan ke dalam *tube* binding column. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. *Tube* binding column dipindahkan ke dalam *tube* baru ukuran 2 ml untuk filtrasi. Menambahkan 500 μ l washing buffer 1 (W1) dan sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Buang larutan hasil buangan pada *tube* 2 ml ke dalam botol pembuangan dan tambahkan 500 μ l washing buffer 2 (W2) dan lakukan seperti metode washing sebelumnya. Pastikan tidak ada tetesan yang menempel pada *tube* binding column kemudian pindahkan *tube* binding column ke tabung ukuran 1,5 ml yang baru untuk elusi. Menambahkan 200 μ l buffer elution ke dalam tabung binding column dan diamkan selama 6 menit pada suhu ruang sampai EL terserap seluruhnya. Sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit untuk mengelusi. DNA genom hasil elusi disimpan pada suhu 4°C atau untuk penyimpanan jangka panjang disimpan pada suhu -20°C.

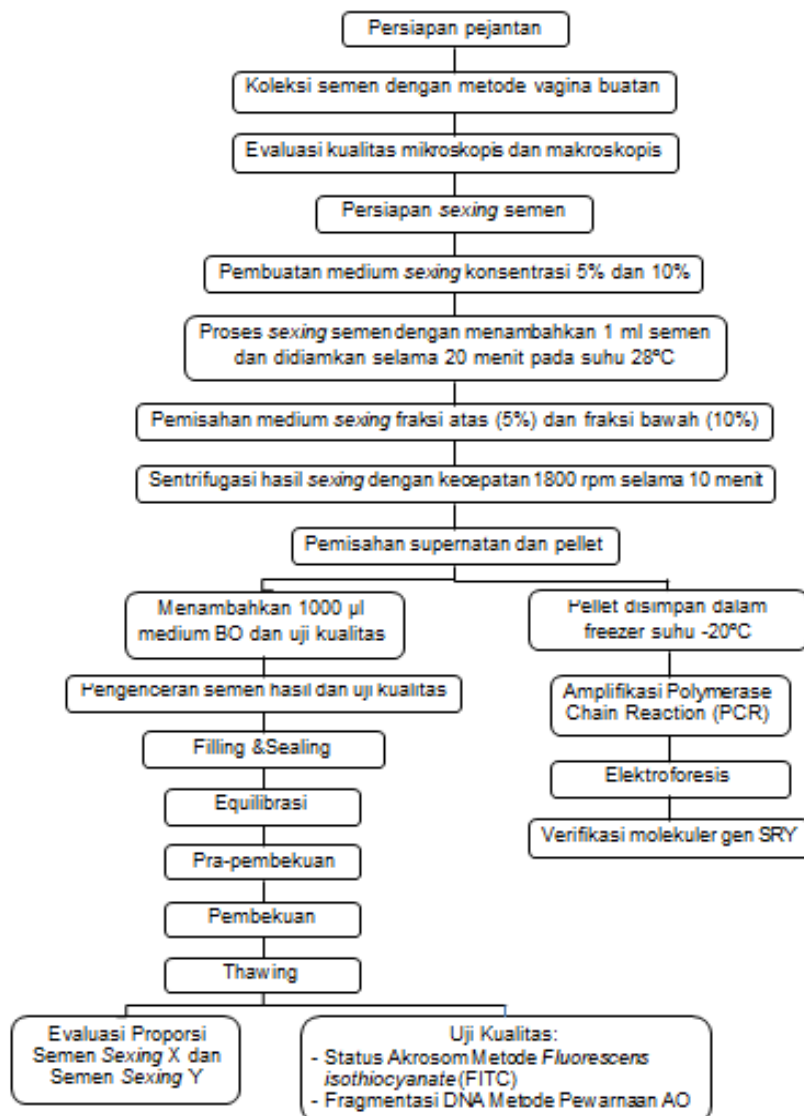
- Amplifikasi Polymerase Chain Reaction (PCR)

Total DNA hasil ekstraksi diamplifikasi menggunakan metode Duplex PCR dengan total volume 15 μ l yang terdiri dari 7,5 μ l GoTaq® Green Mix, 1 μ l primer SRY F, 1 μ l primer SRY R, 2 μ l NFW dan 3,5 μ l DNA dimasukkan dalam tube berukuran 0,2 mL kemudian dihomogenkan. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR Mastercycle Gradient (Bio-Rad) dengan program PCR terdiri dari predenaturasi 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 15 detik, annealing 60°C selama 15 detik, extension 72°C selama 24 detik dan final extension 72°C selama 5 menit dan hold time pada suhu 4°C.

- Elektroforesis

Produk hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% menggunakan pewarna Gel Red (Invitrogen S7563, Amerika Utara). Menimbang serbuk agarose sebanyak 2 gr yang dilarutkan dengan larutan TBE 0,5 \times dan dipanaskan selama 30 detik. Setelah larut, gel kemudian di homogenkan dengan magnetik stirer selama 30 detik dan ditambahkan 3 μ l pewarna Gel Red. Gel dicetak dan didiamkan hingga mengeras. Lepas sisir gel lalu masukkan elektroforesis yang telah diberi larutan TBE 0,5 \times sebanyak 400 ml. Masukkan DNA molekuler (Ladder, Vivantis NL 1407) berukuran 100 bp dan sumur gel kemudian elektroforesis selama 45 menit dengan arus konstan untuk menentukan ukuran dari produk hasil PCR. Gel hasil elektroforesis didokumentasikan dengan documentation system.





Gambar 1. Diagram alir prosedur penelitian

2.4 Parameter Penelitian

Motilitas, Motilitas Progresif dan Pola Pergerakan



ilitas, moltilitas progresif dan pola pergerakan diamati dengan *uter-Assisted Sperm Analyzer* (CASA) berdasarkan Maulana *et al* analisis menggunakan SpermvisionTM 3.7.8 (Minitube Jerman) oskop perbesaran 200× dan diamati dengan 4 sudut pandang. ai rata-rata motilitas, motilitas progresif, VCL, VAP, VSL, BCF, lari setiap sampel dan tersaji dalam bentuk file Ms. Office Excel

Viabilitas

Evaluasi abnormalitas menggunakan metode pewarnaan Eosin-Nigrosin diamati dengan mikroskop cahaya Olympus CX23 perbesaran 400× dengan minimal 10 lapang pandang atau minimal 200 sel. Bagian kepala spermatozoa yang hidup tidak akan terwarnai atau transparan sedangkan spermatozoa yang mati akan atau berwarna ungu. Persentase total abnormalitas dihitung dengan rumus matematika berikut.

$$\text{Percentage of Viability} = \frac{\text{Number of Damaged Spermatozoa}}{\text{Total Number of Spermatozoa}} \times 100\%$$

Abnormalitas

Evaluasi abnormalitas menggunakan metode pewarnaan Eosin-Nigrosin diamati dengan mikroskop cahaya Olympus CX23 perbesaran 400× dengan minimal 10 lapang pandang atau minimal 200 sel. Spermatozoa yang normal akan nampak utuh pada bagian kepala, *midpiece* dan bagian ekor sedangkan spermatozoa yang abnormal akan terlihat memiliki kelainan. Persentase total abnormalitas dihitung dengan rumus matematika berikut.

$$\text{Percentage of Abnormality} = \frac{\text{Number of Damaged Spermatozoa}}{\text{Total Number of Spermatozoa}} \times 100\%$$

Status Akrosom

Evaluasi status akrosom spermatozoa menggunakan metode *Fluorescens isothiocyanate* (FITC) yang diamati menggunakan mikroskop fluorescence dengan panjang gelombang 380-420 nm. Spermatozoa yang berakrosom utuh akan nampak warna hijau dan spermatozoa yang berakrosom tidak utuh tidak berwarna hijau (Fannessia dkk., 2015). Persentase total status akrosom dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Adiputra *et al.*, 2023).

$$\text{Percentage of Acrosome Status} = \frac{\text{Number of Damaged Spermatozoa}}{\text{Total Number of Spermatozoa}} \times 100\%$$

Fragmentasi DNA

Evaluasi fragmentasi DNA dilakukan dengan pewarnaan acridine orange (AO) yang diamati dengan mikroskop fluorescence panjang gelombang 450-490 nm perbesaran 400× sebanyak 10 lapang pandang. Spermatozoa yang mengalami fragmentasi akan nampak berwarna orange dan spermatozoa yang tidak mengalami fragmentasi akan berwarna hijau (Handayani dkk., 2021). Persentase total fragmentasi DNA dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Pratap *et al.*, 2017).

$$\text{SDFI} = 100 \frac{\text{Number of Sperm with DNA Damage}}{\text{Number of Sperms counted}}$$

Ket: SDFI: Sperm DNA Fragmentation Index



in Spermatozoa

konsentrasi atau kuantifikasi protein dilakukan menggunakan rangan pembesaran 562 nm. Hasil spektrofotometer direkap Office Excel. Sedangkan hasil SDS-PAGE difoto dalam bentuk n aplikasi Image.J.

Verifikasi Molekuler Gen SRY

Verifikasi molekuler gen SRY dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang kemudian dielektroforesis untuk menentukan ukuran dari produk hasil PCR. Setelah itu, gel hasil elektroforesis diamati dengan Gensys gel documentation system dan ukuran amplicon ditentukan menggunakan software yang telah tersedia dalam geldoc (Kaiin dkk., 2017).

2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan *Ms. Office Excel* untuk menghitung nilai rata-rata dan dianalisis deskriptif untuk mendeskripsikan hasil kualitas spermatozoa, berat molekul protein dan verifikasi molekuler gen SRY pada spermatozoa sapi Bali polled hasil sexing.

