

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara tropis yang terletak di bawah garis khatulistiwa sehingga memiliki potensi sumber daya alam yang melimpah dan mendukung untuk pengembangan peternakan sapi. Salah satu ternak asli Indonesia adalah sapi bali yang merupakan sapi potong hasil domestikasi banteng liar (*Bos javanicus*) di Jawa selama ratusan tahun yang memiliki daya adaptasi tinggi (Sutarno dan Setyawan, 2016). Populasi sapi bali mencapai 23% dari total populasi sapi potong di Indonesia dan mempunyai peranan penting dalam sektor peternakan serta memiliki peluang pasar menjanjikan untuk terus dikembangkan sehingga pengembangan sapi Bali baik untuk tujuan komersial maupun plasma nutfah perlu didukung dengan kebijakan pemerintah yang relevan (Saleh *et al.*, 2015).

Pemerintah telah melakukan program untuk mendukung peningkatan produktivitas populasi sapi di Indonesia. Program yang telah dilakukan adalah UPSUS SIWAB (Upaya Khusus Sapi Induk Wajib Bunting) yang tertuang dalam Peraturan Menteri Pertanian no.48/Permentan/PK.210/10/2016 dengan tujuan percepatan peningkatan populasi sapi potong (Sirajuddin *et al.*, 2020). Kegiatan yang dilaksanakan pada program ini seperti inseminasi buatan (IB), penyediaan dan distribusi semen beku, nitrogen cair (N₂), serta pemenuhan hijauan pakan. Kemudian pada tahun 2020, program ini dilanjutkan dengan program SIKOMANDAN (Sapi Kerbau Andalan Negeri). Dalam mendukung program ini, diperlukan adanya penyediaan semen beku yang dihasilkan dari pejantan unggul yang nantinya akan digunakan dalam inseminasi buatan (Adiputra *et al.*, 2022).

Salah satu faktor yang mempengaruhi inseminasi buatan adalah kualitas semen sapi jantan yang digunakan (Hasbi *et al.*, 2024). Pande *et al.*, (2018) menyatakan bahwa semen sapi *frieswall* (persilangan sapi Friesian Holstein dan Sahiwal) dengan kandungan protein FAA menunjukkan kualitas semen lebih baik dibandingkan tanpa protein FAA. Karunakaran dan Devanthan (2017) menambahkan semen sapi yang positif memiliki protein FAA mempunyai kemampuan kapasitas dan perlindungan terhadap stress oksidatif yang lebih baik. Protein FAA ditemukan di plasma semen yang diproduksi di kelenjar aksesori dan mampu meningkatkan angka kebuntingan sebanyak 16-19% pada ternak (Beliin *et al.*, 1998). Namun, sapi dengan kualitas semen yang sama, belum tentu memiliki kemampuan fertilitas yang sama. Perbedaan kemampuan fertilitas diperkirakan karena terdapat perbedaan kandungan protein FAA (Sardjito *et al.*, 2011). Oleh karena itu, penelitian terhadap identifikasi protein FAA pada semen sapi Bali diharapkan menghasilkan informasi penting yang nantinya dapat dimanfaatkan dalam pengembangan kedepannya.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi protein FAA pada semen sapi Bali serta kaitannya dengan kualitas semen.

1.3 Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai hubungan protein FAA terhadap kualitas semen sapi Bali.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2024 sampai Mei 2025, bertempat UPT Pelayanan Inseminasi Buatan dan Produksi Semen (UPT-PIBPS) Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan, Desa Pucak, Kecamatan Tompobulu, Kabupaten Maros; Kecamatan Tanete Riaja, Kabupaten Barru; *Corpora Scince*, PT. Wiralab Scientific, Yogyakarta; dan Laboratorium Reproduksi, Gedung Genomik KST Cibinong, Pusat Riset Zoologi Terapan BRIN, Jawa Barat.

2.2 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen pejantan Sapi Bali sebanyak 6 ekor berumur 8-10 tahun. Penampungan dilakukan di UPT Pelayanan Inseminasi Buatan dan Produksi Semen Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan, Desa Puca, Kecamatan Tompobulu, Kabupaten Maros dan Kecamatan Tanete Riaja, Kabupaten Barru. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini air hangat, vaselin, tissue, aluminium foil spiritus, *eosin-nigrosin*, andromed, aquabidest, larutan urea buffer (8 M urea, 75 mM NaCl, 50 mM Tris), pewarna giemsa, *phosphate buffer saline* (PBS), inhibitor protease, larutan *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST) (Tris 3.09 gr; asam citrate 1,73 gr; fruktosa 1,27 gr; 100 ml aquabidest) straw, Tris-HCl, MS-grade trypsin, formic acid, dan semen beku.

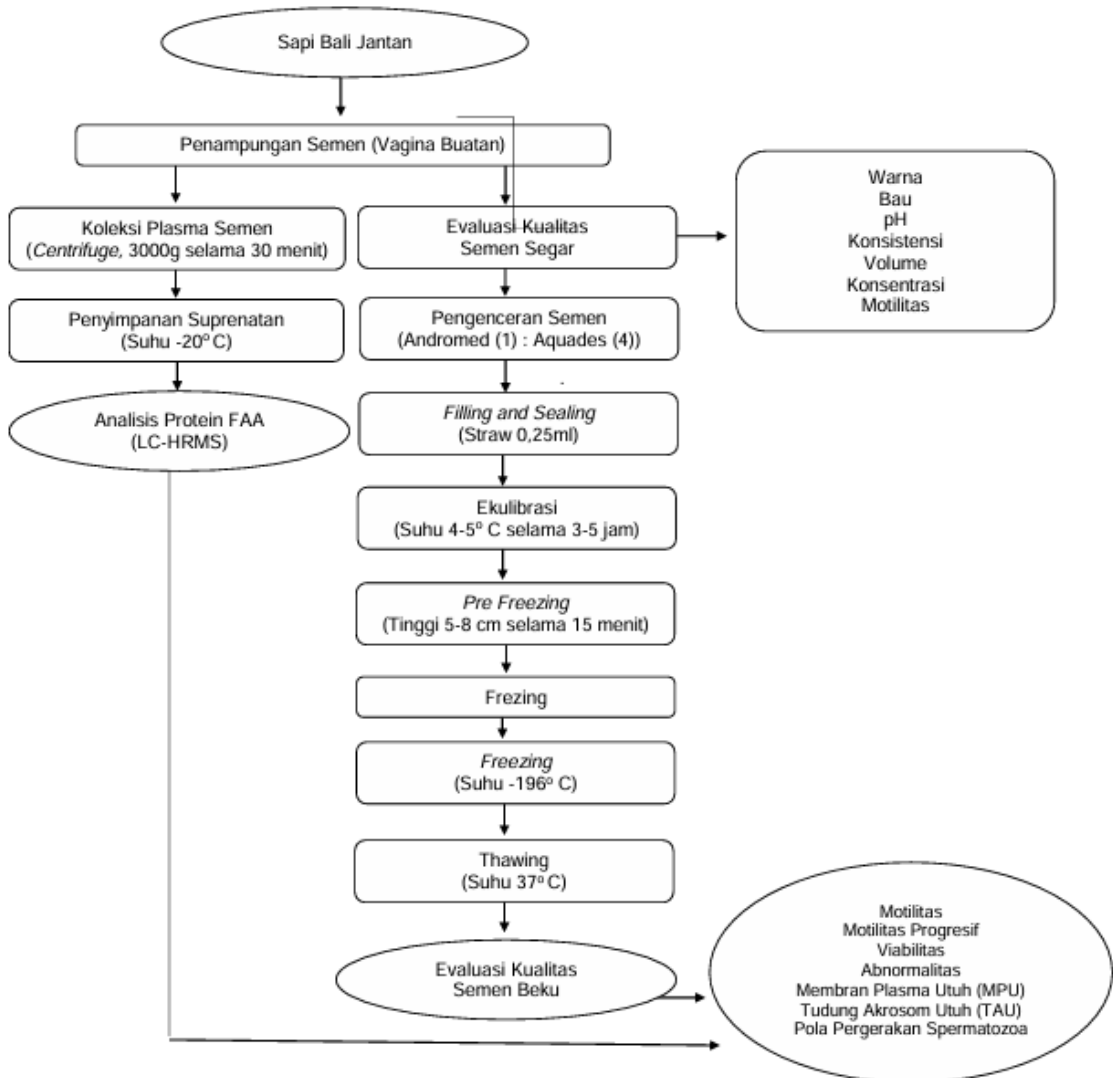
Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah vagina buatan, termos, ember, tabung sperma, *object glass*, *cover glass*, gunting, pH *indicator paper*, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, mesin *filling and sealing* (minitube, Jerman), filter 0.20 µL PVDF (Thermo Fisher) *photometer* SDM-6 (minitube, Jerman), mikroskop trinokuler Olympus CX31 (Olympus, Jepang), waterbath (minitube, Jerman), *centrifuge EBA 200* (Hettich, Jerman), Vanquish™ Horizon UHPLC with Binary Pump (Thermo Scientific™, Germering, Jerman), Orbitrap™ Exploris 240 HRMS (Thermo Scientific™, Bremen, Jerman), Optamax™ NG Heated Electrospray Ionization (H-ESI), dan *computer assisted semen analyzer* (CASA) dengan program sperma vision 3.7 (minitube, Jerman).

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan sebanyak 6 ekor sapi Bali dengan 3 ulangan penampungan semen, identifikasi protein FAA pada semen sapi Bali menggunakan metode deskriptif kuantitatif.

2.3.2 Alur Penelitian



Gambar 1. Diagram Alir Prosedur Penelitian

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.2.1 Ternak

Ternak yang digunakan adalah sapi jantan berumur 8-10 tahun yang dipelihara di UPT Pelayanan Inseminasi Buatan dan Produksi Semen Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan, Desa Puca, Kecamatan Tompobulu, Kabupaten Maros dan dan Kecamatan Tanete Riaja, Kabupaten Barru. Ternak diberi pakan 2 kali sehari berupa hijauan segar pada pagi dan sore hari, serta pemberian air minum secara *adlibitum*.

2.3.2.2 Koleksi Semen dan Plasma Semen

Koleksi semen dan plasma semen dilakukan 1 kali dalam seminggu di UPT Pelayanan Inseminasi Buatan dan Produksi Semen (UPT-PIBPS) Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan, Desa Puca, Kecamatan Tompobulu, Kabupaten Maros dan Kecamatan Tantere Riaja Kabupaten Barru menggunakan sapi Bali. Koleksi semen dilakukan menggunakan metode vagina buatan sedangkan koleksi plasma semen dilakukan dengan metode sentrifugasi menggunakan centrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit (Iskandar *et al.*, 2023).

2.3.2.3 Analisis Protein

2.3.2.3.1 Preparasi sampel

Preparasi plasma semen dimulai dengan menambahkan 2,5 μL inhibitor protease kedalam 100 μL sampel lalu dicentrifuge dengan kecepatan 20.000 rpm selama 30 menit di suhu 4 $^{\circ}$ C. Membuang pellet yang tersisa dan mencampur supernatan dengan aseton (1:5) kemudian disimpan pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama semalam lalu sampel di centrifuge kembali dengan kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 $^{\circ}$ C. Pelet yang terpisah dihomogenkan dengan 100 μL urea buffer (8 M urea, 75 mM NaCl, 50 mM Tris), lalu menambahkan 10 μL 50 mM dithiothreitol dan diinkubasi pada suhu 56 $^{\circ}$ C selama 25 menit. Setelah itu, menambahkan 10 μL 50 mM iodoacetamide dan diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap. Sampel yang telah diinkubasi dihomogenkan dengan 25 mM Tris-HCl (1:5) dan ditambahkan 10 μL MS-grade trypsin. Sampel disimpan pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 17 jam. Menambahkan 10 μL formic acid dan menyaring sampel menggunakan filter 0.20 μL PVDF (*Thermo Fisher*) sebelum sampel di analisis.

2.3.2.3.2 Analisis Proteomik

Analisis proteomik konsentrasi protein seminal plasma dianalisis melalui uji menggunakan LC-HRMS menggunakan *Liquid Chromatography* (Thermo Scientific™ Vanquish™ Horizon UHPLC with Binary Pump, Germering Germany) dan *High Resolution Mass Spectrometry* (Thermo Scientific™ Orbitrap™ Exploris 240 HRMS, Bremen Germany). Pemisahan peptida dilakukan menggunakan fase Gerak air *MS-grade* yang mengandung 0,1% formid acid (A) dan fase gerak asetonitril *MS-grade* yang mengandung 0,1% formid acid (B) menggunakan Teknik gradien. Kondisi fase ini dimulai dari 5% B selama 1 menit, 5-50% B buffer selama 30 menit, dan pada 50% B ditahan selama 2 menit, lalu pada 90% B ditahan selama 2 menit, setelah itu dikembalikan ke kondisi awal 5% B sampai 45

menit dengan kecepatan aliran 75 $\mu\text{L}/\text{menit}$. Analisis dilakukan menggunakan ThermoScientific™ Acclaim™ Acclaim™ PepMap™ 100 dengan panjang 150 mm x ID 1 mm x ukuran partikel 3 μm dengan suhu 30 °C dan volume injeksi 10 μL . Pengukuran spektrometri massa menggunakan Thermo Scientific™ Orbitrap™ Exploris 240 HRMS (Bremen, Germany) mode MS/dd-MS2 penuh yang dioperasikan dalam mode positif dengan aliran gas selubung sebesar 10 AU sedangkan aliran gas bantu sebesar 5 AU. Suhu kapiler diatur sebesar 300 °C dengan tegangan semprot 4.000 V. Rentang pemindaian dilakukan pada 350-1,200 m/z dengan resolusi MS 120,000 FWHM dan 15,000 FWHM dd-MS2 (modifikasi dari Windarsih *et al.*, 2022).

2.3.3.3.3 Analisis Profil Protein

Analisis Profil Protein menggunakan *LC-HRMS* berupa total ion kromatogram yang selanjutnya diekstraksi untuk mengidentifikasi kandungan protein dalam sampel secara menyeluruh. Data urutan protein pada sampel plasma semen dicari pada www.uniprot.org European Molecular Biology Laboratory (EMBL) yang selanjutnya disesuaikan dengan hasil analisis sampel protein menggunakan Thermo Scientific™ Proteome Discoverer™ (San Jose, CA, USA) (modifikasi dari Windarsih *et al.*, 2022).

2.3.3.4 Evaluasi Kualitas Semen

Semen segar yang telah ditampung di evaluasi secara makroskopis (warna, bau, pH, konsistensi, volume) dan mikroskopis (konsentrasi dan motilitas) sebelum diproses lebih lanjut menjadi semen beku.

2.3.3.4.1 Evaluasi Kualitas Semen Segar

Metode evaluasi kualitas semen segar secara makroskopis dan mikroskopis sebagai berikut:

- Warna

Warna semen segar yang normal dilihat dengan warnanya yang berwarna putih susu atau putih krem.

- Bau

Bau semen dapat dicium pada tabung penampung dengan cara melewati tabung penampung semen dibawah lubang hidung. Adapun bau normal semen sapi adalah berbau amis khas disertai bau ternak itu sendiri.

- Derajat Keasaman (pH)

Nilai pH dinilai menggunakan *pH indicator paper* dengan menetaskan semen pada indikator pH (Adiputra *et al.*, 2022)

- Konsistensi

Konsistensi merupakan tingkat kekentalan dari semen yang telah ditampung. Konsistensi menandakan kepadatan spermatozoa dalam semen tersebut. semakin kental semen yang diejakulasikan oleh seekor pejantan, maka semakin padat jumlah spermatozoa didalam semen tersebut.

- Volume
Volume semen merupakan jumlah semen yang di ejakulasikan oleh setiap ekor ternak dalam satuan mililiter yang dapat diukur dengan melihat skala pada tabung setelah penampungan.
- Konsentrasi
Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan mencampurkan 0,035 ml semen dengan 3,5 ml larutan NaCl 0,9% kemudian dihomogenkan. Setelah itu memindahkan kedalam kuvet untuk diukur konsentrasinya menggunakan *photometer* SDM-6 dan melihat hasil perhitungan konsentrasi spermatozoa pada layar *photometer* tersebut (Adiputra *et al.*, 2022).
- Motilitas
Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan meneteskan semen pada *object glass* yang ditutup dengan *cover glass*. Kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Motilitas dinilai secara subjektif dengan melihat jumlah spermatozoa yang bergerak. Adapun skala penilaian motilitas spermatozoa berkisar antara 0-100%. Semen segar harus memiliki motilitas minimal 70% agar dapat diproses menjadi semen beku (Adiputra *et al.*, 2022).

2.3.3.4.2 Evaluasi Kualitas Semen Beku

Metode evaluasi kualitas semen beku secara mikroskopis (motilitas, motilitas progresif, abnormalitas, viabilitas, TAU, MPU, dan kinematika spermatozoa sebagai berikut:

- Motilitas
Semen *post thawing* sebanyak 5 μ l diteteskan pada *object glass* yang ditutup dengan *cover glass* kemudian diletakkan kedalam mikroskop dengan perbesaran 400x. Motilitas spermatozoa yang dinilai dilihat dari spermatozoa yang bergerak secara progresif. Adapun skala penilaian motilitas spermatozoa berkisar antara 0-100% (Adiputra *et al.*, 2022).
- Motilitas Progresif
Motilitas progresif merupakan pergerakan spermatozoa yang bergerak secara progresif maju kedepan. Motilitas progresif spermatozoa dievaluasi dengan menempatkan semen *post thawing* sebanyak 5 μ l pada *object glass* yang ditutup dengan *cover glass* kemudian diamati menggunakan CASA (Hasbi *et al.*, 2023).
- Viabilitas
Semen *post thawing* sebanyak 10 μ l diteteskan pada *object glass*. Kemudian menambahkan pewarna *eiosin-nigrosin* sebanyak 10 μ l dan dihomogenkan. Setelah itu membuat ulasan pada *object glass* yang selanjutnya diamati dibawah mikroskop. Spermatozoa yang hidup pada bagian kepala tidak akan menyerap warna sedangkan spermatozoa yang mati akan menyerap warna pada bagian kepala. Menurut Adiputra dkk.

(2022) persentase spermatozoa hidup (%) dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Spermatozoa hidup (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

- Abnormalitas

Semen *post thawing* sebanyak 10µl ditetaskan pada *object glass*. Kemudian menambahkan pewarna *eiosin-nigrosin* sebanyak 10µl dan dihomogenkan. Setelah itu membuat ulasan pada *object glass* yang selanjutnya diamati dibawah mikroskop. Abnormalitas spermatozoa diamati dengan melihat kelainan pada kepala, badan, atau ekor sperma. Menurut Adiputra dkk. (2022) rumus menghitung abnormalitas spermatozoa sebagai berikut:

$$\text{Abnormalitas} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

- Membran Plasma Utuh

Semen *post thawing* sebanyak 20 µl ditetaskan pada tabung yang berisi 200 µl larutan HOST kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 hingga 45 menit. Setelah itu, meneteskan larutan yang telah diinkubasi pada *object glass* dan ditutup menggunakan *cover glass* lalu diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Spermatozoa dengan ekor yang melingkar merupakan spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh, sedangkan spermatozoa dengan ekor lurus merupakan spermatozoa dengan membran plasma rusak atau tidak utuh. Adapun rumus menghitung persentase MPU menurut Adiputra dkk. (2022) adalah sebagai berikut:

$$\text{MPU(\%)} = \frac{\text{spermatozoa yang bereaksi}}{\text{spermatozoa yang bereaksi} + \text{spermatozoa tidak bereaksi}} \times 100\%$$

- Tudung Akrosom Utuh

Tudung akrosom utuh (TAU) dievaluasi menggunakan pewarna Giemsa (Giemsa absolute 7,5%; PBS 5%; aquabidest 87,5%). Sebanyak 10 µL semen post thawing dibuat preparate ulas dan direndam dalam ethanol 96% selama 20 menit. Preparate yang telah direndam dikering anginkan lalu direndam dalam pewarna Giemsa selama 2,5 jam dan dikering anginkan. Preparate diamati menggunakan mikroskop (perbesaran 200x) dengan menghitung minimal 200 sel. Spermatozoa dengan tudung utuh ditandai dengan spermatozoa yang menyerap warna ungu pada bagian kepala sedangkan spermatozoa dengan tudung rusak adalah spermatozoa yang tidak menyerap warna atau berwarna ungu pucat (Prihantoko *et al.*, 2020). Menurut Fatah dkk. (2018), persentase TAU dapat dihitung minimal 100 spermatozoa dengan rumus :

$$\text{TAU(\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa bertudung utuh}}{\text{Jumlah spermatozoa bertudung utuh} + \text{Jumlah spermatozoa tidak utuh}} \times 100\%$$

- Pola Pergerakan Spermatozoa

Pola pergerakan spermatozoa merupakan salah satu faktor yang sangat berperan dalam proses fertilisasi. Pola pergerakan spermatozoa pada semen sapi dapat diamati menggunakan CASA . pola pergerakan spermatozoa dapat dilihat dengan pola *distance of the curved line (DCL)*, *distance of the average path (DAP)*, *distance of the straight line (DSL)*, *velocity of the curved line (VCL)*, *velocity of the average pathway (VAP)*, *velocity of the straight line (VSL)*, *linearity (LIN)*, *straightness (STR)*, *wobble (WOB)*, *beat cross frequency (BCF)*, *amplitude of lateral (ALH)*, dan *average orientation and change of head (AOC)* (Junaedi et al., 2024).

2.4 Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati meliputi identifikasi protein FAA, motilitas progresif spermatozoa, viabilitas spermatozoa, abnormalitas spermatozoa, MPU, TAU, dan kinematika spermatozoa.

2.5 Analisis Data

Data protein FAA dianalisis menggunakan Thermo Scientific™ Proteome Discoverer™ 2.5 (San Jose, CA, USA) dalam bentuk kelimpahan protein yang dikonversi dalam bentuk persen (%) dan dianalisis secara deksriptif sedangkan data kualitas semen dianalisis menggunakan analisis statistik dengan program IBM SPSS statistik versi 26 (IBM Corp., NY, USA). Hasil disajikan dalam bentuk rata-rata±standar deviasi dengan nilai $P < 0.05$ menunjukkan adanya perbedaan nyata dan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan. Adapun korelasi antara kelimpahan protein FAA dan kualitas semen dianalisis menggunakan *pearson's correlation*. Model matematis RAL menurut Limbongan et al. (2021) dapat dilihat sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

I = 1, 2, ..., 6

j = 1, 2, 3

Y_{ij} = pengamatan pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

μ = rata-rata umum

α_i = pengaruh perlakuan ke- i

ε_{ij} = pengaruh acak pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j