

BIOAKTIVITAS INSULIN LIKE GROWTH FACTOR–I COMPLEX PLASMA SEMINALIS KAMBING TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA HASIL SENTRIFUGASI

Suherni Susilowati

Laboratorium Inseminasi Buatan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

ABSTRACT

Series of explorated laboratory experiment have been conducted to analysed the bioactifity of Insulin Like Growth Factor – I (IGF-I) Complex protein of goat seminal plasm on the membran plasm and acrosom cap of centrifugation sperm. First experiment was conducted to identifiatify and isolate IGF –I Complex of goat seminal plasm by using Native - Polyacrylamide gel electroforesis. The result of analysis of Native – PAGE indicated that IGF-I Complex have molecular weight of 150 kDa. Second experiment was conducted to role of IGF-I Complex protein on the membrane plasm and acrosom cap of centrifugation sperm. Semen was collected by using artificial vagina from eight mature goat. Immediately after initial evaluation, semen was centrifugated with Bracket and Oliphant's (BO) for 5 minutes 1800 rpm. And then divided two groups. Each group was supplemented with 3×10^6 of sperm concentration and then into group I was supplemented with BO medium and group two was supplemented with IGF-I Complex protein. The result of this experiment indicated that percentages of intact plasm membrane and intact acrosom cap were significantly ($p < 0.05$), between BO medium and IGF-I protein. In conclusion, IGF- I Complex protein is the optimal in improving plasm membran and acrosom cap of centrifugation sperm

Key words: sperm, centrifugation, Insulin Like Growth Factor – I Complex, membran plasm, acrosom cap

PENGANTAR

Dalam upaya meningkatkan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in-vitro*, spermatozoa terlebih dahulu harus dipisahkan dari plasma seminalis melalui pencucian. Pencucian semen merupakan suatu cara memisahkan spermatozoa motil dengan immotil, komponen plasma seminalis, agen krioprotektan dan bahan-bahan lain yang dapat berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa (Check *et al.*, 1998, Hardjopranjoto, 2006).

Salah satu metode pencucian spermatozoa yang sering dilakukan pada program fertilisasi *in-vitro* adalah cara sentrifugasi. Dampak buruk dari hasil pemisahan plasma seminalis dengan teknik sentrifugasi adalah adanya peningkatan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) oleh spermatozoa (Agaerwal *et al.*, 2003). Hal tersebut diperkuat oleh penelitian Sardjito (2004), membuktikan bahwa proses sentrifugasi dengan kecepatan 1800G, 2400G dan 2800G menunjukkan adanya peningkatan kerusakan membran spermatozoa yang mengakibatkan daya tahan hidup spermatozoa menjadi menurun.

Spermatozoa diliputi oleh membran sel dari kepala sampai ekor yang mempunyai susunan sangat kompleks baik komposisi molekuler maupun secara fungsional. Membran spermatozoa tersusun dari 43% lipid, 48% protein, dan 9% karbohidrat (Darnell *et al.*, 1990). Komponen membran spermatozoa mempunyai fungsi yang sangat

unik dan spesifik seperti perlekatan spermatozoa dengan sel telur, transpor substrat, dan metabolisme. Fungsi-fungsi tersebut dilakukan oleh struktur yang secara morfologis terletak pada daerah tertentu seperti membran pada bagian kepala berfungsi untuk penembusan sel telur pada proses fertilisasi (Nolan dan Hammersted, 1997). Membran bagian belakang akrosom berfungsi mengadakan kontak pertama dan menjadi satu dengan oolema sel telur pada proses fertilisasi, sedangkan membran pada bagian ekor mempunyai fungsi untuk mendapatkan substrat untuk energi spermatozoa dan menghantar gelombang (Darnell *et al.*, 1990).

Pada proses fertilisasi *in vitro* maupun *in vivo* selain motilitas spermatozoa, keutuhan tudung akrosom dan membran plasma sangat menentukan kemampuan membuahi oosit. *Reactive Oxygen Species* yang berlebihan akibat sentrifugasi semen akan memengaruhi lipid membran terutama asam lemak poli tak jenuh sehingga terjadi peroksidasi lipid. Bila terjadi peroksidasi lipid, membran plasma spermatozoa maupun tudung akrosom akan terganggu. Oleh karena itu, membran spermatozoa harus terjaga keutuhannya agar fertilisasi dapat terjadi. Plasma seminalis mengandung bermacam-macam komponen organik maupun anorganik serta hormon dan protein. Salah satu protein yang terkandung di dalam plasma seminalis kambing adalah *Insulin Like Growth Factor – I* (IGF-I)

Complex yaitu suatu protein kompleks yang terdiri atas 3 molekul, yaitu satu molekul *Insulin Like Growth - I (IGF-I)*, satu molekul *Insulin Like Growth Factor Binding Protein (IGFBP)*, dan satu molekul *Acid Label Subunit (ALS)* (Laron, 2001) dengan berat molekul (BM) 150 kDa.

Penambahan IGF-I pada spermatozoa sapi secara *in-vitro* menghasilkan peningkatan motilitas spermatozoa. *Insulin Like Growth Factor* dalam mempertahankan motilitasnya kemungkinan dengan cara bertindak sebagai antioksidan. Pada proses sentrifugasi plasma seminalis yang mengandung antioksidan hilang, sehingga dengan penambahan IGF-I diduga dapat meredam ROS yang berlebihan, peroksidasi lipid tidak terjadi, yang akhirnya produk akhir malondialdehid (MDA) tidak terbentuk. MDA merupakan golongan aldehid yang bersifat toksik yang mengakibatkan penurunan potensi biologis spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bioaktivitas protein IGF-I Complex plasma seminalis kambing terhadap membran plasma dan tudung akrosom spermatozoa hasil sentrifugasi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian berupa kambing jantan peranakan etawa sebanyak 6 ekor yang digunakan untuk memperoleh sampel. Selain itu juga digunakan bahan-bahan untuk isolasi dan purifikasi protein. *Non Reducing Sample Buffer* (Non-RSB), *separating gel* 12%, *stacking gel*, *Marker High Range SDS-PAGE Standards* (Bio-Rad), *Comassie Blue* (Bio-Rad), larutan destaining, bahan untuk pemeriksaan konsentrasi protein, bahan untuk pemeriksaan membran plasma dan tudung akrosom spermatozoa.

Alat-alat yang diperlukan pada penelitian ini meliputi vagina buatan, tabung skala, sentrifus dingin, gelas beaker, erlenmeyer, mikropipet, eppendorf, seperangkat alat gel elektroforesis horizontal, alat elektroelusi, spektrofotometer Vis dan kuvet dari glass atau polystyrene, kaca benda, kaca penutup mikroskop.

Koleksi Semen dan Purifikasi Protein

Semen ditampung dari kambing jantan peranakan etawa dengan menggunakan vagina buatan. Semen tersebut diencerkan dengan PBS kemudian disentrifus pada suhu 5 °C dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, kemudian supernatan diambil dengan mikropipet dimasukkan ke dalam eppendorf. Purifikasi dilakukan dengan cara menambahkan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dan *Phenylmethenesulfonyl fluoride* (PMSF) kemudian divorteks selama 5 menit, disonikator selama 10 menit pada suhu 4 °C selanjutnya divorteks lagi dan disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm

selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambah dengan etanol absolut dengan perbandingan 1:1 dan diendapkan semalam, etanol dibuang kemudian pelet yang diduga mengandung protein ditambah dengan Tris HCl dengan 1–2 kali volume pelet.

Identifikasi Protein *Insulin Like Growth Factor-I Complex* dengan metode *Native - PAGE*

Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). *Separating gel* dimasukkan ke dalam *plate* menggunakan mikropipet, permukaan dilapisi dengan menambahkan akuades dan dibiarkan 10–30 menit hingga terbentuk gel. Selanjutnya *stacking gel* dituangkan di atas *separating gel* yang telah memadat, setelah itu dipasang sisir untuk membentuk sumuran dan didiamkan selama 30 menit. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat selanjutnya *plate* dipasang pada alat elektroforesis, berikutnya buffer PBS dituangkan pada *chamber* elektroforesis.

Lima belas μ l sampel yang diduga mengandung protein ditambah 15 μ l *Non-Reducing Sample Buffer* (RSB) dimasukkan ke dalam eppendorf, kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100 °C selama 3 menit. Setelah dingin sampel diambil sebanyak 15 μ l dimasukkan dalam sumur *stacking gel*. Protein standar (*marker*) diperlakukan sama dengan sampel. Elektroforesis dihubungkan pada *reservoir* bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30 mA, 130 V selama 1 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian \pm 0,05 cm dari batas bawah *plate gel*. *Plate* dibuka dan gel diambil untuk dilakukan pewarnaan dan pencucian gel.

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining Coomassie Blue R-250* selama 30–60 menit. Kemudian dilakukan penghilangan warna dengan merendam gel dalam larutan destaining dan digoyang secara otomatis sampai gel menjadi jernih dan hasil elektroforesis difoto atau discan.

Isolasi Protein *Insulin Like Growth Factor-I Complex* dengan Metode Elektroelusi

Elektroelusi dilakukan dengan memasukkan potongan *band* pada *gel Native-PAGE* ke dalam kantong selofan sepanjang kurang lebih 10 cm dengan tetap dijaga agar posisi gel tidak melengkung. Bagian atas dan bawah selofan diikat dengan benang, kemudian dimasukkan alat elektroforesis horizontal (*Bio-Rad*). Alat elektroforesis *Bio-Rad* diisi dengan *buffer* sebanyak 500 ml dalam posisi *buffer* melebihi aliran listrik kawat. *Running* elektroelusi

dilakukan pada kondisi 150 Volt, 40 mA selama 2 jam. Cairan hasil elusi ditampung dalam tabung Eppendorf, disimpan pada suhu -70°C , siap dipakai untuk penelitian berikutnya.

Penentuan Kadar Protein dengan Metode Biuret

Penentuan protein menggunakan metode Biuret diawali dengan pembuatan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA). Preparasi pengukuran protein dari sampel dilakukan sebagai berikut.

Kandungan protein *IGF-I Complex* ditentukan dengan menggunakan reagen biuret dengan penambahan larutan standar BSA. Diambil 0,5 ml sampel *IGF-I Complex* hasil elusi ditambah 1ml larutan standar BSA 5000 ppm dan 4 ml reagen biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian daya serapnya diukur dengan spektrofotometer UV – Vis pada λ maksimum yaitu 550 nm. Sebagai blanko dipipet 1,5 ml air dan ditambah 4 ml reagen biuret, dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian daya serapnya diukur dan diulangi 3 kali. Kandungan protein diperoleh dengan cara mengkonversi data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA. (Aulanni'am, 2004).

Aplikasi Protein *Insulin Like Growth Factor-I Complex* terhadap Spermatozoa Hasil Sentrifugasi

Semen kambing ditampung dengan vagina buatan kemudian dilakukan pemeriksaan makroskopis (volume, bau, warna, pH, dan konsistensi). Jika hasil evaluasi baik selanjutnya pada tabung sentrifus dimasukkan semen sebanyak 0,5 ml kemudian ditambah medium *Bracket and Oliphant's* (BO) sebanyak 1 ml dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit. Endapan (*pellet*) diambil dengan *sputit*, dan dicuci kembali, kemudian dihitung sebanyak 3×10^6 spermatozoa untuk perlakuan. Spermatozoa hasil sentrifugasi dibagi 2 yaitu tabung I diisi dengan spermatozoa yang ditambah medium BO dan tabung II diisi dengan spermatozoa yang ditambah protein IGF-I Complex 55 ng. Selanjutnya dilakukan inkubasi 30 menit pada suhu ruang. Spermatozoa yang motil diambil dengan *sputit* kemudian dilakukan pemeriksaan membran plasma spermatozoa dan tudung akrosomnya.

Pemeriksaan Membran Plasma Spermatozoa

Pemeriksaan membran plasma spermatozoa dilakukan dengan *Hypo Osmotik Swelling Test* (HOST) menggunakan larutan sitrat dan fruktosa. Sampel spermatozoa pada tabung I dan tabung II masing-masing diambil sebanyak 0,1 ml

(100 μl) dimasukkan ke dalam *vial Ependorf* yang telah diisi dengan larutan sitrat fruktosa sebanyak 1 ml. Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya dibuat preparat ulas dengan pewarnaan *eosin* (1:1). Evaluasi 100 spermatozoa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 \times . Penilaian dilakukan dengan menghitung proporsi spermatozoa dengan membran plasma utuh yang ditandai dengan ekor melingkar, sedangkan spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak ditandai oleh ekor yang lurus karena membran rusak, permeabilitas meningkat, larutan hipotonik masuk melewati membran sehingga kepala tampak menggelembung dan ekor lurus.

Pemeriksaan Keutuhan Tudung Akrosom

Pemeriksaan keutuhan tudung akrosom dilakukan dengan pembuatan larutan NaCl fisiologis yaitu NaCl 0,9%. Satu ml formalin ditambahkan ke dalam 99 ml larutan NaCl fisiologis dan dikocok sampai homogen. Satu bagian spermatozoa dicampur dengan tiga bagian larutan di atas sampai homogen, didiamkan sekitar 3 menit. Selanjutnya preparat dibuat dengan cara meneteskan satu tetes larutan di atas pada objek gelas dan tutup dengan gelas penutup. Preparat ditekan pelan dengan menggunakan kertas tisu, kelebihan cairan dikeringkan. Seratus spermatozoa dievaluasi di bawah mikroskop fase kontras dengan pembesaran 1000 \times menggunakan minyak emersi. Penilaian dilakukan dengan cara menghitung proporsi spermatozoa dengan tudung akrosom utuh dalam 100 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh ditandai oleh keberadaan tudung akrosom yang berwarna hitam. Analisis data dilakukan dengan uji T (Santoso dan Fandy, 2001)

HASIL

Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Semen Segar Kambing untuk Perlakuan

Hasil pemeriksaan makroskopis semen kambing yang ditampung dari pejantan kambing yang akan dipakai untuk perlakuan adalah sebagai berikut: volume hasil penampungan semen dalam penelitian ini berkisar 1,20 sampai 1,90 ml dengan rata-rata 1,54 ml. Hasil pemeriksaan warna, bau, pH, dan konsistensi tidak terdapat penyimpangan. Warna semen normal adalah berwarna putih kekuningan. Bau semen khas untuk kambing dan tidak berbau busuk atau anyir. pH air mani rata-rata 6,48. Konsistensi semen yang diperoleh adalah kental berarti semen tersebut konsentrasinya tinggi.

Hasil pemeriksaan mikroskopis semen kambing yang ditampung dari pejantan kambing yang akan dipakai untuk perlakuan adalah sebagai berikut. Konsentrasi semen yang didapat berkisar antara 2350 sampai 2550 juta/ml dengan rata-rata 2410 juta/ml. Gerakan massa diberi tanda +++ yang artinya spermatozoa tersebut sangat baik yaitu menunjukkan gerakan gelombang yang besar dan banyak serta gerakan individu spermatozoa adalah progresif (P), ini berarti spermatozoa bergerak aktif maju ke depan yaitu berkisar 86–88% dengan rata-rata 87%. Persentase spermatozoa yang hidup berkisar 88–92% dengan rata-rata 90,8%. Bila hasilnya baik, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit. Hasil pada sentrifugasi ini menunjukkan terjadi penurunan motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa yaitu sebesar 83% untuk motilitas, 85% untuk daya tahan hidup serta terjadi kerusakan membran plasma spermatozoa. Hal ini ditunjang oleh penelitian Dasrul (2005) yang membuktikan bahwa sentrifugasi gradien percol pada spermatozoa kerbau dapat menyebabkan kerusakan membran plasma. Selanjutnya hasil spermatozoa yang telah disentrifugasi digunakan untuk manipulasi *in-vitro*.

Persentase membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa setelah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata dan SD membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa

Parameter	Medium P1 (BO)	Medium P2 (IGF – I) Complexprotein
MPU (%)	33,63 ± 2,83 ^b	81 ± 2,56 ^a
TAU (%)	33 ± 3,66 ^b	80,25 ± 3,01 ^a

Notasi a,b,c pada baris yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)

Keterangan:

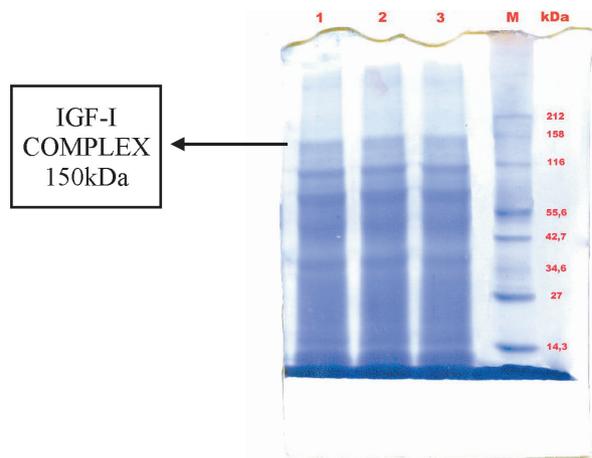
P1 : Medium Bracket and Oliphant's (BO)

P2 : Medium IGF-I Complex protein

MPU : Membran Plasma Utuh

TAU : Tudung Akrosom Utuh

Berdasarkan data pada tabel 1 dapat diketahui bahwa persentase membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh dari dua perlakuan medium menunjukkan perbedaan. Analisis statistik dengan uji T menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara medium BO dan *IGF-I Complex* terhadap membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh. Berdasarkan tabel tersebut juga dapat diketahui bahwa persentase membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh yang paling tinggi adalah pada protein IGF-I Complex.

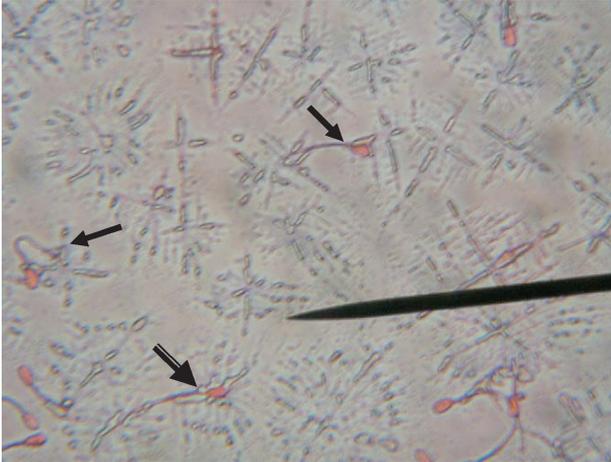


Gambar 1. Analisis gel Native-PAGE protein plasma seminalis kambing

PEMBAHASAN

Semen yang disentrifugasi menyebabkan hilangnya plasma seminalis yang berakibat agen antioksidan yang terdapat di dalam plasma hilang. Pada keadaan normal pada sel spermatozoa hidup, terjadi metabolisme untuk mendapatkan ATP melalui fosforilasi oksidatif. Sebesar 85–90% oksigen diperlukan untuk mitokondria, 1–3% oksigen direduksi secara univalen menjadi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Bila kadar ROS yang terbentuk berlebihan akibat dari sentrifugasi tersebut maka akan berpengaruh terutama pada membran plasma spermatozoa yaitu pada lipid membran sehingga akan terjadi reaksi rantai yang akan menghasilkan senyawa toksik.

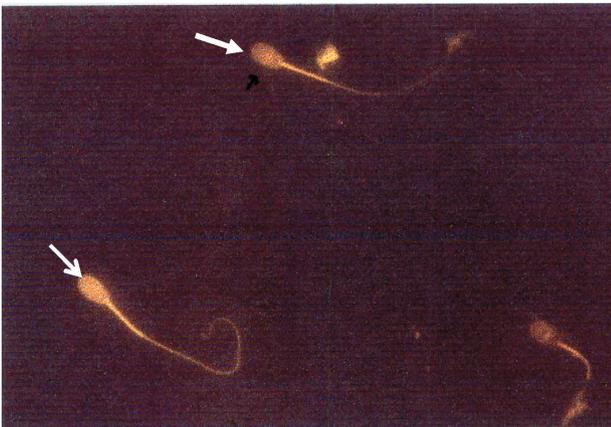
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa lebih tinggi pada medium protein *IGF-I Complex* daripada BO medium. Kemungkinan *Insulin Like Growth Factor I (IGF-I) Complex* mempunyai peran sebagai antioksidan (Donald *et al.*, 1998). Penelitian Susilowati (2007) juga menunjukkan bahwa penambahan protein *IGF-I Complex* pada spermatozoa kambing hasil sentrifugasi menunjukkan bahwa protein *IGF-I Complex* dapat menurunkan kadar malondialdehid (MDA). Dalam arti luas antioksidan merupakan senyawa-senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan termasuk enzim-enzim dan protein-protein pengikat logam. Dalam meredam dampak negatif yaitu dengan cara mencegah terhimpunnya senyawa-senyawa oksidan secara berlebihan (*preventive anti-oxidants*) dan mencegah reaksi rantai berlanjut (*chain-breaking anti-oxidants*). Antioksidan pencegah yaitu mencegah terjadinya



Gambar 2. Membran plasma spermatozoa dengan *Hypoosmotic Swelling Test* (perbesaran 400×)

Keterangan:

- Spermatozoa yang membrannya utuh (ekor melingkar)
- Spermatozoa yang membrannya rusak (ekor lurus)



Gambar 3. Tudung akrosom spermatozoa dengan perbesaran 400×

Keterangan:

- Tudung akrosom spermatozoa yang utuh (hitam)
- Tudung akrosom spermatozoa yang rusak

radikal hidroksil (Suryohudoyo, 2000). Apabila radikal hidroksil berikatan dengan asam lemak poli tak jenuh yang merupakan komponen lipid membran akan terjadi oksidasi lipid yang akhirnya menghasilkan MDA. Dalam hal ini apakah protein *IGF-I Complex* pada penelitian ini bertindak sebagai *preventive anti-oxidant* atau *chain-breaking anti-oxidant* belum jelas. *Reactive Oxygen*

Species (ROS) yang terbentuk akan diredam oleh protein *IGF-I Complex* yaitu dengan cara mengabstraksikan satu atom hidrogen, sehingga peroksidasi lipid tidak terjadi dan akhirnya lipid membran tidak rusak. Akibatnya membran plasma spermatozoa dan tudung akrosom spermatozoa tidak mengalami kerusakan sehingga transpor molekul yang melalui membran plasma berjalan dengan normal.

KEPUSTAKAAN

- Agaerwal ARA, Saleh, dan Bedalwy MA, 2003. Role of Reactive Oxygen Species in the Pathophysiology of Human Reproduction. *Fertility and Sterility*.79: 829–843.
- Aulanni'am, 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Fakultas pertanian Universitas Brawijaya Press.
- Check JH, Shanis BS, Cooper SO, dan Bollendorf A, 1998. Male Sex Preselection: Swim Up Technique and Insemination of Women After Ovulation Induction. *Arch Androl* 56: 456–487.
- Darnell J, Lodish H, and Baltimore D, 1990. Molecular Cell Biology. Second Edition. Sci.Am. Book.
- Dasrul, 2005. Peran Senyawa Oksigen Reaktif dalam Mekanisme Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur Hasil Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. Disertasi. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga Surabaya.
- Donald H, Andrew M, Kouba J, Brett J, Lackey R, William R, Boone, dan Gray L, 1998. Identification of Insulin Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa: Influence on Sperm Motility. *Biol of Reproduction*. 59: 330–337.
- Hardjopranjoto S, 2006. Perkembangan Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Pidato Ilmiah. Pada Acara Temu Ilmiah Sehari dalam Rangka Purnabakti Prof. Dr. Soehartojo Hardjopranjoto MSc, Drh. Dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Nolan JP dan Hamersted RH, 1997. Regulation Membran Stability and Acrosom Reaction in mammalian Sperm. *J. of Androl*. 34: 567–587.
- Sardjito T, 2004. Pengaruh Sentrifugasi Spermatozoa sapi terhadap Integritas Membran, Resistensi dan Kelayakan Kondisi pada Proses Kapasitasi In Vitro. Tesis. Penelitian Eksperimental Laboratorik Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Santoso, S dan Fandy T, 2001. Riset Pemasaran Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. PT Gramedia, Jakarta.
- Suryohudoyo P, 2000. Kapita Selekta. Ilmu Kedokteran Molekuler. Cetakan I. CV Sagung Seto, Jakarta.
- Susilowati S, 2007. Peran IGF-I Complex Plasma seminalis kambing terhadap kandungan malondialdehid (MDA) pada spermatozoa hasil sentrifugasi. Penelitian Mandiri.