

Profil Protein Spermatozoa Setelah Pembekuan

M. Dwi Susan¹⁾, Sri Rahayu¹⁾

1) Laboratorium Biomolekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia. E-mail: dwi.susan1990@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui profil protein spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan. Protein spermatozoa diisolasi dari 10 sampel sapi Friesian holstein dengan pemisahan fraksi atas dan bawah hasil sentrifugasi. Profil protein kemudian 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 spermatozoa dengan berat molekul 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 20, 14, 12, 10 dan 9 kDa, dan pada semen beku ditemukan 8 pita protein spermatozoa dengan berat molekul 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 14 dan 12 kDa. Sementara itu 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 dan 6 kDa, dan 11 pita protein dengan berat molekul 128, 116, 103, 90, 75, 69, 48, 40, 31, 20 dan 14 kDa pada semen beku. Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan profil protein spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan yang dilihat dari variasi berat molekul protein pada masing – masing perlakuan.

kata kunci : pembekuan, protein, SDS PAGE, spermatozoa.

ABSTRACT

The aims of this research was to determine protein profile of spermatozoa before and after freezing. Spermatozoa proteins was isolated from 10 sample Friesian holstein using separate upper and lower fraction of centrifugation result. Protein profiles was analysed by SDS PAGE with separating gel 12,5%. Data was analyzed descriptively by comparing of spermatozoa protein profiles of before and after freezing. The result showed in upper fraction of fresh semen found 12 protein bands with molecular weight of 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 20, 14, 12, 10, 9 kDa and frozen semen found 8 protein bands with molecular weight of 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 14, 12 kDa. In the lower fraction of fresh semen found 16 protein bands with molecular weight of 128, 116, 103, 90, 75, 69, 48, 40, 31, 26, 20, 14, 10, 9, 7, 6 kDa, and 11 protein bands with molecular weights of 128, 116, 103, 90, 75, 69, 48, 40, 31, 20 14 kDa in frozen semen. In conclusion, there were differences protein profiles of spermatozoa before and after freezing semen are seen from variation of molecular weight protein on each treatments.

key words : protein, SDS PAGE, spermatozoa.

PENDAHULUAN

Bioteknologi yang bisa digunakan untuk meningkatkan populasi sapi dalam negeri adalah inseminasi buatan (IB). IB dilapangan banyak menggunakan semen beku hasil pembekuan dengan pertimbangan masa simpan lebih lama dan pelaksanaannya lebih mudah dibandingkan dengan semen segar. Namun pada beberapa kasus, pembekuan dan thawing dapat menginduksi kerusakan spermatozoa yang berakibat pada penurunan kualitas (Zilli et al, 2005) seperti penurunan motilitas sebesar 40%

(Tanaka et al, 2000), peningkatan abnormalitas dan penurunan viabilitas sebesar 20-30% (Dhanju et al, 2001), penurunan integritas membran plasma (Nishizono et al, 2000), peningkatan kesalahan kondensasi kromatin, dan peningkatan fragmentasi DNA (Yildiz et al, 2007). Adanya penurunan kualitas spermatozoa akan mengakibatkan penurunan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Zilli, 2005).

Penurunan kualitas spermatozoa selama pembekuan dan thawing salah satunya disebabkan oleh peningkatan kadar reactive oxygen species (ROS). Hasil produk ROS seperti

Peroksida lipid akan merusak struktur dan fungsi membran dengan mengacaukan struktur fosfolipid dan fluiditas membran (Atiken, 1995). Peningkatan Ca^{2+} ekstra dan intraseluler dan adanya peroksida lipid pada membran fosfolipid akhirnya akan mengubah struktur dan terdegradasinya membran (Awda, 2009). Terdegradasinya membrane menyebabkan kerusakan komponen sel yang penting seperti DNA dan protein.

Kerusakan DNA oleh peroksida lipid seperti pembukaan cincin, fragmentasi dan cross linking protein-DNA dan pemecahan untai DNA akan menyebabkan sel mengalami mutasi atau letal (Awda, 2009). Selain itu, hasil peroksidasi lipid seperti malondialdehyde (MDA) dan 4-hydroxynonenol juga memicu terjadinya modifikasi oksidasi protein yang dapat merusak enzim active sites, merusak konformasi struktural protein dan menyebabkan protein tidak folding atau kesalahan folding untuk membentuk struktur aslinya (Kumar et al, 2010).

Adanya perubahan atau hilangnya susunan protein selama pembekuan tentunya akan mengakibatkan perubahan aktifitas fungsional protein (Lessard et al, 2000). Salah satu contoh fungsi penting protein spermatozoa adalah sebagai ligan untuk pengenalan dengan ZP3 yang merupakan glikoprotein pada zona pelusida (Morales, 1996). Mempertimbangkan hal itu maka penelitian dengan tujuan untuk mengetahui profil protein spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan ini penting untuk dilakukan.

METODE PENELITIAN

Sampel penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 5 semen segar dan beku sapi Friesian Holstein yang dikoleksi dari Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari Malang. Semen segar yang digunakan memiliki motilitas masa ++ dan motilitas individu >70%. Semen beku yang digunakan adalah semen beku yang telah disimpan selama 1 bulan.

Isolasi protein spermatozoa

Metode isolasi protein spermatozoa yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan Cheema et al (2010). Spermatozoa dan seminal plasma dipisahkan menggunakan PBS hangat pH 7,4 dengan sentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Diambil fraksi atas dan bawah,

lalu ditambahkan PBS hangat pH 7,4 pada masing – masing fraksi. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Diambil pelet dan ditambahkan PBS hangat pH 7,4, lalu disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Diambil pelet dan ditambahkan buffer ekstrak protein yang mengandung 1M Tris Cl-pH 6,8, 5M NaCl, 10% sodium deoxycholate, 20% SDS dan ddH₂O. Hasil akhir adalah isolat crude protein yang disimpan pada suhu -20°C sampai akan dilakukan elektroforesis. Untuk mengetahui konsentrasi protein total setiap isolat dilakukan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometri.

Analisis profil protein

Profil protein spermatozoa dianalisis menggunakan SDS PAGE dengan konsentrasi separating gel 12,5% dan stacking gel 5%. Running sampel dilakukan pada arus konstan 30 mA selama kurang lebih 60 menit. Gel hasil running diwarnai menggunakan Commasie Brilliant Blue sampai pita protein terlihat jelas.

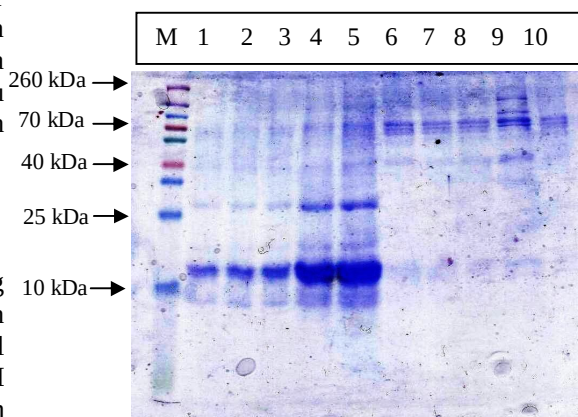
Analisis data

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis profil protein spermatozoa

Berdasarkan hasil elektroforesis dapat diketahui perbedaan profil protein spermatozoa pada fraksi atas semen segar dan beku (gambar 1 dan tabel 1)



Gambar 1. hasil elektroforesis 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 1. variasi berat molekul protein spermatozoa fraksi atas (kDa)

Pita protein	Fraksi atas									
	Segar					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	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-

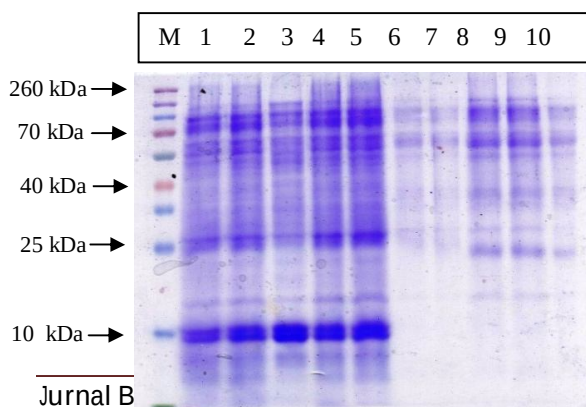
Keterangan :

. Ada pita protein

- Tidak ada pita protein

Hasil elektroforesis 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 semen beku ditemukan 9 pita protein dengan berat molekul 144, 128, 99, 90, 83, 59, 31, 14 dan 12 kDa. Pada hasil analisis semen beku tidak ditemukan 3 pita protein dengan berat molekul 20, 10 dan 9 kDa yang ditemukan pada semua semen segar.

Hasil elektroforesis fraksi bawah (gambar 2 dan tabel 2) juga dapat diketahui adanya perbedaan profil protein antara semen segar dan beku



Gambar 2. hasil elektroforesis SDS PAGE protein spermatozoa fraksi bawah. M adalah marker protein dengan berat molekul 260-10 kDa. Lane 1-5 adalah isolat crude protein semen segar. lane 6-10 adalah isolat crude protein semen beku.

Tabel 2. variasi berat molekul 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

Perbedaan profil protein dapat dilihat berdasarkan keberadaan pita – pita protein dan variasi berat molekul protein. Hasil elektroforesis 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 semen beku ditemukan 11 pita protein dengan berat molekul 128, 116, 103, 90, 75, 69, 48, 40, 31, 20 dan 14 kDa. Ada 5 pita protein dengan berat molekul 26, 10, 9, 7 dan 6 kDa yang ditemukan pada semua semen segar tidak ditemukan pada semua semen beku.

Penelitian yang dilakukan Ollero et al (1998) menggunakan sampel sapi menunjukkan bahwa ada perbedaan profil protein spermatozoa antara semen segar dan beku hasil pembekuan. Ada 4 pita protein dengan berat molekul 245, 100, 68, dan 35 kDa yang tidak terdeteksi pada semen beku. Tidak terdeteksinya pita protein dikarenakan telah hilang selama proses pembekuan. Adanya perbedaan berat molekul yang ditemukan pada penelitian ini dengan

penelitian yang dilakukan Ollero dimungkinkan karena pemilihan bangsa sapi dan parameter waktu pembekuan yang digunakan pada penelitian ini berbeda dengan penelitian Ollero et al.

Hilangnya protein spermatozoa selama pembekuan disebabkan oleh banyak faktor. Salah satunya adalah adanya peningkatan kadar ROS selama pembekuan (Awda, 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 (O₂) karena adanya stres oksidasi pada proses oksidasi fosforilasi. Rendahnya produksi O₂ menginduksi terjadinya peroksida lipid (Lamirande et al, 1997). Peroksida lipid akan merusak struktur dan fungsi membran dengan mengacaukan struktur fosfolipid dan fluiditas membran (Atiken, 1995). Peningkatan ekstra dan intraseluler Ca²⁺ dan peroksida lipid pada membran fosfolipid akhirnya akan mengubah struktur dan degradasi membran (Awda, 2009). Degradasi membrane akan menyebabkan terdegradasinya komponen sel yang penting seperti protein dan DNA. Protein yang telah terdegradasi oleh produk ROS akan dengan mudah berpindah ke medium ekstraseluler karena membrane sel yang telah rusak (Zilli et al, 2005).

Pembekuan semen yang mengakibatkan terdegradasinya beberapa molekul protein spermatozoa akan berkorelasiterhadap penurunan kualitas spermatozoa, seperti penurunan motilitas sebesar 40% (Tanaka et al, 2000), peningkatan abnormalitas, penurunan viabilitas sebesar 20-30% (Dhanju et al, 2001) dan penurunan kemampuan kapasitas saat fertilisasi (Nandre, 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Zilli et al (2005) menghasilkan bahwa terjadi penurunan tingkat penetasan ikan yang dibuahi dengan spermatozoa hasil pembekuan.

Dari gambar 1 dan 2 hasil elektroforesis diketahui terdapat perbedaan tebal dan tipisnya pita protein. Secara keseluruhan pita protein semen segar terlihat lebih tebal dibandingkan dengan pita protein semen beku. Adanya perbedaan tebal tipisnya pita protein dipengaruhi oleh konsentrasi total protein pada masing – masing sampel. Semakin tinggi konsentrasi total protein maka pita yang tercetak dalam gel akan semakin tebal, begitu juga semakin rendah konsentrasi total protein maka pita yang tercetak dalam gel akan semakin tipis.

Dari gambar 1 dan 2 juga dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan jumlah dan variasi berat molekul pita protein pada fraksi atas dan bawah. Pada fraksi atas ditemukan lebih sedikit pita protein daripada fraksi bawah, dan berat molekul protein pada kedua fraksi tidak sama meskipun ada beberapa protein dengan berat molekul sama yang muncul. Adanya perbedaan jumlah pita protein antara fraksi atas dan bawah, dimungkinkan karena ada beberapa pita protein seminal plasma yang ikut terdeteksi dalam fraksi bawah.

Pencucian spermatozoa dari seminal plasma bisa dilakukan menggunakan sentrifugasi. Hasil swim up akan terbentuk beberapa medium. Spermatozoa yang hidup atau yang masih aktif bergerak akan menuju keatas media sedangkan spermatozoa yang mati, berbagai macam mikroorganisme, dan debris sel akan bergerak dan mengendap kebawah media (Jamel, 2008).

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).

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan profil protein spermatozoa sebelum dan setelah pembekuan yang dilihat dari variasi berat molekulnya. Setelah pembekuan semen, pada fraksi atas tidak ditemukan protein dengan berat molekul 20, 10 dan 9 kDa dan pada fraksi bawah tidak ditemukan protein dengan berat molekul 26, 10, 9, 7 dan 6 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada pihak Balai Besar Inseminasi Buatan yang telah memberikan izin melakukan koleksi semen, dan seluruh staff Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya atas bantuannya selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Aitken RJ. 1995. Free Radicals, Lipid Peroxidation and Sperm Function. *ReprodFertil Dev*.7:659–668.
- [2] Awda, Basim J, Meghan Mackenzie-Bell, and Marry M. Buhr. 2009. Reactive Oxygen Species and Boar Sper Function. *Journal Biolreprod*. 81:553 – 561.
- [3] 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
- [4] 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
- [5] 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*.
- [6] Jameel, Tahir. 2008. Sperm Swim-Up: A Simple And Effective Technique Of Semen Processing For Intrauterine Insemination. *Journal Pak Med Assoc*. 58:71-74
- [7] Kumar, Vinay, Abul K Abbas, Nelson Fausto, Jon C. Aster, and James A. Perkins. 2010. *Robbins and Cotran Pathology Basic of Disease, Professional Edition, 8th. Saunders Elsevier. Philadelpha*.
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Lessard C, S Parent, P Leclerc, JL Bailey, and R Sullivan. 2000. Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. *Journal Androl*. 21:700-707
- [11] 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
- [12] 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
- [13] 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.
- [14] Sudarmadji, S. 1996. *Teknik Analisa Biokimiawi. Edisi Pertama. Liberty. Yogyakarta*.
- [15] Tanaka H, Herliantien, Herwiyanti E, Lubis OP, Buwono, danPujianto J. 2002 *The Aftercare Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project. Japan International Cooperation Agency. p. 2*
- [16] 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
- [17] Zilli, Loredana, Roberto Sciafone, Vincenzo Zonno, Rocco Rossanao, Carlo Storelli and Sebastiano Viella. 2005. Effect of Cryopreservation on Sea Bass Sperm Protein. *Journal Biolog of Reproduction*. 72:1262-1267.