

**PROFIL PROTEIN SPERMATOZOA SETELAH  
PEMBEKUAN**

Oleh :

**M. Dwi Susan**

**0910910056**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

**PROFIL PROTEIN SPERMATOZOA SETELAH  
PEMBEKUAN**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Oleh :

**M. Dwi Susan**

**0910910056**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**PROFIL PROTEIN SPERMATOZOA SETELAH  
PEMBEKUAN**

Oleh :

**M. Dwi Susan**  
**0910910056**

Telah dipertahankan di depan majelis penguji pada tanggal 12 Juli 2013 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar sarjana dalam Bidang Biologi

Mengetahui,  
**Pembimbing I**

**Dr. Sri Rahayu, M. Kes**  
**NIP. 196205281987012 001**

Mengetahui,  
**Ketua Program Studi**  
**Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Rodliyati Azrianingsih, S.Si., MAgr. Sc., Ph.D**  
**NIP. 19700128 199412 2 001**

## HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : M. Dwi Susan  
Nim : 0910910056  
Jurusan : Biologi  
Judul skripsi : Profil Protein Spermatozoa Setelah Pembekuan

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Tugas Akhir ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila dikemudian hari diketahui isi skripsi saya merupakan hasil plagiat, makasaya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Juli 2013  
Yang menyatakan

**M. Dwi Susan**  
**Nim. 0910910056**

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## **PROFIL PROTEIN SPERMATOZOA SETELAH PEMBEKUAN**

M. Dwi Susan, Sri Rahayu. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. 2013

### **ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui profil protein spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan. Protein spermatozoa diisolasi dari 10 sampel (5 sampel semen segar dan 5 sampel semen beku) sapi Friesian holstein dengan pemisahan fraksi atas dan bawah hasil sentrifugasi untuk memisahkan spermatozoa dengan seminal plasma. Profil protein dianalisis menggunakan SDS PAGE dengan konsentrasi separating gel 12,5%. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan profil protein spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan. Hasil analisis menunjukkan bahwa pada fraksi atas semen segar ditemukan 12 pita protein dengan berat molekul 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 20, 14, 12, 10, 9 kDa, sedangkan pada fraksi atas semen beku ditemukan 8 pita protein dengan berat molekul 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 14, 12 kDa. Pada fraksi bawah semen segar ditemukan 16 pita protein dengan berat molekul 128, 116, 103, 90, 75, 69, 48, 40, 31, 26, 20, 14, 10, 9, 7, 6 kDa, sedangkan pada fraksi bawah semen beku ditemukan 11 pita protein dengan berat molekul 128, 116, 103, 90, 75, 69, 48, 40, 31, 20, 14 kDa. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan profil protein spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan berdasarkan berat molekul protein.

kata kunci : pembekuan, protein, SDS PAGE, spermatozoa

# PROTEIN PROFILE SPERMATOOZOA AFTER FREEZING

M. Dwi Susan, Sri Rahayu. Department of Biology, Faculty of  
Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Malang.

2013

## ABSTRACT

The purpose of this research was to analyze protein profile of spermatozoa before and after semen freezing. Spermatozoa proteins was isolated from 10 sample Friesian holstein using separate upper and lower fraction of sentrifugation result. The protein was characterized by SDS PAGE. Theprotein with moleculer weight of 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 20, 14, 12, 10, 9 kDa were detected in upper fraction of fresh semen, while the protein with moleculer weight of 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 14, 12 kDa were detected in upper fraction of frozen semen. In lower fraction of fresh semen was found protein with molecular weight of 128, 116, 103, 90, 75, 69, 48, 40, 31, 26, 20, 14, 10, 9, 7, 6 kDa, while protein with molecular weights of 128, 116, 103, 90, 75, 69, 48, 40, 31, 20 14 kDa was found in frozen semen. In conclusion, there are different protein profiles of spermatozoa before and after semen freezing based on moleculer weight of protein.

key words : freezing, protein, SDS PAGE, spermatozoa

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, berkah, kasih dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul “**Profil Protein Spermatozoa Setelah Pembekuan**”. Selama penyusunan skripsi, penulis banyak mendapat bimbingan dan saran, serta bantuan baik moril maupun materil. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr. Sri Rahayu, M.Kes sebagai dosen pembimbing I dan ketua Laboratorium BiologiSelulerdan Molekuler atas bimbingan yang telah diberikan untuk menyelesaikan skripsi ini
- 2.Drs. Aris Soewondo M.Si sebagai dosen penguji I dan Dr. Agung Pramana W.M, M.Si sebagai dosen penguji II atas kritik dan saran yang telah diberikan untuk menyelesaikan skripsi ini.
3. Ayahanda Kholik, ibunda Sri Handayani, saudaraku Wulan Fitri Astuti, M. Dwi Susanto, Nabilla P Aradhana, Charissa D Aradhana, Agil A Sanjayadan Anas A Hariski.
4. Tim Laboratorium BiologiSelulerdan Molekuler, khususnya Susiati, S.Si, MBiomed, Arik Arubil, S.Si dan Melina Rubaenah, S.Si.
6. Teman – teman biologi 2009, Yustino Armend Wigoeno, Pangesti Dimiartha, Erni Usnia D, Leni Agustina, Meilisa Dwi Ayu, Savitri Nurlaila.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah mendukung penyelesaian penulisan skripsi ini

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari semua pihak. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi inibermanfaat bagi semua pihak dan menjadi sumbangsih bagi perkembangan ilmu pengetahuan

Malang, Juli 2013

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL.....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI.....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	2
1.4 Manfaat.....	2
<b>II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Semen.....	4
2.2 Seminal Plasma.....	4
2.3 Spermatozoa.....	5
2.4 Protein Spermatozoa.....	8
2.5 Efek Pembekuan Semen.....	10
2.6 SDS PAGE.....	12
<b>III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>14</b>

3.1 Waktu dan Tempat .....	14
3.2 Cara Kerja .....	14
<b>IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>16</b>
4.1 Uji Kuantitatif Protein Spermatozoa.....	16
4.2 Analisis Profil Protein Spermatozoa.....	17
<b>VPENUTUP.....</b>	<b>25</b>
5.1 Kesimpulan.....	25
5.2 Saran.....	25
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>26</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Anatomi Spermatozoa.....	6
Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis Protein Spermatozoa Fraksi Atas.... Dengan SDS PAGE .....	17
Gambar 4.2 Zimogram Elektroforesis Protein Spermatozoa Fraksi.... Atas.....	18
Gambar 4.3 Hasil Elektroforesis Protein Spermatozoa Fraksi Bawah.. Dengan SDS PAGE .....	20
Gambar 4.2 Zimogram Elektroforesis Protein Spermatozoa Fraksi.... Bawah .....	21



## DAFTAR TABEL

Tabel 1 Konsentrasi Protein Total Spermatozoa Fraksi Atas dan.....Bawah.....  
.....16

Tabel 2. Profil Protein Spermatozoa Fraksi Atas.....18

Tabel 3. Profil Protein Spermatozoa Fraks Bawah.....21

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Cara Perhitungan Konsentrasi Protein Total Hasil.....	
Isolasi.....	32
Lampiran 2 Perhitungan Berat Molekul ProteinSpermatozoa Fraksi..	
Atas Dan Bawah.....	33
Lampiran 3 Komposisi Larutan Untuk Isolasi Dan SDS.....	37



## DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Keterangan
APS	Amonium persulfate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
IB	Inseminasi Buatan
CBB	Chomasie Brilliant Blue
kDa	kilo Dalton
MDA	Malondialdehyde
mg	miligram
mL	mililiter
mA	miliamphere
nm	namometer
PBS	Phosphat Buffer Saline
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Rotasi per menit
RSB	Reducing Sample Buffer
SDS	Sodium Deodecyl Sulfate
SDS PAGE	Sodium Deodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	N,N,N',N' -tetramethylenediamine
Uv-Vis	Ultraviolet Visible

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu bioteknologi reproduksi yang berkembang saat ini. Perkembangan pemanfaatan IB semakin pesat sejak diperkenalkan semen beku (Sugoro, 2009). Pembekuan semen bertujuan supaya sel spermatozoa dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama (Kostaman, 2003). Namun, pembekuan spermatozoa menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa (Zilli *et al*, 2009).

Selama proses pembekuan terjadi perubahan konsentrasi larutan intra dan ekstraseluler akibat dari pembentukan kristal es dan keluarnya air karena masuknya krioprotektan didalam sel (Masuda, 1992). Pembentukan kristal es yang besar akan menyebabkan kerusakan membran sel dan komponen intraseluler lainnya (Lemma, 2011 dan Nalella, 2004) yang berakibat pada penurunan kualitas (Zilli *et al*, 2005) seperti penurunan motilitas sebesar (Tanaka *et al*, 2000), peningkatan abnormalitas dan penurunan viabilitas (Dhanju *et al*, 2001), penurunan integritas membran plasma (Nishizono *et al*, 2000), peningkatan fragmentasi DNA (Yildiz *et al*, 2007), kerusakan struktur akrosom dan terhambatnya aktivitas akrosom protease dan akrosin (Talei, 2010). Adanya penurunan kualitas spermatozoa mengakibatkan penurunan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Zilli *et al*, 2005). Kerusakan membran sel selama pembekuan juga bisa disebabkan oleh peningkatan kadar reactive oxygen species (ROS) (Awda *et al*, 2009). Hasil produk ROS seperti Peroksida lipid dan terjadinya peningkatan  $Ca^{2+}$  ekstra dan intraseluler pada membran fosfolipid selama pembekuan akan mengubah struktur dan terdegradasinya membran (Awda, 2009). Terdegradasinya membrane menyebabkan kerusakan komponen sel yang penting seperti DNA (Aitken, 1998).

Kerusakan DNA oleh peroksida lipid seperti pembukaan cincin, pemecahan untai DNA (Awda *et al*, 2009), modifikasi semua basa nukleotida, crosslinking kromatin DNA menyebabkan DNA mengalami mutasi (Agarwal, 2005). Mutasi pada urutan DNA bisa

menyebabkan perubahan struktur protein hasil sintesis protein. Perubahan struktur atau bahkan hilangnya protein spermatozoa selama pembekuan tentunya akan mengakibatkan perubahan aktifitas fungsional protein dengan komponen-komponen lainnya, yang berakibat protein tidak lagi berfungsi maksimal sebagai enzim, reseptor atau saluran ion (Medeiros et al, 2002).

Penelitian Suprayogi dkk (2010) berhasil menemukan 11 pita protein membran spermatozoa sapi dengan berat molekul 11,49, 14,66, 24,74, 28,43, 31,07, 46,32, 51,43, 67,97, 72,77, 83,78 dan 118,72 kDa. Berdasarkan berat molekul tersebut telah banyak penelitian yang berhasil mengidentifikasi jenis proteinnya dan dihubungkan dengan fungsinya. Salah satu contoh fungsi protein spermatozoa adalah membantu inisiasi terhadap signal transduksi sehingga menghasilkan eksositosis akrosomal (Gahmberg et al, 1996). Penelitian Dhanju et al (2001) menunjukkan bahwa kerusakan membran saat pembekuan akan menyebabkan perubahan molekul protein penyusunnya yang ditandai hilangnya beberapa protein dengan berat molekul tertentu. Begitu juga dengan penelitian Hayati dkk (2006) yang menyimpulkan bahwa semakin tinggi kerusakan membran maka semakin tinggi juga penurunan ketebalan dan luas area pita protein membran spermatozoa tikus. Protein spermatozoa terdapat di hampir seluruh organel.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dibuat rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah terdapat perbedaan profil protein spermatozoa sebelum dan setelah dibekukan?.

## **1.3 Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui profil protein spermatozoa sebelum dan setelah dibekukan.

## **1.4 Manfaat**

Manfaat yang diharapkan dengan diadakannya penelitian ini adalah untuk mendapatkan informasi mengenai perubahan profil protein spermatozoa selama pembekuan, yang nantinya bisa



digunakan sebagai dasar untuk pengembangan pembuatan media pengencer dalam kriptopreservasi semen.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Semen

Semen terdiri dari dua bagian, yaitu spermatozoa dan seminal plasma. Seminal plasma sebesar 90% dan spermatozoa sebesar 10%. Spermatozoa di hasilkan di dalam testis, sedangkan seminal plasma dihasilkan oleh epididimis, kelenjar – kelenjar vesikulares dan prostata (Toelihere, 1985). Analisis semen dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu secara mikroskopis dan makroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan volume, warna, bau, pH dan konsistensi. Sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi konsentrasi, motilitas masa dan individu, serta viabilitas (Susilowati, 2011).

Hasil analisis beberapa penelitian menunjukkan bahwa volume semen sapi bervariasi setiap penampungan yaitu antara 5 - 8 ml/ejakulat (Hafez, 2000). Warna semen sapi beraneka ragam dari putih, putih susu, krema apabila konsentrasi spermatozoa tinggi, dan kadang – kadang berwarna kuning karena mengandung riboflavin yang disekresikan oleh kelenjar vesikula. Warna semen menentukan konsistensi dan konsentrasi. Apabila warna semen semakin pudar, maka konsentrasi spermatozoa semakin menurun dan semen akan semakin encer (Evans *et al*, 1987 dan Wildeus, 1995). pH semen antara 6,4 – 7 (Hafez, 2000). Nilai makroskopis semen dapat ditentukan lebih awal dan merupakan gambaran sesungguhnya kualitas sperma yang terkandung dalam semen. Gerakan masa rata – rata bernilai positif tiga (+ + +), Konsentrasi spermatozoa tiap ejakulat berkisar antara 700 - 1500 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/ml, Motilitas awal sperma sesaat setelah penampungan antara 60 % - 90%, abnormalitas rata – rata 2,5% (Evan *et al*, 1987).

#### 2.2 Seminal Plasma

Seminal plasma adalah suatu cairan yang disekresikan oleh prostata, kelenjar- kelejar vesikularis seminalis dan epididimisyangdikeluarkankedalam uretra (Susylowati, 2011 dan

Toelihere, 1985). Seminal plasma mempunyai fungsi yaitu : (1) sebagai transportasi dari sistem reproduksi jantan pada saat ejakulasi, (2) menyediakan medium aktivitas sebelum spermatozoa non-motil, (3) sebagai *buffer* dan penyedia nutrisi untuk membantu kelangsungan hidup spermatozoa setelah dideposisikan ke dalam kelamin betina (Evans *et al*, 1987).

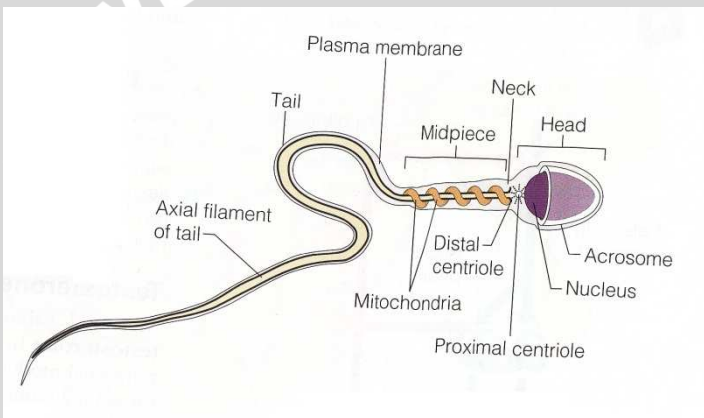
Seminal plasma mengandung berbagai senyawa organik dan anorganik. Senyawa organik diantaranya fruktosa, asam sitrat, sorbitol, gliseril fosforilkholin, ergothionin, phospholipid, prostaglandin, asam amino dan asam oksalat (Partodihardjo, 1987). Senyawa anorganik diantaranya bikarbonat, kalium dan natrium (Toelihere, 1985). Juga ditemukan senyawa dengan berat molekul tinggi, seperti kolesterol dan protein (Hafez, 2000).

Kandungan dan fungsi senyawa kimia dalam seminal plasma telah banyak diketahui dan beberapa diantaranya dikaitkan dengan kualitas semen. Senyawa organik dan anorganik berperan sebagai *buffer* untuk menjaga tekanan osmotik, mempertahankan membran, dan motilitas spermatozoa (Eghbali *et al*, 2008). Kolesterol berperan untuk pembentukan impermeabilitas dan kohesivitas membran (White, 1993). Beberapa protein berperan dalam menstabilkan membran, viabilitas spermatozoa, reaksi kapasitasi dan akrosom, serta fertilisasi (Barrios *et al*, 2000). Kandungan senyawa kimia seminal plasma bervariasi antar spesies dan bahkan antar individu. Hal itu disebabkan oleh jumlah dan ukuran kelenjar aksesoris, ukuran epididymis dan testis (Toelihere, 1993; Hafez *et al*, 2000), umur, musim, dan jumlah testosteron (Thontipet *et al*, 2008).

### **2.3 Spermatozoa**

Spermatozoa dibentuk dari spermatogenesis. Sperma dewasa terdiri dari tiga bagian yaitu kepala, leher dan ekor (Gambar 2.1). Kepala spermatozoa memiliki bentuk oval memanjang, lebar dan datar pada satu pandangan dan sempit pada pandangan yang lain dengan bagian paling tebal pada pangkal kepala yang melangsing ke apex yang tipis (Toelihere, 1985). Kepala sperma terdapat inti sel dan akrosom yang berisi enzim hidrolitik antara lain proacrosin, hyaluronides, esterase dan asam hidrolase yang berperan dalam proses fertilisasi (Martini, 2001). Berdasarkan letak akrosom, kepala

sperma terbagi menjadi daerah akrosomal dan daerah post akrosomal. Daerah akrosomal terbagi lagi menjadi segmen principal dan segmen equatorial. Segmen principal terlibat dalam inisiasi ikatan dengan zona pelusida dan segmen equatorial terlibat dalam inisiasi fusi dengan membran plasma oosit (McLeskey, 1998). Ekor sperma dibagi menjadi 3 bagian utama yaitu, middle piece, principal piece dan end piece (Toelihere, 1985). Middle piece membentuk aksonema yang terdiri dari sembilan pasang mikrotubulus yang tersusun disekitar pusat filamen. Susunan mikrotubulusnya adalah 9+2 yang dikelilingi oleh sembilan serabut kasar padat yang berhubungan dengan sembilan pasang aksonema (Susilowati, 2011).



Gambar 2.1 : Anatomi Spermatozoa (Marieb, 2009)

Spermatozoa memiliki organel-organel yang sangat sedikit dibandingkan sel-sel lain. Spermatozoa tidak memiliki ribosom, retikulum endoplasma dan badan golgi. Sebaliknya spermatozoa memiliki banyak sekali mitokondria yang letaknya sangat strategis untuk pengefisiensian energi yang diperlukan. Kebanyakan organel tersebut akan menghilang pada saat maturasi berlangsung dan tinggal beberapa organel termodifikasi yang tetap menjalankan fungsi spermatozoa (Gilbert, 1994).

Komponen utama inti sel spermatozoa adalah kromatin yang terdiri atas DNA dan protein-protein yang heterogen. Struktur kromatin spermatozoa yang kompak dapat melindungi integritas

genetik spermatozoa selama fusi dari saluran reproduksi jantan ke saluran reproduksi betina (Fraser, 2004). Protein inti terdiri atas lebih dari 90% protamin, suatu polipeptida yang kaya akan agrinin dan berfungsi untuk menghilangkan histon, menyebabkan kondensasi kromatin dan menghambat ekspresi gen pada proses spermiogenesis (Bellve, 1982). Struktur kromatin yang berbeda akan mempengaruhi kandungan kromatin. Rasio massa total protamin dan DNA spermatozoa manusia sedikit lebih kecil dibandingkan dengan spermatozoa sapi, kuda, marmut dan mencit (Fraser, 2004).

Proses pembentukan sperma diawali dengan spermatositogenesis yang melibatkan spermatogonia yang berasal dari gonosit yang terletak pada dasar tubulus seminiferus. Kemudian spermatogonia akan membelah secara mitosis. Sel-sel spermatogonia yang terbentuk akan berpoliferasi dan berdiferensiasi sampai membentuk spermatosit primer. Setelah itu spermatosit akan melangsungkan pembelahan meiosis sampai menghasilkan spermatid yang membawa kromosom homolog (Johnson *et al.*, 1997). Setelah itu terjadi spermiogenesis dimana spermatid berubah menjadi spermatozoa. Perubahan pada proses ini meliputi kondensasi kromatin inti, pembentukan ekor sperma dan perkembangan acrosom carp (Susilowati, 2011).

Terjadinya motilitas spermatozoa diawali dengan sperm activating peptide (SAP) mengikat dan mengaktifkan enzim transmembran guanil siklase (mGC) melalui atau tanpa reseptor. Nitric oxide (NO) kemudian mengaktifkan enzim guanil siklase. Aktifnya enzim guanil siklase menyebabkan peningkatan konsentrasi cyclic guanin monophosphate (cGMP) yang selanjutnya mengaktifkan kanal kalium (K<sup>+</sup>), sehingga menyebabkan potensial membrannya terhiperpolarisasi. Hiperpolarisasi membran menstimulasi beberapa kanal ion dan juga enzim transmembran adenil siklase (mAC). Aktivasi enzim ini menyebabkan peningkatan konsentrasi cyclic Adenosin Monophosphate (cAMP), yang selanjutnya dapat memfosforilasi enzim protein kinase A (PKA) dan juga protein tirosin kinase (PTK). Fosforilasi enzim-enzim tersebut selanjutnya memfosforilasi protein-protein pada ekor untuk memulai motilitas (Purohit *et al.*, 1999).

Spermatozoa memerlukan kapasitas untuk bisa menuju oosit. Peningkatan jumlah kalsium intraseluler selama kapasitas,

hiperaktifas dan reaksi akrosom diperlukan spermatozoa untuk bisa menembus dinding pelusida. Peningkatan konsentrasi ion kalsium diperlukan untuk menstimulasi sinyal intraseluler yang dihubungkan dengan kapasitas (Bailey, 2000).

## 2.4 Protein Spermatozoa

Protein adalah kumpulan asam amino yang diikat oleh ikatan peptida hasil dari translasi. Protein pada spermatozoa terdapat di hampir diseluruh selmeskipun spermatozoa tidak memiliki ribosom (Gilbert, 1994). Protein menjadi komponen penting dari membran spermatozoa. Interaksi protein-lipid sangat penting untuk penyebaran dan folding protein. Interaksi ini juga diperlukan untuk fungsi protein sebagai enzim, reseptor, pergerakan ion seperti kalsium. Interaksi dari membran dan interaksi antara komponen-komponennya berfungsi maksimal pada suhu tubuh yang normal. Pembekuan dengan suhu yang terlalu rendah dan lama akan membuat hilangnya struktural molekul protein, sehingga mengganggu stabilitas protein dengan komponen-komponen lainnya, yang berakibat protein tidak lagi berfungsi maksimal (Medeiros *et al.*, 2002). Kerusakan konfigurasi membran juga akan mempengaruhi fungsi komponen glycocalyx, protein periferas yang diketahui membantu dalam menginduksi reaksi kapasitas dan reaksi akrosom, dan memfasilitasi terjadinya fertilisasi (Barrios, 2000).

Rusaknya membran plasma dan hilangnya struktural protein selama pembekuan, nantinya akan menurunkan kualitas spermatozoa yang ditandai dengan rendahnya motilitas (Tanaka *dkk.*, 2000), tingginya abnormalitas dan rendahnya viabilitas (Dhanju *et al.*, 2001), gangguan integritas membran plasma (Nishizono *et al.*, 2000), rendahnya kapasitas pada saat spermatozoa berada disaluran reproduksi betina (Nandre *et al.*, 2013), kerusakan struktur akrosom, dan menghalangi aktivitas akrosom protease dan akrosin (Talei, 2010).

Beberapa tahun terakhir ini banyak penelitian yang mengidentifikasi protein spermatozoa baik yang terdapat pada seminal plasma ataupun organel lainnya yang dihubungkan dengan fertilitas suatu spesies. Kambing, sapi, babi, tikus, mencit, dan manusia adalah yang sering digunakan untuk penelitian. Identifikasi

protein biasanya menggunakan teknik SDS PAGE untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul.

Seminal plasma terdiri atas persenyawaan organik dan anorganik, sedangkan senyawa dengan berat molekul tinggi ditemukan dalam bentuk protein (Hafez, 2000). Protein yang terdapat pada seminal plasma terikat pada permukaan membran spermatozoa yang berperan untuk menstabilkan membran sampai terjadi reaksi kapasitasi dan reaksi akrosom (Strzezeck *et al*, 2002). Penelitian yang dilakukan Sauza (2006) menggunakan SDS PAGE dengan konsentrasi separating gel 13% menghasilkan 37 pita protein seminal plasma dengan berat antara 100,6 sampai 17,1 kDa. Sedangkan yang menggunakan separating gel 22% menghasilkan 9 pita protein seminal plasma dengan berat molekul antara 15,6 sampai 3,6 kDa

Protein plasma semen pada beberapa hewan telah diidentifikasi dan dihubungkan dengan kualitas dan fertilitas spermatozoa. Protein dengan berat 12-20 kDa dalam plasma semen babi diidentifikasi sebagai spermadhesin, yaitu protein yang ditemukan di bagian perifer membran yang berfungsi sebagai ligan untuk berikatan dengan zona pelusida (Strzezeck *et al*, 2002). Pada plasma semen domba ditemukan protein dengan berat molekul <20kDa yang berperan untuk memperbaiki permeabilitas membran spermatozoa (Barrios *et al.*, 2000). Pada sapi ditemukan protein bovine seminal plasma(BSP) dengan berat molekul 28-30 kDa yang berperan dalam reaksi kapasitasi dengan menginduksi pelepasan kolesterol sehingga fluiditas membran berkurang (Therien *et al*, 1998). Pada semen manusia ditemukan protein dengan berat molekul 18-95 kDa yang dikenali sebagai proakrosin/akrosin yang berperan dalam pelisisan zona pelusida (Pardesi *et al.*, 2004), sedangkan protein 54 kDa diidentifikasi sebagai  $\alpha$ -L-fucosidase yang berperan dalam penembusan lendir serviks dan transportasi spermatozoa (Khunsook *et al.*, 2002).

Protein spermatozoa yang juga sering diteliti adalah protein membran. Protein membran spermatozoa memiliki struktur dan fungsi yang sama dengan protein di dalam sel pada umumnya, namun ada beberapa protein spesifik yang membedakannya. Adanya perbedaan tersebut mengakibatkan fungsinya tidak sama dengan protein sel lainnya seperti berperan sebagai ligan untuk reseptor

zona pelusida pada saat adhesi fertilisasi, dan inisiasi terhadap signal transduksi sehingga menghasilkan eksositosis akrosomal (Gahmberg *et al*, 1996). Ciri protein membran spermatozoa adalah memiliki suatu kemampuan untuk memodifikasi diri secara cepat dalam merespon rangsangan imunologis ataupun fisiologis, dan selalu mengalami reorganisasi di dalam saluran reproduksi sehingga selalu terjadi reaksi dengan senyawa lain (Schorter, 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Kurniawan (2009) menggunakan manusia menghasilkan 10 pita protein membran dengan berat molekul 135, 99, 81, 73, 46, 38, 31, 20, 12, dan 11 kDa. Sedangkan Suprayogi dkk (2010) berhasil mengidentifikasi 11 pita protein membran spermatozoa sapi dengan berat molekul 11,49, 14,66, 24,74, 28,43, 31,07, 46,32, 51,43, 67,97, 72,77, 83,78 dan 118,72 kDa.

## **2.5 Efek Pembekuan Semen**

Pembekuan semen merupakan suatu teknik penyimpanan sel spermatozoa dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel di dalam sel sehingga fungsi fisiologis, biologis, dan morfologis tetap ada, yang dilakukan pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  dalam nitrogen cair (Boediono, 2003). Teknik pembekuan semen juga diketahui mampu mempengaruhi fungsi spermatozoa seperti menginduksi terjadinya rekasi akrosom dini, hilangnya fungsi mitokondria, kesalahan kondensasi kromatin, yang mana hal tersebut berpengaruh terhadap viabilitas, motilitas dan fertilitas spermatozoa (Lemma, 2011).

Pembekuan mampu menyebabkan stress yang mana menghasilkan reorientasi pengikatan membran fosfolipid menjadi konfigurasi yang berbeda yang dapat mempengaruhi fungsi dan permeabilitas membran (Lessard *et al*, 2000). Respon stress yang ditunjukkan oleh spermatozoa terhadap perubahan suhu disebut coldshock. Pada umumnya coldshock akan menyebabkan penurunan metabolisme, hilangnya permeabilitas membran, dan hilangnya komponen intraseluler (Lemma, 2011)

Rusaknya membran sel adalah yang paling signifikan terjadi (Lemma, 2011). Hal itu dikarenakan pada suhu yang sangat rendah terjadi pembentukan kristal es intraseluler. Adanya kristal es tersebut membuat tekanan gradien osmotik, dimana air didalam sel lebih



rendah daripada air diluar sel, sehingga air keluar dari sel spermatozoa (Andrabi, 2007 dan watson 2000) dan terjadi dehidrasi sel. Apabila waktu pembekuan semakin lama, sehingga air keluar dari sel dan memperbesar pembentukan kristal intraseluler akan menyebabkan kerusakan membran sel dan komponen lainnya (Lemma, 2011).

Pembekuan secara signifikan juga mampu meningkatkan produksi reactive oxygen species (ROS) pada spermatozoa sapi dan kuda. ROS dalam kadar yang normal diperlukan sebagai mediator penting terhadap fungsi spermatozoa, terlebih dalam menginduksi terjadinya kapasitas, hiperaktivasi, integritas akrosom, dan fusi spermatozoa ke oosit. Namun apabila produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralisir oleh sistem pertahanan akan menyebabkan kerusakan membran sel (Alvarez *et al*, 1995) dan DNA, menghambat fusi spermatozoa ke oosit, dan menurunkan motilitas spermatozoa sapi, kuda dan babi (Awda *et al*, 2009).

Terjadinya peningkatan ROS pada pembekuan disebabkan karena habisnya atau kurangnya antioksidan yang tersedia pada spermatozoa tidak mampu mengubah oksigen reaktif (O) menjadi senyawa yang netral (O<sub>2</sub>) karena adanya stres oksidasi pada proses oksidasi fosforilasi. Rendahnya produksi O<sub>2</sub> menginduksi terjadinya peroksida lipid (Lamirande *et al*, 1997). Hasil akhir peroksida lipid pada membran spermatozoa adalah terputusnya rantai asam lemak tidak jenuh dan menghasilkan senyawa toksik Malondialdehyde (MDA) yang bersifat toksik pada sel (Griveau, 1997).

DNA sangat rentan terhadap ROS karena ROS dapat menyebabkan hidrosilasi, terbukanya cincin, fragmentasi, crosslinking transitori protein DNA dan pemecahan untai DNA yang menyebabkan sel mutasi atau letal (Awda *et al*, 2009). Menurut penelitian Talaei (2010) 4,45% DNA akan terfragmentasi setelah proses pembekuan dan thawing. ROS juga menghambat sinyal kalsium dan induksi ionophor untuk fusi spermatozoa ke oosit, juga menstimulasi peroksidasi yang mereduksi fluiditas membran plasma dan mengganggu pengikatan enzim membran dan ion. Selain itu ROS juga memicu penurunan motilitas dengan cara menghabiskan ATP oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang diperlukan untuk oksidasi fosforilasi sehingga terjadi penurunan fosforilasi protein yang diperlukan untuk motilitas (Awda *et al*, 2009).

Menurut penelitian Dhanjuet *al* (2001) kerusakan membran spermatozoa sapi akan berakibat terhadap berubahnya komponen protein penyusun membran sel yang ditandai dengan penurunan jenis protein. Jenis protein penyusun membran spermatozoa dan seminal plasma menurun dengan peningkatan pembekuan antara 6 sampai 24 bulan. Penurunan protein membran bervariasi antara 30 sampai 40%, dan seminal plasma antara 28 sampai 59%. Bahkan ada beberapa protein membran yang hilang. Dari hal itu Dhanju menyimpulkan bahwa ada korelasi positif antara waktu pembekuan dan kerusakan komponen membran. Semakin meningkat waktu pembekuan semen maka kerusakan membran akan semakin tinggi.

Hasil penelitian Hayati (2006) menunjukkan bahwa protein membran spermatozoa tersusun atas banyak macam protein. Profil protein diketahui dari tebal dan tipisnya pita protein yang terbentuk pada setiap pita protein. Terjadi perubahan profil protein setelah diberi perlakuan pemaparan 2-Methoxyethanol. Semakin lama pemaparan senyawa 2-methoxyethanol akan menyebabkan semakin tinggi kerusakan membran dan semakin tinggi juga penurunan ketebalan dan luas area pita protein membran spermatozoa tikus.

## **2.6 SDS PAGE**

Pemisahan makromolekul dalam suatu medan listrik disebut elektroforesis. Elektroforesis memerlukan media penyangga sebagai tempat bermigrasinya molekul – molekul biologi. Media penyangganya bermacam – macam tergantung pada tujuan dan bahan yang akan dianalisa. Media penyangga yang sering dipakai dalam elektroforesis antara lain, yaitu kertas, selulose, asetat dan gel. Elektroforesis sangat umum digunakan untuk memisahkan protein atau asam nukleat. Pada pemisahan protein bisa menggunakan media Gel poliakrilamid dan Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Metode dengan bahan – bahan tersebut dikenal dengan Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Fatchiyah *dkk*, 2007).

SDS sebagai detergen anionik berikatan dengan protein sehingga terjadi diasosiasi pada rantai polipeptida (Glick dan Pasternak, 1998). Pada rantai polipeptida yang dihubungkan antara ikatan sulfida terdiasosiasi menjadi subunit terkecil dengan

perlakuan pemanasan dan keberadaan agen pereduksi sulfat. Selain itu SDS juga memberikan muatan negatif pada protein sehingga pemisahan saat elektroforesis hanya tergantung pada berat molekulnya (Rabytet *al*, 1987).

Preparasi pada sampel diperlukan untuk membuat protein dapat terseparasi dan divisualisasikan dengan baik pada gel poliakrilamid. Preparasi sampel dilakukan dengan menggunakan Tracking dye untuk memberi penanda pada protein yang dirunning dan juga memberi muatan negatif pada protein sehingga terlihat pergerakan protein tersebut dalam gel. Pada preparasi tersebut juga digunakan gliserol atau sukrosa untuk pemberat pada sampel sehingga sampel protein mengendap di dasar sumuran dan dapat dengan mudah memasuki gel ketika ditarik oleh arus listrik positif. (Manzet *al*, 2004)

Pada saat elektroforesis berlangsung, protein akan bergerak dari elektroda negatif menuju elektroda positif sampai jarak tertentu pada poliakrilamid yang tergantung berat molekulnya. Semakin rendah berat molekulnya, maka semakin jauh pula protein bergerak, sebaliknya, protein dengan berat molekul lebih besar akan bergerak pada jarak yang lebih pendek. Protein dengan berat molekul lebih rendah akan berhenti bergerak pada bagian atas gel, sebaliknya protein dengan berat molekul lebih besar akan bergerak pada bagian gel yang lebih bawah. Dengan demikian, pada jalur pergerakan protein akan didapatkan jajaran protein (disebut sebagai pita protein) yang sudah memisah berdasarkan berat molekulnya (Fatchiyah dkk, 2011).

Pada kondisi tidak diwarnai, protein tidak terlihat. Setelah diwarnai dengan larutan pewarna yang mengandung Coomassie Brilliant Blue R-250, protein yang tidak berwarna menjadi berwarna biru. Pada kondisi ini, bisa mengetahui keberadaan dan mengukur mobilitas protein untuk kemudian menentukan berat molekulnya (Fatchiyah dkk, 2011).

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2012 sampai dengan Mei 2013, bertempat di Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

#### 3.2 Cara Kerja

##### 3.2.1 Koleksi semen

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 5 semen segar dan 5 semen beku sapi Friesian Holstein yang dikoleksi di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari. Semen segar yang digunakan memiliki kualitas baik dengan kriteria motilitas masa ++ dan motilitas individu 70%. Sedangkan semen beku yang digunakan adalah semen beku yang telah disimpan selama 1 bulan.

##### 3.2.2 Isolasi protein spermatozoa

Metode isolasi protein spermatozoa yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan Cheema et al (2010). Semen sebanyak 500  $\mu$ L dimasukkan kedalam tabung ependorf 1,5 mL dan ditambahkan 1000  $\mu$ L PBS hangat pH 7,4. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C untuk memisahkan spermatozoa dengan seminal plasma. Diambil fraksi atas dan bawah, kemudian masing-masing fraksi ditambahkan 1000  $\mu$ L PBS pH 7,4. Suspensi divortex dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C. Diambil pelet dan ditambahkan 1000  $\mu$ L PBS pH 7,4. Suspensi divortex dan disentrifugasi lagi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C. Diambil pelet dan ditambahkan 100  $\mu$ L buffer

ekstrak. Hasil akhirnya adalah isolat crude protein yang bisa disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai akan dilakukan elektroforesis.

### **3.2.3 Uji kuantitatif protein**

Untuk mengetahui konsentrasi protein total masing-masing isolat dilakukan uji kuantitatif menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis. Isolat crude protein sebanyak  $5\ \mu\text{L}$  dimasukkan kedalam tabung ependorf yang telah berisi  $995\ \mu\text{L}$  PBS pH 7,4. Kemudian suspensi dipindahkan kedalam cuvet dan dimasukkan kedalam spektrofotometri untuk diukur nilai absorbansinya dengan panjang gelombang 260 dan 280 nm. Berdasarkan nilai absorbansi yang didapatkan, dihitung konsentrasi protein menggunakan rumus  $A_{280} \times \text{faktor koreksi}$ .

### **3.2.4. Analisis profil protein spermatozoa**

Isolat crude protein juga dilakukan uji kualitatif menggunakan SDS PAGE dengan konsentrasi separating gel 12,5% dan stacking gel 5% (komposisi bahan ada pada lampiran 3). Setelah pembuatan gel, sebanyak  $5\ \mu\text{L}$  sampel mix yang terdiri dari  $5\ \mu\text{L}$  isolat crude protein dan  $5\ \mu\text{L}$  LRSB yang telah didenaturasi selama 10 menit dimasukkan kedalam sumuran gel menggunakan mikropipet. Kemudian dimulai running sampel pada arus konstan 30 mA selama 40 – 50 menit atau sampai tracking dye mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Gel hasil running diredam dalam larutan yang mengandung CBB selama kurang lebih 15 menit untuk melihat keberadaan dan mobilitas pita protein. Kemudian gel dicuci dengan air beberapa kali dan dilanjutkan dengan diredam pada larutan destaining selama kurang lebih 30 menit atau sampai pita terlihat jelas.

### **3.2.5 Analisis Data**

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara deskriptif dengan membandingkan profil protein hasil SDS PAGE sebelum dan setelah pembekuan

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Uji kuantitatif protein Spermatozoa

Konsentrasiprotein total spermatozoa yang didapatkan bervariasi pada semua sampel (tabel 1). Pada sampel fraksi atas, konsentrasi protein total semua semen segar lebih tinggi dibandingkan dengan semen beku. Sedangkan pada sampel fraksi bawah, konsentrasi protein total semen segar nomor 2, 3 dan 5 lebih tinggi dibandingkan semen beku dan konsentrasi protein total semen segar nomor 1 dan 4 lebih rendah dibandingkan dengan semen beku. Adanya perbedaan konsentrasi kemungkinan disebabkan karena setiap sampel diambil dari sapi yang berbeda, jumlah sel spermatozoa semen segar lebih banyak dibandingkan dengan semen beku dan sebagian protein telah mengalami kerusakan selama proses isolasi protein. Selain itu adanya perbedaan konsentrasi juga dapat disebabkan karena jumlah sel spermatozoa yang ada pada setiap fraksi.

Tabel 1. Konsentrasi protein total spermatozoa fraksi atas dan bawah semen segar dan beku.

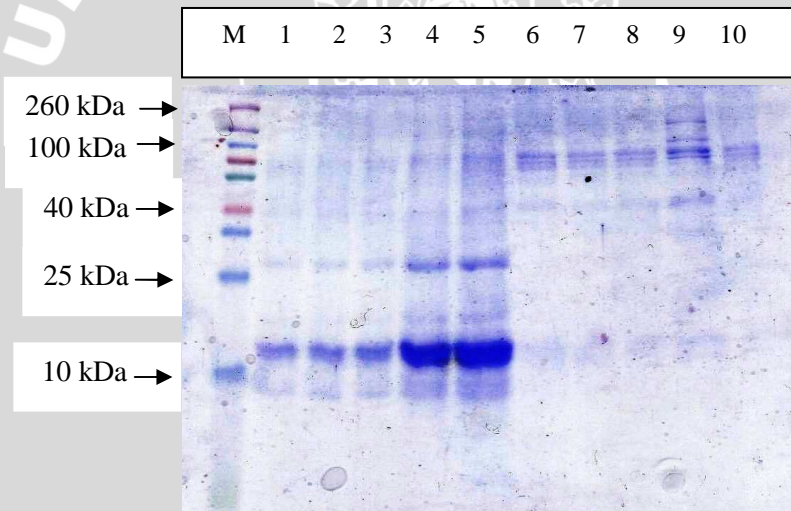
Sampel	Fraksi atas		Fraksi bawah	
	Segar (mg/mL)	Beku (mg/mL)	Segar (mg/mL)	Beku (mg/mL)
1	0,064	0,039	0,181	0,240
2	0,053	0,012	0,164	0,061
3	0,083	0,039	0,282	0,023
4	0,064	0,024	0,214	0,240
5	0,089	0,039	0,176	0,131

Data perhitungan konsentrasi protein total didapatkan dari absorbansi cahaya spektrofotometri terhadap larutan yang berisi isolat crude protein. Isolat crude protein didapatkan dari hasil isolasi semen. Isolasi penting dilakukan untuk memisahkan protein dari makromolekul lain yang tidak diinginkan dalam analisis. Ada 3 tahapan utama dalam isolasi protein, yaitu memisahkan sel dari

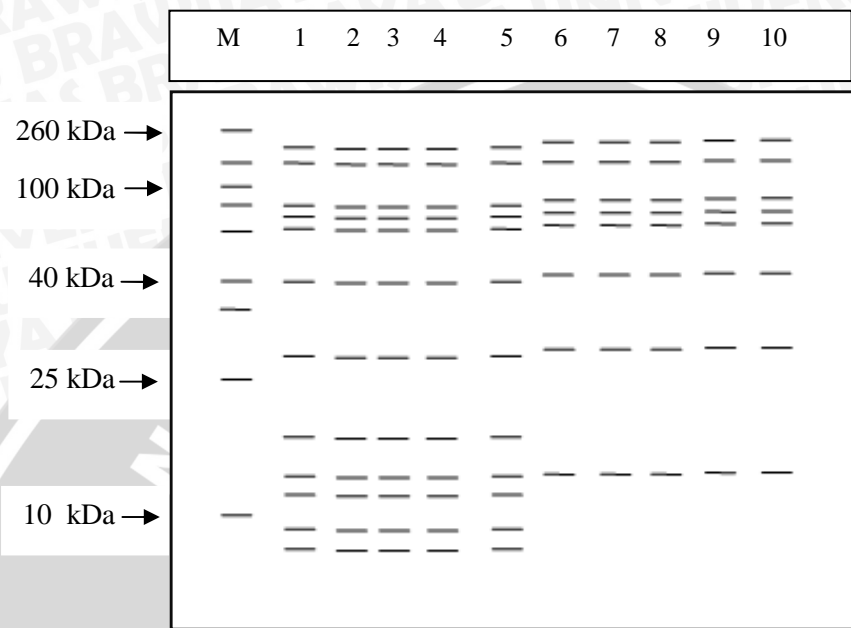
jaringannya, menghancurkan membran sel dan memisahkan organel-organel penyusunnya (Fatchiyahdkk, 2011). Salah satu metode yang bisa digunakan untuk isolasi protein spermatozoa adalah metode PBS-bufferekstrak. PBS berfungsi sebagai larutan pencuci spermatozoa dari seminal plasma dan Buffer ekstrak berfungsi untuk melisiskan membran sel dan membran bilayer fosfolipid tanpa mendegradasi protein (Chemaet *al*, 2010; Syarifudin, 2011).

#### 4.2 Analisis profil protein spermatozoa

Berdasarkan hasil elektroforesis dapat diketahui perbedaan profil protein spermatozoa pada fraksi atas semen segar dan beku (gambar 4.1, 4.2 dan tabel 2)



Gambar 4.1. Hasil elektroforesis protein spermatozoa fraksi atas SDS PAGE dengan konsentrasi separating gel 12,5%. M adalah marker protein dengan berat molekul 260-10 kDa. Lane 1-5 adalah isolat crude protein dari 5 semen segar. Lane 6-10 adalah isolat crude protein dari 5 semen beku.



Gambar 4.2. Zimogram SDS PAGE protein spermatozoa fraksi atas. M adalah marker protein dengan berat molekul 260-10 kDa. Lane 1-5 adalah isolat crude protein dari 5 semen segar. Lane 6-10 adalah isolat crude protein dari 5 semen beku.

Tabel 2. Profil protein spermatozoa fraksi atas (kDa)

Pita protein	Fraksi atas									
	Semen segar					Semen beku				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
144kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
128kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
99kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
90kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•



83 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
59 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
31 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
20 kDa	•	•	•	•	•	–	–	–	–	–
14 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
12 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
10 kDa	•	•	•	•	•	–	–	–	–	–
9 kDa	•	•	•	•	•	–	–	–	–	–

Keterangan :

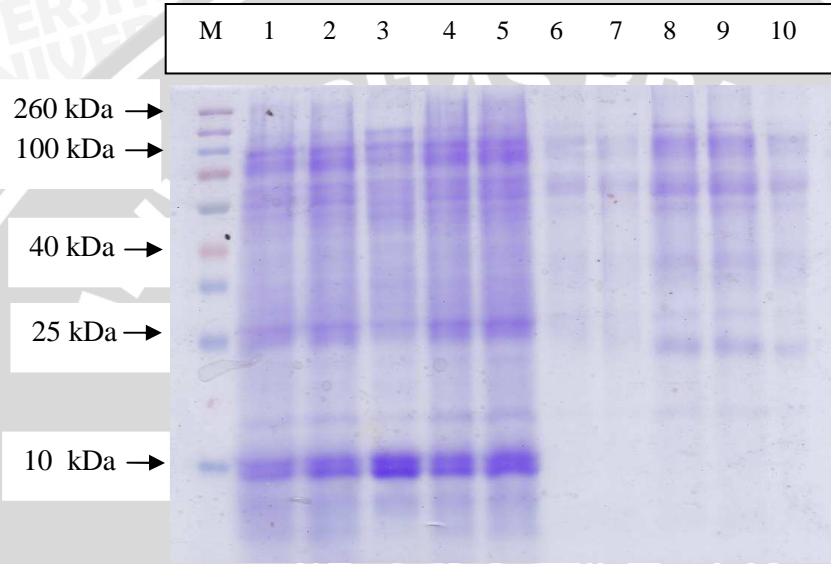
- Ada pita protein
- Tidak ada pita protein

Pada semua sampel semen segar ditemukan 12 pita protein spermatozoa dengan berat molekul 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 20, 14, 12, 10 dan 9 kDa. Sedangkan pada semua sampel beku didapatkan 9 pita protein spermatozoa dengan berat molekul 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 14 dan 12 kDa. Hasil elektroforesis pada semen beku menunjukkan ada 3 pita protein dengan berat molekul 20, 10 dan 9 kDa yang tidak ditemukan. Padahal ketiga pita protein dengan berat molekul tersebut ditemukan pada semua sampel semen segar.

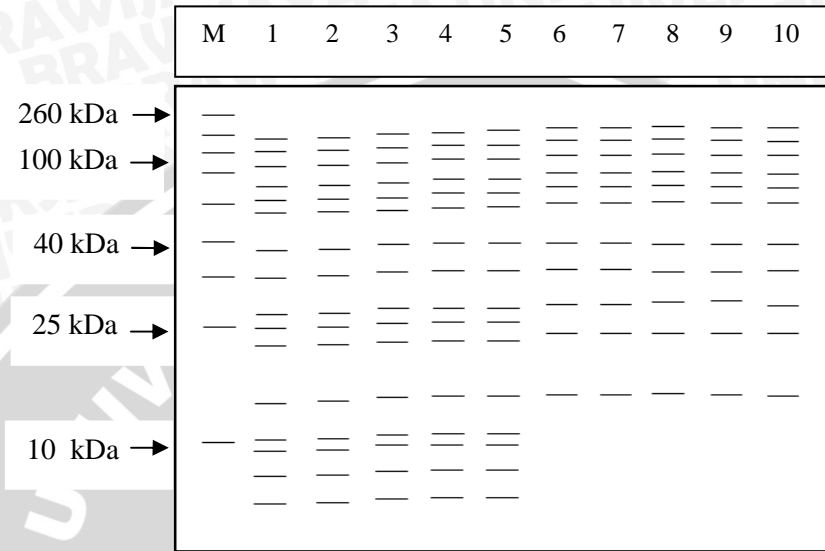
Penelitian yang dilakukan oleh Suprayogi *dkk* (2010) menggunakan semen segar berhasil menemukan 11 pita protein dengan berat molekul 11,4914,66, 24,74, 28,43, 31,07, 46,32, 51,43, 67,97, 72,77, 83,78 dan 118,72. Adanya perbedaan beberapa berat molekul protein pada penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan oleh Suprayogi *dkk* (2010) kemungkinan karena bangsa sapi yang digunakan berbeda, pada penelitian ini menggunakan sapi Friesian Holstein sedangkan pada penelitian Suprayogi menggunakan sapi Simental dan Limousin.

Pada hasil elektroforesis protein spermatozoa fraksi bawah semen segar dan beku juga menunjukkan adanya perbedaan profil protein (gambar 4.3, 4.4 dan tabel 3). Hasil elektroforesis semua sampel semen segar ditemukan 16 pita protein dengan berat molekul 128, 116, 103, 90, 75, 69, 48, 40, 31, 26, 20, 14, 10, 9, 7 dan 6 kDa. Sedangkan pada hasil elektroforesis semua sampel semen beku ditemukan 11 pita protein dengan berat molekul 128, 116, 103, 90,

75, 69, 48, 40, 31, 20 dan 14 kDa. Perbedaan profil protein pada fraksi bawah ini ditunjukkan dengan tidak ditemukannya 5 pita protein dengan berat molekul 26, 14, 9, 7 dan 6 kDa pada semen beku yang ditemukan pada semua sampel semen segar



Gambar 4.3. Hasil elektroforesis protein spermatozoa fraksi bawah SDS PAGE dengan konsentrasi separating gel 12,5%. M adalah marker protein dengan berat molekul 260-10 kDa. Lane 1-5 adalah isolat crude protein dari 5 semen segar. Lane 6-10 adalah isolat crude protein dari 5 semen beku.



Gambar 4.4. Zimogram SDS PAGE protein spermatozoa fraksi bawah. M adalah marker protein dengan berat molekul 260-10 kDa. Lane 1-5 adalah isolat crude protein dari 5 semen segar. Lane 6-10 adalah isolat crude protein dari 5 semen beku.

Tabel 3. Profil protein spermatozoa fraksi bawah (kDa)

Pita protein	Fraksi bawah									
	Segar					Beku				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
128kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
116kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
103kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
90kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
75 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
69 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

48 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
40 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
31 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
26 kDa	•	•	•	•	•	–	–	–	–	–
20 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
14 kDa	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
10 kDa	•	•	•	•	•	–	–	–	–	–
9 kDa	•	•	•	•	•	–	–	–	–	–
7 kDa	•	•	•	•	•	–	–	–	–	–
6 kDa	•	•	•	•	•	–	–	–	–	–

Keterangan :

- Ada pita protein
- Tidak ada pita protein

Hasil elektroforesis fraksi bawah berhasil menemukan lebih banyak pita protein dibandingkan dengan hasil elektroforesis fraksi atas. Adanya perbedaan pita protein yang ditemukan antara fraksi atas dan bawah, dimungkinkan karena ada beberapa pita protein seminal plasma yang ikut terdeteksi dalam fraksi bawah. Menurut Jamel (2008) pencucian spermatozoa dari seminal plasma bisa dilakukan menggunakan sentrifugasi. Hasil sentrifugasi akan terbentuk beberapa fraksi. Spermatozoa yang hidup atau yang masih aktif bergerak akan menuju fraksi atas sedangkan spermatozoa yang mati, seminal plasma, berbagai macam mikroorganisme, dan debris sel akan bergerak dan mengendap kefraksi bawah.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Ollero *et al* (1998) menggunakan semen segar dan beku hasil pembekuan dari sapi menunjukkan bahwa ada beberapa pita protein spermatozoa dengan berat molekul 245, 100, 68 dan 35 kDa yang tidak ditemukan setelah dilakukan pembekuan semen. Tidak ditemukannya pita protein disebabkan karena hilangnya protein selama pembekuan. Adanya perbedaan berat molekul yang tidak ditemukan pada penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan Ollero *et al* (1998) dimungkinkan karena penggunaan bangsa sapi dan parameter waktu pembekuan yang digunakan pada penelitian ini berbeda dengan penelitian Ollero *et al* (1998).

Hilangnya protein spermatozoa ada hubungannya dengan kerusakan membran (Ollero *et al*, 1998) dan peningkatan kadar ROS (Awda *et al*, 2009) yang terjadi selama proses pembekuan. Produk ROS seperti peroksidasi lipid dan 4-hydroxynonenol merusak struktur dan fungsi membran dengan mengubah dan/atau menghilangkan struktur fosfolipid dan merubah fluiditas membran. Pengikatan  $\text{Ca}^{2+}$  ekstraseluler dengan membran fosfolipid menurunkan fluiditas membran bilayer, selanjutnya kerusakan struktur bilayer akan meningkatkan permeabilitas sehingga ion-ion dan molekul-molekul mudah keluar masuk membran. Meningkatnya aktivitas extra dan intraseluler yang disebabkan oleh gabungan aksi lipid peroksidasi dan  $\text{Ca}^{2+}$  pada membran fosfolipid akan menghilangkan struktur dan merusak membran (Awda *et al*, 2009).

Kerusakan membran tentunya juga akan menyebabkan degradasi komponen sel yang penting seperti protein dan DNA. Kerusakan pada protein disebabkan lipid peroksidasi bereaksi dengan asam amino penyusun protein khususnya asam amino sistein yang mengandung gugus sulfhidril (-SH) (Iwasaki *et al*, 1992). Protein yang telah terdegradasi oleh produk ROS akan dengan mudah berpindah ke medium ekstraseluler karena membran sel yang telah rusak. Terdegradasinya protein akan bertanggung jawab terhadap penurunan kelimpahan atau konsentrasi protein dalam satu daerah (Zilli *et al*, 2005).

Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa dengan terdegradasinya beberapa molekul protein selama proses pembekuan mampu menurunkan kualitas spermatozoa, seperti penurunan kemampuan motilitas spermatozoa sebesar 40% (Tanaka *et al*, 2000), tingginya abnormalitas dan turunnya viabilitas spermatozoa sebesar 20-30% (Dhanju *et al*, 2001), rendahnya kemampuan kapasitas spermatozoa saat berada disaluran reproduksi betina (Nandreet *et al*, 2012), rusaknya struktur akrosom dan menghambat aktivitas akrosom protease dan akrosin spermatozoa (Talei, 2010). Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Zilli *et al* (2010) dengan menggunakan sampel semen segar dan beku menunjukkan bahwa terjadi penurunan tingkat penetasan dan abnormalitas perkembangan embrio awal ikan sea bass yang dibuahi dengan spermatozoa hasil pembekuan.

Semua sampel fraksi atas dan bawah baik pada semen segar dan beku ditemukan 4 pita protein dengan berat molekul yang sama, yaitu 128, 90, 31 dan 14 kDa. Pita protein dengan berat molekul 90 kDa diidentifikasi sebagai heat shock protein 90 (HSP-90) yang memiliki peran penting terhadap toleransi stress serta mengaktifkan nitric oxide synthase (NOS) yang bermanfaat untuk membantu motilitas spermatozoa. Semakin tinggi ekspresi HSP-90 maka semakin tinggi pula motilitas dan ketahanan spermatozoa terhadap stress akibat pembekuan dan thawing (Cao *et al*, 2003). Protein dengan berat molekul 31 kDa diidentifikasi sebagai Heparin Binding Protein 30 (HBP-30) dengan nama Fertility Associated Antigen (FAA). Fungsi protein tersebut untuk meningkatkan angka kebuntingan sapi sebesar 16-19% (Lenz *et al*, 2000).



## **BAB V**

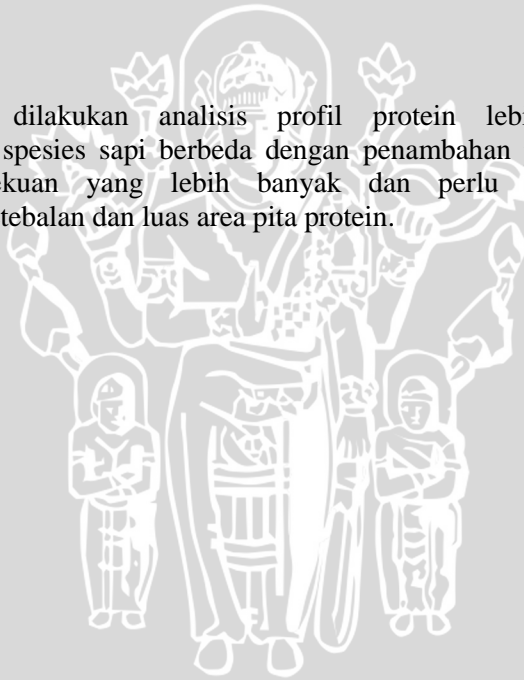
### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan profil protein spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan berdasarkan berat molekul protein. Setelah pembekuan semen, pada fraksi atas tidak ditemukan pita protein dengan berat molekul 20, 10 dan 9 kDa, sedangkan pada fraksi bawah tidak ditemukan pita protein dengan berat molekul 26, 10, 9, 7 dan 6 kDa.

#### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan analisis profil protein lebih lanjut menggunakan spesies sapi berbeda dengan penambahan parameter waktu pembekuan yang lebih banyak dan perlu dilakukan perhitungan ketebalan dan luas area pita protein.



## DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A. 2005. Role of oxidative stress in male infertility and antioxidant supplementation. *US Kidney & Urological Disease*. 8:122-5
- Aitken RJ. 1995. Free Radicals, Lipid Peroxidation and Sperm Function. *ReprodFertil Dev*.7:659–668.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Journal Biol Reprod*. 59: 1037–1046.
- Alvarez JG, Strorey BT. 1995. Differential Incorporation of Fatty Acid Into and Peroxidative Loss of Fatty Acid From Phospholipid of Human Spermatozoa. *Journal Mol Reprod Dev*. 42:334 – 345
- Andrabi S.M. H. 2007. Fundamental Principles of Cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* Bull Spermatozoa. Mini review. *Int. J. Agri. and Biol*. 9:367-369
- Awda, Basim J, Meghan Mackenzie-Bell, and Marry M. Buhr. 2009. Reactive Oxygen Species and Boar Sper Function. *Journal Biolreprod*. 81:553 – 561.
- Barrios, B., R. Perez-pe, M. Gallego, A. Tato, J. Osoda, T. Muino-Blancos and J.A. Cebrian-Perez. 2000. Seminal plasma protein revert the cold shock damage on ram sperm membrane. *Journal Biol. Reprod*. 63:1531-1537.
- Bellve AR. 1982. Biogenesis of The Mammalia Spermatozoon : Transformation of The Nucleus During Spermiogenesisi.
- Bailey JL, JF Bilodeau and N Cormier, 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal* : 21:1-7
- Boediono, A. 2003. Vitrifikasi vs pembekuan lambat pada pembekuan embrio. *Symposium Perkumpulan Teknologi Reproduksi Indonesia (PATRI)*. Denpasar.
- Cao, Wen-Lei, Yi-Xing Wang, Zu-Qiong Xiang, and Zheng Li. 2003. Cryopreservation-induced decrease in heat-shock protein 90 in human spermatozoa and its mechanism. *Asian Journal Androl*. 5:43-46



- Cheema, Ranjna S, Amrit K. Bansal, G.S. Bilaspuri, and V. K. Gandotra. 2010. Correlation between the proteins and protein profile(s) of different regions of epididymis and their contents in goat buck. *Animal Science Papers and Reports*. 29:75-84.
- Dhanju, C.K, R.S Cheema and S.P Kaur. 2001. Effects of Freezing On Protein and Profiles Of Sperm Membrane Extracts and Seminal Plasma of Buffalo Bulls. *Journal of Department of Animal Breeding, College of Veterinary Sciences, Punjab Agricultural University, Ludhiana, India*.
- Eghbali, M, S.M. Alavi-Shoushtari And S. Asri-Rezaii. 2008. Effects Of Copper And Superoxyde Dismutase Content Of Seminal Plasma On Buffalo Semen Characteristics. *Journal Biol. Sci.* 11:1964-1968.
- Evans G and Maxwell WMC, 1987. *Salamons Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths. Sydney.
- Fatchiyah., Estri Laras Arumingtyas., Sri Widyarti., dan Sri Rahayu. 2011. *Prinsip Dasar Analisis Biologi Molekuler*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Frasser L. 2004. Structural Damage to Nuclear DNA in Mammalian Spermatozoa : It's Evaluation techniques And Relationship With Male Infertility. *Journal vet Sci*. 7:311-321
- Gilbert, S.F. 1994. *Developmental Biology Edisi ke-4*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Griveau JP LeLannou D. 1997. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. *Journal Androl*. 20:60-90
- Hafez, E. S. E. 2000. *Semen Evaluation in Reproduction In Farm Animals 7th edition*. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland, USA
- Hayati,Alfiah, Soesanto Mangkoewidjojo, Aucky Hinting, Sukarti Moeljopawiro. 2006. Profil Protein Membran Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus L.*) Setelah Pemaparan 2-Methoxyethanol. *Jurnal Berkala Ilmiah Biologi* 2006. 1:39-44
- Jameel, Tahir. 2008. Sperm Swim-Up: A Simple And Effective Technique Of Semen Processing For Intrauterine Insemination. *Journal Pak Med Assoc*. 58:71-74
- Johnson L, Blanchard T.L, Varner D.D, and Scrutchfield W.L. 1997. Factors affecting Spermatogenesis and testicular In The Stalion. *Journal Theriogenology*. 48:1199-1216

- Khunsook, S., J.A. Alhadeff and B.S. Bean. 2002. Purification and characterization of human seminal plasma  $\alpha$ -L-fucosidase. *Journal Mol. Hum. Reprod.* 8:221-227.
- Kostaman, Tatan dan A.R. Setioko. 2011. Perkembangan Penelitian Teknik Kriopreservasi Untuk Penyimpanan Semen Unggas. Makalah Balai Penelitian Ternak. Bogor
- Kurniawan, Dedy. 2009. Karakterisasi Antibodi Hasil Induksi Protein Membran Spermatozoa Manusia 20 KDA (PM 20 KDA) Dan Distribusi PM 20 KDA Pada Spermatozoa Manusia. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.
- Lamirande, Eve de Lamirande, Hong Jiang, Armand Zini, Hideya Kodama and Claude Gagnon. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Journal Review Reproduction.* 2:48-54
- Lemma, Alemayehu. 2011. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, Artificial Insemination in Farm Animals. <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/effect-of-cryopreservation-on-spermquality-and-fertility>. Diakses tanggal 9 Februari 2013.
- 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
- Manz, Andreas, N. Pamme, dan D. Iossifidis. 2004. *Bioanalytical Chemistry*. Imperial College Press, London.
- Marieb, Elaine N. 2009. *Essentials of Human Anatomy & Physiology*. Person Education, Inc. United State
- Martini, F.H. 2001. *Fundamental of Anatomy & Physiology* 5th edition. Prentice Hall Inc. New Jersey
- McLeskey, S.B, Dowds C, Carballada R, White R.R and Saling P.M. 1998. Molecule Involved In Mammalian Sperm-egg Interaction. *Int.Rev. Cytol*
- Masuda, H. 1992. *Artificial Insemination Manual for Cattle*. Association of Live Stock Technology Japan. Japan
- Medeiros CMO, F Forell, ATD Oliveria, and JL Rodrigues, 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenol.* 57:327-44
- Muller K, Muller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe´ C. 2008. Characterization of sperm plasma membrane properties after

- cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoal. *J Biol Reprod.* 78:390–399.
- Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. 2004. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil Steril.* 82: 913-918.
- Nandre, R.M, Fatima, Sh, Bhupal G, Derashri H.J and Joshi, C.G. 2013. Assessment of variations in Indian *Bubalus bubalis* seminal plasma proteins during winter and summer seasons. *Iranian Journal of Veterinary Research.* 14:1-8
- Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T and Nakagata N. 2004. Decrease of Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa After Freezing And Thawing Is Related To Cellular Injury. *Biology of Reproduction* 71:973–978.
- Ollero, M, O. Bescos, J.A Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco. 1998. Loss of Plasma Membran Protein of Bull Spermatozoa Through The Freezing-Thawing Process. *Journal Theriogenology Elsevier.* 49:547-555
- Pardesi, S.R., S.P. Dandeker, S.N. Jamdar and P. Harikumar. 2004. Identification and purification of an aspartic proteinase from human semen. *Journal Ind. J. Clin.Biochem.* 19:84-92
- Partodihardjo S. 1987. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya. jakarta
- Purohit S B, Laloraya M, Kumar G P. 1999. Role of Ion and Ion Channels In Capacitation and Acrosome Reaction of Spermatozoa. *Asian Journal Androl.* 1:95-107.
- Rabyt, J.F and White, B.J. 1987. *Biochemical Technique. Teory and Practice.* Brooks/ Cole Publishing Co. California.
- Poccia D. 1986. Remodeling of Nucleoprotein During Gametogenesis, fertilization and Early Development. *Int Rev Cytol.* 56:1- 65
- Souza, F.F de., C.S Barreto., M.D Lopez. 2006. Characteristic of Seminal Plasma Proteins and Their Correlation with Canine Semen Analysis. *Jornal of Theriogenology.* 68:100–106
- Strzezeck, J, F. Saizcidnha, P. Wysocki, A. Tyszkiewiezs, and M. Jastrzebski. 2002. Seminal plasma protein as marker of biological value of boar semen. *Journal Anim. Sci. Paper Reports.* 20:255-266.

- Sugoro, Irawan. 2009. Kajian Bioetik : Pemanfaatan Inseminasi Buatan (IB) Untuk Peningkatan Produktivitas Sapi. <http://www.sith.itb.ac.id/publikasi-ia/Filsafat/Inseminasi%20Buatan-Bioetika-Irawan-Sugoro.pdf>. Diakses 31 Januari 2013
- Suprayogi, Tri Wahyu, Ainur Rofiq, Trilas Sardjito, Adi Prijo Rahardjo. 2010. Identifikasi Fertility Associated Antigen (FAA) Pada Membran Plasma Spermatozoa Sapi Menggunakan Teknik Sodium Deodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE) dan Western Blot. Artikel ilmiah Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Susilowati, Trinil. 2011. Spermatology. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Syafaruddin dan Tri Joko Santoso. 2011. Optimasi Teknik Isolasi Dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif Pada Kemiri Sunan (Reutalis trisperma (Blanco) Airy Shaw). *Journal Littri*. 17:11-17
- Tanaka H, Herliantien, Herwiyanti E, Lubis OP, Buwono, dan Pujiyanto J. 2002 The Aftercare Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project. Japan International Cooperation Agency. p. 2.
- Therien, I, R. Moreau, and P. Manjunath. 1998. Major protein of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induced cholesterol efflux from epididymal sperm. *Journal Biol. Reprod.* 59:768-776.
- Toelihere MR, 1985. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Thongtip N, J. aikhun S. Mahasawangkul, K. Kornkaewrat P. Pongsopavijitr, N. Songsasen and A. Pinyopummin. 2008. Potential factors affecting semen quality in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Journal Reprod. Biol. Endocrin.* 17:6-9.
- Watson P.F. 2000. The Causes of Reduce Fertility With Cryopreserved Semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60:481-92
- White, I.G. 1993. Lipid And Calcium Uptake Of Sperm In Relation To Cold Shock And Preservation: A Review. *Journal Reprod. Fertil. Dev.* 5:639-658.

Yildiz, Cengiz, Palma Ottaviani, Napoleon Law, Renise Ayearst, Ling Liu and Colin McKerlie. 2007. Effects of Cryopreservation On Sperm Quality, Nuclear DNA Integrity, In Vitro Fertilization, And In Vitro Embryo Development In The Mouse. *Biology of Reproduction*. 133:585-595

Zilli, Loredana, Roberto Schiavone, Vincenzo Zonno, Rocco Rossanao, Carlo Storelli and Sebastiano Viella. 2004. Adenosine triphosphate concentration and b-D-glucuronidase activity as indicators of sea bass semen quality. *Journal Biol Reprod*. 70:1679–1684



## Lampiran 1. Cara perhitungan konsentrasi protein hasil ioslasi

### LT 1. Konsentrasi protein spermatozoa fraksi atas

Sampel	Fraksi atas					
	Semen segar			Semen beku		
	A280	CF	A280*CF (mg/mL)	A280	CF	A280*CF (mg/ml)
1	0,087	0,74	0,06438	0,041	0,94	0,03854
2	0,071	0,74	0,05254	0,021	0,55	0,01155
3	0,107	0,78	0,08346	0,038	1,02	0,03876
4	0,087	0,74	0,06438	0,021	1,12	0,02352
5	0,09	0,99	0,0891	0,054	0,59	0,03186

Keterangan :

A280 : nilai hasil absorbansi panjang gelombang 280 nm

CF : corection factor

A280\*CF : konsentrasi protein total

### LT 2. Konsentrasi protein spermatozoa fraksi bawah

Sampel	Fraksi bawah					
	Semen segar			Semen beku		
	A280	CF	A280*CF (mg/mL)	A280	CF	A280*CF (mg/mL)
1	0,273	0,66	0,18018	0,243	0,99	0,24057
2	0,211	0,78	0,16458	0,128	0,48	0,06144
3	0,427	0,66	0,28182	0,206	0,99	0,20394
4	0,376	0,57	0,21432	0,283	0,85	0,24055
5	0,259	0,68	0,17612	0,177	0,74	0,13098

Keterangan :

A280 : nilai hasil absorbansi panjang gelombang 280 nm

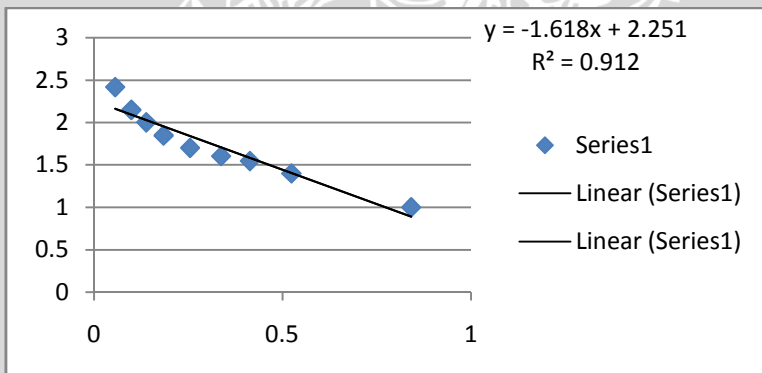
CF : corection factor

A280\*CF : konsentrasi protein total

## Lampiran 2. Perhitungan Berat Molekul Protein Spermatozoa

LT 3. BM marker protein spermatozoa fraksi bawah

Pita ke-	BM Marker	rf Marker	Log BM
Pita 1	260	0,05648855	2,414973
Pita 2	140	0,099236641	2,146128
Pita 3	100	0,138931298	2
Pita 4	70	0,184732824	1,845098
Pita 5	50	0,254961832	1,69897
Pita 6	40	0,33740458	1,60206
Pita 7	35	0,413740458	1,544068
Pita 8	25	0,523664122	1,39794
Pita 9	10	0,841221374	1



LG 1. Grafik regresi log BM dan Rf marker

LT 4. BM protein spermatozoa fraksi bawah semen segar

Pita ke-	rf	Log BM	BM (kDa)
Pita 1	0,08728943	2,110195865	128,8831

Pita 2	0,11638591	2,063094487	115,6364
Pita 3	0,14701378	2,013514089	103,1607
Pita 4	0,18376723	1,954017611	89,95341
Pita 5	0,23124043	1,877167994	75,3647
Pita 6	0,25421133	1,839982695	69,18034
Pita 7	0,35222052	1,681325421	48,00931
Pita 8	0,40735069	1,592080704	39,09135
Pita 9	0,47166922	1,487961868	30,75827
Pita 10	0,52220521	1,406154211	25,47735
Pita 11	0,58039816	1,311951455	20,50933
Pita 12	0,67840735	1,153294181	14,23293
Pita 13	0,76875957	1,007032006	10,16324
Pita 14	0,79479326	0,964888668	9,22335
Pita 15	0,85298622	0,870685911	7,42482
Pita 16	0,91424196	0,771525115	5,909151

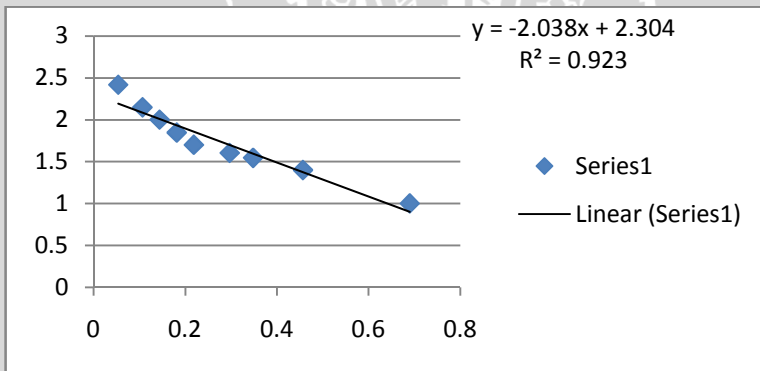
LT 5. BM protein spermatozoa fraksi bawah semen beku

Pita ke-	rf	Log BM	BM (kDa)
Pita 1	0,08728943	2,110195865	128,8831
Pita 2	0,11638591	2,063094487	115,6364
Pita 3	0,14548239	2,015993109	103,7512
Pita 4	0,18223583	1,956496631	90,46834
Pita 5	0,22970904	1,879647014	75,79613
Pita 6	0,25114855	1,844940735	69,97465
Pita 7	0,35375191	1,678846401	47,73604
Pita 8	0,40275651	1,599517764	39,76654
Pita 9	0,47320061	1,485482848	30,58319
Pita 10	0,58192956	1,309472435	20,39259
Pita 11	0,67075038	1,16568928	14,645



LT 6. BM marker protein spermatozoa fraksi atas

Pita ke	BM Marker	rf Marker	Log BM
Pita 1	260	0,054329372	2,414973
Pita 2	140	0,106960951	2,146128
Pita 3	100	0,144312394	2
Pita 4	70	0,181663837	1,845098
Pita 5	50	0,21901528	1,69897
Pita 6	40	0,297113752	1,60206
Pita 7	35	0,348047538	1,544068
Pita 8	25	0,456706282	1,39794
Pita 9	10	0,689303905	1



LG3. Grafik regresi log BM dan Rf marker

LT 7. BM protein spermatozoa fraksi atas semen segar

Pita ke-	rf	Log BM	BM (kDa)
Pita 1	0,0719755	2,157777948	143,8063
Pita 2	0,09647779	2,107830015	128,1829
Pita 3	0,15007657	1,998568913	99,67102

Pita 4	0,17151608	1,954864472	90,12898
Pita 5	0,18836141	1,920525268	83,27704
Pita 6	0,2618683	1,77068147	58,97684
Pita 7	0,39816233	1,492846095	31,10614
Pita 8	0,49157734	1,302419602	20,0641
Pita 9	0,57274119	1,136967075	13,70778
Pita 10	0,5957121	1,090140888	12,30668
Pita 11	0,64624809	0,987123277	9,707855
Pita 12	0,6676876	0,943418836	8,77847

LT 8. BM protein spermatozoa fraksi atas semen beku

Pita ke-	rf	Log BM	BM (kDa)
Pita 1	0,0704441	2,160899694	144,8437
Pita 2	0,09647779	2,107830015	128,1829
Pita 3	0,15160796	1,995447167	98,95715
Pita 4	0,17304747	1,951742726	89,48345
Pita 5	0,18683002	1,923647014	83,8778
Pita 6	0,26339969	1,767559724	58,55443
Pita 7	0,39663093	1,495967841	31,33054
Pita 8	0,56508423	1,152575804	14,2094
Pita 9	0,59264931	1,09638438	12,48488

### Lampiran 3. Komposisi larutan untuk isolasi protein dan SDS

#### PAGE

100 mL PBS pH 7,4

- NaCl 8 gr
- KCl 0,2 gr
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,15 gr
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 gr
- dH<sub>2</sub>O 100 mL

Separating gel 12,5%.

- Akrilamid 30% 2482 µL
- Tris Cl pH 8,8 1500 µL
- dH<sub>2</sub>O 1818 µL
- SDS 10% 75 µL
- APS 10% 75 µL
- Temed 5 µL

Stacking gel 5%.

- Akrilamid 30% 450 µL
- Tris Cl pH 6,8 380 µL
- dH<sub>2</sub>O 2110 µL
- SDS 10% 30 µL
- APS 10% 30 µL
- Temed 5 µL

Running buffer

- Tris base 1,15 gr
- Glisin 7,2 gr
- SDS 0,5 gr
- dH<sub>2</sub>O 50 mL

### Staining (CBB)

- CBB 0,05 gr
- Metanol 50 mL
- Asam asetat 10 mL
- dH<sup>2</sup>O 40 mL

### Destaining

- Metanol 50 mL
- Asam asetat 10 mL
- dH<sup>2</sup>O 40 mL

