

Mengukur Kadar Protein *Fertility Associated Antigen* (FAA) pada Semen Sapi Menggunakan Qubit Fluorometer

Measure Content *Fertility Associated Antigen* (Faa) Protein Level In Bovine Sperm Counted By Qubit Fluorometer

¹Trilas Sardjito, ²Ayu Aprillia Megawati, ¹Tri Wahyu Suprayogi, ¹Handayani Tjitro

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Unair

² PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : mkh_ua@yahoo.com

Abstract

Fertility Associated Antigen (FAA) is a protein on sperm bull which helpful to increase pregnancy rate. The present of this protein specifically can increase bull fertility. This research aimed to measure FAA on bull sperm counted by Qubit Fluorometer. Sample used are semen from 4 bulls which are 2 Simmental, 1 Friessian Holstein, and 1 Limousine. Semen obtained from frozen semen laboratory Teaching Farm of Airlangga University. Semen is accommodated using artificial vagina. Then do the macroscopic (volume, scent, pH, color, and consistency) and microscopic (motility, viability, and concentration) examination. Sample then tested result in protein FAA. From some protein, 31 kDa show up and that protein which identified as FAA after it is reacted with monoclonal antibody anti-FAA. After that the level is counted by Qubit Fluorometer. The result is 31,0; 30,1; 31,6; and 50,9 (µg/mL elusi sample). This research show that FAA on each bull is different.

Keywords : FAA, Semen, Qubit Fluorometer

Pendahuluan

Indonesia dengan jumlah penduduk di atas 220 juta jiwa membutuhkan pasokan daging yang besar. Peternakan domestik belum mampu memenuhi permintaan daging dari masyarakat. . Peningkatan konsumsi daging sapi per kapita penduduk Indonesia cenderung meningkat seiring bertambahnya jumlah penduduk.

Suatu realita bahwa untuk memenuhi kebutuhan daging nasional yang ternyata per kapita per tahun masih sangat kecil (menurut Dirjen Peternakan sekitar 1,72 kg/kapita/tahun), populasi sapi potong yang ada sekarang ini (berdasarkan data statistik Dirjen Peternakan sekitar 10,5 juta ekor) tidak mampu untuk memenuhinya.

Peningkatan populasi ternak sapi, menuntut penyediaan sumber bibit, baik sebagai ternak bibit maupun bakalan untuk penggemukan (Tolihere, 1985). Untuk meningkatkan populasi ternak sapi diperlukan peningkatan efisiensi reproduksi dan fertilitas ternak (Hafez, 2000). Maka dari sudut pandang itulah, para ilmuwan mencari cara tepat

untuk meningkatkan reproduksi dan fertilitas ternak. Diantaranya adalah inseminasi buatan (IB). Teknologi IB terus berkembang di berbagai negara dan mulai dikembangkan di Indonesia sebelum tahun 1950 oleh Prof. Zeit (Partodiharjo, 1992).

Teknologi IB memiliki efisiensi dan manfaat yang sangat besar bagi perkembangan peternakan di Indonesia. Seperti misalnya, seekor pejantan yang memiliki sifat genetik baik dapat membuahi ratusan betina dan peternak tidak perlu memelihara pejantan, sehingga secara otomatis akan meminimalisir biaya pemeliharaan. Pejantan unggul tersebut adalah pejantan yang telah mengalami seleksi, sehingga anak-anak yang dihasilkan mendapatkan sifat yang baik pula (Partodiharjo, 1992).

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan IB adalah kualitas semen yang digunakan (Webb, 2004). Cara yang dilakukan melalui pemeriksaan, baik makroskopis maupun mikroskopis. Pengujian konsentrasi dan morfologi spermatozoa merupakan dasar hubungan kondisi spermatozoa yang dapat menentukan tingkat abnormal dan dapat berpengaruh pada fertilitas

ternak (Januskaukas dan Zilinskas, 2002). Keuntungan menggunakan IB diantaranya memberikan penggunaan pejantan secara luas, meningkatkan laju seleksi genetik, mengurangi resiko penularan penyakit kelamin dan menekan biaya untuk pemeliharaan pejantan (Hunter, 1995).

Sapi yang mempunyai kualitas semen sama kadang-kadang memiliki prosentase yang berbeda dalam membuahi sel telur. Hal ini menyebabkan tanda tanya besar apa yang menyebabkan variasi tersebut. Penelitian baru telah menemukan protein yang dihasilkan oleh kelenjar aksesori yang dilepaskan ke dalam semen setelah ejakulasi. Protein ini, diidentifikasi sebagai *Fertility Associated Antigen* (FAA) (Lenz *et al.*, 2000). FAA menunjukkan keberadaan kumpulan protein i-like DNase pada kelenjar seks aksesoris sapi dan membentuk dasar untuk identifikasi kandidat penanda genetik untuk kesuburan sapi (McCauley *et al.*, 1999). Pada saat spermatozoa meninggalkan epididimis spermatozoa belum mengandung (FAA). Protein ini diproduksi dalam kelenjar vesikula seminalis, prostat, dan kelenjar cowper. Semen yang terdiri dari plasma seminalis akan mengikat *Heparin Binding Protein* (HBP) yang akan mempengaruhi kemampuan spermatozoa dalam melakukan kapasitasi (McCauley *et al.*, 2004).

Penelitian lebih lanjut menemukan bahwa sapi jantan dengan protein FAA dalam membran spermatozoanya akan meningkatkan angka kebuntingan sebesar 16-19% pada sapi betina ($n = 12.000$), ketika melahirkan secara alami atau melalui inseminasi buatan bila dibandingkan dengan sapi yang tidak memiliki (FAA) (Lenz *et al.*, 2000). Bellin *et al.* (1998) mengatakan bahwa kehadiran FAA dalam plasma membran spermatozoa positif berasosiasi memberikan angka keturunan yang tinggi dalam program IB.

Berdasarkan latar belakang diatas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengukur kadar protein *Fertility Associated Antigen* (FAA) dalam semen sapi. Dari hasil penelitian ini, diharapkan mampu bermanfaat bagi ilmu peternakan khususnya untuk meningkatkan kesuburan ternak.

Materi dan Metode Penelitian

Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah: Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: vagina buatan, tabung penampungan semen, tabung reaksi, aluminium foil, thermometer, pengaduk kaca, beaker glass, erlemeyer, pipet pasteur, mikro pipet, gelas ukur, mikroskop, petridish, pipet mikro, tip, handuk, lap tangan,

kapas, vaselin, kertas label, *stick glass*, thermometer, alkohol 70%, vagina buatan, *innerliner*, *glove*, *preputium washing machine* dengan air hangat/NaCl 0,9%, tabung sperma, corong, pompa, pelindung tabung sperma (protective tube), sikat pembersih, tali pengikat ekor, Segel tambang, tambang brongsong, kandang kawin, mikroskop, *beaker glass*, *sticle glass*, *object glass*, *cover glass*, tissue, *spektro-photometer*, qubit fluorometer dan kit.

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah semen dari 4 sapi jantan yang diambil dengan menggunakan vagina buatan.

Isolasi Sampel Sperma Sapi

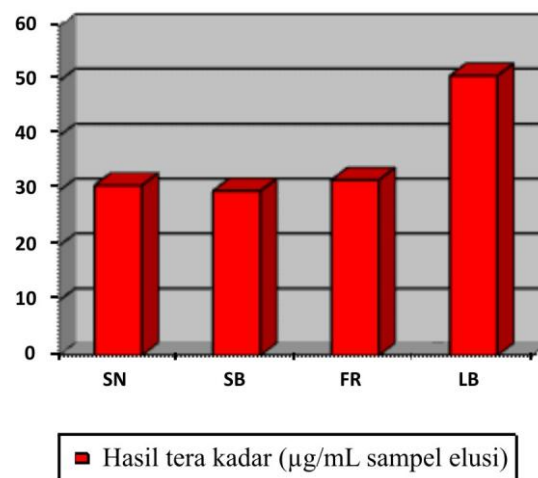
Semen ditampung dari sapi jantan jenis Limosin, Fressian Holstein, dan Simental dengan menggunakan vagina buatan. Penampungan semen dilakukan pada waktu sore hari sekitar pukul 16.00-17.00 WIB. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan secara makroskopis (volume, bau, warna, pH, dan konsistensi) dan secara mikroskopis (motilitas, viabilitas, konsentrasi). Setelah itu didapatkan isolate elusi berupa protein FAA dengan BM 31kDa.

Menghitung Kadar Protein FAA menggunakan Qubit Fluorometer

Pertama menyiapkan bahan sampel yang telah dipanaskan 100°C selama 5 menit. Sampel yang digunakan 10 μ l. Dilanjutkan dengan menyiapkan *Quant it reagent*, *Quant it buffer* (kedua bahan ini yang nantinya dicampur untuk membuat working solution), dan 3 standar kit. Setelah semua bahan terkumpul, membuat *working solution* (sesuai kebutuhan). Siapkan Buffer 199 μ l dan Reagen 1 μ l / sampel dan standar kit. Jadi membuat *working solution* sebanyak 1400 μ l (untuk 4 sampel dan 3 standart kit masing-masing 190 μ l). Lalu masukkan *reagent* dan *buffer* kedalam satu tube yang sama. Larutan ini yang nantinya akan di tambahkan ke dalam semua tube (ke 4 sampel dan ke3 standar). Selanjutnya, tambahkan masing-masing 190 μ l working solution tersebut ke dalam 4 tube sampel @ (10 μ l), tube putih berisi standard O (10 μ l), tube kuning berisi standard 200 (10 μ l), tube orange berisi standard 400 (10 μ l). Perlu diketahui bahwa ketiga standard ini telah tersedia didalam *kit invitrogen Quant It*. Setelah keempat tube diatas sudah ditambahkan working solution, kemudian resuspensikan. Inkubasikan keempat tube tersebut selama 15 menit (kalau masih ada gelembung udaranya harus diambil). Terakhir nyalakan Qubit Fluorometer, setting pada angka 90. Setting RUN new callibration. Hitung standard

Tabel 1. Penghitungan konsentrasi spermatozoa sampel

No	Sampel	Konsentrasi spermatozoa (jt/ml)	Volume (ml)	Kadar FAA ($\mu\text{g/mL}$ sampel elusi)
1	Simental Notoroso (SN)	1441	7,5	31,0
2	Simental Baravalian (SB)	1264	3,4	30,1
3	Fresian Holstein Ronggolawe (FR)	1054	7,2	31,6
4	Limosin Baluran (LB)	1521	7,7	50,9

Gambar 1. Diagram Batang Hasil Peneraan Kadar *Fertility Associated Antigen* (FAA) ($\mu\text{g/mL}$)

1,2,3 dan terakhir sampel. Pada standard 1,2,3 akan muncul penghitungan sebesar 90. Sedangkan pada sampel akan muncul besaran hasil yang berbeda.

Hasil dan Pembahasan

Jumlah isolate elusi yang akan diukur menggunakan Qubit fluorometer adalah Simental Notoroso 10 μL , Simmental Barravarian 10 μL , Fresian Holstein 10 μL , Limosin Baluran 10 μL . Ke 4 sampel tersebut berasal dari konsentrasi yang berbeda-beda (Tabel 1)

Berdasarkan hasil penelitian ini, konsentrasi dari spermatozoa yang tinggi belum tentu mempunyai kadar FAA yang tinggi sebagai salah satu faktor yang mempengaruhi kesuburan. Dari data yang telah diperoleh dalam table 1, ternyata ditemukan kadar FAA yang tinggi tidak selalu didapatkan dari jumlah spermatozoa yang tinggi. Hasil penelitian berdasarkan volume ejakulat, konsentrasi spermatozoa, dan peneraan menggunakan Qubit fluorometer dari sampel Simental

Notoroso (SN) yang memiliki volume 7,5 ml, konsentrasi spermatozoa 1.441 jt/ml, hasil tera 31,0 $\mu\text{g/mL}$. Sampel Limosin Baluran (LB) yang memiliki volume 7,7 ml, konsentrasi spermatozoa 1.521 jt/ml, hasil tera 50,9 $\mu\text{g/mL}$. Sampel Fresian Holstein Ronggolawe (FR) dengan volume 7,2 ml, konsentrasi spermatozoa 1.054 jt/ml, hasil tera 31,6 $\mu\text{g/mL}$. Dan sampel Simental Baravalian (SB) bervolume 3,4 ml, konsentrasi 1.264 jt/ml, hasil tera 30,1 $\mu\text{g/mL}$. Sehingga bisa dilihat, bahwa sapi yang memiliki konsentrasi spermatozoa dan volume ejakulat yang tinggi belum tentu memiliki kadar FAA yang tinggi pula, dimana *Fertility Associated Antigen* (FAA) merupakan protein yang berperan dalam peningkatan kesuburan pada sapi pejantan (Mc Cauley, 2004). FAA adalah protein yang terikat pada HBP yang diproduksi di plasma seminal, kelenjar aksesoris, dan membran sperma (Mc Cauley *et al.*, 1999).

Fertility Associated Antigen merupakan unsur intrinsik yang berguna sebagai fasilitator reaksi kapasitasi dalam rangkaian reaksi akrosom pada

saluran reproduksi betina sehingga keberhasilan fertilisasi akan semakin meningkat (Therien *et al.*, 1998). Peningkatan fertilisasi inilah yang diharapkan akan mengatasi masalah-masalah dan tantangan yang dihadapi subsektor peternakan terutama dalam meningkatkan populasi, produksi dan produktivitas ternak baik secara kualitas maupun kuantitas.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini bisa disimpulkan bahwa kadar *Fertility Associated Antigen* (FAA) 31 kDa dapat dihitung dari 10 µl isolat hasil Elusi semen sapi yang diukur menggunakan Qubit fluorometer dan mempunyai kadar yang berbeda-beda antara sapi satu dengan yang lain. Hasil pengukuran sampel Simental Notoroso (SN) 31,0 µl, Simental Baravalian (SB) 30,1 µl, Fresian Holstein Ronggolawe (FR) 31,6 µl, Limosin Baluran (LB) 50,9 µl.

Daftar Pustaka

- Bellin, M.E., J.N. Oyarzo, H.E. Hawkins, H. Zhang, R. G. Smith, D.W. Forrest, and L. R. Sprott. 1998. Fertility-associated Antigen on Bull Sperm Indicates Fertility Potential. *J. Anim. Sci.* 76:2032-2039.
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7th ed. Lippicott Williams dan Wilkins. Philadelphia. USA.
- Hunter, R.H.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB, Bandung, Penerbit Universitas Udayana, Bali.
- Januskaukas, A. and H. Zilinkas. 2002. Bull Semen Evaluation Post-Thaw and Relation of Semen Characteristics to Bull Fertility. *Veterinarija ir zootechnika*. T. 17 (39)
- Lenz, R. W., H. Zhang, J. N. Oyarzo, M. E. Bellin, and R.L.Ax. 2000. Bovine Fertility-Associated Antigen (FAA) and a Recombinant Segment of FAA Improve Sperm Function. SSR, Abstract 80.
- McCauley, T. C., M. E. Bellin, Z. Huanmin, and R. L. Ax. 1999. "Purification and Characterization of Fertility-Associated Antigen (FAA) in Bovine Seminal Fluid," *Mol. Reprod. and Dev.* 54 (1999): 145–153.
- McCauley, T. C., G. R. Dawson, J. N. Oyarzo, J. McVicker, S. F. Marks, and R. L. Ax. 2004. Development and validation of a lateral-flow cassette for fertility diagnosis in bulls. *IVD Technology* 10:35-40.
- Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jurusan Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Penerbit Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Therien, I., R. Moreau, and P. Manjunath. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 59:786-776.
- Toelihere, M.R., 1985. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa, Bandung.
- Webb, D. W. 2004. *Artificial Insemination in Dairy Cattle*. http://edis.ifas.ufl.edu/BO_DYDSO_89#table-