

Potensi Alfa Enolase (ENO₁) Membran Plasma Spermatozoa Sapi Bali Sebagai Protein Antigenik

(Bali Bull Spermatozoa Plasma Membrane Alpha Enolase Potential as an Antigenic Protein)

Teguh Sumarsono^{1*}, Bambang Purwantara², Iman Supriatna², Mohamad Agus Setiadi², Muhammad Agil²

¹Program Doktor Pascasarjana IPB University

²Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University

*Penulis untuk korespondensi: teguh.sumarsono@unja.ac.id

Diterima 23 Juli 2022, Disetujui 23 Oktober 2022

ABSTRAK

Antibodi imunoglobulin G (IgG) merupakan salah satu imunoglobulin yang dikandung oleh antibodi anti-sperma (ASA) yang terdapat pada saluran reproduksi betina. Imunoglobulin G dapat berikatan dengan protein-protein yang berpotensi sebagai protein antigenik seperti alfa enolase (ENO₁). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dinamika dan potensi ENO₁ membran plasma spermatozoa sebagai protein antigenik serta kualitas spermatozoa sapi Bali dengan perlakuan 0,5 mg/ml IgG. Sampel penelitian adalah 16 ejakulat yang diperoleh dari 4 ekor pejantan. Motilitas spermatozoa dievaluasi menggunakan CASA, viabilitas melalui metode pewarnaan diferensial, Keutuhan Membran Plasma (MPU) menggunakan metode *Hypo-osmotic Swelling Test* (HOS-Test), nilai *Mix Anti-globulin Reaction* (MAR) diperoleh dari MAR-Test, sedangkan kuantitas ENO₁ diukur dengan ELISA. Analisis data menggunakan analisis ragam RAK. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan dengan IgG sampai 0,5 mg/ml menurunkan motilitas, kinematika spermatozoa, viabilitas, MPU dan kuantitas ENO₁ membran plasma spermatozoa ($P < 0,01$), serta meningkatkan nilai MAR-test ($P < 0,05$). Penelitian menyimpulkan bahwa IgG dapat menurunkan kualitas spermatozoa dan kuantitas ENO₁, sekaligus menunjukkan bahwa ENO₁ membran plasma spermatozoa sapi Bali berpotensi sebagai protein antigenik.

Kata kunci: ASA, ENO₁, IgG, kualitas spermatozoa, nilai MAR

ABSTRACT

Immunoglobulin G (IgG) is one of the immunoglobulins included in the anti-sperm antibodies (ASA) present in the female reproductive tract. Immunoglobulin G can bind to proteins that have the potential to act as antigenic proteins such as alpha enolase (ENO₁). The aim of this study is to determine the dynamics and potential of spermatozoa plasma membrane ENO₁ as an antigenic protein and the quality of Bali bull spermatozoa with 0.5 mg/ml IgG treatment. The research sample consisted of 16 ejaculates obtained from 4 bulls. Spermatozoa motility was measured by CASA, spermatozoa viability by differential staining method, plasma membrane integrity (PMI) by the *Hypo-osmotic Swelling Test* (HOS-Test) method, *Mix Anti-globulin Reaction* (MAR) values obtained from MAR-Test, while the quantity of ENO₁ was measured by ELISA. Data analysis was performed by RCBD analysis of variance. The results showed that treatment with IgG up to 0.5 mg/ml decreased motility, spermatozoa kinematics, viability, PMI and ENO₁ quantity of spermatozoa plasma membrane ($P < 0.01$), and increased the MAR-test value ($P < 0.05$). Thus it can be concluded that IgG can decrease spermatozoa quality and quantity of spermatozoa plasma membrane ENO₁, and plasma membrane ENO₁ of Bali cattle spermatozoa is potential as an antigenic protein.

Keywords: ASA, ENO₁, IgG, MAR value, spermatozoa quality

PENDAHULUAN

Kegagalan reproduksi dan infertilitas selain disebabkan oleh kematian embrio dini serta kegagalan implantasi, juga dapat disebabkan karena kegagalan fertilisasi. Proses fertilisasi dapat terganggu apabila terjadi penurunan kapasitas spermatozoa yang diakibatkan reaksi imunologis karena spermatozoa dianggap sebagai antigen. Keberadaan spermatozoa menurut Marey *et al.*, (2014) dapat menjadi pemicu reaksi imunologis dalam bentuk peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi yang mengakibatkan pemasukan neutrofil polimorfonuklear (PMN) ke dalam lumen saluran reproduksi wanita. Neutrofil polimorfonuklear diketahui merupakan pembersih spermatozoa yang motil dan tidak motil (Li & Funahashi, 2010), juga menyebabkan pengaktifan sel-sel fagosit yang dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa sebagai akibat dari peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (Fair & Lonergan, 2018).

Penurunan kapasitas spermatozoa selain itu, juga dapat disebabkan keberadaan ASA) yang dihasilkan oleh saluran reproduksi hewan betina. Rossato *et al.*, (2004) melaporkan bahwa diproduksinya ASA merupakan respon terhadap antigen yang terdapat pada spermatozoa. ASA lebih lanjut dilaporkan dapat menyebabkan peningkatan kematian spermatozoa di saluran reproduksi betina. Protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa telah diketahui dapat berikatan dengan ASA yang terdapat pada saluran reproduksi hewan betina (Nowicka-Bauer *et al.*, 2016). Pengikatan protein membran spermatozoa oleh ASA dapat mengganggu fungsi spermatozoa termasuk penghambatan motilitas dan viabilitas Spermatozoa (Marey *et al.*, 2016). ASA menurut Vazquez-Levin *et al.*, (2014) akan menghambat reaksi akrosom dan penyatuan spermatozoa dengan oosit. Imunitas terhadap spermatozoa dapat disebabkan adanya ASA (Bronson *et al.*, 1984). Antibodi anti-spermatozoa telah terbukti dapat menurunkan motilitas spermatozoa (Menge & Beitner 1989). Chao (2011) lebih lanjut melaporkan bahwa ASA dapat memengaruhi parameter kualitas semen. Immunoglobulin G merupakan salah satu tipe immunoglobulin yang terkandung dalam ASA (Sinisi *et al.*, 2003) dan berpengaruh negatif terhadap fertilitas spermatozoa manusia (Cui *et al.*, 2015). Gangguan terhadap spermatozoa yang diakibatkan oleh immunoglobulin adalah berupa aglutinasi, imobilisasi dan menghambat proses-proses yang harus dilewati untuk fertilisasi normal (Helene *et al.*, 2017). Srivastava *et al.*, (2016) melaporkan bahwa ASA ditemukan pada 61% sapi yang mengalami kawin berulang (*repeat breeding*).

Alfa enolase adalah salah satu isoform enolase

yang ditemukan pada sel eukariot (Verma & Dutta, 1994). Alfa enolase adalah protein dengan berat molekul 47 kDa dan berperan dalam metabolisme energi (Somashekar *et al.*, 2017), berstruktur dimer yang terdiri atas dua subunit (alfa, beta atau gamma) baik secara berhadapan atau antiparalel (Kato *et al.*, 1983). ENO1 spermatozoa rusa liar Sika (*Sika wild deer*) telah diketahui merupakan salah satu protein yang reaktif terhadap ASA (Kawase & Jimbo, 2018).

IgG berpeluang dapat berikatan dengan ENO1 membran plasma spermatozoa karena telah diketahui bahwa molekul ENO1 memiliki area yang dapat diikat oleh antibodi (epitop). Menurut Pietkiewicz *et al.* (2018), pada molekul α -enolase manusia terdapat bagian yang dapat diikat oleh anti-ENO1 yakni di bagian terminal C dari epitop tiga. Berdasarkan hal tersebut perlu dikaji apakah IgG dapat berikatan dengan ENO1 yang terdapat pada membran plasma spermatozoa sapi bali dan apakah pengikatan ENO1 dengan IgG akan berdampak kepada kualitas spermatozoa sapi bali.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Maret 2021 bertempat di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari, Malang dan Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR), Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Seluruh prosedur dalam penggunaan hewan pada penelitian ini telah memperoleh persetujuan dari Komisi Etik Hewan, IPB dengan nomor sertifikat: 002/KEH/SKE/I/2021

Bahan dan alat

Semen yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil penampungan dari pejantan yang dipelihara di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari, Malang. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 16 ejakulat. Larutan PBS (*Dulbeccos's, Sigma Life Science, USA*) digunakan sebagai pengencer dan pencuci. Bahan perlakuan berupa *bovine IgG (MyBioSource, USA)*. Bahan lain yang digunakan adalah Pewarna Eosin-Nigrosin, larutan *Hipo-osmotic Reaction (HOS)*, kit IgG-SperMar TEST (*FertiPro, Belgium*) dan kit ELISA *bovine Alpha Enolase (MyBioSource, USA)*.

Peralatan yang dipergunakan dalam pengukuran kualitas spermatozoa meliputi mikroskop cahaya (Olympus CX41) untuk pengukuran viabilitas, keutuhan membran plasma (MPU) dan nilai *Mix Anti-globulin*

Reaction (MAR), Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) untuk pengukuran motilitas, kinematika spermatozoa dan abnormalitas, photometer (SDM 6) untuk pengukuran konsentrasi dan ELISA reader beserta kelengkapannya untuk mengukur kuantitas ENO₁. Proses preparasi menggunakan peralatan berupa sentrifus, *waterbath*, pipet mikro dan tabung mikro

Penampungan semen dan pemeriksaan kualitas awal

Semen/ejakulat sampel penelitian ditampung dengan menggunakan vagina buatan (Kanesharatnam *et al.* 2012). Pemeriksaan secara makroskopis yang meliputi volume, warna, konsistensi dan pH dilakukan setelah semen ditampung. Pemeriksaan/pengukuran kualitas awal spermatozoa secara mikroskopis meliputi motilitas, abnormalitas, viabilitas, abnormalitas dan konsentrasi spermatozoa.

Perlakuan IgG

Spermatozoa sebelum diperlakukan, terlebih dahulu dilakukan pencucian terhadap ejakulat. Pencucian dilakukan dengan cara menambahkan larutan PBS (pengenceran) dan sentrifugasi. Ejakulat diencerkan 4 kali dari volume awal, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 500xg selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan sedimen diencerkan kembali dengan PBS. Setelah 4 kali pencucian, volume dikembalikan ke volume awal. Ejakulat setelah pencucian, ejakulat ditambahkan 0,5 mg/ml IgG (Suri *et al.*, 1986)

Pengukuran motilitas, viabilitas, integritas membran plasma dan nilai MAR

Pengukuran motilitas progresif, kinematika spermatozoa (VCL: *curvilinear velocity*, VSL: *stright line velocity*, VAP: *average path velocity*, ALH: *lateral head displacement*, BCF: *beat-cross frequency*) dan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan CASA The Hamilton Thorne IVOS II ver. 12.1. Viabilitas dievaluasi dengan metode pewarnaan diferensial eosin-nigrosin (Agarwal *et al.* 2016), sedangkan keutuhan membran plasma (MPU) diukur dengan metode HOS-Test (Ramu dan Jeyendran 2012). Nilai MAR ditentukan dengan menggunakan prosedur yang disertakan pada kit IgG-SperMar TEST.

Pengukuran kuantitas ENO₁

Pengukuran kuantitas ENO₁ dilakukan terhadap semen segar maupun semen yang telah diperlakukan

dengan IgG. Proses preparasi pertama adalah proses pencucian dan pengenceran kembali untuk memperoleh spermatozoa yang bebas dari plasma semen dengan konsentrasi tertentu. Pencucian ejakulat segar maupun hasil perlakuan dilakukan menggunakan larutan PBS. Larutan PBS yang ditambahkan untuk pencucian adalah sebanyak 3 kali dari volume awal, sehingga diperoleh semen dengan tingkat pengenceran 4 kali. Semen yang telah diencerkan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 500xg selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pellet diencerkan kembali sampai diperoleh semen dengan konsentrasi 1×10^6 spermatozoa/ml. Proses pencucian dilakukan 4 kali. Prosedur pencucian mengikuti petunjuk dari Tripathi *et al.*, (1999). Semen hasil proses preparasi kemudian dibekukan pada temperatur -20°C untuk kepentingan transportasi. Preparasi kedua adalah penyiapan ejakulat hasil preparasi pertama untuk dapat diukur kandungan ENO₁ nya. Prosedur preparasi kedua mengikuti protokol yang telah disertakan di dalam kit ELISA *bovine alpha enolase*.

Preparasi kedua setelah selesai, selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi untuk menentukan kandungan ENO₁ dari ejakulat. Pembacaan absorbansi dilakukan dengan menggunakan ELISA Reader (Biotek, Software Gen5) pada panjang gelombang 450 nm.

Rancangan percobaan dan analisis data

Desain percobaan dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 perlakuan IgG x 16 kelompok. Pengaruh IgG terhadap kualitas spermatozoa dan kuantitas ENO₁ membran plasma spermatozoa dianalisis dengan menggunakan sidik ragam Rancangan Acak Kelompok (RAK) dan dilanjutkan dengan Uji jarak berganda Duncan apabila perlakuan memberikan pengaruh yang nyata (Steel & Torrie, 1995).

HASIL

Kualitas semen/ejakulat segar

Pejantan yang dijadikan sumber semen harus dapat menghasilkan semen dengan kualitas yang layak untuk diinseminasikan atau diolah menjadi semen cair atau semen beku. Hasil evaluasi terhadap kualitas semen dapat dinyatakan bahwa semen yang dihasilkan pejantan sapi bali terkategori baik. Kualitas semen segar pada penelitian ini, merupakan indikator untuk memastikan bahwa apabila terjadi perubahan kualitas akibat perlakuan, maka perubahan kualitas yang terjadi benar-benar disebabkan oleh perlakuan dan bukan disebabkan karena kualitas ejakulat yang

buruk atau pejantan yang tidak layak untuk dijadikan sumber semen. Kualitas semen/ejakulat awal sampel penelitian ini tersaji pada Tabel 1.

Kualitas spermatozoa dan kuantitas ENO1 dengan perlakuan IgG

Keberadaan protein pada permukaan membran plasma spermatozoa termasuk ENO1, diduga akan dapat diikat oleh antibodi dan akan berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa. Kuantitas ENO1 yang diukur bukan merupakan ENO1 intraselular, melainkan ENO1 yang terdapat pada membran plasma spermatozoa, karena tidak dilakukan destruksi spermatozoa. Hasil pemeriksaan motilitas progresif, viabilitas, MPU, nilai mix anti globulin reaction test (MAR) dan kuantitas ENO1 terhadap semen yang diberi perlakuan dengan IgG tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan perlakuan dengan 0,5 mg/ml IgG sangat nyata menurunkan motilitas, viabilitas dan MPU spermatozoa sapi bali ($P < 0,01$). Hasil pengukuran nilai MAR-tes menunjukkan bahwa perlakuan 0,5 mg/ml IgG nyata meningkatkan nilai MAR ($P < 0,05$).

ENO1 berdasarkan hasil penelitian terbukti dapat diikat oleh IgG. Tabel 2 dan Gambar 1 menunjukkan perlakuan IgG sangat nyata menurunkan kuantitas ENO1. Grafik kuantitas ENO1 dengan perlakuan IgG dapat dilihat pada Gambar 1.

Kinematika spermatozoa dengan perlakuan IgG

Kinematika spermatozoa menurut Gallagher *et al.*, (2019) adalah dinamika pergerakan kepala spermatozoa sewaktu melakukan pergerakan pada lintasan yang dibuatnya. CASA akan mengukur parameter kecepatan gerak, rasio kecepatan dan karakteristik ayunan spermatozoa. Soler *et al.*, (2017) mengemukakan bahwa dari delapan parameter kinematika spermatozoa yang dihasilkan CASA, lima parameter (VCL, VSL, VAP, ALH dan BCF) merupakan parameter utama, sedangkan tiga parameter lain (LIN, STR dan WOB) adalah ukuran rasio dari parameter-parameter utama. Pengukuran kinematika spermatozoa berguna untuk prediksi fertilitas spermatozoa, karena keberhasilan proses fertilisasi ditentukan oleh kecepatan dan bentuk pergerakan dari spermatozoa. Menurut Maylem *et al.*, (2018) parameter kinematika spermatozoa akan memberikan gambaran objektif tentang motilitas yang merupakan indikator kualitas utama dan sangat menentukan fertilitas spermatozoa. Perlakuan terhadap semen

(penambahan bahan pengencer, pendinginan dan pembekuan) telah diketahui dapat mengubah kinematika spermatozoa. Lima parameter utama kinematika spermatozoa sapi bali dengan perlakuan IgG tersaji pada Tabel 3.

Hasil analisis ragam terhadap 5 parameter utama kinematika spermatozoa sapi bali dengan perlakuan IgG menunjukkan terjadinya perubahan kinematika motilitas yang sangat nyata pada VSL, VAP dan BCF ($P < 0,01$; Tabel 3). Perubahan yang nyata terjadi pada VCL ($P < 0,05$; Tabel 3) serta tidak terjadi perubahan pada ALH ($P > 0,05$; Tabel 3).

PEMBAHASAN

Kualitas semen segar sapi bali berumur 5-6 tahun yang dilaporkan oleh Ratnawati *et al.* (2020) adalah: volume sebesar 4,6 ml, pH 6,7, konsentrasi spermatozoa 828×10^6 /ml, motilitas total 85,1% dan motilitas progresif 68,4%. Prastowo *et al.* (2018) melaporkan volume semen sapi bali berkisar antara 4,55 - 5,18 ml, pH 6,51 - 6,52, konsentrasi spermatozoa $962,30 - 1079 \times 10^6$ /ml, motilitas spermatozoa 66,4 - 58% dan abnormalitas 4,59 - 5,17%. Kualitas semen hasil penelitian ini (Tabel 1), kualitas semen/ejakulat segar sampel penelitian tidak berbeda jauh dengan dua peneliti terdahulu. Perbedaan yang terjadi diduga lebih disebabkan oleh variasi individu. Menurut Lemma dan Shemsu (2015) kualitas semen segar yang dihasilkan dari setiap individu pejantan dapat bervariasi.

Indikator kualitas spermatozoa terpenting adalah motilitas, karena agar dapat mencapai lokasi fertilisasi dan melakukan penetrasi oosit spermatozoa sangat bergantung kepada motilitas (Dcunha *et al.*, 2022). Penurunan motilitas spermatozoa dengan perlakuan 0,5 mg/ml IgG dapat terjadi karena ikatan IgG dengan protein membran plasma menyebabkan aglutinasi sehingga pergerakan spermatozoa terganggu. Dugaan lain adalah terjadi gangguan terhadap aktivitas ENO1 yang terdapat pada membran plasma dalam fisiologi pergerakan filamen ekor spermatozoa, sehingga motilitas terganggu. Hal ini didukung oleh fakta terjadinya penurunan kuantitas ENO1 akibat perlakuan IgG. Menurut Wahyuningsih (2013) aglutinasi dan penurunan motilitas spermatozoa merupakan akibat dari reaksi antara protein antigenik yang terdapat pada permukaan membran plasma spermatozoa dengan antibodi. Pengikatan protein membran plasma menyebabkan penurunan konsentrasi ion kalsium intraselular (Rossato *et al.*, 2004).

Viabilitas dapat dijadikan indikator apakah suatu

Tabel 1. Kualitas semen/ejakulat segar

Pejantan	n	Volume (ml)	pH	Konsentrasi (10 ⁶ /ml)	Motilitas		Abnormalitas (%)
					TM	PM	
I	4	4,30	6,7	1079,50	89,50	77,50	5,30
II	4	6,55	6,6	727,50	85,58	82,93	2,35
III	4	4,63	6,6	1058,50	90,60	89,40	6,63
V	4	5,48	6,5	1122,75	87,30	71,00	7,00
		5,24	6,6	1047,06	88,20	80,26	5,32

Keterangan : TM : Motilitas Total PM : Motilitas progresif

Tabel 2. Kualitas spermatozoa dan kuantitas alfa enolase dengan perlakuan IgG

Indikator	Perlakuan IgG (mg/ml)	
	0	0,5
Motilitas progresif (%)	76,26 ^A	62,76 ^B
Viabilitas (%)	79,64 ^A	76,45 ^B
Integritas membran plasma (MPU) (%)	84,21 ^A	80,08 ^B
Nilai Mix Anti Globulin Reaction Test (MAR) (%)	6,92 ^a	8,74 ^b
Kuantitas ENO1 (ng/1x10 ⁶ spermatozoa)	1,59 ^A	0,14 ^B

Keterangan : - Superskrip huruf kapital yang berbeda menunjukkan perbedaan sangat nyata (P<0,01)

- Superskrip huruf kecil yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

Tabel 3. Kinematika spermatozoa dengan perlakuan IgG

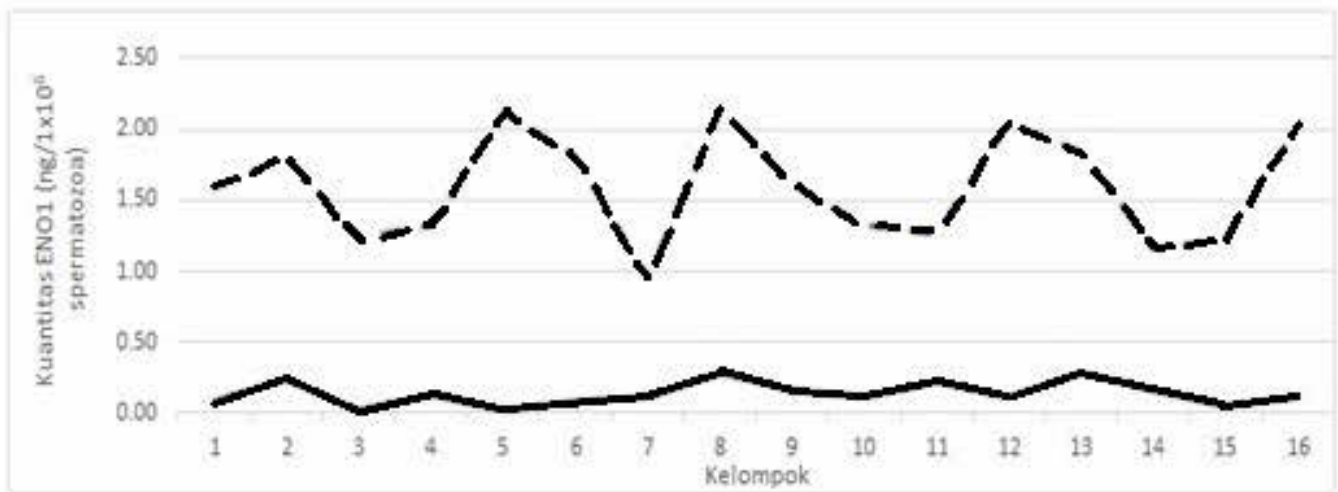
Parameter kinematika motilitas	Perlakuan IgG (mg/ml)	
	0	0,5
VCL (µm/s)	190,40 ^a	157,53 ^b
VSL (µm/s)	116,68 ^A	82,69 ^B
VAP (µm/s)	123,43 ^A	95,11 ^B
ALH (µm)	6,08 ^a	5,88 ^a
BCF (Hz)	32,54 ^A	22,83 ^B

Keterangan : - VCL : curvilinear velocity; VSL: stright line velocity; VAP: average path velocity; ALH: lateral head displacement; BCF: beat-cross frequency

- Superskrip huruf kapital yang berbeda menunjukkan perbedaan sangat nyata (P<0,01)

- Superskrip huruf kecil yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

- Superskrip huruf kecil yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan (P>0,05)



Keterangan : - - - - perlakuan IgG 0 mg/ml; ——— perlakuan IgG 0,5 mg/ml

Gambar 1 Grafik Kuantitas ENO1 dengan perlakuan IgG

substansi termasuk antibodi memiliki efek toksik terhadap spermatozoa. Viabilitas spermatozoa mengalami penurunan dengan perlakuan 0,5 mg/ml IgG (Tabel 2). Fakta ini mengindikasikan bahwa IgG dapat bersifat toksik bagi spermatozoa. Menurut Helene *et al.*, (2017) ASA yang mengandung IgG dapat menyebabkan aglutinasi dan immobilisasi spermatozoa dan memiliki efek sitotoksik bagi spermatozoa manusia.

Agar tetap hidup dan motil, spermatozoa harus memiliki membran yang utuh, karena proses fisiologis spermatozoa yang terkait dengan viabilitas dan motilitas sangat bergantung kepada integritas membran plasma. Pada membran plasma spermatozoa terdapat protein-protein yang berperan dalam menentukan fertilitas spermatozoa, namun berpotensi sebagai protein antigenik (Young, 2016). Kenyataan bahwa akibat perlakuan 0,5 mg/ml IgG menyebabkan penurunan integritas membran plasma (MPU) (Tabel 2) membuktikan bahwa ikatan antara IgG dengan protein membran plasma spermatozoa termasuk ENO1 menyebabkan kestabilan dan sifat fisik membran plasma spermatozoa terganggu. Pujiyanto *et al.*, (2018) melaporkan bahwa ikatan antara antibodi dengan protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa manusia akan menyebabkan modifikasi membran plasma dan mengubah permeabilitas membran plasma.

Peningkatan nilai MAR-tes akibat perlakuan 0,5 mg/ml IgG (Tabel 2) membuktikan terjadinya ikatan antara protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa dengan IgG. Menurut Wahyuningsih (2013), protein-protein membran plasma spermatozoa kelinci dengan berat molekul 46, 66 dan 73 kDa, dapat berikatan dengan antibodi.

Berdasarkan Tabel 2 dan Gambar 1 dapat dibuktikan bahwa ENO1 merupakan protein antigenik. Kondisi ini dapat terjadi karena IgG yang ditambahkan berikatan dengan epitop yang ada pada molekul ENO1. Lebioda dan Stec (1991) melaporkan bahwa variable region dari ENO1 dapat berperan sebagai epitop.

Perubahan kinematika motilitas akibat perlakuan 0,5 mg/ml IgG (Tabel 3) dapat terjadi karena pengikatan IgG pada protein-protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa menyebabkan aglutinasi, lisisnya membran plasma dan peningkatan bobot spermatozoa, sehingga terjadi penurunan motilitas sekaligus merubah pola pergerakan spermatozoa. Penurunan motilitas dan perubahan pola pergerakan spermatozoa diduga akan berpengaruh negatif terhadap fertilitas spermatozoa yang pada gilirannya akan memengaruhi fertilitas pejanan. Menurut Veron *et al.*, (2016) ASA dapat menyebabkan aglutinasi dan lisisnya membran plasma spermatozoa. Lebih lanjut dilaporkan bahwa ASA dapat menjadi penyebab penurunan motilitas progresif dan perubahan kinematika motilitas spermatozoa. Fertilitas pejanan berkorelasi dengan parameter kinematika motilitas (Farrel *et al.*, 1998)

Dapat disimpulkan bahwa IgG dapat menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa dan kuantitas ENO1 sekaligus menunjukkan bahwa alfa enolase membran plasma spermatozoa sapi Bali berpotensi sebagai protein antigenik.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. 2016. *Andrological Evaluation of Male Infertility : Eosin-Nigrosin staining procedure*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D. 1984. Sperm antibodies: Their role in infertility. *Fertil. Steril.* 42 (2): 171–183.
- Chao D. 2011. Discuss the seminal plasma antisperm antibody, and the association between semen parameters and sperm morphology. *Asia Pac. Tradit. Med.* 7: 104–105.
- Cui D, Han G, Shang Y, Liu C, Xia L, Li L. 2015. Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 444: 29–36.
- Dcunha R, Hussein RS, Ananda H, Kumari S, Adiga SK, Kannan N, Zhao Y, Kalthur G. 2022. Current insights and latest updates in sperm motility and associated applications in assisted reproduction. *Reprod. Sci.* 29: 7–25.
- Fair S, Lonergan P. 2018. Understanding the causes of variation in reproductive wastage among bulls (Review). *Animal:* 1–10.
- Gallagher MT, Cupples G, Ooi EH, Kirkman-Brown JC, Smith DJ. 2019. Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Hum. Reprod.* 34: 1173–1185
- Helene L, Toky RR, Joffrey M, Marc G. 2017. Effect of sperm treatment on the Anti-sperm antibodies IgG and IgA. *Int. J. Immunol.* 5(3): 49–52.
- Juliana A, Hartono M, Suharyati S. 2015. Repeat breeder pada sapi Bali di Kabupaten Pringsewu. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu* 3(2): 42–47.
- Kanesharatnam N, Eswaramohan T, Balasubaramaniam K. 2012. Fractionation of X and Y chromosome-bearing bovine spermatozoa through sugar gradients for sex predetermination in dairy cattle. *Int J Biosci Biochem Bioinforma* 2(3): 203–206.
- Kato K, Okagawa Y, Suzuki F, Shimizu A, Mokuno K, Takahashi Y. 1983. Immunoassay of human muscle enolase subunit in serum: a novel marker antigen for muscle diseases. *Clinica Chimica Acta.* 131 (1–2): 75–85.
- Lebioda L, Stec B. 1991. Mapping of isozymic differences in enolase. *Int. J. Biol. Macromol.* 13: 97–100.
- Lemma A, Shemsu T. 2015. Effect of age and breed on semen quality and breeding soundness evaluation of pre-service young bulls. *J Reprod Infertility.* 6: 35–40.
- Li JC, Funahashi H. 2010. Effect of blood serum, caffeine and heparin on in vitro phagocytosis of frozen-thawed bull sperm by neutrophils derived from the peripheral blood of cows. *Theriogenology* 74: 691–698
- Marey MA, Liu J, Kowsar R, Haneda S, Matsui M, Sasaki M, Takashi S, Hayakawa H, Wijayagunawardane MP, Hussein FM, Miyamoto A. 2014. Bovine oviduct epithelial cells downregulate phagocytosis of sperm by neutrophils: prostaglandin E₂ as a major physiological regulator. *Reproduction* 147: 211–219.
- Maylem ER, Aquino FP, Ocampo LC, Atabay EP, Atabay EC. 2018. The use of computer assisted sperm analyzer in evaluating the sperm kinematics of fresh and frozen thawed buffalo semen. *Philipp J Vet Anim Sci.* 44 (1): 42–50
- Marey MA, Yousef MS, Kowsar R, Hambruch N, Shimizu T, Pfarrer C. 2016. Local immune system in oviduct physiology and pathophysiology: attack or tolerance? *Domest Anim Endocrinol.* 56: 204–211.
- Menge AC, Beitner O. 1989. Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil. Steril.* 51: 486–492.
- Nowicka-Bauer K, Kamieniczna M, Cibulka J, Ulcova-Gallova Z, Kurpisz M. 2016. Proteomic identification of sperm antigens using serum samples from individuals with and without antisperm antibodies. *Andrologia.* 48: 693–701.
- Pancholi V. 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 902–920
- Pietkiewicz J, Danielewicz R, Iwona S. Bednarz-Misa, Ceremuga I, Wiśniewski J, Mierzchala-Pasierb M, Bronowicka-Szydełko A, Ziomek E, Gamian A. 2018. Experimental and bioinformatic approach to identifying antigenic epitopes T in human α - and β -enolases. *Biochemistry and Biophysics Reports:* 15: 25–32.
- Prastowo S, Dharmawan P, Nugroho T, Bachtar A, Lutojo, Pramono A. 2018. Kualitas semen segar sapi Bali (*Bos javanicus*) pada kelompok umur yang berbeda. *Jurnal Ilmu Ternak* 18(1):1–7.
- Pujianto DA, Hajizah, Mansur IG, Amarudin. 2018. Antisperm antibodies disrupt plasma membrane integrity and inhibit tyrosine phosphorylation in human spermatozoa. *Med J Indones.* 27(1): 3–11.
- Ramu S, Jayendran RS. 2012. The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity. *Methods Mol Biol.* 927: 21–5.
- Ratnawati D, Antari R, Pamungkas D. 2020. Profil kualitas semen sapi Bali pada berbagai tingkat umur. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner Virtual.* Bogor, Indonesia 26–27 Oktober 2020 hlm. 105–112.
- Rossato M, Galeazzi C, Ferigo M, Foresta C. 2004. Antisperm antibodies modify plasma membrane functional integrity and inhibit osmosensitive

- calcium influx in human sperm. *Hum. Reprod.* 19(8): 1816–1820.
- Sinisi AA, Di Finizio B, Pasquali D, Scurini C, D'Apuzzo A, Bellastella A. 2003. Prevalence of antisperm antibodies by SpermMAR test in subjects undergoing a routine sperm analysis for infertility. *Int J Androl* 16: 311–314.
- Soler C, Valverde A, Bompard D. 2017. New methods of semen analysis by casa. *Sel'skokhozyaistvennaya Biol. Agricultural Biol.* 52: 232–241.
- Somashekar L, Selvaraju S, Parthipan S, Patil SK, Binsila BK, Venkataswamy MM, Bhat SK, Ravindra JP. 2017. Comparative sperm protein profiling in bulls differing in fertility and identification of phosphatidylethanolamine-binding protein 4, a potential fertility marker. *Andrology* 5: 1032–1051.
- Steel RG, Torrie JH. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistik*. Penerjemah Bambang. Sumantri. Gramedia Pustaka, Jakarta.
- Suri AK, Guerin B, Thibier M. 1986. Effect of infection of the genital tract on the concentration of IgG and albumin in bull serum and bull semen. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 13: 273–278.
- Tripathi D, Sharma NC, Singh SK, Gupta LK. 1999. Identification of bovine sperm specific polypeptides reactive with antisperm antibodies. *Indian J. Experimet Biol.* 37: 655–661.
- Vazquez-Levin MH, Marín-Briggiler CI, Veaute C. 2014. Antisperm antibodies: invaluable tools toward the identification of sperm proteins involved in fertilization. *Am J Reprod Immunol.* 72: 206–218.
- Verma M, Dutta SK. 1994. DNA sequences encoding enolase are remarkably conserved from yeast to mammals. *Life Sci.* 55: 893.
- Veron GL, Molina RI, Tissera AD, Estofan GM, Marin-Briggiler CI, Vasquez-Levin MH. 2016. Incidence of sperm surface autoantibodies and relationship with routine semen parameters and sperm Kinematics. *Am. J. Reprod. Immunol.* 76: 59–69.
- Wahyuningsih SPA. 2013. Agglutination of mice sperm in antibody of 46, 66, and 73 KDa protein from rabbit sperm membrane. *Procidings 4th ICOWOBAS-RAFSS 2013, Johor Bahru, Malaysia, 3–5 September 2013.*
- Young SL. 2016. Introduction: Reproductive immunology: Checkered past and bright future. *Fertil. Steril.* 106(3): 497–498.