

Penambahan Osteopontin dalam Pengencer Semen Beku Sapi Perah *Friesian Holstein* Meningkatkan Ekspresi *B-Cell CLL/Lymphoma-2* Spermatozoa *Postthawing*

(ADDITIONAL OSTEOPONTIN INTO FROZEN FRIESIAN-HOLSTEIN SEMEN DILUTER INCREASES THE EXPRESSION OF B-CELL CLL/LYMPHOMA-2 IN POSTTHAWING SPERM)

Abdul Samik¹, Yudit Oktanella², Tatik Hernawati³,
Ngakan Made Rai Widjaja⁴, Intan Purwa Dewanti²

¹Departemen Fisiologi Reproduksi,

²Mahasiswa Program Magister Ilmu Biologi Reproduksi,

³Departemen Inseminasi Buatan, ⁴Departemen Kedokteran Dasar Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Jalan Mulyorejo, *Kampus C*, Surabaya, Jawa Timur 60115,

Telp: (031)5924081, E-mail: samik_s3@yahoo.co.id

ABSTRAK

Viabilitas semen beku *postthawing* merupakan salah satu faktor penting yang dalam program IB yang ditentukan oleh dua jenis kematian sel, yaitu apoptosis dan nekrosis. Sapi perah jantan dengan tingkat kesuburan yang baik memiliki konsentrasi osteopontin (OPN) yang tinggi pada seminal plasmanya. Osteopontin juga diketahui sebagai protein yang berhubungan dengan ketahanan seluler melalui inhibisi kematian sel secara apoptosis, dan ekspresi *B-cell CLL/Lymphoma-2 (Bcl-2)* hampir selalu dikaitkan dengan kemampuan pertahanan sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan osteopontin ke dalam pengencer semen beku terhadap ekspresi *Bcl-2* spermatozoa *postthawing*. Semen berasal dari sapi perah FH berumur sekitar empat tahun. Perlakuan terbagi menjadi empat kelompok, yang terdiri dari : P₀ semen segar dengan penambahan OPN 0 µg/5.10⁷ spermatozoa; P₁, semen segar dengan penambahan OPN 5 µg/5.10⁷ spermatozoa; P₂, semen segar dengan penambahan OPN 10 µg/5.10⁷ spermatozoa; dan P₃, semen segar dengan penambahan OPN 20 µg/5.10⁷ spermatozoa. Pemeriksaan ekspresi *Bcl-2* spermatozoa dilakukan dengan metode imunositokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok P₀ dan P₁ tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (p>0,05), tetapi kelompok perlakuan P₂ dan P₃ berbeda nyata dengan kelompok kontrol (p>0,05). Meskipun demikian, tidak terdapat perbedaan ekspresi *Bcl-2* yang nyata antara kelompok perlakuan P₂ dan P₃ (p>0,05). Simpulan dari penelitian ini adalah penambahan osteopontin dalam pengencer semen beku mampu meningkatkan ekspresi *Bcl-2* spermatozoa sapi perah FH *postthawing*.

Kata-kata kunci: osteopontin, ekspresi *Bcl-2*, pengencer semen, spermatozoa sapi perah.

ABSTRACT

Post thawed frozen semen viability is one of the most important keys in artificial insemination depended on two major cell death mechanism, apoptosis and necrosis. It has been known that good fertility dairy bull's seminal plasma contains high concentration of osteopontin (OPN). Osteopontin also known as cell survival protein via inhibition to apoptotic cell death, and *B-cell CLL/Lymphoma-2 (Bcl-2)* expression mostly related to the ability of cell survival. The aim of this study was to investigate the influence of additional OPN into frozen semen diluter on post thawed sperm *Bcl-2* expression. Fresh semen collected from ±4 year Friesian Holstein bull. Treatment group divided into four groups i.e.: control group (P₀: without OPN supplementation), (P₁: fresh semen with OPN supplementation 5 µg/5.10⁷ spermatozoa), (P₂: fresh semen with OPN supplementation 10 µg/5.10⁷ spermatozoa), (P₃: fresh semen with OPN supplementation 20 µg/5.10⁷ spermatozoa). *Bcl-2* sperm expression was determined using immunocytochemistry. The result of this study showed that there was no significant difference between group P₀ and P₁ (p>0,05), but both group P₂ and group P₃ showed a significant difference with P₀ (p<0,05). Nevertheless, there was no significant difference between group P₂ to group P₃ on post thawed Friesian Holstein sperm *Bcl-2* expression (p>0,05). The conclusion of this study is osteopontin supplement in frozen semen diluter is capable to increase post thawed Friesian Holstein sperm *Bcl-2* expression.

Key words: osteopontin, *Bcl-2* expression, semen diluter, dairy bull's sperm

PENDAHULUAN

Salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan program inseminasi buatan (IB) adalah kualitas semen. Pembuatan semen beku merupakan salah satu usaha untuk meningkatkan daya simpan spermatozoa, karena daya tahan hidup spermatozoa pasca ejakulasi sangat terbatas. Semen beku juga mampu melestarikan genetik pejantan ternak unggul untuk tujuan peningkatan populasi secara kualitatif dan kuantitatif. Namun, masih banyak kendala yang seringkali terjadi pada pembuatan semen beku berkaitan dengan masalah penurunan fertilitas spermatozoa akibat berbagai perubahan yang dialami oleh sel spermatozoa selama tahap kriopreservasi.

Kerusakan akibat kriopreservasi spermatozoa yang seringkali ditemukan adalah gangguan membran, penurunan motilitas dan viabilitas, kerusakan DNA, serta terjadinya apoptosis (Anzar *et al.*, 2002; Paasch *et al.*, 2004; Ivanova-Kicheva *et al.*, 2005) dan nekrosis (Anzar *et al.*, 2002). Viabilitas spermatozoa pada saat dibekukan pada suhu -196°C cenderung menurun, sesuai dengan penelitian yang dilaporkan oleh Anzar *et al.*, (2002) yang mengindikasikan terjadinya kenaikan jumlah spermatozoa yang mengalami apoptosis hingga 40%. Ketahanan sel terhadap kematian secara apoptosis salah satunya diatur oleh aktivitas protein pro- dan anti-apoptosis keluarga *B-cell CLL/Lymphoma-2 (Bcl-2)* yang terdapat dalam *inter-membrane mitochondrial space (IMS)* (Reed, 2000; Kuwana dan Newmeyer, 2003).

Osteopontin (OPN) diperkenalkan sebagai salah satu protein yang diekspresikan dalam cairan kelenjar aksesoris dan berhubungan dengan fertilitas sapi jantan (Moura *et al.*, 2005). Kadar OPN ditemukan 2,5 kali lebih besar pada seminal plasma sapi perah *Holstein* dengan fertilitas yang bagus dibanding dengan sapi perah dengan fertilitas rendah (Killian *et al.*, 1993; Cancel *et al.*, 1997).

Osteopontin terutama berikatan dengan reseptor integrin dan CD44. Glikoprotein transmembran CD44 ada dalam spermatozoa sapi, selain itu sub-unit integrin α_v dan α_5 telah diidentifikasi terdapat pada spermatozoa sapi (Erikson *et al.*, 2003). Kehadiran osteopontin dan reseptornya pada spermatozoa serta cairan seminalis mengindikasikan bahwa molekul tersebut berperan dalam sistem reproduksi jantan. Erikson (2006) menunjukkan bahwa spermatozoa yang diinkubasi dengan

penambahan osteopontin memiliki persentase viabilitas yang lebih tinggi dibanding spermatozoa tanpa penambahan osteopontin.

Penambahan protein ke dalam pengencer semen beku yang berhubungan dengan perbaikan fertilitas spermatozoa telah banyak diteliti (Bergeron *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2005; Goncalves *et al.*, 2008). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan osteopontin ke dalam pengencer semen beku terhadap ekspresi *Bcl-2* spermatozoa *postthawing*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Taman Ternak Pendidikan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, dan Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya, Malang. Rangkaian penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga Juni 2013.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Sampel penelitian dibagi menjadi empat kelompok secara acak, terdiri dari kelompok kontrol (P_0) berupa semen segar dengan penambahan OPN $0\mu\text{g}/5.10^7$ spermatozoa, kelompok perlakuan 1 (P_1) berupa semen segar dengan penambahan OPN $5\mu\text{g}/5.10^7$ spermatozoa, kelompok perlakuan 2 (P_2) berupa semen segar dengan dengan penambahan OPN $10\mu\text{g}/5.10^7$ spermatozoa, kelompok perlakuan 3 (P_3) berupa semen segar dengan dengan penambahan OPN $20\mu\text{g}/5.10^7$ spermatozoa. Konsentrasi penambahan OPN diperoleh berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan oleh Erikson (2006).

Semen sapi FH jantan ditampung menggunakan vagina buatan yang selanjutnya dilakukan pemeriksaan kualitas semen segar secara makroskopis dan mikroskopis meliputi: gerakan massa, gerakan individu, dan konsentrasi spermatozoa dengan spektrofotometer.

Bahan pengencer yang digunakan adalah susu skim dikombinasikan dengan kuning telur, ditambahkan antibiotik penicillin (dosis 1000 IU/mL) dan streptomycin (1 mg/mL). Pengencer skim kuning telur dibagi menjadi dua bagian yaitu pengencer A dan pengencer B, komposisi pengencer B adalah gliserol 16%, fruktosa 2%, dan pengencer A. Semen segar dalam tabung pengukur dimasukkan dalam gelas beker yang

berisi air, kemudian dilakukan inkubasi selama lima menit dengan penambahan osteopontin dan *phosphate buffer saline* (PBS) sesuai perlakuan (Suprayogi, 2013). Osteopontin yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari membran spermatozoa sapi FH dengan bobot molekul 58 kDa oleh Hernawati *et al.*, (2012) melalui metode elektroelusi.

Teknik imunositokimia dilakukan untuk mengetahui ekspresi protein *Bcl-2* pada spermatozoa sapi FH *postthawing* dengan menggunakan antibodi poliklonal *rabbit anti-Bcl2* (Abcam® No.Cat.ab7973). Spermatozoa yang mengekspresikan *Bcl-2* tampak adanya warna coklat kehitaman. Pengamatan ekspresi *Bcl-2* menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dan 1000x kemudian dihitung persentase sel spermatozoa yang mengekspresikan *Bcl-2* dibanding total sel spermatozoa.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji sidik ragam dan jika terdapat perbedaan pada masing-masing perlakuan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran kualitas spermatozoa sapi perah FH sebelum perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas semen segar sapi perah *friesian holstein* berdasarkan beberapa indikator beberapa indikator

Indikator	Nilai
Volume	5,5 mL1.
Konsentrasi	1.293 juta/mL
Konsistensi	Cukup kental
Warna	Putih susu
Bau	Khas
pH	6-7
Gerakan Massa	++
Motilitas Progresif	75%
Viabilitas	85%

Keterangan: Gerakan massa ++ adalah gerakan spermatozoa bersama-sama yang membentuk gelombang sedang, banyak, dan cepat.

Ekspresi *Bcl-2* spermatozoa sapi perah FH pascathawing

Gambaran pengaruh osteopontin terhadap ekspresi *Bcl-2* spermatozoa sapi perah FH pascathawing disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan persentase ekspresi *Bcl-2* spermatozoa sapi perah FH *postthawing* setelah penambahan osteopontin

Kelompok Perlakuan	Ekspresi <i>Bcl-2</i> spermatozoa (%) (- x ± SD)
P0	31,8034 ^c ± 2,32
P1	38,8575 ^{bc} ± 7,28
P2	44,2176 ^{ab} ± 5,83
P3	47,8493 ^a ± 10,58

Keterangan : Superskrip (^{a,b,c,d}) yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan (p<0,05).
 P₀, semen segar dengan penambahan OPN 0 µg/5.10⁷ spermatozoa;
 P₁, semen segar dengan penambahan OPN 5 µg/5.10⁷ spermatozoa;
 P₂, semen segar dengan dengan penambahan OPN 10 µg/5.10⁷ spermatozoa;
 P₃, semen segar dengan dengan penambahan OPN 20 µg/5.10⁷ spermatozoa.
Bcl-2 = *B-Cell Cll/Lymphoma-2*

Data ekspresi *Bcl-2* spermatozoa sapi perah FH *postthawing* ditetapkan berdasarkan persentase spermatozoa yang mengekspresikan *Bcl-2* melalui metode imunositokimia dengan menggunakan *software* Ni-S Elements BR 4.10.00; Nikon. Gambaran spermatozoa yang mengekspresikan *Bcl-2* dan yang tidak mengekspresikan *Bcl-2* disajikan pada Gambar 1.

Penelitian ini menggunakan semen segar dengan kualitas yang baik (Tabel 1.). Hasil pemeriksaan semen segar sapi perah FH secara makroskopis maupun mikroskopis memperlihatkan kualitas semen segar sesuai dengan Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku Direktorat Jenderal Peternakan.

Pada penelitian ini, hasil analisis data ekspresi *Bcl-2* spermatozoa sapi perah FH

utero tubal junction (UTJ) pada periode pre-ovulasi lebih tinggi dibanding periode post-ovulasi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekspresi *Bcl-2* dari sel epitel UTJ diduga berperan terhadap ketahanan spermatozoa selama berada di saluran oviduk sebelum terjadi ovulasi. Jeong dan Seol (2008) dan Chanapiwat *et al.*, (2011) telah membuktikan bahwa setelah *thawing* ekspresi protein keluarga *Bcl-2* menurun dibandingkan dengan spermatozoa segar. Hal tersebut mengindikasikan adanya peranan ekspresi protein *Bcl-2* terhadap ketahanan sel spermatozoa.

Osteopontin mampu melakukan inisiasi proliferasi, motilitas, dan blokade apoptosis pada berbagai jenis sel melalui reseptor integrin. Kemampuan OPN dalam menghambat kematian sel pertama kali diidentifikasi oleh Dendahrt *et al.*, (1995), kemudian diketahui bahwa OPN mampu meningkatkan ketahanan sel melalui hambatan terhadap kematian sel secara apoptosis (Scatena *et al.*, 1998).

SIMPULAN

Simpulan dari penelitian ini yaitu penambahan osteopontin dalam pengencer semen beku mampu meningkatkan ekspresi *Bcl-2* spermatozoa sapi perah Friesian Holstein *postthawing*. Konsentrasi penambahan OPN yang digunakan dalam kelompok P₂ menunjukkan efek osteopontin yang mampu meningkatkan ekspresi *Bcl-2* spermatozoa sapi perah FH *postthawing*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terimakasih kepada staf Taman Ternak Pendidikan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga; Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya, Malang.

DAFTAR PUSTAKA

- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP. 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *Bio Reprod* 66: 354–360.
- Bergeron A, Vandenberg G, Proulx D, Bailey JL. 2002. Comparison of Extenders, Dilution Ratios and Theophylline Addition on the Function of Cryopreserved Walleye Semen. *Theriogenology* 57(3): 1061-1071.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ. 1997. Osteopontin is the 55-Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. *Bio Reprod* 57: 1293-1301.
- Cancel AM. 1999. Osteopontin Localization in the Holstein Bull Reproductive Tract. *Bio Reprod* 60: 454–460.
- Chanapiwat PRP, Gyu-Jin, Tummaruk, Kaeoket K. 2011. Sperm parameters and gene expression of boar spermatozoa following cooling and freezing process. Proceedings of the 5th Asian Pig Veterinary Society Congress 7-9 March 2011, Pattaya, Thailand.
- Denhardt DTP, Lopez CA, Rollo EE, Hwang SM, An XR, Walther SE. 1995. Osteopontin-induced Modifications of Cellular Functions. *Ann NY Acad Sci* 760: 127-142.
- Erikson DW, Chapman DA, Ealy A, Killian GJ. 2003. Immunodetection of Osteopontin on Holstein bull Sperm and α_v and α_5 Integrins on Bovine Oocytes. *Bio Reprod* 68(Suppl. 1): 575.
- Erikson DW. 2006. Role of Osteopontin in Bovine Sperm Capacitation and Fertilization [Dissertation]. Pennsylvania. The Pennsylvania State University.
- Goncalves RF, Chapman DA, Bertolla RP, Eder I, Killian GJ. 2008. Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects in vitro fertilization and embryo development (abstract). *Anim Reprod Sci* 108(3-4): 375-83.
- Hernawati T, Samik A, Suprayogi T W. 2012. Perbaikan Mutu Semen Beku Sapi Perah Friesian Holstein melalui Penambahan Osteopontin dalam Media Pembekuan [Laporan Riset Unggulan Perguruan Tinggi Dikti]. Surabaya. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.
- Ivanova-Kicheva, D, Dimitrov A, Nikolov I, Daskalova D, Peltrov M. 2005. Analysis of Plasma Membrane Integrity by Using of Fluorescein Labeled Annexin V And Its Relationship to Motility and Viability of Ram Sperm after Cryopreservation. *Journal Central European Agriculture* 6(3): 331-336.

- Jeong SY, Seol D W. 2008. The Role of Mitochondria in Apoptosis. BMB Report. <http://bmbreports.org>.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. 1993. Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. *Bio Reprod* 49: 1202-1207.
- Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Hong GW, Reed JC. 1994. Immunohistochemical Determination of In Vivo Distribution of Bax, a Dominant Inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 145(6): 1323-1336.
- Kuwana T, Newmeyer DD. 2003. Bcl-2-family Proteins and The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 691-699.
- Moura AA. 2005. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull The case for osteopontin. *Anim Reprod* 2(1): 3-10.
- Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ. 2006. Proteins of the Cauda Epididymal Fluid Associated With Fertility of Mature Dairy Bulls. *J Androl* 27(4):
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander H J, Agarwal A. 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Bio Reprod* 71: 1828-1837.
- Reed JC. 2000. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol* 157: 1415-1430.
- Saile B, Matthes N, El Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. 2001. The bcl, NFkB and p53/p21WAF1 Systems are Involved in Spontaneous Apoptosis and in the Anti-Apoptotic Effect of TGF- β or TNF- α on Activated Hepatic Stellate Cells. *European Journal of Cell Biology* 80: 554-561.
- Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicossia RF, and Giachelli CM. 1998. NF κ B Mediates α_3 Integrin-Induced Endothelial Cell Survival. *J Cell Biol* 141: 1083-1093.
- Sonenshein G E. 1997. Rel/NF-kappa B Transcription Factors and the Control of Apoptosis. *Semin Cancer Biol*, 8:113-119.
- Suprayogi TW. 2013. Potensi *Fertility Associated Antigen* (FAA) Plasma Seminalis Sapi Pejantan dalam Menambah Peningkatan Kesuburan Semen Beku Sapi Simental. [Disertasi]. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Tienthai P. 2005. An Immunohistochemical Study of Anti-Apoptotic Bcl-2 in the Pig's Oviduct during the Oestrous Cycle. *Thai J Vet Med* 35(4): 31.
- Weber GF, Asshkar S, Glimcher MJ, Cantor H. 1996. Receptor-Ligand Interaction Between CD44 and Osteopontin (Eta-1). *Science* 271: 509-512.
- Xiaojian T, Jianfang L, Beiqin Y, Liping S, Yingyan Y, Min Y, Bingya L, Zhenggang Z. 2013. Osteopontin Splice Variants Differentially Exert Clinicopathological Features and Biological Functions in Gastric Cancer. *Int J Biol Sci* 9(1): 55-66.
- Zhao J, Dong L, Lu B, Wu G, Xu D, Chen J, Li K, Tong X, Dai J, Yao S, Wu M, Guo Y. 2008. Down-Regulation of Osteopontin Suppresses Growth and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma via Induction of Apoptosis. *Gastroenterology* 135: 956-968.